

MAŁGORZATA ROBAK, KLAUDIA SZCZEPAŃSKA,
MAGDALENA RAKICKA-PUSTUŁKA, MAŁGORZATA SEROWIK,
ADAM FIGIEL

BIOSYNTETA I SUSZENIE ROZPYŁOWE INWERTAZY Z DROŻDZY *YARROWIA LIPOLYTICA*

Streszczenie

Inwertaza jest ważnym enzymem powszechnie stosowanym w przemyśle spożywczym, zwłaszcza w cukiernictwie. Dostępne na rynku preparaty inwertazy zawierają enzym uzyskany z drożdży *Saccharomyces cerevisiae* w postaci płynnej. Poszukiwanie nowych źródeł inwertazy oraz uzyskanie bardziej stabilnych preparatów (proszków) może korzystnie zwiększyć ofertę dla przemysłu spożywczego. Do otrzymania sproszkowanych preparatów enzymatycznych stosuje się liofilizację, suszenie fluidyzacyjne, a nawet suszenie rozpyłowe.

Celem pracy była ocena procesu biosyntezy inwertazy z glicerolu przez genetycznie zmodyfikowany polski szczep *Yarrowia lipolytica* oraz otrzymanie suszonego rozpyłowo preparatu tego enzymu. Biosyntezę enzymu wydzielanego przez drożdże prowadzono w trzech niezależnych procesach bioreaktorowych (H1, H2 i H3) z glicerolem jako głównym źródłem węgla. Z jednego bioreaktora uzyskano od 15926 do 40710 jednostek inwertazy (U) o aktywności właściwej $96,8 \div 645,6$ U/mg białka. Do suszenia rozpyłowego przeznaczono 3690 ml zmieszanego płynu pohodowlanego o aktywności właściwej wynoszącej 263,4 U/mg białka. W procesie suszenia rozpyłowego z dodatkiem 1 % metylocelulozy otrzymano 198,12 g proszku o aktywności właściwej 113,4 U/mg białka. Inwertaza z *Y. lipolytica* w postaci proszku wykazywała niższe optimum pH i temperatury niż enzym natywny oraz była bardziej termostabilna. W zastosowanych warunkach suszenia rozpyłowego inwertaza utraciła 67 % aktywności i dlatego w dalszym postępowaniu należy przeprowadzić badania nad optymalizacją parametrów suszenia.

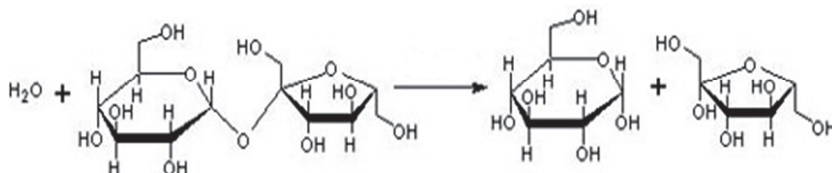
Słowa kluczowe: *Yarrowia lipolytica*, inwertaza, suszenie rozpyłowe, biosynteza

Wprowadzenie

Inwertaza według międzynarodowej klasyfikacji enzymów jest β -fruktofuranozydazą (nazywaną także sacharazą, fruktohydrolazą czy beta-sukrazą) o nume-

Prof. dr hab. M. Robak, mgr inż. K. Szczepańska, dr inż. M. Rakicka-Pustułka, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności, dr inż. M. Serowik, prof. dr. hab. inż. A. Figiel, Instytut Inżynierii Rolniczej, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, ul. Chelmońskiego 37, 51-630 Wrocław. Kontakt: malgorzata.robak@upwr.edu.pl

rze EC 3.2.1.26. Hydrolizuje sacharozę – podstawowy energetyczny zapasowy materiał roślin – do fruktozy i glukozy (rys. 1), a w odpowiednich warunkach prowadzi także syntezę polimerów fruktozowych (fruktanów), przyłączając kolejne cząsteczki fruktozy do powstającego łańcucha sacharydowego [1].



Rys. 1. Hydroliza sacharozy do glukozy i fruktozy przez invertazę

Fig.1. Hydrolysis of sucrose to glucose and fructose by invertase

Enzym ten jest szeroko rozpowszechniony w świecie, a jego fizjologiczne znaczenie wciąż jest badane [5]. Za najlepiej poznaną invertazę, zarówno pod względem budowy białka, jak i ekspresji kodujących ją genów, uważa się tę pochodzącą z drożdży *Sacharomyces cerevisiae*. Drożdże te wyposażone są w geny kodujące invertazę, znane pod ogólną nazwą SUC, tworzące rozproszoną rodzinę sześciu reprezentantów: SUC1-SUC5 oraz SUC-7. Najważniejszy z nich to gen SUC2, a efektem jego ekspresji są dwie formy białka: wewnętrzna invertaza glikozylowana zawieszona w cytozolu oraz zewnętrzna nieglikozylowana umieszczona w przestrzeni periplazmatycznej i wydzielana do środowiska. Obie formy enzymu są kodowane przez ten sam gen (SUC2), ale proces translacji rozpoczyna się z dwóch różnych kodonów starterowych [3]. Zewnętrzna invertaza otrzymuje dodatkowe dwa aminokwasy pełniące funkcję sekwencji sygnałowej, które wspomagają przedostanie się białka do przestrzeni periplazmatycznej, gdzie ulega agregacji do tetrameru, heksameru lub oktameru, wszystkie o tej samej aktywności enzymatycznej [21]. Gen SUC2 z *S. cerevisiae* wklonowano do genomu innych drobnoustrojów, w tym niekonwencjonalnych drożdży *Yarrowia lipolytica* [13, 26]. Taki zabieg umożliwia uzyskanie preparatu invertazy z tańszych substratów, np. glicerolu.

Inwertaza jest ważnym enzymem powszechnie stosowanym w przemyśle spożywczym, zwłaszcza w cukiernictwie. Używana jest do produkcji nadziewanych pomadek (likierowych, kremowych, śmietanowych), sztucznego miodu oraz syropu glukozowo-fruktozowego [6]. Dostępne na rynku preparaty invertazy zawierają enzym z drożdży *S. cerevisiae* w postaci płynnej, jednak możliwe jest stosowanie tych preparatów w postaci proszku. Sproszkowane preparaty enzymatyczne do celów spożywczych otrzymuje się m.in. w procesach liofilizacji, suszenia fluidyzacyjnego czy suszenia rozpyłowego.

Suszenie rozpyłowe, zwane inaczej suszeniem rozpryskowym, stosuje się do utrwalania żywności, w produkcji polimerów, proszków metali, farmaceutyków oraz preparatów enzymatycznych [16, 19, 28]. Ta metoda suszenia zmniejsza ilości wody zawartej w produkcie poprzez czynnik suszący, jakim jest gorące powietrze ($> 100\text{ }^{\circ}\text{C}$). Suszenie rozpyłowe było stosowane już w 1920 r. do suszenia mleka, a w latach 1938 - 1944 opracowano proces otrzymywania tą metodą kawy rozpuszczalnej [23, 24]. Gotowy susz może być przechowywany nawet do kilku lat.

Celem niniejszej pracy było uzyskanie suchego preparatu inwertazy z drożdży *Yarrowia lipolytica* jako alternatywnego enzymu na potrzeby przemysłu spożywczego.

Materiał i metody badań

W badaniach używano szczepu drożdży *Yarrowia lipolytica* A-101-B56-5, otrzymanego na drodze genetycznej transformacji polskiego szczepu dzikiego *Y. lipolytica* A-101 ekspresyjną kasetą drożdżową zawierającą gen SUC2 pod kontrolą promotora XPR2 [26]. W szczepie tym znajdują się dwa tandemowo powtórzone geny SUC2 [8].

Drożdże przeznaczone do zaszczepiania bioreaktora namnażano w podłożu inokulacyjnym zawierającym w 1 l: 50 g źródła węgla (glukozy lub glicerolu), 1,5 g NH_4Cl , 1 g YE, 1 g peptonu oraz 0,03 g tiaminy. Hodowle inokulacyjne prowadzono w 50 ml podłoża w kolbach o pojemności 250 ml w temp. $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, przez 48 h, przy 170 rpm w wyrząsarce G10 Gyrotary Shaker (Gyrotary, USA). Hodowle produkcyjne prowadzono w bioreaktorze Biostat B Plus (o objętości 5 l, Sartorius, Niemcy) w 2 l podłoża, przy czym w 1 l podłoża znajdowało się: 100 g glicerolu, 1,5 g NH_4Cl , 1 g $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0,7 g KH_2PO_4 , 0,3 g YE oraz 0,03 g tiaminy. Proces przebiegał w temp. $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ przez 48 h, przy obrotach 800 rpm i napowietrzaniu – 0,36 vvm. Inokulum stanowiło 10 %.

Podczas prowadzenia tych procesów pobierano próbki i oznaczano zawartość glicerolu, kwasu cytrynowego, arabitolu i mannitolu oraz oznaczano aktywność inwertazy i zawartość białka zgodnie z metodyką opisaną niżej. Hodowle prowadzono do wyczerpania glicerolu (źródła węgla). Próbki do badań pobierano co 10 h – szczegółowy czas ich pobierania podano na wykresach. Analizom poddawano płyn pohodowlany otrzymywany po odwirowaniu komórek drożdżowych przy 4000 rpm przez 15 min w wirówce z chłodzeniem Sigma 3-16K (Polygen, Niemcy).

Dla porównania aktywności inwertazy produkowanej przez niekonwencjonalne drożdże *Y. lipolytica* stosowano także enzym z *S. cerevisiae*. Materiałem wyjściowym był handlowy preparat drożdży piekarskich, którego 100 g rozpuszczano w 1 l 0,1 M roztworu sodы oczyszczonej i inkubowano: w temp. $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ przez 24 h, a następnie przez kolejne 24 h w temp. $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po inkubacji próbkę odwirowywano w wirówce z chłodzeniem Sigma 3-16K (Polygen, Niemcy) przy 5500 rpm przez 30 min i zagęsz-

czano przy użyciu membrany o punkcie odcięcia $50 \cdot 10^3$ Da (Milipore Labscale TM TFF System, Niemcy).

Płyn pochodzący z trzech procesów bioreaktorowych (H1, H2 i H3) o objętości 3690 ml poddano suszeniu. Do płynu zawierającego inwertazę jako nośnik dodano 1 % metylocelulozy w odniesieniu do suchej substancji. Proces suszenia rozpyłowego prowadzono w suszarce Anhydro Lab 1 (Anhydro, Søborg, Dania) w temp. wlotowej 125°C i wylotowej -75°C , przy szybkości podawania preparatu wynoszącej 35 ml/min, czyli 2100 ml/h i ciśnieniu w dyszy – 1,5 atm.

Białko oznaczano kolorymetryczną metodą Lowry'ego [10]. Oznaczanie aktywności inwertazy polegało na pomiarze uwolnionych cukrów redukujących z użyciem odczynnika DNS [17]. Jednostkę enzymatyczną inwertazy wyrażano jako ilość enzymu uwalniającego 1 μmol cukru redukującego w ciągu 1 min, w określonych warunkach reakcji. Substratem była sacharoza (0,1 M roztwór w wodzie destylowanej), reakcję prowadzono w 0,1 M buforze octanowym o pH 4,5. Do wyznaczenia optimum pH zastosowano 0,1 M bufor octanowy (zakres kwaśny) oraz 0,1 M bufor Tris-HCl (zakres zasadowy).

Zawartość glicerolu, kwasu cytrynowego oraz arabitolu i mannitolu (jako śladowych metabolitów) oznaczano metodą HPLC przy użyciu chromatografu (Beckman Gold System, USA) z kolumną Aminex HPX87H podłączoną do detektora UV (210 nm) oraz refraktometru (RI). Rozdział prowadzono w temp. $20 \pm 1^\circ\text{C}$ z 20 mM H_2SO_4 jako eluentem podawanym z szybkością 0,6 ml/min [8, 9].

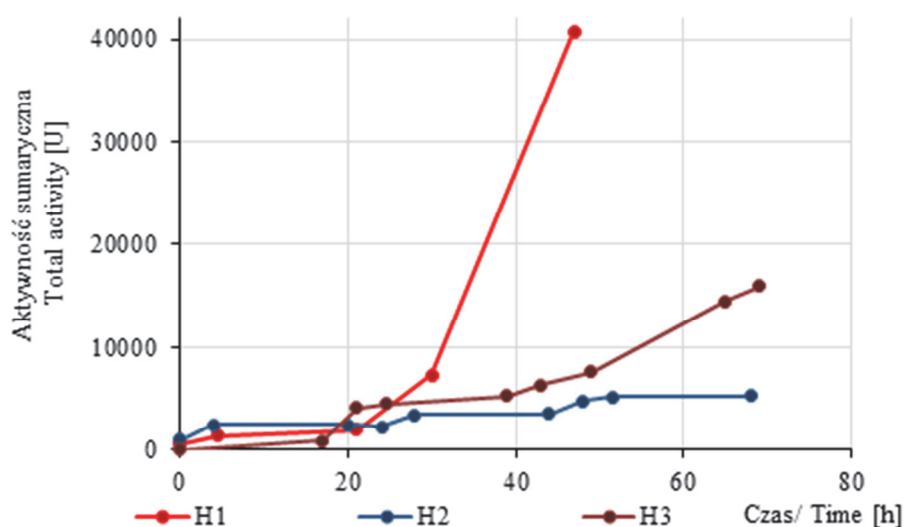
Wyniki i dyskusja

Proces biosyntezy inwertazy

Biosynteza inwertazy przez *Y. lipolytica* A-101-B56-5 w trzech hodowlach bioreaktorowych (H1, H2 i H3) przebiegała z podobną dynamiką do 30. godziny procesu, pomimo że w procesie H1 oraz H3 zastosowano inokulum przygotowane w podłożu z glicerolem, a w H2 – w podłożu z glukozą. Po tym czasie w procesie H1 nastąpił gwałtowny przyrost aktywności, czego nie obserwowano w dwóch pozostałych procesach (rys. 2). Aktywność całkowita inwertazy płynu pochodzącego H1 wynosiła 40709,9 U i była prawie siedmiokrotnie wyższa niż w procesie H2 (5216,1 U) oraz ponad dwukrotnie wyższa niż w procesie H3 (15 925,9 U). Wydajność biosyntezy inwertazy w odniesieniu do zastosowanego substratu wynosiła: 428,5 U/g (H1), 69,5 U/g (H2) i 177 U/g (H3), a w odniesieniu do biomasy: 1929,4 U/g (H1), 427,5 U/g (H2) i 1197,4 U/g (H3).

Całkowita zawartość białka w płynie pochodzącym z tych procesów była największa w 20. godzinie i wynosiła $80 \div 140$ mg. Po zakończeniu procesów całkowita zawartość białka w płynach pochodzących była mniejsza, wynosiła $56 \div 62$ mg. Na

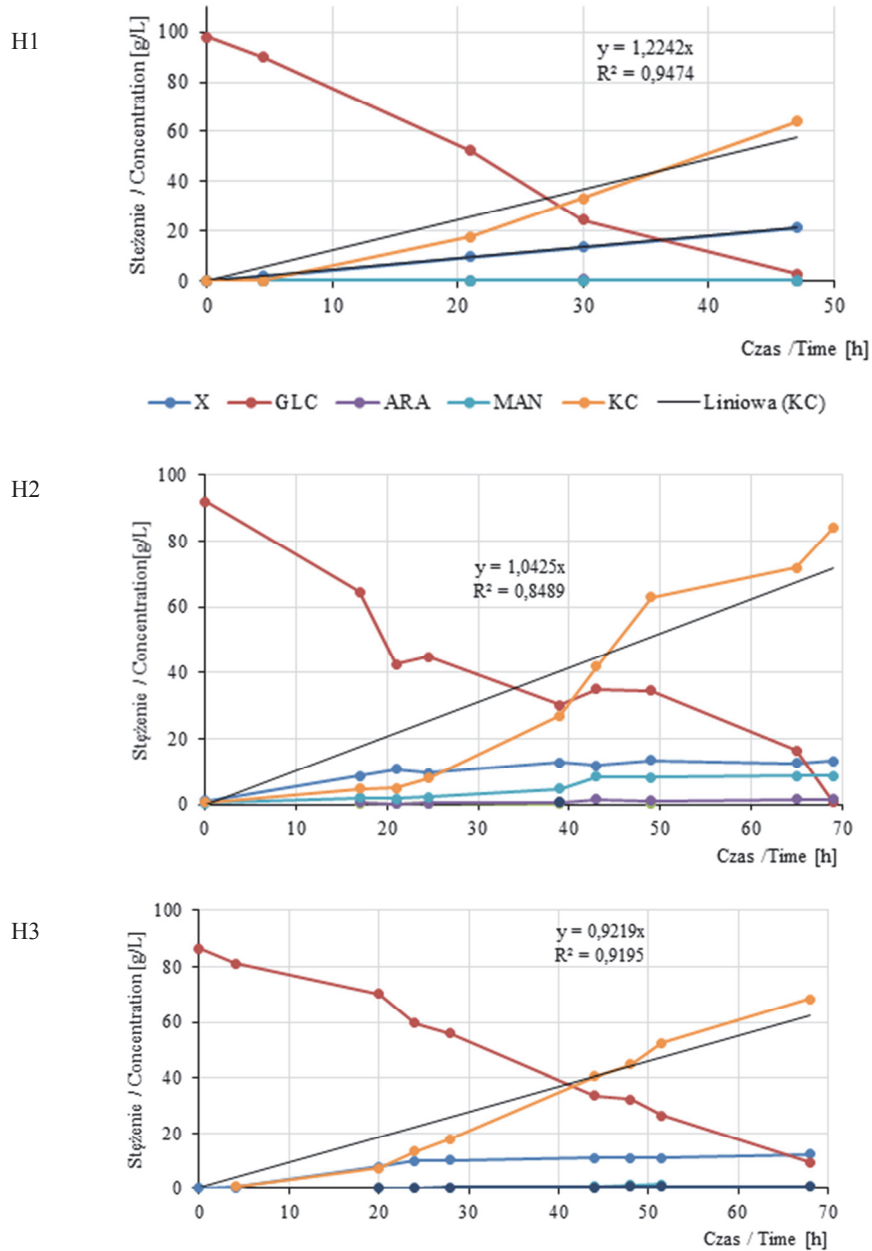
podstawie wartości aktywności oraz zawartości białka obliczono aktywność właściwą poszczególnych prób w czasie procesów. Najwyższą aktywność właściwą inwertazy stwierdzono w płynie pochodzącym z hodowli H1 (645,62 U/mg białka), ponad dwukrotnie wyższą niż w procesie H3 (243,97 U/mg białka) i ponad sześciokrotnie wyższą niż w H2 (96,79 U/mg białka). Jednocześnie w płynach pochodzących z hodowli otrzymano kwas cytrynowy. Przebieg biosyntezy kwasu cytrynowego przez szczep *Y. lipolytica* A-101-B56-5 śledzono na podstawie przyrostu stężenia metabolitów i biomasy oraz ubytku substratu (rys. 3).



Rys. 2. Aktywność inwertazy w płynie po hodowlach: H1, H2 i H3

Fig. 2. Activity of invertase in post-culture liquids in: H1, H2 and H3

Zaobserwowana różnica szybkości wykorzystania glicerolu mogła być związana z tym, że inokula były przygotowywane w oddzielnych partiach i różniły się źródłem węgla. W procesie H1 oraz H3 zastosowano inokulum przygotowane w podłożu z glicerolem, a w H2 – w podłożu z glukozą. Przyrost biomasy w procesie H1 był bardziej dynamiczny szczególnie po 30 h i ostatecznie doprowadził do uzyskania prawie dwa razy większego plonu biomasy niż w H2 i H3. Pomimo różnic pod względem zawartości biomasy i szybkości wykorzystania glicerolu w hodowlach H1 i H2 uzyskano podobne stężenie kwasu cytrynowego i pozostałych metabolitów. W procesie H3 uzyskano najwyższe stężenie kwasu cytrynowego (84 g/l), prawie o 27 % wyższe niż w pozostałych dwóch hodowlach. Tak dużej różnicy nie obserwowano podczas porównania równań opisujących proces biosyntezy cytrynianu (rys. 3). Równania opisujące przyrost kwasu w czasie są bardzo podobne i w warunkach jego biosyntezy



Objaśnienia / Explanatory notes:

X – biomasa / biomass, GLC – glicerol / glycerol, ARA – arabitol / arabitol, MAN – mannitol / mannitol, KC – cytrynian / citrate.

Rys. 3. Stężenie glicerolu i metabolitów, w tym kwasu cytrynowego, podczas procesów H1, H2 i H3

Fig. 3. Concentration of glycerol and metabolites including citric acid during H1, H2 and H3 processes

z glicerolu przez szczep *Y. lipolytica* A-101-B56-5 można przyjąć, że przyrost jest liniowy zgodny z równaniem $y = 1,095x$, gdzie: y – stężenie cytrynianu, x – czas. Zanieczyszczenie pozostałymi metabolitami było małe i sumarycznie nie przekraczało 20 g/l w każdym z procesów. Płyny pochodowlane z procesów H1 (1 l), H2 (1 l) i H3 (2,2 l) zmieszano i otrzymano 4200 ml preparatu zawierającego inwertazę, białko i kwas cytrynowy. Sumaryczna zawartość inwertazy wynosiła 35196 U, białka – 133,6 mg, a kwasu cytrynowego – 294 g. Zmieszany płyn pochodowlany cechowała aktywność właściwa inwertazy wynosząca 263,44 U/mg białka.

Proces suszenia rozpyłowego

Do suszenia rozpyłowego pobrano 3690 ml zmieszanego płynu pochodowlanego zawierającego 30922,2 U inwertazy, 117,38 mg białka oraz 277 g cytrynianu. W procesie suszenia, do którego dodano metylocelulozę w ilości 36,9 g, otrzymano 198,12 g proszku. Około 161 g proszku pochodziło z zawartych w płynie metabolitów (kwasu cytrynowego i innych substancji oraz wydzielonych białek). Na podstawie ilości otrzymanego proszku i ilości kwasu cytrynowego zawartego w zmieszonym płynie należy zwrócić uwagę na utratę podczas suszenia prawie 50 % kwasu.

W otrzymanym proszku oznaczono aktywność inwertazy. W tym celu naważono 5 próbek o masie 50 mg każda, a następnie rozpuszczono w 1 ml wody i przeprowadzono analizę. Otrzymane wyniki przedstawiono w tab. 1.

Tabela 1. Aktywność inwertazy w próbkach suszonego preparatu inwertazy
Table 1. Activity of invertase in samples of spray-dried invertase preparation

Nr próbki Sample No.	Aktywność inwertazy / Activity of invertase		
	[U]	[U/mg białka] [U/mg of protein]	[U/g proszku] [U/g of powder]
1	8 052,98	78,68	40,647
2	13 690,46	133,76	69,10
3	13 287,25	129,82	67,07
4	13 518,94	132,09	68,24
5	9 457,94	92,41	47,74
$\bar{X} \pm SD$	11 601,51 \pm 2 649,00	113,35 \pm 25,88	58,56 \pm 13,37

Objaśnienia / Explanatory notes:

\bar{X} – wartość średnia / mean value, SD – odchylenie standardowe / standard deviation.

Odchylenie standardowe pomiarów było bliskie 23 %, ale odzyskana aktywność inwertazy wynosiła 11601,51 U, czyli 33 %. Aktywność właściwa połączonych płynów pochodowlanych wyniosła 263,44 U/mg białka, a preparatu suszonego – 113,35 U/mg białka. Wartości te są zatem wzajemnie zgodne, gdyż w przeliczeniu

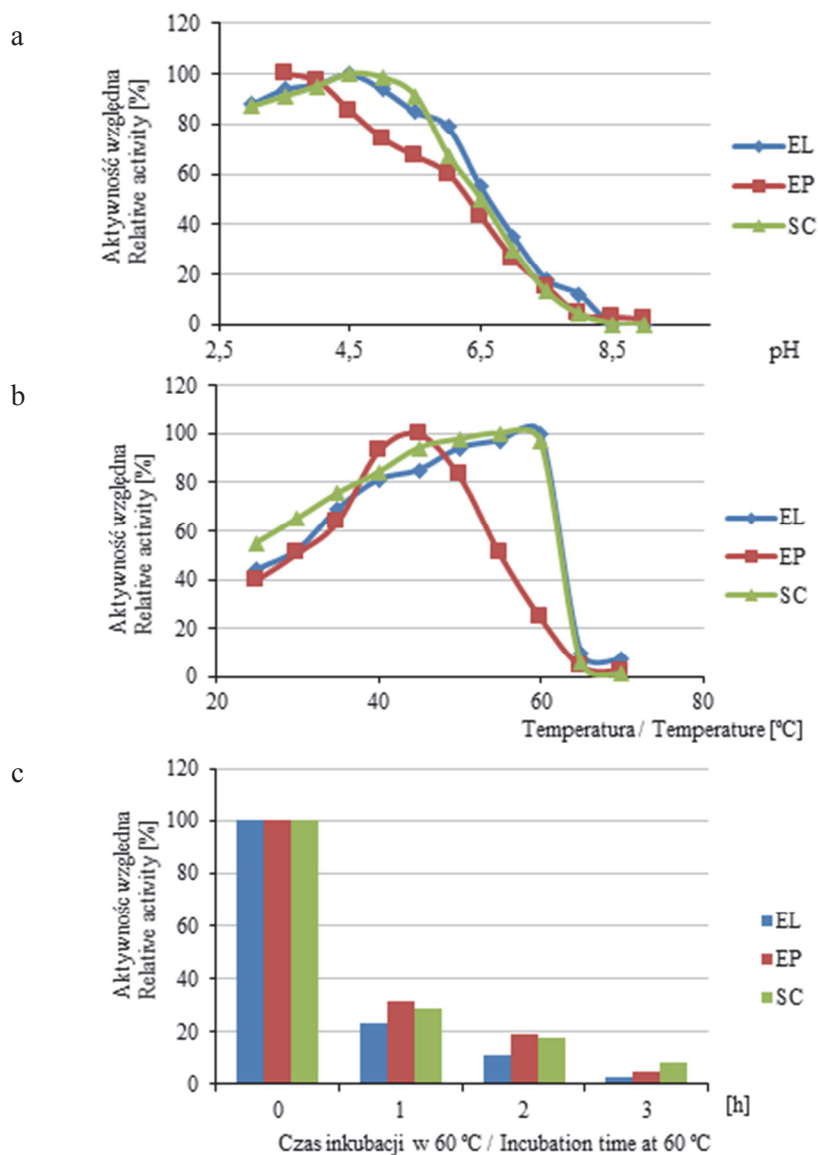
odzyskano 87,3 % wprowadzonej ilości białka. Zawartość białka w suszonym preparacie wynosiła 0,517 mg/g proszku, co sumarycznie stanowi 102,43 mg ze 117,38 mg poddanych suszeniu. Świadczy to jednoznacznie o utracie aktywności inwertazy podczas suszenia rozpyłowego.

Charakterystyka suszonego preparatu inwertazy

Optimum pH enzymu w płynie (EL) oraz enzymu w proszku (EP) zawierało się w zakresie pH kwaśnego, chociaż wartości nieznacznie się różniły. Optymalne dla EP było pH 3,5 a dla EL – pH 4,5 (rys. 4a). Jeszcze większą różnicę zaobserwowano pod względem optymalnej temperatury hydrolizy sacharozy przez preparaty inwertazy. Optimum temperatury EL wynosiło 60 °C, a EP – 45 °C, czyli było zdecydowanie niższe (rys. 4b). W obu przypadkach w temp. 65 °C obserwowano niską aktywność inwertazy, poniżej 10 % wartości optymalnej. Termostabilność inwertazy w obu preparatach była podobna w temp. 20 oraz 40 °C. Inwertaza nie traciła aktywności podczas 3-godzinnego przetrzymywania w tych warunkach. Natomiast w temp. 60 °C enzym w proszku był bardziej stabilny. Po 2 h inkubacji jego aktywność była dwa razy wyższa niż w preparacie płynnym.

Trzy procesy (H1, H2 i H3) biosyntezy inwertazy przez szczep *Y. lipolytica* A-101-B56-5 przeprowadzono w dwóch wariantach różniących się inokulum. We wszystkich wariantach w bioreaktorze użytym źródłem węgla był glicerol, podczas gdy w hodowli inokularnej wykorzystano glicerol (H1 oraz H3) lub glukozę (H2). Glukoza zastosowana w hodowli inokularnej procesu H2 (i obecna jeszcze na początku kultury w bioreaktorze) mogła być przyczyną uzyskania najmniejszej aktywności inwertazy (2,61 U/ml). Niską aktywność inwertazy obserwowali także Żubrowski i wsp. [29] po użyciu sacharozy do biosyntezy inwertazy. Pomimo zastosowania tego samego szczepu drożdży *Y. lipolytica* uzyskana aktywność płynów pohodowlanych była kilkakrotnie niższa (0,063 U/ml). Po zastosowaniu optymalizowanych podłoży z sacharozą aktywność inwertazy była natomiast kilkakrotnie większa, wynosiła od 1,75 do 14 U/ml [9]. W procesach badanych w niniejszej pracy i prowadzonych wyłącznie w obecności glicerolu uzyskano podobną aktywność inwertazy wynoszącą 8,0 U/ml (H3) i 20,35 U/ml (H1), a w przeliczeniu na 1 l – 8 ÷ 20 tysięcy U. Zatem glicerol jako tanie i odpadowe źródło węgla może również być wykorzystany do biosyntezy zewnątrzkomórkowej inwertazy wydzielanej przez genetycznie zmodyfikowany szczep *Y. lipolytica* A-101-B56-5. Uzyskana ilość enzymu jest porównywalna do ilości enzymu otrzymywanego z innych źródeł. Oyedeji i wsp. [14] w hodowli ze skórką z ananasa jako tanim substratem i przy użyciu grzybów *Aspergillus niger* IBK1 uzyskali zbliżoną zawartość inwertazy. Prawie 10 razy wyższą aktywność inwertazy wykazali natomiast Qureshi i wsp. [15] w doświadczeniu z drożdżami *S. cerevisiae* Angel. W hodowli wytrząsanej w medium z syropem daktylowym szczep wydzielił inwertazę

w ilości 190000 U/l. Jest to najwyższa wartość odnotowana podczas biosyntezy zewnętrzkomórkowej inwertazy.



Rys. 4. Optimum pH (a), optimum temperature (b) i termostabilność w temp. 60 °C (c) inwertazy z *Y. lipolytica* w płynie (EL), w proszku (EP) oraz inwertazy z *S. cerevisiae* (SC)

Fig. 4. pH optimum (a), temperature optimum (b) and thermo-stability at 60 °C (c) of invertase from *Y. lipolytica* in form of liquid (EL), powder (EP) and invertase from *S. cerevisiae* (SC)

Dodatkowym atutem prowadzonych procesów z udziałem *Y. lipolytica* jest jednoczesna biosynteza kwasu cytrynowego. We wszystkich trzech procesach uzyskano cytrynian w znacznych ilościach – $64 \div 84$ g/l. Szybkość biosyntezy tego kwasu też była duża, w zakresie $1 \div 1,3$ g/l/h, a szybkość właściwa – $0,064 \div 0,091$ g/g/h (w przeliczeniu na biomase). Duża też była wydajność z substratu, wynosiła 93 %. Podobne wyniki dotyczące gromadzenia kwasu cytrynowego w podłożu z glicerolem lub sacharozą otrzymali Lazar i wsp. [8, 9], Rymowicz i wsp. [20] oraz Morgunov i wsp. [12]. Największe stężenie cytrynianu nagromadzanego przez ten gatunek drożdży uzyskali Rakicka i wsp. [18].

Po porównaniu wyników uzyskanych w badaniach własnych z wynikami innych naukowców można wnioskować o celowości wykorzystania glicerolu jako źródło węgla w hodowli drożdży *Y. lipolytica* A-101-B56-5 ukierunkowanej na jednoczesną produkcję kwasu cytrynowego i inwertazy. Dodatkowym atutem hodowli na glicerolu jest brak pozostałości cukrów redukujących, istotnie interferujących z pomiarem aktywności enzymu oraz z suszeniem.

Kolejnym etapem pracy było suszenie rozpyłowe płynu zawierającego inwertazę z użyciem nośnika w postaci metylocelulozy. Wykazano zmniejszenie aktywności enzymu sięgające 67 % wobec płynu pochodzącego z jednoczesnym odzyskiem białka na poziomie 87,3 %. Obniżenie aktywności enzymu odnotowali również Yoshii i wsp. [27], którzy w badaniach prowadzonych nad suszeniem rozpyłowym dehydrogenazy alkoholowej uznali wartość temperatury wlotowej i wylotowej za ważny czynnik zachowania aktywności enzymu. Podczas podwyższania temperatury powietrza wlotowego z 70 do 83 °C odnotowali 40-procentowe obniżenie aktywności enzymatycznej. Samborska i wsp. [22] podczas suszenia α -amylazy otrzymanej z grzybów *Aspergillus oryzae* przy zastosowaniu przepływu 0,8 i 1,2 ml/s oraz temp. 200 °C uzyskali wzrost aktywności enzymu. Po zastosowaniu tej samej temperatury, ale przy zmniejszeniu szybkości podawania płynu uzyskano preparat o niższej aktywności. Najprawdopodobniej było to spowodowane dłuższym czasem oddziaływania wysokiej temperatury na enzym, przy zwiększonej szybkości czas ten był krótszy. Inaczej do badań nad suszeniem rozpyłowym enzymów podeszli Miliqvist-Fureby i wsp. [11], którzy jako główną zmienną wybrali nośnik enzymu. Zmieszali trypsynę z różnymi węglowodanami: laktozą, sacharozą, mannitolem, α -cyklodekstryną i dekstryną, a następnie poddali mieszaniny suszeniu rozpyłowemu. Sacharoza i mannitol okazały się mniej wydajne niż pozostałe węglowodany, jednak nawet w najmniej korzystnym przypadku aktywność resztkowa trypsyny wynosiła ponad 80 %. Ponadto stwierdzono silną akumulację białka na powierzchni węglowodanów, którą można kontrolować poprzez dodatek niejonowego środka powierzchniowo czynnego. Jak wynika z powyższych badań, jest wiele czynników mających wpływ na utrzymanie bądź zwiększenie aktywności enzymatycznej wysuszonych preparatów. Powodem utraty aktywności

inwertazy w badaniach własnych może być źle dobrana temperatura procesu lub użycie nieodpowiedniego nośnika. Może to być też specyfika enzymu. Lipaza z drożdży *Y. lipolytica* nie traciła aktywności enzymatycznej podczas suszenia rozpyłowego w identycznych warunkach (dane niepublikowane). Parametry procesu, takie jak: temperatura powietrza wlatującego i wylatującego, intensywność podawania surowca do rozpylacza oraz ciśnienie powietrza w rozpylaczu mają wpływ na jakość końcowego produktu. W celu uzyskania bardziej korzystnych właściwości suszonych proszków, proces można poddawać modyfikacji, np. zmieniać temperaturę suszenia bądź prędkość podawania surowca do komory suszącej [24].

Suszony preparat inwertazy zbadano w celu wyznaczenia optimum pH, temperatury oraz stabilności białka. Najwyższą aktywność enzymatyczną suchego preparatu wykazano w pH 3,5, a płynnego – w pH 4,5. Enzym badany w niniejszej pracy zaliczany jest do kwaśnych inwertaz o optimum pH w zakresie 3,5 ÷ 5. Odrębną grupą są inwertazy zasadowe bądź neutralne. Badacze obecnie poszukują zupełnie innych źródeł inwertazy. Ciekawym przykładem jest inwertaza, którą uzyskali Guo i wsp. [7] z jedwabnika morwowego (*Bombyx mori*). Maksymalną aktywność inwertazy o nazwie Bmsuc1 obserwowano w pH 7 i pH 8, przy czym zauważono wyższą wrażliwość enzymu na wzrost pH powyżej wartości optymalnej niż przy przejściu do bardziej kwaśnego środowiska.

Optymalna temperatura aktywności inwertazy zawartej w suszonym preparacie wyniosła 45 °C, a płynnego enzymu – 55 °C. Odwrotne wyniki otrzymali Danisman i wsp. [4] podczas badań nad kowalencyjnie unieruchomioną na membranie (pHEMA-GMA) inwertazą pozyskaną z grzybów *Aspergillus niger*. Badacze określili optimum temperatury aktywności inwertazy immobilizowanej na poziomie 55 °C, a w przypadku wolnego enzymu – 45 °C. W przypadku rozpyłowo suszonego preparatu inwertazy w niniejszej pracy uzyskano podobne wyniki do tych, które wykazali Bayramoglu i wsp. [2] w badaniach nad enzymem immobilizowanym na nanocząstkach magnetycznych. Unieruchomiona forma enzymu okazała się również bardziej stabilna w wyższej temperaturze niż jej wolny odpowiednik. Aktywność inwertazy zawartej w proszku (otrzymanym w wyniku suszenia rozpyłowego) i przetrzymywanej przez 2 h w temp. 65 °C wynosiła prawie 20 %, a wolnej inwertazy – niecałe 10 % wyjściowej aktywności. Badania enzymu immobilizowanego na montmorylonicie K-10 podjęli Sanjay i Sugunan [25]. Unieruchomienie enzymu poprzez wiązania kowalencyjne na nośniku poprawiło jego stabilność termiczną. Tak związana inwertaza wykazywała aktywność na poziomie 70 %, podczas gdy wolny enzym po półtorej godziny wykazywał jedynie 10 % początkowej aktywności. Niestety takiej poprawy termostabilności inwertazy nie obserwowano w badaniach własnych w odniesieniu do suszonego rozpyłowo preparatu enzymu z *Y. lipolytica*. Zwiększenie termostabilności enzymu wymaga

dalszych badań nad optymalizacją parametrów suszenia. Badania te mogłyby też przyczynić się do zwiększenia wydajności suszenia.

Wnioski

1. Glicerol jako tanie i odpadowe źródło węgla może być użyty do biosyntezy zewnątrzkomórkowej inwertazy wydzielanej przez genetycznie zmodyfikowany szczep *Y. lipolytica* A-101-B56-5.
2. Po zastosowaniu suszenia rozpyłowego uzyskano inwertazę wykazującą podwyższoną termostabilność, niższe optimum temperatury i pH.
3. W celu otrzymania preparatu sproszkowanej inwertazy o wyższej aktywności należy zoptymalizować parametry procesu suszenia rozpyłowego.

Literatura

- [1] Barbosa P.M.G., de Morais A.P., de Andrade Silva C.A., da Silva Santos F.R., Garcia N.F.L., Foneseca G.C., Leite R.S.R, da Paz M.F.: Biochemical characterization and evaluation of invertases produced from *Saccharomyces cerevisiae* CAT-1 and *Rhodotorula mucilaginosa* for the production of fructooligosaccharides. *Prep. Biochem. Biotechnol.*, 2018, 48 (6), 506-513.
- [2] Bayramoglu G., Doz T., Ozalp V.C., Arica M.Y.: Improvement stability and performance of invertase via immobilization on to silanized and polymer brush grafted magnetic nanoparticles. *Food Chem.*, 2017, 221, 1442-1450.
- [3] Carlson M., Botstein D.: Two differentially regulated mRNAs with different 5' ends encode secreted with intracellular forms of yeast invertase. *Cell*, 1982, 28 (1), 145-154.
- [4] Danisman T., Tan S., Kacar Y., Ergene A.: Covalent immobilization of invertase on microporous pHEMA-GMA membranę. *Food Chem.*, 2004, 85 (3), 461-466.
- [5] Deng S., Mai Y., Niu J.: Fruit characteristics, soluble sugar compositions and transcriptome analysis during the development of *Citrus maxima* "seedless", and identification of SUS and INV genes involved in sucrose degradation. *Gene*, 2019, 689, 131-140.
- [6] Enzyme Development Corporation: Enzeco invertase use in confections. [on line]. Dostęp w Internecie [06.12.2020]: <http://www.enzymedevelopment.com/wp-content/uploads/2011/10/Invertase-use-in-Confections-first-rev-01-05-04.pdf>
- [7] Guo. P.C., Wang Q., Wang Z., Dong Z., He H., Zhao P.: Biochemical characterization and functional analysis of invertase Bmsuc1 from silkworm, *Bombyx mori*. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2018, 107(B), 2334-2341.
- [8] Lazar Z., Walczak E., Robak M.: Simultaneous production of citric acid and invertase by *Yarrowia lipolytica* SUC+ transformants. *Biores. Technol.*, 2011, 102 (13), 6982-6989.
- [9] Lazar Z., Żubrowski D., Korzun-Chłopicka U., Robak M.: Recombinant strain of *Yarrowia lipolytica* in simultaneous biosynthesis of citrate and invertase from sucrose. *Acta Sci. Polon. Biotechnologia*, 2016, 15(3), 25-35.
- [10] Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951, 193 (1), 265-275.
- [11] Millqvist A., Malmsten M., Bergenstahl B.: Spray-drying of trypsin – surface characterisation and activity preservation. *Int. J. Pharm.*, 1999, 188 (2), 243-253.

- [12] Morgunov I.G., Kamzolova S.V., Lunina J.N.: Citric acid production by *Yarrowia lipolytica* yeast on different renewable raw materials. *Fermentation*, 2018, 4 (2), #36.
- [13] Nicaud J.-M., Fabre E., Gaillardin C.: Expression of invertase activity in *Yarrowia lipolytica* and its use as a selective marker. *Curr. Genet.*, 1989, 16, 253-260.
- [14] Oyedeji O., Bakare M.K., Adewale I.O., Olutiola P.O., Omoboye O.: Optimized production and characterization of thermostable invertase from *Aspergillus niger* IBK1, using pineapple peel as alternate substrate. *Biocat. Agric. Biotechnol.*, 2017, 9, 218-223.
- [15] Qureshi A.S., Khushk I., Ali A.H., Majeed H., Ahmad A.: Production of invertase from *Saccharomyces cerevisiae* Angel using date syrup as a cost effective carbon source. *Afr. J. Biotechnol.*, 2017, 16 (15), 777-781.
- [16] Parikh D.: Advances in spray drying technology: New applications for a proven process. *Am. Pharm. Rev.*, 2008, 11(1).
- [17] Piegza M., Jurkiewicz M., Kancelista A., Łaba W., Witkowska D.: Moulds lytic enzymes in the production of *Yarrowia* high-protein feed additives. *EJPAU*, 2015, 18(4), #04.
- [18] Rakicka M., Wolniak J., Lazar Z., Rymowicz W.: Production of high titer of citric acid from inulin. *BMC Biotechnology*, 2019, 19, #11.
- [19] Rosiński M., Piasecka-Kwiatkowska D., Warchalewski J.R.: Przegląd metod separacji i oczyszczania białek przydatnych w badaniach i analizie żywności. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2005, 3 (44), 5-22.
- [20] Rymowicz W., Rywińska A., Żarowska B., Juszczyk P.: Citric acid production from crude glycerol by acetate mutants of *Yarrowia lipolytica*. *Chem. Pap.*, 2006, 60, 391-394.
- [21] Sainz-Polo M.A., Ramirez-Escudero M., Lafraya A., Gonzalez B., Marin-Navarro J., Polaina J., Sanz-Aparicio J.: Three-dimensional structure of *Saccharomyces* invertase, role of a non-catalytical domain in oligomerization and substrate specificity. *J. Biol. Chem.*, 2013, 288 (14), 9755-9766.
- [22] Samborska K., Witrowa-Rajchert D., Goncalves A.: Spray-drying of α -amylase – the effect of process variables on the enzyme inactivation. *Drying Technology*, 2007, 4 (23), 941-953.
- [23] Samborska K.: Suszenie rozpyłowe w przemyśle spożywczym. *Post. Techn. Przetw. Spoż.*, 2008, 1, 63-69.
- [24] Samborska K.: Suszenie rozpyłowe enzymów – przyczyny inaktywacji oraz metody i mechanizmy ich stabilizacji. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2010, 6 (73), 7-17.
- [25] Sanjay G., Sugunan S.: Enhanced pH and thermal stabilities of invertase immobilized on montmorillonite K-10. *Food Chem.*, 2004, 9 (4), 573-579.
- [26] Walczak E., Robak M., Mauesberger S.: Gene disruption, transformants selection and physiological properties of *Yarrowia lipolytica* A-101 clones. *BIOTRANS*, Oviedo, Spain, 8-13 July 2007, poster.
- [27] Yoshii H., Buche F., Tekeuchi N., Terrol C., Ohgawara M., Furuta T.: Effects of protein on retention of ADH enzyme activity encapsulated in trehalose matrices by spray drying. *J. Food Eng.*, 2007, 87 (1), 34-39.
- [28] Zhang S., Lei H., Gao X., Xiong X., Wu W.D., Wu Z., Chen X.D.: Fabrication of uniform enzyme-immobilized carbohydrate microparticles with high enzymatic activity and stability via spray drying and spray freeze drying. *Powder Technology*, 2018, 330, 40-49.
- [29] Żubrowski D., Lazar Z., Robak M.: Optymalizacja składu podłoża z sacharozą do biosyntezy cytrynianu oraz inwertazy przez *Yarrowia lipolytica* A-101-B56-5 w warunkach hodowli stacjonarnych w mikroanalizatorze Bioscreen C. *Acta Sci. Polon. Biotechnologia*, 2013, 12 (3), 31-40.

BIOSYNTHESIS AND SPRAY-DRYING OF INVERTASE FROM *YARROWIA LIPOLYTICA*

S u m m a r y

Invertase is an important enzyme commonly used in the food industry, especially in the confectioners' trade. Invertase preparations available on the market contain the enzyme from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* in a liquid form. The search for new sources of invertase and the obtainment of more stable preparations (powders) may favourably increase the offer for the food industry. Lyophilisation, fluid bed drying and even spray-drying are used to obtain powdered enzyme preparations.

The objective of the research study was to evaluate the process of invertase biosynthesis by a genetically modified Polish *Yarrowia lipolytica* strain from glycerol and to produce a powder of this enzyme by spray-drying. The biosynthesis of the enzyme secreted by yeast was conducted in three independent bioreactor cultures (H1, H2 and H3) with glycerol as the main carbon source. In one bioreactor culture there were obtained 15926 to 40710 invertase units (U) of a specific activity ranging 96.8 ÷ 645.6 U/mg of protein. For spray-drying 3690 ml of mixed post-culture liquid was used; its specific activity was 263.4 U/mg of protein. During spray-drying with 1 % of methylcellulose added 198.12 g of powder was collected and its specific activity was 113.4 U/mg of protein. The powdered invertase from *Y. lipolytica* had lower pH and temperature optima than the native enzyme and was more thermostable. Under the applied conditions of spray-drying the invertase lost 67 % of the activity, thus further research should be conducted into the optimisation of spray-drying parameters.

Key words: *Yarrowia lipolytica*, invertase, spray-drying, biosynthesis ☒