

JOLANTA KRZYCZKOWSKA, IZABELA STOLARZEWICZ, DOMINIKA BELLOK, MAŁGORZATA BELLOK, EWA BIAŁECKA-FLORJAŃCZYK

WPLYW MODYFIKACJI POŻYWKI NA BOKATALITYCZNE WŁAŚCIWOŚCI DROŻDŻY

Streszczenie

Drożdże stanowią bogate źródło enzymów wykorzystywanych w procesach biotechnologicznych przemysłu spożywczego. Działanie enzymów polega na katalizowaniu reakcji chemicznych nie tylko w organizmach żywych, ale także i poza nimi, zatem drożdże mogą również spełniać ważną rolę w syntezach chemicznych. Z punktu widzenia przetwarzania produktów spożywczych szczególnie istotne są reakcje estryfikacji i hydrolizy estrów.

Celem pracy było określenie wpływu składu pożywki na aktywność katalityczną trzech gatunków drożdży *Rhodotorula glutinis*, *Pichia jadinii* i *Saccharomyces cerevisiae*, na przykładzie reakcji modelowej, jaką jest hydroliza laurynianu fenylu. Badane gatunki drożdży, celem porównania, hodowano w standardowych warunkach (podłoże YPD) oraz na pożywkach wzbogacanych w różne źródła azotu oraz węgla.

Najsukuteczniejsze w hydrolizie estru, przy udziale w pożywce hodowanej oliwy z oliwek, były drożdże z gatunku *Pichia jadinii*, (ok. 50 % przereagowania laurynianu fenylu po 10 h, w porównaniu z 8 % przereagowaniem przy standardowej pożywce YPD), natomiast gatunek *Rhodotorula glutinis* najsukuteczniej hydrolizował badany ester podczas hodowli w obecności mocznika (powyżej 50 % po 5 h w porównaniu z 8 % przy zastosowaniu YPD). W przypadku *Saccharomyces cerevisiae*, hodowanego w obecności oliwy z oliwek, przereagowanie rzędu 50 % osiągnięto dopiero po 40 h. Można zatem wnioskować, że właściwe modyfikacje pożywki pozwalają na stymulowanie lipolitycznych zdolności poszczególnych gatunków drożdży.

Słowa kluczowe: lipazy, *Rhodotorula glutinis*, *Pichia jadinii*, *Saccharomyces cerevisiae*, pożywka mikrobiologiczna

Wprowadzenie

Drożdże wykorzystywane są w biotechnologii i mikrobiologii żywności, zarówno w procesach fermentacyjnych, jak i w przekształcaniu i wzbogacaniu produktów spo-

Mgr inż. J. Krzyczkowska, dr inż. I. Stolarzewicz, Katedra Chemii, mgr inż. D. Bellok, mgr inż. M. Bellok, dr hab. E. Białecką-Florjańczyk, prof. SGGW, Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Oceny Żywności, Wydz. Nauk o Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, ul. Nowoursynowska 159 C, 02-776 Warszawa

żywczych. Stanowią one bogate źródło enzymów, spośród których ważną grupą o wszechstronnym zastosowaniu są lipazy. Przemysłowe wykorzystanie lipaz dotyczy restrukturyzacji tłuszczów, produkcji związków smakowo-zapachowych, produktów specjalnego przeznaczenia czy bioemulgatorów; ponadto odgrywają one ważną rolę jako selektywne katalizatory reakcji chemicznych, przede wszystkim hydrolizy i syntezy estrów [4, 5]. Handlowe lipazy pochodzenia mikrobiologicznego wydzielane są np. z takich drożdży, jak *Candida antarctica*, *Candida rugosa* czy *Candida cylindracea*; ciągle jednak poszukuje się nowych mikroorganizmów zdolnych do produkcji lipaz. Lipazy z drożdży są szczególnie cenione w procesach biotechnologicznych, ponieważ drożdże są postrzegane przez konsumentów jako bezpieczne (znajdują się na liście GRAS) [10]. Z danych literaturowych wynika, że również inne gatunki drożdży np. *Rhodotorula glutinis* [3], *Geotrichum candidum* [7], a także *Saccharomyces cerevisiae* [6, 8, 9] wytwarzają pewne ilości lipaz. Poszczególne gatunki drożdży charakteryzują się różną zdolnością do biosyntezy lipaz, zarówno pozakomórkowych, jak i wewnątrzkomórkowych; zależy ona między innymi od składu podłoża i warunków, w których prowadzona jest hodowla.

Celem pracy było określenie wpływu składu podłoża hodowlanego na aktywność hydrolityczną drożdży *Pichia jadinii* i *Rhodotorula glutinis*, a następnie dokonanie porównania z wynikami drożdży piekarskich *Saccharomyces cerevisiae*. Badania przeprowadzono na przykładzie reakcji modelowej, którą była hydroliza laurynianu fenylu. Kwas laurynowy (dodekanowy) należy do kwasów tłuszczowych, zatem postęp hydrolizy jego estrów jest ściśle związany z obecnością lipaz w środowisku reakcji.

Materiał i metody badań

Do badań użyto drożdży: *Rhodotorula glutinis*, *Pichia jadinii* i *Saccharomyces cerevisiae*, pochodzących z kolekcji Czystych Kultur Zakładu Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności SGGW w Warszawie oraz liofilizowanych drożdży piekarskich firmy Lesaffre. Materiał mikrobiologiczny przechowywano w temp. 4 °C, na skosach YPD (2 % glukozy, 2 % peptonu, 1 % ekstraktu drożdżowego, pH = 5) z dodatkiem 2 % agaru. Podczas hodowli wgłębnych wykorzystywano płynne podłoże namnażające YPD oraz podłoża stymulujące wydzielanie lipaz, o zróżnicowanym składzie źródeł węgla (oliwa z oliwek, olej kukurydziany, olej palmowy) i azotu (mocznik, pepton) – dokładny skład podłoży podano w tab. 1. Wszystkie podłoża sterylizowano w autoklawie, w temp. 121 °C przez 5 min.

Doświadczenie rozpoczynano od przeszczepienia materiału biologicznego ze skosów na płynne podłoże YPD. Kolbę płaskodenną o pojemności 500 cm³, wypełnioną 80 cm³ podłoża YPD, przeszczepiano drożdżami pobranymi ze skosów, stosując metodę zmywu przy użyciu 5 cm³ jałowej wody destylowanej. Komórki namnażano przez 48 h, w temp. 28 °C, wytrząsając kolbki na wytrząsarce posuwisto-zwrotnej przy

200 obr./min. Po tym czasie zawiesinę przelewano do wyjałowionych gilz i wirowano przez 10 min przy 1500 obr./min. Otrzymany supernatant zlewano z osadu, a biomasę drożdży przenoszono do kolb płaskodennych (obj. 500 cm³) zawierających 80 cm³ zmodyfikowanego podłoża. Hodowlę prowadzono przez okres kolejnych 5 dni, stosując te same warunki. Następnie zawartość kolb wirowano przez 10 min przy 3500 obr./min, po czym uzyskany supernatant wykorzystywano w reakcji hydrolizy, a w namnożonej biomacie oznaczano zawartość suchej substancji przy użyciu wagosuszarki.

Tabela 1

Skład podłoży hodowlanych (zróżnicowane źródła węgla i azotu) oraz uzysk biomasy.

Composition of culture media (different carbon and nitrogen sources) and cell biomass.

Nr No	Rodzaj podłoża Type of medium	Skład podłoża Composition of medium	Uzysk biomasy [g/l] Cell biomass [g/l]	
			<i>Pichia jadinii</i>	<i>Rhodotorula glutinis</i>
1.	YPD	20 g/l glukozy / glucose 20 g/l peptonu / peptone 10 g/l ekstraktu drożdżowego yeast extract	13,5	16,0
2.	Podłoże z mocznikiem Medium containing urea	20 g/l glukozy / glucose 10 g/l oliwy z oliwek / olive oil 2 g/l mocznika / urea 10 g ekstraktu drożdżowego yeast extract	17,1	16,2
3.	Podłoże azotowe Medium containing nitrogen	20 g/l glukozy / glucose 2 g/l mocznika / urea 3 g/l peptonu / peptone 10 g/l ekstraktu drożdżowego yeast extract	15,8	16,8
4.	Podłoże z olejem palmowym Medium containing palm oil	20 g/l glukozy / glucose 10 g/l oleju palmowego / palm oil 20 g/l peptonu / peptone 10 g/l ekstraktu drożdżowego yeast extract	22,0	26,0
5.	Podłoże z oliwą z oliwek Medium containing olive oil	20 g/l glukozy / glucose 10 g/l oliwy z oliwek / olive oil 20 g/l peptonu / peptone 10g/l ekstraktu drożdżowego yeast extract	18,9	28,9
6.	Podłoże z olejem kukurydzianym Medium containing corn oil	20 g/l glukozy glucose 10 g/l oleju kukurydzianego corn oil 20 g/l peptonu / peptone 10 g/l ekstraktu drożdżowego yeast extract	22,7	25,0

Reakcja hydrolizy

Do kolb płaskodennych (poj. 500 cm³) wprowadzano 90 cm³ supernatantu (w przypadku drożdży liofilizowanych naważano 3 g drożdży, 3 g sacharozy i odmierzano 60 cm³ wody destylowanej) i 0,75 mmola laurynianu fenylu, rozpuszczonego w 0,2 cm³ etanolu. Kolby umieszczano na wytrząsarce posuwisto-zwrotnej (200 obr./min) w temp. 28 °C. Te same warunki zachowano przy prowadzeniu reakcji z drożdżami liofilizowanymi. Postęp reakcji hydrolizy (procentowy ubytek substratu – laurynianu fenylu i przyrost produktu – fenolu) śledzono przez 72 h, pobierając próbki w odstępach 1 h przez pierwsze 6 h, następnie po 24, 48 i 72 h. Mieszaninę reakcyjną analizowano przy użyciu chromatografu gazowego Shimadzu GC-171, kolumna kapilarna BPX 70, detektor płomieniowo-jonizacyjny, gaz nośny - azot, stosując następujący profil zmian temperatury: 120 °C przez 1 min, przyrost 30 °C/1 min do 180 °C, kolejno przyrost 5 °C/1min do 230 °C i przetrzymanie w tej temperaturze przez 5 min. Rejestrację rozdziału chromatograficznego laurynianu fenylu i fenolu dokonywano z użyciem programu Chromax 2005.

Wyniki i dyskusja

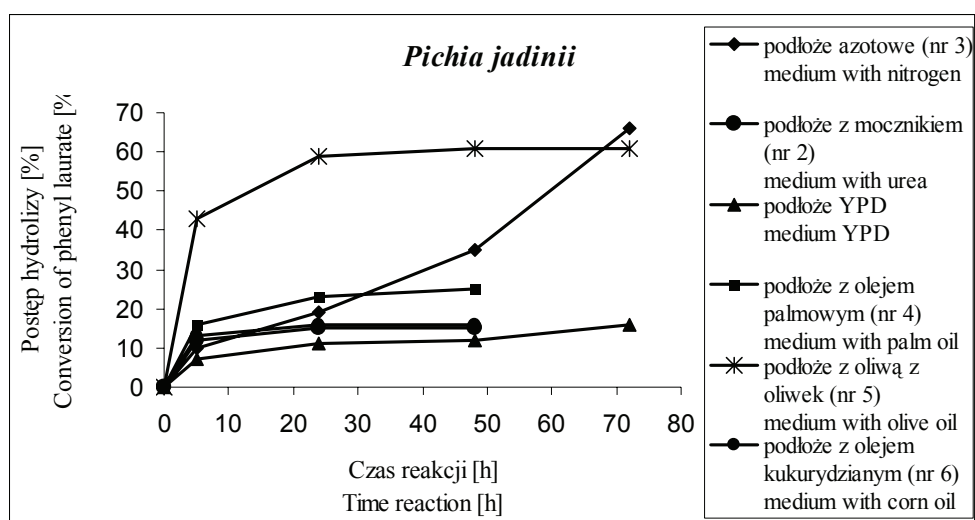
Postęp hydrolizy laurynianu fenylu przy udziale drożdży *Pichia jadinii* i *Rhodotorula glutinis*, hodowanych na pożywkach wzbogacanych w różne źródła węgla (przede wszystkim substancje lipidowe, takie jak oleje: palmowy, kukurydziany bądź oliwa z oliwek) i azotu przedstawiono na rys. 1. i 2. W tab. 1. podano skład stosowanych podłoży hodowlanych oraz uzysk biomasy z poszczególnych hodowli.

W celu porównania wybrane reakcje przeprowadzono z udziałem drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, hodowanych w analogicznych warunkach oraz dostępnych handlowo liofilizowanych drożdży piekarskich (Lesaffre) (rys. 3). Te ostatnie są najczęściej stosowane w laboratoriach chemicznych, ponieważ ich użycie nie wymaga zaplecza mikrobiologicznego.

W standardowym podłożu YPD drożdże *Rhodotorula glutinis* wykazywały znacznie większą aktywność katalityczną (całkowite przereagowanie po 70 h) niż *Pichia jadinii* (ok. 16 % w tym samym czasie).

W przypadku *Rhodotorula glutinis* zastosowanie podłoży ze zwiększoną zawartością azotu (podłoże nr 2 i 3) wpływało korzystnie na przebieg reakcji; całkowite przereagowanie osiągnięto po 48 h w porównaniu z 70 % przy użyciu podłoża YPD, przy czym relatywnie największe różnice zaobserwowano w pierwszej fazie reakcji (do 5 h). Natomiast wzbogacenie podłoża w składniki lipidowe (podłoża nr 4, 5, 6) hamowało, w porównaniu z YPD, efekt katalityczny. Drożdże *Pichia jadinii* najefektywniej katalizowały hydrolizę badanego estru, gdy zastosowano supernatant z hodowli z dodatkiem oliwy z oliwek – przereagowanie rzędu 40 % po upływie 5 h w porównaniu

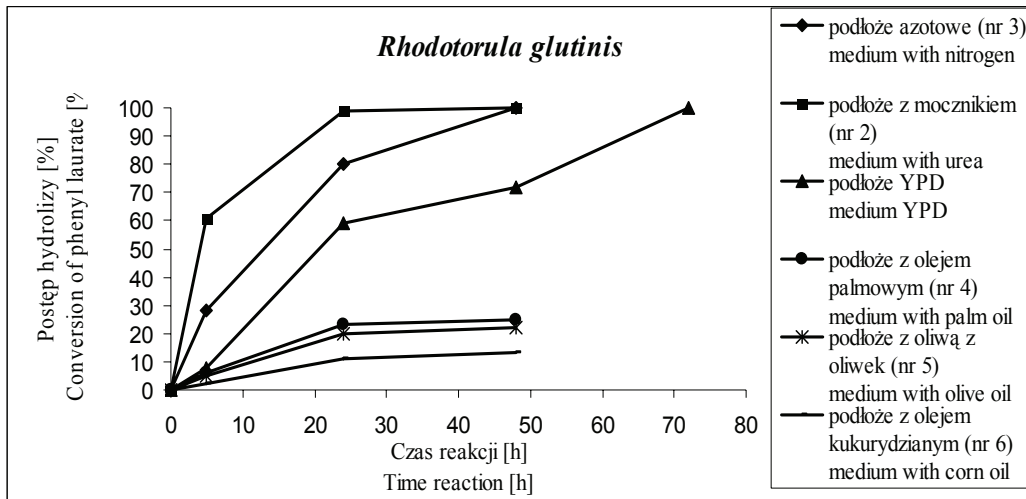
z 7 % po tym samym czasie w podłożu YPD. Po dodaniu do podłoży oleju palmowego bądź oleju kukurydzianego stymulacja lipolitycznych zdolności *Pichia jadinii* była znikoma. Wynikać to może z różnicy w składzie kwasów tłuszczowych zastosowanych olejów roślinnych. O ile podłoże ze zwiększoną zawartością azotu było skuteczne w obu przypadkach, to obecność mocznika wpłynęła korzystnie tylko na hydrolizę w obecności drożdży *Rhodotorula glutinis*. Można to powiązać ze zdolnością tych drożdży do produkcji ureazy, dzięki czemu są one w stanie, w odróżnieniu od *Pichia jadinii*, metabolizować mocznik.



Rys. 1. Wpływ składu podłoża hodowlanego na aktywność katalityczną drożdży *Pichia jadinii* w reakcji hydrolizy laurynianu fenylu.

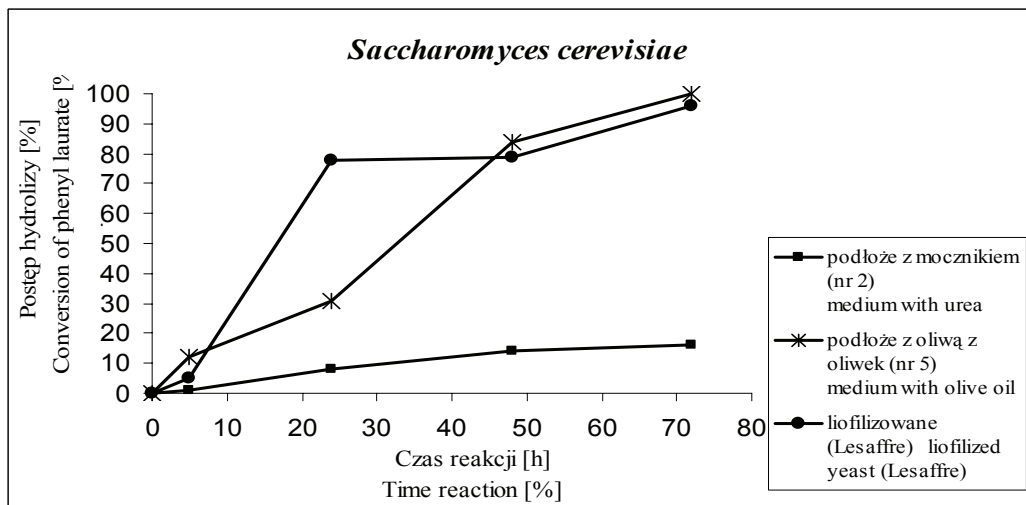
Fig. 1. Effect of the composition of medium on the catalytic activity of *Pichia jadinii* yeast under the hydrolysis reaction of phenyl laurate.

Przy użyciu drożdży *Pichia jadinii* zaobserwowano zahamowanie wzrostu prze-reagowania po upływie ok. 20 h od rozpoczęcia hydrolizy. Można przypuszczać, że po tym okresie następował spadek aktywności lipaz, co praktycznie oznacza zatrzymanie postępu reakcji. Drożdże *Rhodotorula glutinis* wykazywały podobny efekt w warunkach niestymulujących zdolności lipolitycznych (podłoże nr 4, 5 i 6). Natomiast w pozostałych przypadkach (podłoże YPD i podłoże ze zwiększoną zawartością azotu) nie zaobserwowano zahamowania reakcji przed osiągnięciem jej zakończenia. Również w przypadku drożdży *Pichia jadinii*, w obecności podłoża azotowego (nr 3), stymulującego wydzielanie lipaz, nie nastąpiło zahamowanie reakcji po upływie 70 h od jej rozpoczęcia.



Rys. 2. Wpływ składu podłoża hodowlanego na aktywność katalityczną drożdży *Rhodotorula glutinis* w reakcji hydrolizy laurynianu fenylu.

Fig. 2. Effect of the composition of medium on the catalytic activity of *Rhodotorula glutinis* under the hydrolysis reaction of phenyl laurate.



Rys. 3. Wpływ składu podłoża hodowlanego na aktywność katalityczną drożdży *Saccharomyces cerevisiae* w reakcji hydrolizy laurynianu fenylu.

Fig. 3. Effect of the composition of medium on the catalytic activity of *Saccharomyces cerevisiae* on the hydrolysis of phenyl laurate.

Wyniki te częściowo pokrywają się z rezultatami otrzymanymi w przypadku typowo lipolitycznych drożdży, takich jak *Candida rugosa* [2] czy *Yarrowia lipolytica* [1] i wskazują na indukujący wpływ oliwy z oliwek (*Pichia*) czy możliwości przyswajania azotu (*Pichia*, *Rhodotorula*) na biosyntezę enzymów lipolitycznych.

Podłoża lipidowe powodują wzrost ilości otrzymanej biomasy, natomiast nie stwierdzono jednoznacznej korelacji pomiędzy ilością biomasy i zdolnością lipolityczną badanych szczepów (tab. 1).

Najbardziej efektywne z zastosowanych podłoży (tj. podłoże z dodatkiem mocznika i oliwy z oliwek) użyto do reakcji przeprowadzonych w obecności drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. W reakcjach z udziałem tych drożdży dodatek mocznika hamował hydrolizę, natomiast w obecności oliwy z oliwek hydroliza przebiegała, w przybliżeniu, ze stałą szybkością, osiągając całkowite przereagowanie po upływie 72 h. Podobny stopień zaawansowania hydrolizy laurynianu fenylu otrzymano przy bezpośrednim użyciu w reakcji dostępnych handlowo liofilizowanych drożdży piekarskich (Lesaffre). Zaobserwowano jednak istotną różnicę w profilu zmian stężenia produktu w czasie: przy użyciu supernatantu otrzymanego w obecności oliwy reakcja hydrolizy rozpoczynała się od momentu dodania substratu, natomiast przy użyciu wyłącznie drożdży liofilizowanych reakcja wymagała dość długiego okresu inkubacji (ok. 7 h). Prawdopodobnie lipazy pozakomórkowe pojawiają się dopiero w ostatnim etapie logarytmicznej fazy wzrostu, wcześniej były gromadzone wewnątrz komórek.

Wnioski

1. Właściwa modyfikacja pożywki przy zastosowaniu poszczególnych gatunków drożdży przyczynia się istotnie do zwiększania efektu katalitycznego w reakcji hydrolizy estrów kwasów tłuszczowych.
2. Mocznik okazał się najlepszym źródłem wzmagającym zdolności lipolityczne drożdży *Rhodotorula glutinis*.
3. Spośród zastosowanych podłoży lipidowych, przy użyciu drożdży *Pichia jadinii*, efekt katalityczny zaobserwowano jedynie w przypadku dodania oliwy z oliwek.
4. Liofilizowane drożdże piekarskie *Saccharomyces cerevisiae* są zdolne do katalizowania hydrolizy estrów kwasów tłuszczowych; prawdopodobnie zatem mogą być producentem lipaz, pod warunkiem odpowiednio długiego czasu reakcji, umożliwiającego wydzielenie lipaz pozakomórkowych.

Praca była prezentowana podczas XIII Ogólnopolskiej Sesji Sekcji Młodej Kadry Naukowej PTTŻ, Łódź, 28 - 29 maja 2008 r.

Literatura

- [1] Corzo G., Revah S.: Production and characteristics of the lipase from *Yarrowia lipolytica* 681. Bio-resource Technol., 1999, **70**, 173-180.
- [2] Dalmau E., Montesinos J.L., Lotti M., Casas C.: Effect of different carbon sources on lipase production by *Candida rugosa*. Enzyme Mikrob. Technol., 2000 **26**, 657-663.
- [3] Hatzinikolaou, D.G., Kourentzi E., Stamatis H., Christakopoulos P., Kolisis F.N., Kekos D., Macris B.J.: A novel lipolytic activity of *Rhodotorula glutinis* cells: Production, partial characterization and application in the synthesis of esters. J. Bios. Bioeng., 1999, **88**, 53-56.
- [4] Jaeger K-E., Eggert T.: Lipases for biotechnology. Curr. Opin. Biotech., 2002, **13**, 390-397.
- [5] Krzyczkowska J., Stolarzewicz I. Wpływ immobilizacji na aktywność katalityczną drożdży piekarskich *Saccharomyces cerevisiae*. Doktorant a rozwój nauk rolniczych. Wielokierunkowość badań w rolnictwie. Zeszyty Naukowe AR w Krakowie, 2008, **444 (2)**, 413-420.
- [6] Nurminen T., Suomalainen H.: The lipolytic activities of isolated cell envelope fractions of baker's yeast. Biochem. J., 1970, **118**, 759-763.
- [7] Rywińska A., Witkowska D.: Utylizacja odpadów tłuszczowych z udziałem wybranych szczepów *Geotrichum candidum*. Acta Sci. Pol. Biotechnologia, 2006, **5**, 27-38.
- [8] Schousboe I.: Triacylglycerol lipase activity in baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). Bioch. Biophys. Acta, 1976, **450**, 165-174.
- [9] Shirazi S.H., Rahman S.R., Rahman M.M.: Production of extracellular lipases by *Saccharomyces cerevisiae*. World J. Microb. Biotech., 1998, **14**, 595-597.
- [10] Vakhlu J., Kour A.: Yeast lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. Electronic J. Biotechnol., 2006, **9 (1)**.

EFFECT OF MEDIUM MODIFICATION ON BIO-CATALYTIC PROPERTIES OF YEASTS

Summary

Yeasts constitute a rich source of enzymes used in biotechnological processes in food industry. The activity of enzymes consists in catalyzing chemical reactions not only in live organisms, but, also, outside those live organisms, thus, yeasts can also fulfil an important role in chemical syntheses. From the point of view of food products processing, the reactions of esterification and hydrolysis of esters are particularly essential.

The objective of this paper was to determine the impact of medium composition on the catalytic activity of three kinds of yeasts: *Pichia jadinii*, *Rhodotorula glutinis*, and *Saccharomyces cerevisiae* exemplified by a model reaction of hydrolysis of phenyl laurate. The yeasts studied were cultured under the typical conditions (YDP medium) and on media enriched by various sources of nitrogen and carbon.

The *Pichia jadinii* yeasts proved to be most efficient in the hydrolysis of esters with a medium containing olive oil (about 50 % of the conversion of phenyl laurate after 10 h compared to 8 % of conversion using a standard YPD medium). As for *Rhodotorula glutinis*, the ester studied hydrolyzed most efficiently while being culture with the participation of urea (more than 50 % after the 5 h compared with 8 % with the YPD medium applied). In the case of *Saccharomyces cerevisiae*, cultured in the presence of olive oil, a level of 50% of the conversion was reached as late as after 40 h. Therefore, it can be concluded that proper modifications of medium allow for the stimulation of lipolytic activity of individual kinds of yeasts.

Key words: lipase, *Rhodotorula glutinis*, *Pichia jadinii*, *Saccharomyces cerevisiae*, microbiological medium 