

JOLANTA KRZYCZKOWSKA, IZABELA STOLARZEWICZ,
EWA BIAŁECKA-FLORJAŃCZYK

**BADANIE KATALITYCZNEGO DZIAŁANIA DROŹDŹY
PIEKARSKICH *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* W REAKCJI
HYDROLIZY ESTRÓW Z WYKORZYSTANIEM
CHROMATOGRAFII GAZOWEJ**

Streszczenie

Celem pracy była ocena wpływu długości alifatycznego łańcucha węglowego kwasów karboksylowych oraz procesu immobilizacji drożdży (w alginianie wapnia lub w poli(alkoholu winylowym) na szybkość i wydajność reakcji hydrolizy estrów fenylowych. Przebieg reakcji śledzono metodą chromatografii gazowej, z zastosowaniem kolumny kapilarnej BPX 70 i detektora płomieniowo-jonizacyjnego. Stwierdzono, że katalityczny efekt drożdży piekarskich *Saccharomyces cerevisiae* zmniejsza się ze wzrostem długości łańcucha kwasu karboksylowego. Immobilizacja drożdży wprawdzie w nieznacznym stopniu zmniejsza szybkość hydrolizy, ale ułatwia wyizolowanie produktu oraz umożliwia wielokrotne wykorzystanie biokatalizatora.

Słowa kluczowe: biotransformacje, drożdże piekarskie, hydroliza, immobilizacja, alginian sodu, poli(alkohol winylowy)

Wprowadzenie

Biotransformacje są ważną i dynamicznie rozwijającą się dziedziną chemii i technologii żywności, w której przekształcenia substratu (także ksenobiotycznego) zachodzą przy udziale wolnych enzymów bądź zawierających je komórek czy tkanek [6]. Najdogodniejszym sposobem prowadzenia procesów biotransformacji jest zastosowanie czystych enzymów. Jest to jednak związane z dużymi kosztami, gdyż wymaga izolacji i oczyszczania odpowiedniej ilości enzymu oraz stałego dostępu do jego źródła. Dlatego też najczęściej stosowanymi biokatalizatorami w procesach biotransformacji są komórki mikroorganizmów.

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

Większość wykorzystywanych w praktyce przekształceń enzymatycznych stanowią biotransformacje z udziałem hydrolaz. Enzymy te katalizują reakcje hydrolizy wiązań estrowych, amidowych i glikozydowych, a w środowisku o niskiej aktywności wody również reakcje, w których tworzą się wyżej wymienione wiązania. Źródłem hydrolaz (np. inwertazy [9], esteraz [4], a także lipaz [10]) są drożdże piekarskie *Saccharomyces cerevisiae*, które ze względu na swe właściwości i bezpieczeństwo w użyciu (znajdują się na liście GRAS) są jednymi z ważniejszych mikroorganizmów dla przemysłu spożywczego. Aktywność esteraz ma także decydujący wpływ na właściwości smakowo-zapachowe produktów żywnościowych poprzez regulację stanu równowagi pomiędzy stężeniem estrów i wolnych kwasów [12]. Dlatego też celowe wydawało się zbadanie zdolności hydrolitycznych drożdży w odniesieniu do różnych estrów. W dotychczasowych pracach [1] stwierdzono, że drożdże piekarskie katalizują wybiórczo reakcję hydrolizy estrów kwasów alifatycznych, podczas gdy estry kwasów aromatycznych nie reagują w tych warunkach.

Celem pracy było określenie wpływu długości łańcucha alifatycznych kwasów karboksylowych na przebieg reakcji hydrolizy estrów kwasów alifatycznych. Ponadto na przykładzie modelowej reakcji hydrolizy octanu fenylu porównano aktywność drożdży liofilizowanych oraz immobilizowanych w alginianie wapnia lub poli(alkoholu winylowym).

Material i metody badań

Badania przeprowadzono z użyciem liofilizowanych drożdży piekarskich *Saccharomyces cerevisiae* produkowanych przez firmę S. I. Lesaffre. Komórki drożdży unieruchamiano wewnątrz żelu pochodzenia naturalnego (alginian wapnia) lub syntetycznego (poli(alkohol winylowy) PVA).

Procesy immobilizacji drożdży prowadzono zgodnie z procedurą opisaną w literaturze [2, 8]. Do kolb płaskodennych o objętości 50 cm³ odważano 0,4 g alginianu sodu bądź 1,6 g alkoholu poliwinylowego i 0,12 g alginianu sodu. Naważki rozpuszczano w 10 cm³ 1 % płynu Ringera, po czym wyjaławiano w autoklawie, w temp. 121 °C przez 20 min. Drożdże liofilizowane aktywowano w 0,85 % roztworze soli fizjologicznej i dodawano do roztworu alginianu w stosunku 1:1. W ten sposób końcowy roztwór zawierał 2 % alginianu sodu bądź 0,6 % alginianu sodu i 8 % PVA. Całość po dokładnym wymieszaniu była wkraplana do 0,2 M roztworu chlorku wapnia lub w przypadku PVA do 0,05 M chlorku wapnia w nasyconym roztworze kwasu borowego. W przypadku obu technik immobilizacji formowane kulki miały średnicę ok. 3 - 4 mm.

Reakcji hydrolizy poddawano estry fenylowe następujących kwasów alkanokarboksylowych: octowego, propanowego, heksanowego (kapronowego) CH₃(CH₂)₄COOH, heptanowego CH₃(CH₂)₅COOH, oktanowego (kaprylowego)

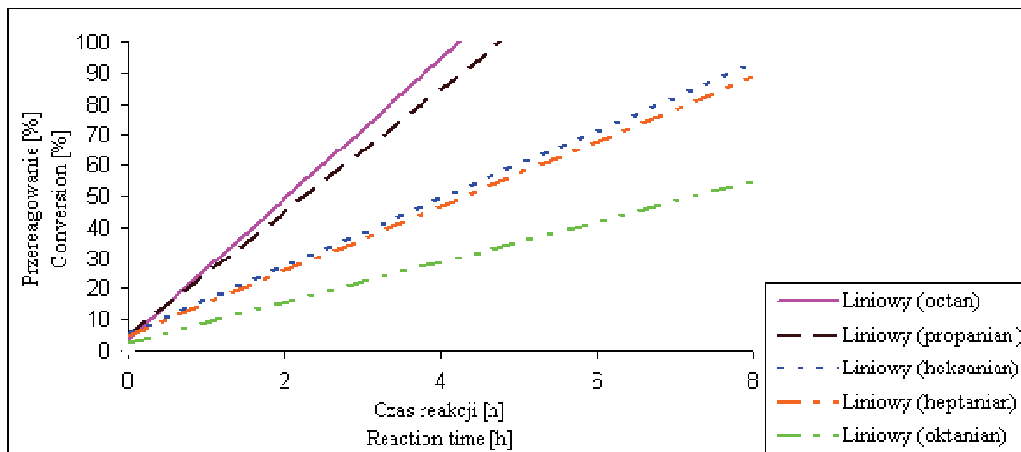
CH₃(CH₂)₆COOH i dodekanowego (laurynowego) CH₃(CH₂)₁₀COOH. Każdy wariant analizowano (drożdże liofilizowane lub immobilizowane) dwukrotnie.

Do kolby okrągłodennej naważano 3 g drożdży (w przypadku drożdży immobilizowanych uwzględniano zawartość drożdży w masie immobilizatu), 3 g sacharozy oraz dodawano 60 cm³ wody destylowanej. Po wymieszaniu dodawano 1,5 mmol odpowiedniego estru rozpuszczonego w niewielkiej ilości etanolu (0,5 cm³). Reakcję prowadzono na wytrząsarce posuwisto-zwrotnej SM-30 Control (Edmund Buhler, Niemcy) o częstotliwości drgań 320 cykli na min, w temp. pokojowej, przez 8 h. Próbkę do oznaczeń, w ilości 3 ml, pobierano w odstępach jednogodzinnych, za wyjątkiem pierwszej, którą pobierano już po 30 min. Z pobranych próbek ekstrahowano chloroformem ester oraz produkt jego hydrolizy - fenol. Próbkę mieszaniny reakcyjnej poddawano analizie przy użyciu chromatografu gazowego Shimadzu GC-171 wyposażonego w detektor płomieniowo-jonizacyjny i kolumnę kapilarną wypełnioną fazą stacjonarną BPX 70 o długości 30 m, średnicy wewnętrznej 0,22 i grubości filmu 0,25 μm. Jako gaz nośny zastosowano azot. Korzystano z następującego profilu zmian temperatury: 60 °C przez 1 min, przyrost 10 °C/min do 200 °C, 5 min w 200 °C. Temp. injektora 225 °C, a detektora 250 °C. Objętość nastrzykiwanej próby wynosiła 1 μl. Rejestrację rozdziału chromatograficznego dokonywano z użyciem programu Chromax 2005.

Wyniki i dyskusja

Analizując wyniki uzyskane w badaniach nad katalitycznym działaniem drożdży piekarskich w reakcji hydrolizy estrów: octanu, propanianu, heksanianu (kapronianu), heptanianu, oktanianu (kaprylanu) i dodekianianu (laurynianu) fenylu stwierdzono, we wszystkich przypadkach, liniową zależność pomiędzy stężeniem produktu a czasem hydrolizy (rys. 1), co oznacza, że w badanym zakresie stężeń wystąpił zerowy rząd reakcji (szybkość reakcji jest stała). Ponadto zaistniał wyraźny związek szybkości reakcji hydrolizy i długości łańcucha węglowego. Szybkość prowadzonej reakcji malała wraz ze wzrostem długości łańcucha węglowego w takim stopniu, że w przypadku laurynianu fenylu po upływie 8 h praktycznie nie zaobserwowano postępu reakcji, chociaż octan przereagował całkowicie już po 4 h. Oznacza to, że w zastosowanych warunkach reakcji aktywnymi enzymami były przede wszystkim esterazy, ponieważ estry wyższych kwasów tłuszczowych (np. laurynianu), jako podatne na działanie enzymów lipolitycznych, nie ulegają hydrolizie.

Immobilizacja jest procesem wiązania biokatalizatora z wielkocząsteczkowym nośnikiem. Zarówno enzymy, jak i całe komórki, można immobilizować metodami chemicznymi lub fizycznymi. Od rodzaju matrycy i sposobu wiązania zależy ilość, aktywność, stabilność, optimum pH i temperatury działania immobilizowanego biokatalizatora [7].



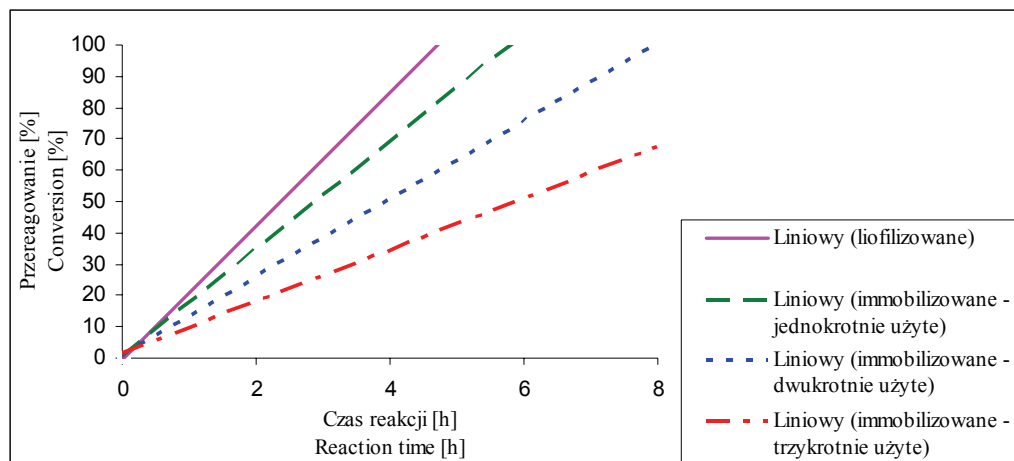
Objaśnienia: / Explanatory notes:

Liniowy (octan) / Linear (acetate); Liniowy (propanian) / Linear (propanoate); Liniowy (heksanian) / Linear (hexanoate); Liniowy (heptanian) / Linear (heptanoate); Liniowy (oktanian) / Linear (octanoate)

Rys. 1. Porównanie postępu reakcji hydrolizy estrów: octanu, propanianu, heksanianu, heptanianu i oktanianu fenylu przy użyciu drożdży liofilizowanych.

Fig. 1. Comparison of the hydrolysis reaction progresses of phenyl esters: acetate, propanoate, hexanoate, heptanoate, and octanoate using the lyophilized baker's yeast.

W porównaniu z tradycyjnymi metodami wykorzystującymi wolne komórki zastosowanie immobilizowanych biokatalizatorów wiąże się z technologicznymi i ekonomicznymi korzyściami. Immobilizacja pozwala na prowadzenie przemian w mniejszych objętościach, zwiększa stabilność termiczną enzymów i ich odporność na działanie odczynników organicznych, ogranicza występowanie zakażeń mikrobiologicznych oraz obniża pracochłonność i koszt procesu (wielokrotne wykorzystanie biokatalizatora) [7]. Ocena wpływu procesu immobilizacji w alginianie wapnia i PVA na aktywność katalityczną drożdży piekarskich wykonano na podstawie reakcji hydrolizy octanu fenylu. Wykorzystywany w immobilizacji alginian jest polisacharydem zbudowanym z reszt kwasu D-mannuronowego i L-guluronowego połączonych wiązaniami 1, 4. Otrzymuje się go z wodorostów lub niektórych szczepów bakteryjnych [5]. Cechą charakterystyczną alginianu jest jego pęcznienie, a z jonami dwu- i trójwartościowymi tworzenie żeli. Immobilizacja z użyciem alginianu zachodzi w łagodnych warunkach, jest łatwa do zrealizowania i tania. Jednak naturalne polimerowe żele, w porównaniu z syntetycznymi, wykazują większą wrażliwość na ścieranie i są niestabilne chemicznie. Stąd też często wykorzystuje się immobilizację w matrycach syntetycznych [9]. Poli(alkohol winylowy) w porównaniu z innymi syntetycznymi hydrożelami (np. akryloamidem) jest związkami nietoksycznym, tanim, łatwo dostępnym i stabilnym chemicznie [3, 6].

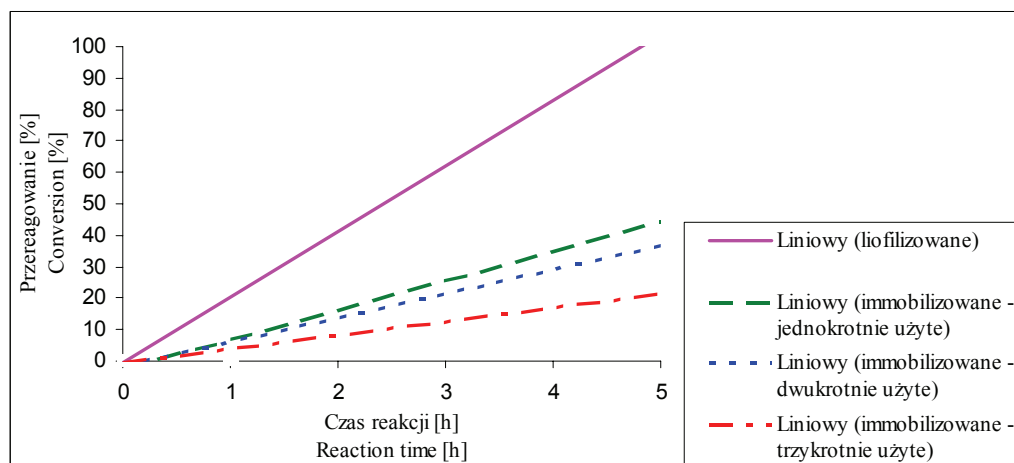


Objaśnienia: / Explanatory notes:

Liniowy (liofilizowane) / Linear (lyophilized yeast); Liniowy (immobilizowane – jednokrotnie użyte) / Linear (immobilized and one time applied yeast); Liniowy (immobilizowane – dwukrotnie użyte) / Linear (immobilized and two times applied yeast); Liniowy (immobilizowane – trzykrotnie użyte) / Linear (immobilized and two three times applied yeast)

Rys. 2. Porównanie postępu hydrolizy octanu fenylu przy użyciu drożdży liofilizowanych oraz immobilizowanych w alginianie wapnia użytych wielokrotnie.

Fig. 2. Comparison of the hydrolysis reaction progresses of phenyl acetate using the lyophilized yeast and the yeast immobilized in calcium alginate and multiply applied.



Objaśnienia jak na rys. 2. / Explanatory notes as in. Fig. 2.

Rys. 3. Porównanie postępu hydrolizy octanu fenylu przy użyciu drożdży liofilizowanych oraz immobilizowanych w poli(alkoholu winylowym) użytych wielokrotnie.

Fig. 3. Comparison of the hydrolysis progress of phenyl acetate using the lyophilized yeast and the yeast immobilized in poly(vinyl alcohol) (PVA) and multiply applied.

Porównując wyniki uzyskane przy użyciu drożdży immobilizowanych w alginianie wapnia oraz poli(alkoholu winylowym) z wartościami otrzymanymi z zastosowaniem wolnych komórek (rys. 2 i 3) można stwierdzić, że immobilizacja spowodowała niewielkie obniżenie aktywności katalitycznej. Na straty aktywności biokatalizatora w wyniku immobilizacji mogło złożyć się kilka czynników. Przede wszystkim unieruchomienie komórek drożdży wewnątrz matrycy spowodowało pojawienie się oporów ruchu masy związanych z dyfuzją substratu i produktów. W przypadku poli(alkoholu winylowego) (rys. 3) aktywność biokatalizatora była relatywnie niższa w porównaniu z immobilizacją w alginianie wapnia (rys. 2), a dodatkowo ujawnił się wpływ kwasu borowego. Immobilizacja mikroorganizmów w matrycy PVA sprowadza się bowiem do zastosowania w procesie żelowania silnie kwaśnego roztworu kwasu borowego, który w stężeniu nasycenia roztworu może działać toksycznie na immobilizowany biokatalizator [11]. Jednak immobilizacja upraszcza znacznie etap oddzielenia biokatalizatora od produktu oraz umożliwia wielokrotne jego użycie. Z wyników przedstawionych na wykresie zarówno w przypadku immobilizacji w alginianie wapnia, jak i poli(alkoholu winylowym), wynika, że jest to możliwe. Przy dwukrotnym lub trzykrotnym użyciu drożdży immobilizowanych obserwuje się jedynie niewielkie obniżenie ich aktywności.

Wnioski

1. Efekt katalityczny drożdży piekarskich w reakcji hydrolizy estrów zmniejsza się w miarę wzrostu długości łańcucha kwasu alkanokarboksylowego wchodzącego w skład estru. Można zatem przyjąć, że w stosowanych warunkach reakcji aktywność katalityczna drożdży związana jest głównie z obecnością esteraz, ponieważ estry wyższych kwasów tłuszczowych podatne są przede wszystkim na działanie enzymów lipolitycznych.
2. Immobilizacja drożdży w niewielkim stopniu obniża ich aktywność katalityczną, (w większym stopniu w przypadku PVA), zawsze jednak znacznie ułatwia proces wyodrębnienia produktów z mieszaniny reakcyjnej oraz pozwala na wielokrotne użycie katalizatora.

Praca była prezentowana podczas VI Konferencji Naukowej nt. „Nowoczesne metody analityczne w zapewnieniu jakości i bezpieczeństwa żywności”, Warszawa, 6 - 7 grudnia 2007 r.

Literatura

- [1] Białecka-Florjańczyk E., Majewska E., Kapturowska A., Stobnicka A.: Chemoselektywna hydroliza wiązań estrowych z udziałem drożdży piekarskich *Saccharomyces cerevisiae*. Mat. III Kongresu Biotechnologii w Poznaniu, 9 - 12 wrzesień 2007.

- [2] Chang Ch., Tseng S.: Immobilization of *Alcaligenes eutrophus* using PVA crosslinked with sodium nitrate. *Biotechnol. Techn.*, 1998, **12** (12), 865-868.
- [3] Dave R., Madamwar D.: Esterification in organic solvents by lipase immobilized in polymer of PVA-alginate-boric acid. *Process Biochem.*, 2006, **41**, 951-955.
- [4] Degrassi G., Uotila L., Klima R., Venturi V.: Purification and properties of an esterase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and identification of the encoding gene. *Appl. and Environ. Microbiology*, 1999, **65** (8), 3470-3472.
- [5] Draget K., Skjak-Braek G., Smidsrod O.: Alginate based new materials. *Int. J. Biol. Macromol.*, 1997, **21**, 47-55.
- [6] Faber K.: *Biotransformations in organic chemistry*. Springer Verlag. Berlin 2000.
- [7] Kourkoutas Y.: Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. *Food Microbiol.*, 2004, **21**, 377-397.
- [8] Krzyczkowska J, Stolarzewicz I.: Wpływ immobilizacji na aktywność katalityczną drożdży piekarskich *Saccharomyces cerevisiae* *Zesz. Nauk. UR w Krakowie*. Artykuł w druku.
- [9] Milovanović A., Božić N., Vujčić Z.: Cell wall invertase immobilization in calcium alginate beads *Food Chem.*, 2007, **104** (1), 81-86.
- [10] Nurminen T., Oura E., Suomalainen H.: The enzymic composition of the isolated cell wall and plasma membrane of baker's yeast. *Bioch. J.* 1970, **116** (1), 61-69.
- [11] Parascandola P., Branduardi P., Alteriss E.: PVA-gel as an effective matrix for yeast strain immobilization aimed at heterologous protein production. *Enzyme and Microbial Technol.*, 2006, **38**, 184-189.
- [12] Varstrepren K.I.: Flavor-active esters: Adding fruitiness to beer. *J. Bios. Bioeng.*, 2003, **96** (2), 110-118.

RESEARCH INTO THE CATALYTIC EFFECT OF SACCHAROMYCES CEREVISIAE BAKER'S YEAST ON THE HYDROLYSIS OF ESTERS USING GAS CHROMATOGRAPHY

S u m m a r y

The objective of the research was to assess the effect of carbon chain length of carboxylic acids and of the immobilization process of yeast (running in the calcium alginate or in poly(vinyl alcohol) on the rate and yield of the hydrolysis reaction of phenyl esters. The course of this reaction was monitored using a gas chromatography method with a BPX 70 capillary column and a flame-ionization detector applied. It was found that the catalytic effect of the *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeast decreased with the increasing carbon chain length of carboxylic acids. Although the immobilization of yeast caused a slight drop in the rate of hydrolysis, however, it also facilitated the isolation of product and made it possible to multiply use the biocatalyst.

Key words: biotransformation, baker's yeast, hydrolysis, immobilization, calcium alginate, poly(vinyl alcohol) ☒