

DOROTA NOWAK, AGNIESZKA NOWAK

KINETYKA WZROSTU BIOMASY ORAZ BIOSYNTETY ENZYMÓW AMYLOLITYCZNYCH PRZEZ DROŹDŹE *SACCHAROMYCOPSIS FIBULIGERA* PODCZAS HODOWLI W BIOREAKTORZE

Streszczenie

Celem pracy była ocena wpływu zastosowania różnych źródeł węgla w podłożu indukcyjnym na przebieg biosyntezy enzymów amyloolitycznych podczas hodowli drożdży *Saccharomyces fibuligera*, prowadzonej w bioreaktorze. Podłoża indukcyjne zawierały 2 % skrobi: ziemniaczanej natywnej, ziemniaczanej zmodyfikowanej lub tapiokowej. W trakcie hodowli w próbkach mierzono gęstość optyczną (OD), plon biomasy oraz aktywność amylaz metodą biochemiczną Bernfelda. Największy przyrost biomasy ($14 \text{ g}_{\text{s.s.}}/\text{dm}^3$) oraz najwyższą aktywność enzymów amyloolitycznych w podłożu hodowlanym ($35 \mu\text{mol}$ maltozy/ $\text{cm}^3 \cdot \text{min}$) uzyskano, gdy źródłem węgla w medium hodowlanym była natywna skrobia ziemniaczana.

Słowa kluczowe: skrobia ziemniaczana, skrobia tapiokowa, skrobia modyfikowana, podłoże indukcyjne, produkcja amylaz

Wprowadzenie

Atrakcyjność preparatów enzymatycznych związana jest z ich szerokim zastosowaniem niemal w każdej gałęzi przemysłu spożywczego [3]. Ułatwiają one otrzymanie pożądanych zmian surowca, poprawę jakości produktu gotowego oraz zmniejszenie kosztów produkcji [16].

W skali przemysłowej otrzymuje się enzymy, wykorzystując do tego celu mikroorganizmy. Procesy biosyntezy ulegają stałemu rozwojowi spowodowanemu głównie nowymi możliwościami wykorzystania inżynierii genetycznej do modyfikacji organizmów oraz nowych rozwiązań konstrukcyjnych bioreaktorów [5, 6]. Dzięki inżynierii genetycznej otrzymuje się obecnie preparaty o wybranej ściśle określonej specyficzności, a dzięki temu o nowych właściwościach i zastosowaniach w przemyśle. Mimo to, organizmy genetycznie zmodyfikowane cechuje duża zmienność i niska stabilność

w procesach technologicznych. Dlatego też w dalszym ciągu prowadzone są doświadczenia na szczepach pochodzących ze środowiska naturalnego, których genom w nie został wcześniej zmodyfikowany na drodze inżynierii genetycznej [1].

Jedną z najstarszych i najbardziej rozpowszechnionych grup enzymów są enzymy amylolityczne [3, 13]. Znalazły one zastosowanie w przemyśle gorzelniczym, piekarskim i skrobiowym. Ich udział w procesie scukrzania skrobi jest podstawą produkcji skrobi zmodyfikowanej, która w technologii żywności ma ogromne znaczenie ze względu na możliwości modyfikacji i projektowania różnorodnych właściwości produktów czy funkcje nośnika innych substancji. Stąd amylazy, zarówno bezpośrednio, jak i pośrednio, wpływają na kształtowanie jakości wyrobu gotowego. Tak więc ich popularność i zapotrzebowanie na nie wykazuje tendencję wzrostową, dlatego też w dalszym ciągu prowadzone są badania nad szczepami drobnoustrojów o potencjalnym znaczeniu dla przemysłu [10].

Wydajność biosyntezy zależy od cech użytego mikroorganizmu, jak i od warunków czy parametrów hodowli [11]. Jednym z kierunków działań zmierzających do wzrostu wydajności pożądanego produktu są prace nad dokładną charakterystyką przebiegu procesu biosyntezy, których wyniki pozwolą na poznanie optymalnych parametrów tego procesu [11, 12]. Poznanie przemian zachodzących w bioreaktorze w skali laboratoryjnej umożliwi wykorzystanie tej wiedzy przy powiększaniu skali procesu.

Gatunek *Saccharomycopsis fibuligera* to drożdże stanowiące mikroflorę miejsc, których jednym ze składników jest skrobia, stąd *Saccharomycopsis fibuligera* jest jednym z ważniejszych gatunków drożdży mającym zdolność syntezy enzymów amylolitycznych. Ma zdolność asymilacji węglowodanów takich, jak: glukoza, sacharoza, maltoza, celobioza, trehaloza, rafinoza, melecytoza, skrobia rozpuszczalna [4].

Celem pracy była ocena wpływu różnych źródeł węgla w podłożu produkcyjnym na przebieg biosyntezy enzymów amylolitycznych podczas hodowli drożdży *Saccharomycopsis fibuligera* prowadzonej w bioreaktorze.

Material i metody badań

W pracy wykorzystano drożdże *Saccharomycopsis fibuligera* z Kolekcji Czystych Kultur Zakładu Mikrobiologii i Biotechnologii Żywności SGGW w Warszawie.

Do hodowli inokulacyjnej zastosowano podłoża płynne YPS (po 100 cm³ podłoża w 4 kolbach o pojemności 500 cm³), które szczepiono kulturą drożdży *Saccharomycopsis fibuligera* ze skosu agarowego (YPG). Hodowlę prowadzono w warunkach dynamicznych w temperaturze 30 °C przez 20 h, na wytrząsarce (Julaba – SW 22, Niemcy) przy 200 obr./min. Skład podłoży namnażającego i produkcyjnych przedstawiono w tab. 1.

Tabela 1

Skład podłoży użytych do hodowli.

Chemical composition of media used for cultivation.

Wyszczególnienie Specification	Składniki podłoża inokulacyjnego [g/dm ³] Components of <i>inoculum</i> [g/dm ³]	Składniki podłoża produkcyjnego [g/dm ³] Components of cultivation medium [g/dm ³]			
	YPS	PSZ [2]	PST	Sz	PSzM
Ekstrakt drożdżowy Yeast extract	10	-	-	-	-
Pepton / Pepton	10	10	10		10
Skrobia ziemniaczana Native potato starch	10	20	-	10	-
Modyfikowana skrobia ziemniaczana [g/dm ³] Modified potato starch [g/dm ³]	-	-	-	-	20
Skrobia tapiokowa Tapioca starch	-	-	20	-	-
MgCl ₂	-	0,6	0,6	0,6	0,6
CaCl ₂	-	0,1	0,1	0,1	0,1
Woda destylowana Distilled water	Do 1 l	Do 1 l	Do 1 l	Do 1 l	Do 1 l

Objaśnienia: Explanatory notes:

PSZ – natywna skrobia ziemniaczana / native potato starch; PST – natywna skrobia tapiokowa / native tapioca starch; SZ – podłoże ograniczające (skrobia ziemniaczana, bez źródła azotu) / limiting medium (potato starch without a source of nitrogen; PSzM – skrobia ziemniaczana zmodyfikowana / modified potato starch.

Do hodowli właściwej przygotowano 3600 cm³ podłoża indukcyjnego według składu zamieszczonego w tab. 1., używając jako rozpuszczalnika wody destylowanej. Następnie korygowano pH do wartości 5,0 za pomocą 30 % kwasu solnego.

Hodowle prowadzono w bioreaktorze BioFlo 3000 (f-my New Brunswick Scientific, USA). Podłoże hodowlane wraz ze zbiornikiem roboczym sterylizowano w temp. 121 °C przez 25 min, a następnie chłodzono do temp. 30 °C (temperatura prowadzenia hodowli produkcyjnej). Przed zaszczepieniem podłoże intensywnie mieszano (400 obr./min) i dodatkowo natleniano za pomocą sprężonego powietrza podawanego przez barboter (natężenie przepływu powietrza 100 l/h) aż do uzyskania 100 % nasycenia rozpuszczonym tlenem. Objętość *inoculum* wynosiła 400 ml, co stanowiło 10 % (v/v) w stosunku do podłoża właściwego. W trakcie hodowli produkcyjnej utrzymywane

były następujące parametry pracy bioreaktora: temp. 30 °C, intensywność mieszania 400 obr./min i intensywność natleniania 100 l powietrza/h.

W trakcie hodowli monitorowano natlenienie względne. W pobieranych w trakcie hodowli próbkach mierzono gęstość optyczną (OD), określano plon biomasy oraz aktywność enzymów amylolitycznych, której miarą przyjęto zdolność rozkładu skrobi do cukrów redukujących. Pomiaru gęstości optycznej (tzw. OD₆₀₀), jako absorbancję, dokonano przy użyciu spektrofotometru (Thermo Electron Corporation - Helios Gamma) przy długości fali $\lambda = 600$ nm. Plon biomasy oznaczano w przeliczeniu na suchą masę – komórki drożdży zawieszono w 30 cm³ podłoża hodowlanego odwirowywano przy 6000 obr./min przez 10 min w wirówce (Sigma Laboratory Centrifuges, Szwajcaria), zlewano supernatant z osadu i osad wraz z wytarowaną gilzą suszono w suszarce komorowej (KBC-65G Wamed, Polska) w temp. 60 °C przez 6 h, po czym studzono w eksykatorze i ponownie ważono. Aktywność enzymów oznaczano metodą biochemiczną Bernfelda [15]. W metodzie tej wykorzystuje się właściwości redukujące cukrów, które w środowisku zasadowym redukują grupy nitrowe kwasu 3,5-dinitrosalicylowego (DNS) do grup aminowych. Powstałe pochodne aminowe mają barwę pomarańczową, której intensywność zależy od zawartości cukrów redukujących w próbce, uwalnianych podczas działania enzymów amylolitycznych.

Przeprowadzono cztery hodowle na podłożu PSZ, trzy na podłożu PST oraz po dwie na PSzM i Sz.

Wyniki i dyskusja

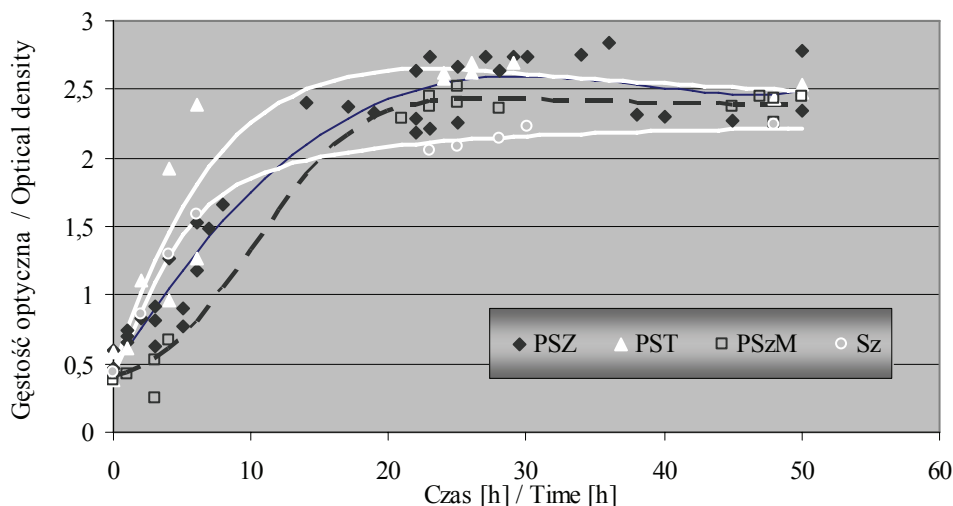
Przebieg zmian gęstości optycznej (OD) płynu hodowlanego podczas hodowli *Saccharomyces fibuligera*, w zależności od składu podłoża indukcyjnego, przedstawiono na rys. 1.

Przebieg krzywych wskazuje na wpływ składu podłoża na kinetykę zmian gęstości optycznej medium hodowlanego [9], mimo że czułość tego wskaźnika jest ograniczona. W przypadku podłoży pełnowartościowych wartość gęstości optycznej określonej w stanie stacjonarnym hodowli wynosiła powyżej 2,5 i osiągnięta była ok. 15. do 20. h hodowli. Niższe o ok. 20 % wartości OD stwierdzono w przypadku hodowli na podłożu Sz, które nie zawierało źródła azotu.

W celu uzyskania bardziej dokładnych informacji dotyczących wzrostu drożdży w warunkach doświadczeń i wskazania podłoża zapewniającego największy przyrost biomasy, wyznaczono krzywe przyrostu plonu biomasy drożdży *Saccharomyces fibuligera*. Uzyskane wyniki przedstawiono na rys. 2.

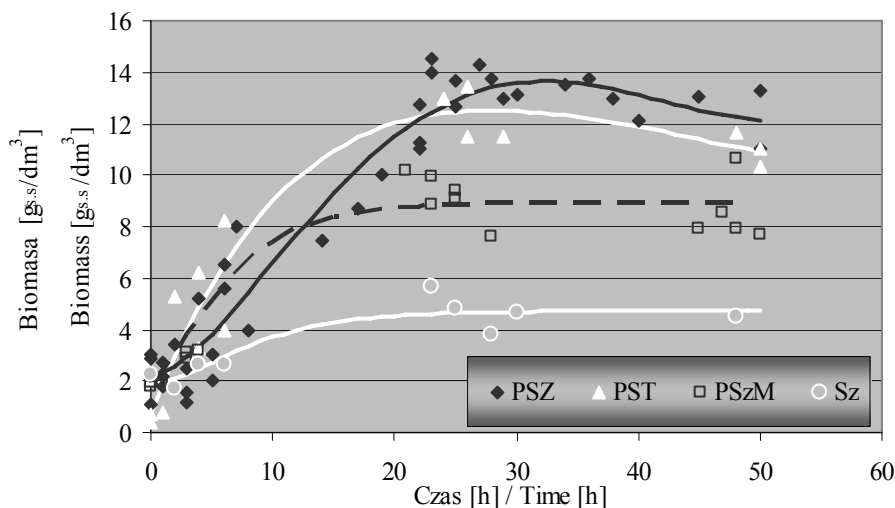
Największy przyrost biomasy stwierdzono w przypadku, gdy źródło węgla stanowiła natywna skrobia ziemniaczana (PSZ). Wynosił on ok. 14 g_{s.s.}/dm³ i wartość maksymalna została osiągnięta po ok. 25 h hodowli. Mniejszy o około 10 - 15 % przyrost biomasy uzyskano na podłożu ze skrobią tapiokową natywną (PST). W przypadku zastosowania

wania skrobi ziemniaczanej zmodyfikowanej (PSzM) plon biomasy był o ok. 40 % mniejszy. Uzyskanie niższych plonów, w porównaniu z hodowlą na podłożu PSz, związane jest z budową cząsteczkową zastosowanych skrobi i dostępnością atomów węgla [14]. Świadczy o tym również trwająca ok. 5 h faza przyspieszania wzrostu, poprzedzająca fazę logarytmicznego wzrostu, widoczna tylko przy skrobi ziemniaczanej.



Rys. 1. Wpływ składu podłoża hodowlanego na przyrost biomasy drożdży *Saccharomycopsis fibuligera*.

Fig. 1. Effect of the composition of culture medium on the biomass gain of *Saccharomycopsis fibuligera* yeast.

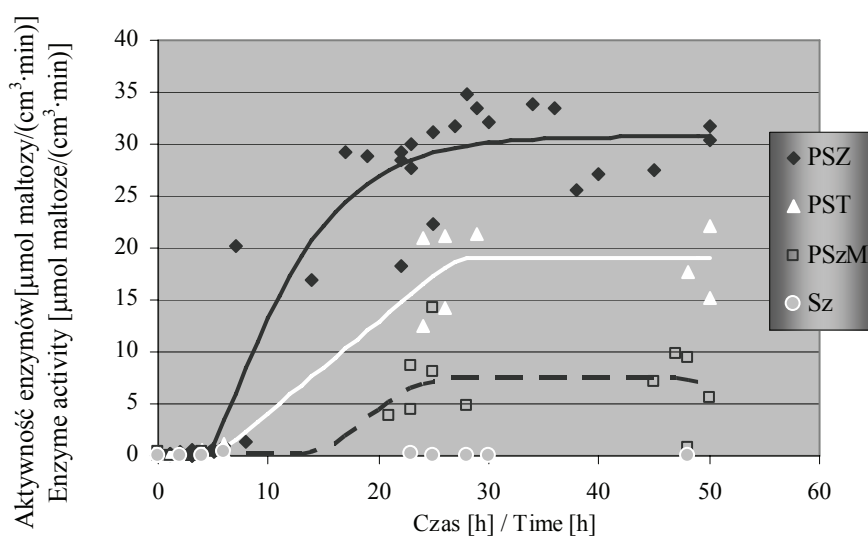


Rys. 2. Wpływ rodzaju skrobi w podłożu na przyrost biomasy drożdży *Saccharomycopsis fibuligera*.

Fig. 2. Effect of the kind of starch in culture medium on the biomass gain of *Saccharomycopsis fibuligera* yeast.

W przypadku podłoża Sz, w którym źródłem węgla była skrobia ziemniaczana, ale źródło azotu zostało usunięte, a wzrost drożdży następował tylko dzięki obecności tego pierwiastka wynikającej z wprowadzenia go do podłoża wraz z *inoculum*, uzyskano najmniejszą ilość biomasy, tj. ok. 5 g_{s.s.}/dm³. Azot jest jednym z makroelementów wchodzących w skład komórki. Uczestniczy w tworzeniu biomasy komórkowej, dlatego jego brak spowodował zahamowanie rozmnażanie drożdży.

Wpływ różnego pochodzenia skrobi na aktywność enzymów amylolitycznych wydzielanych przez drożdże do podłoża jest bardzo wyraźny (rys. 3).



Rys. 3. Wpływ rodzaju skrobi w podłożu na biosyntezę enzymów amylolitycznych przez drożdże *Saccharomyces fibuligera*.

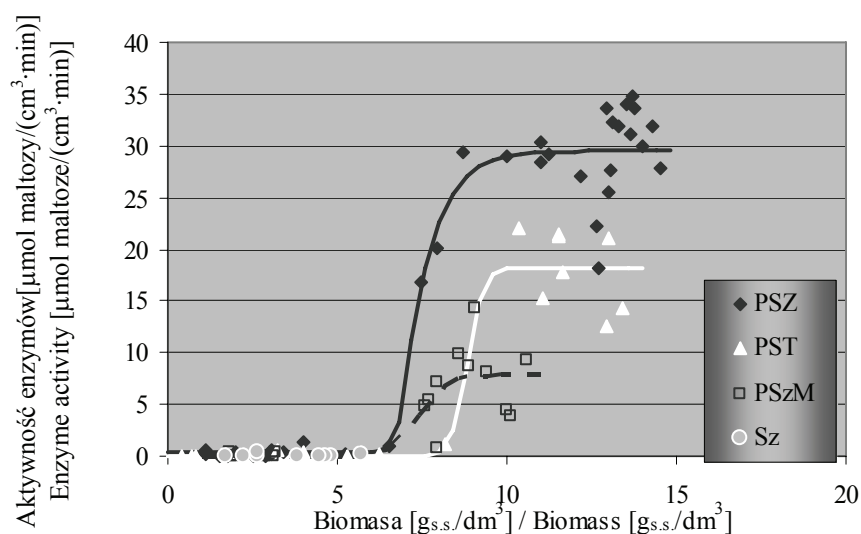
Fig. 3. Effect of the kind of starch in culture medium on the biosynthesis of amylase enzymes by *Saccharomyces fibuligera* yeast.

W przypadku wariantów podłoża PSZ i PST wzrost aktywności enzymów w podłożu – w sposób możliwy do stwierdzenia przy zastosowanej metodyce – zaczął następować po około 5 h hodowli. W przypadku skrobi zmodyfikowanej (PSzM) wzrost aktywności enzymów amylolitycznych obserwowano dopiero po 15 h od zaszczepienia. W podłożu zawierającym skrobię ziemniaczan, pomiędzy 5. a 15. godziną hodowli stwierdzono gwałtowny wzrost aktywności enzymatycznej do wartości ok. 30 μmol maltozy/(cm³·min), po czym wartość ta stabilizowała się. Podobny charakter zmian występował podczas hodowli z wykorzystaniem skrobi tapiokowej (PST), z tym że osiągnięta maksymalna aktywność enzymatyczna było o ok. 50 % niższa. W hodowli, w której źródło węgla stanowiła skrobia zmodyfikowana (PSzM) istotny wzrost aktywności enzymatycznej następował po 20 h hodowli, a jej wartość była ponad

4-krotnie niższa w stosunku do hodowli PSZ. W przypadku podłoża ograniczającego (Sz) nie obserwowano wzrostu aktywności enzymów amylolitycznych – niedobór azotu w środowisku hodowlanym uniemożliwił drożdżom syntezę enzymów.

Największą aktywność enzymów amylolitycznych uzyskano w hodowli na podłożu ze skrobią ziemniaczaną PSZ. Podobną aktywność termostabilnej amylazy uzyskali Mamo i Gessesse [7] podczas hodowli *Bacillus* sp. Na rynku dostępne są preparaty enzymatyczne o aktywności 1000 razy większej, jednak po procesie biosyntezy poddawane są one szeregowi operacji *streaming down*, takich jak: zagęszczanie oczyszczanie.

Analizując korelację pomiędzy ilością biomasy drożdży w podłożu hodowlanym na danym etapie hodowli oraz aktywnością wytworzonych enzymów amylolitycznych (rys. 4) nasuwa się spostrzeżenie, że niezależnie od rodzaju skrobi zawartej w podłożu indukcyjnym, obecność enzymów stwierdza się dopiero wtedy, gdy ilość biomasy jest w granicach 7-8 $\text{g}_{\text{s.s.}}/\text{dm}^3$. Następuje wówczas skokowy wzrost aktywności enzymów oznaczanych w medium. Wartość ta jest zbliżona do ilości biomasy powstałej w podłożu ograniczającym Sz, co sugeruje, że do wytworzenia tej ilości biomasy wystarczają składniki pochodzące z podłoża hodowlanego użytego do sporządzenia *inoculum* i drobnoustroje nie są zmuszone do rozkładu skrobi, aby pozyskać węgiel.



Rys. 4. Zależność pomiędzy przyrostem biomasy drożdży *Saccharomycopsis fibuligera* a aktywnością enzymów amylolitycznych.

Fig. 4. Correlation between the biomass gain of *Saccharomycopsis fibuligera* yeast and the amylase enzyme activity

Wnioski

1. Rodzaj źródła węgla w podłożu produkcyjnym determinuje biosyntezę enzymów. Spośród substancji stanowiących źródło węgla, użytych w przeprowadzonych doświadczeniach, natywna skrobia ziemniaczana okazała się najbardziej korzystnym substratem do biosyntezy enzymów. W warunkach tej hodowli uzyskano największy plon biomasy ($14 \text{ g}_{\text{s.s.}}/\text{dm}^3$) oraz najwyższą aktywność enzymów amylolitycznych w podłożu hodowlanym ($35 \mu\text{mola maltozy}/(\text{cm}^3 \cdot \text{min})$).
2. Nie zaobserwowano bezpośredniej korelacji pomiędzy aktywnością wytworzonych enzymów a wielkością uzyskanego plonu biomasy. Wzrost aktywności enzymów miał charakter skokowy.

Wyniki zamieszczone w niniejszej publikacji uzyskane zostały w ramach badań własnych SGGW. Praca była prezentowana podczas I Sympozjum Żywności z okazji 30-lecia powołania specjalizacji Inżynieria Żywności na Wydziale Nauk o Żywności SGGW, Warszawa, 5 - 6 czerwca 2008 r.

Literatura

- [1] Czapski J.: Wybrane kierunki rozwoju dodatków do żywności, Przem. Ferm. Owoc. Warz., 2001, **2**, 7-9.
- [2] Gonzalez C.F., Farina J.I., Figueroa L.I.C.: A critical assessment of a viscometric assay for measuring *Saccharomycopsis fibuligera* α -amylase activity on gelatinised cassava starch. Enzyme and Microbial Technol. 2002, **30**, 169-175.
- [3] Kołakowski E., Bednarski W., Bielecki S.: Enzymatyczna modyfikacja składników żywności, Wyd. Akademii Rolniczej, Szczecin 2005.
- [4] Kurtzman C.P., Fell J.W.: The Yeasts, A Taxonomic Study. Elsevier, Amsterdam 1998.
- [5] Larsson G., Jørgensen S.B., Pons M.N., Sonnleitner B., A Tijsterman, Titchener-Hooker N.: Biochemical engineering science, J. Biotechnol. 1997, **59**, 3-9.
- [6] Ledakowicz S.: Inżynieria bioreaktorowa. Inżynieria i Aparatura Chemiczna, 2002, **3**, 4-5.
- [7] Mamo G., Gessesse A.: Thermostable amylase production by immobilized thermophilic *Bacillus* sp. Biotechnology Techniques, 1997, **11**, **6**, 447-450.
- [8] Nigam P., Singh D.: Enzyme and microbial systems involved in starch processing. Enzyme and Microbial Technol., 1995, **17**, 770-778.
- [9] Nowak D., Kasiak T., Lewicki P.P., Duszkievicz-Reinhard W.: Pilot-plant cultivation of brewery's yeast *Saccharomyces cerevisiae* enriched with magnesium. Pol. J. Food Nutr. Sci., 2005, **14/55**, **2**, 177-182.
- [10] Rutkowski A., Sawicka-Żurkowska R.: Preparaty enzymatyczne a substancje dodatkowe do żywności. Przem. Spoż., 2002, **8**, 50-54.
- [11] Lemmel S.A., Heimsch R.C., Edwards L.L.: Optimizing the continuous production of *Candida utilis* and *Saccharomycopsis fibuliger* on potato processing wastewater Appl. Environ. Microbiol., 1979, **37** (**2**), 227-232.

- [12] Lemmel S.A, Heimsch R.C., Korus R.A.: Kinetics of growth and amylase production of *Saccharomycopsis fibuligera* on potato processing wastewater. Appl. Environ. Microbiol., 1980, **39** (2), 387-393.
- [13] Sangeetha P.T., Ramesh M.N., Prapulla S.G.: Recent trends in the microbial production, analysis and application of fructooligosaccharides, Trends Food Sci. Technol., 2005, **16**, 442-457.
- [14] Sawicka-Żurkowska R., Zielińska K., Jędrychowska B.: Enzymatyczna degradacja różnych rodzajów skrobi surowej. Przem. Spoż., 1999, **5**, 33-36.
- [15] Toczko M., Grzebińska A.: Materiały do ćwiczeń z biochemii, Wyd. SGGW, Warszawa 2001.
- [16] Warchalewski R.: Zastosowanie enzymów w produkcji żywności na przełomie wieków. Przem. Spoż. 2001, **8**, 40-44.

KINETICS OF GROWTH AND AMYLASE BIOSYNTHESIS OF *SACCHAROMYCOPSIS FIBULIGERA* DURING CULTIVATION IN BIOREACTOR

S u m m a r y

The objective of this paper was to estimate the effect caused by the application of various sources of carbon in culture medium on the biosynthesis of amylase enzymes during cultivation of *Saccharomycopsis fibuligera* yeast in a bioreactor. In the inductive media, starch content constituted 2 % and consisted of native potato starch, modified potato starch, or native tapioca starch. During cultivation, optical density (OD), biomass yield, and amylase activity were measured in the samples collected. The Bernfeld method was used to determine the amylase activity. The highest biomass gain ($14 \text{ g}_{\text{d.m.}}/\text{dm}^3$) and the highest amylase activity ($35 \text{ } \mu\text{mol maltose}/(\text{cm}^3 \text{ min})$) in the culture medium were obtained when the native potato starch was a source of carbon in the culture medium.

Key words: potato starch, tapioca starch, modified starch, inductive medium, production of amylases ☒