

# ACTA SCIENTIARUM POLONORUM

Czasopismo naukowe założone w 2001 roku przez polskie uczelnie rolnicze

**Biotechnologia**

Biotechnologia

Biotechnology

9(1) 2010



Bydgoszcz Kraków Lublin Olsztyn  
Poznań Siedlce Szczecin Warszawa Wrocław

**Rada Programowa *Acta Scientiarum Polonorum***

Kazimierz Banasik (Warszawa), Janusz Falkowski (Olsztyn),  
Florian Gambuś (Kraków), Franciszek Kluza (Lublin),  
Janusz Prusiński (Bydgoszcz), Jerzy Sobota (Wrocław) – przewodniczący,  
Stanisław Socha (Siedlce), Waldemar Uchman (Poznań)

**Rada Naukowa serii *Biotechnologia***

Danuta Witkowska (Wrocław) – przewodnicząca, Włodzimierz Bednarski (Olsztyn),  
Włodzimierz Grajek (Poznań), Anna Maraz (Budapeszt, Węgry),  
Zdzisław Targoński (Lublin), Vesna Zechner-Krpan (Zagrzeb, Chorwacja)

Opracowanie redakcyjne i korekta:

Elżbieta Winiarska-Grabosz  
Janina Szydłowska

Łamanie  
Alina Gebel

Projekt okładki  
Daniel Morzyński

ISSN 1644-065X

*Wydanie publikacji dofinansowane ze środków  
Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu*

© Copyright by Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu,  
Wrocław 2010

Redaktor Naczelny – prof. dr hab. Andrzej Kotecki  
ul. Sopocka 23, 50-344 Wrocław, tel./fax 71 328-12-77  
e-mail: wyd@up.wroc.pl <http://www.up.wroc.pl>

Nakład 200 + 16 egz. Ark. wyd. 2,4. Ark. druk. 2,25  
Druk i oprawa: F.P.H. „ELMA”

## AKTYWNOŚĆ FERMENTACYJNA DROŹDŹY GORZELNICZYCH W OBECNOŚCI CYNKU (II)

Joanna Chmielewska, Joanna Kawa-Rygielska

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

**Streszczenie.** Celem pracy była próba oceny wpływu dodatku Zn (II) (0,05 i 0,12 mg·dm<sup>-3</sup>) do podłoży z glukozą oraz zacierów kukurydzianych na wybrane cechy i aktywność fermentacyjną drożdży gorzelniczych. Suplementacja Zn (II) nie wpływała na zmianę dynamiki fermentacji i wydajność etanolu z glukozy w przypadku wszystkich badanych szczepów, natomiast obniżała wydajność fermentacji skrobi przez *Saccharomyces cerevisiae* D2. Drożdże *Saccharomyces cerevisiae* Safethanol 3035 uzyskiwały większą wydajność etanolu ze skrobi przy dodatku 0,12 mg·dm<sup>-3</sup> Zn (II), zaś *Saccharomyces diastaticus* ATCC 13007 – w przypadku obu dawek Zn (II). Komórki badanych szczepów pochodzące z prób fermentowanych z Zn (II) w dawce 0,12 mg·dm<sup>-3</sup> odznaczały się najlepszym stanem fizjologicznym. Dodatek Zn (II) powodował większy przyrost biomasy drożdży *Saccharomyces diastaticus* ATCC 13007 oraz *Schwanniomyces occidentalis* ATCC 48086. Nie wykazano istotnego wpływu Zn (II) na wielkość komórek drożdży.

**Słowa kluczowe:** etanol, drożdże gorzelnicze, kukurydza, Zn (II)

### WSTĘP

Efektywność procesu fermentacji jest ściśle związana z obecnością w środowisku jonów metali, odgrywających istotną rolę w procesach biochemicznych zachodzących w komórce. Zn (II) jest niezbędny do wzrostu drożdży oraz fermentacji, mimo iż jego zawartość w mediach fermentacyjnych jest, w porównaniu z innymi jonami, stosunkowo niewielka. Cynk jest kofaktorem i składnikiem strukturalnym około 300 enzymów, w tym dehydrogenazy alkoholowej [De Nicola i Walker 2009, Yang i Zhou 2001], stabilizuje błony komórkowe i wpływa na przepuszczalność membran. Niedobór cynku może powodować spowolnienie i nieprawidłowy przebieg fermentacji [De Nicola i Walker 2009]. Obecność Zn (II) łagodzi toksyczny wpływ Co (II) i Cu (II) na drożdże [Mochaba i in. 1996, Pasternakiewicz i Tuszyński 1997, Tuszyński i Makarewicz 2000]. Z kolei zbyt wysokie stężenie Zn (II) może być dla drożdży toksyczne ze względu na wpływ na przepuszczalność membran względem potasu, co obniża zarówno dynamikę

---

Adres do korespondencji – Corresponding author: Joanna Chmielewska, Katedra Technologii Rolnej i Przechowalnictwa, Zakład Technologii Fermentacji, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, ul .C.K. Norwida 25, 50-375 Wrocław, e-mail: Joanna.Chmielewska@wnoz.up.wroc.pl

wzrostu, jak i aktywność fermentacyjną drożdży [Stehlik-Tomas i in. 2004]. Zdolność biosorpcji i akumulacji Zn (II) w komórkach drożdży [Dodic i in. 2001, Tuszyński i Pasternakiewicz 2000, Wang i Chen 2006] może mieć istotne znaczenie przy ich wykorzystaniu na cele paszowe. Wzbogacanie mediów fermentacyjnych w jony metali może wpływać na podniesienie atrakcyjności wywarów gorzelnicznych jako pasz. Prezentowane w literaturze badania dotyczą głównie oddziaływania Zn (II) na drożdże browarnicze [Poreda i in. 2009, Tuszyński i Makarewicz 1998, 2000, Zhao i in. 2009]. Natomiast celem niniejszej pracy była próba oceny wpływu dodatku Zn (II), zarówno do syntetycznych podłoży fermentacyjnych, jak i zacierów kukurydzianych, na wybrane cechy oraz aktywność fermentacyjną przemysłowych drożdży gorzelnicznych i drożdży o uzdolnieniach amylolytycznych.

## MATERIAŁ I METODY

Materiał biologiczny stanowiły drożdże *Saccharomyces cerevisiae* D2, *Saccharomyces cerevisiae* Safethanol 3035, *Saccharomyces diastaticus* ATCC 13007 i *Schwanniomyces occidentalis* ATCC 48086. Syntetyczne podłoża fermentacyjne z glukozą ( $100\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ ), ekstraktem drożdżowym,  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  i  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  oraz zacieru skrobiowe (przygotowane metodą bezciśnieniowego uwalniania skrobi, z ziarna kukurydzy ( $200\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) odmiany KB 1902, z dodatkiem preparatów firmy Novozymes: upłynniającego Termamyl 120 L i scukrzającego Spirytzyme Fuel) wzbogacano  $\text{ZnCl}_2$  ( $0,05$  i  $0,12\text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$  Zn (II)). Sporządzono także analogiczne próby kontrolne bez dodatku Zn (II). Testy fermentacyjne prowadzono w temperaturze  $30^\circ\text{C}$  przy stężeniu biomasy  $0,2\text{ g s.m. drożdży}\cdot 100\text{ cm}^{-3}$  lub  $100\text{ g}^{-1}$  próby. W czasie fermentacji co 24 h oceniano:

- wagowo dynamikę procesu fermentacji glukozy oraz skrobi wyrażoną procentową ilością wydzielanego w czasie  $\text{CO}_2$  w stosunku do całkowitej ilości wydzielonego  $\text{CO}_2$  [g];
- mikroskopowo – stan fizjologiczny komórek drożdży w trakcie fermentacji glukozy i skrobi, zaprezentowany jako indeks  $I_f$  [% komórek pączkujących/% komórek nieaktywnych (barwiących się błękitem metylenowym)];
- przyrost biomasy podczas fermentacji glukozy – poprzez pomiar gęstości zawiesiny za pomocą spektrofotometru BECKMAN DU'650 przy  $\lambda=560\text{ nm}$  oraz wyznaczenie na podstawie krzywych standardowych [dane niepublikowane] zmian stężenia suchej substancji drożdży [ $\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ ] w czasie procesu;
- wielkość komórek drożdży podczas fermentacji glukozy – za pomocą laserowego analizatora cząstek MASTERSIZER 2000 firmy Malvern Instruments.

Po zakończeniu procesu fermentacji próby poddano dwukrotnej destylacji. W destylacie piknometrycznie oznaczono zawartość etanolu i obliczono wydajność etanolu  $Y_p/s$  z glukozy oraz skrobi ( $\text{g etanolu/g cukru}$ ). W wywarze oznaczono zawartość glicerolu ( $\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ ) i kwasu bursztynowego ( $\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ ) przy użyciu HPLC firmy Varian typu PRO-Star. Wszystkie próby wykonano w 3 powtórzeniach. Wyniki dotyczące wydajności etanolu poddano analizie statystycznej w programie STATISTICA 8. Przeprowadzono test Duncana przy  $\alpha=0,05$ .

## WYNIKI I DISKUSJA

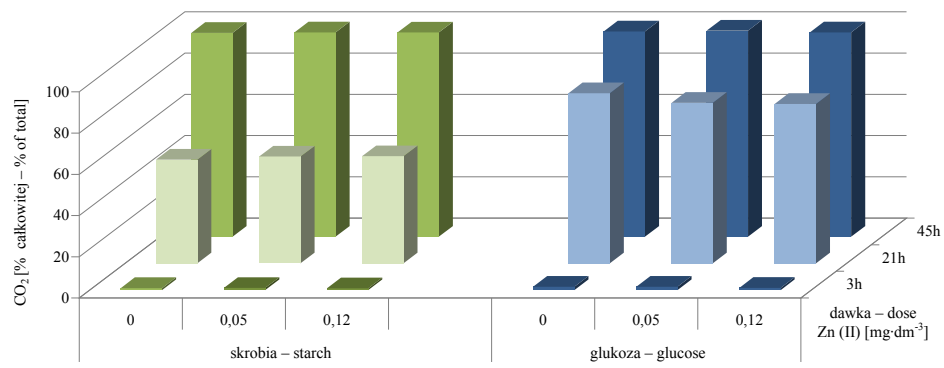
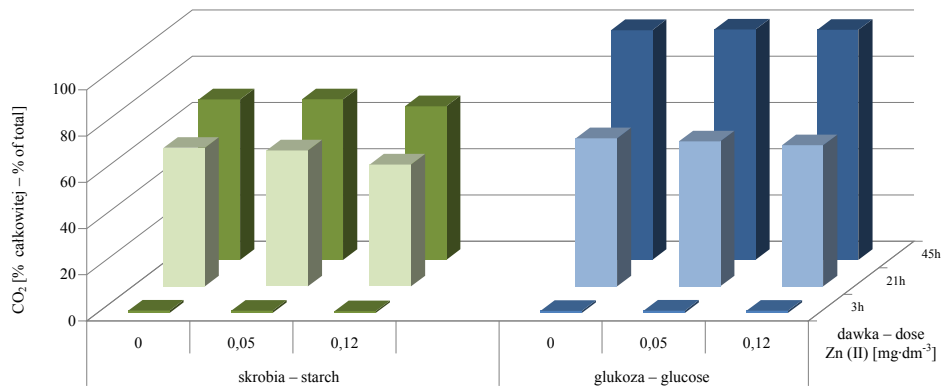
Optymalne do wzrostu biomasy i fermentacji stężenie Zn (II) zależy od szczepu drożdży oraz biodostępności jonów [De Nicola i in. 2009]. Zdaniem Bromberga i in. [1997] optymalna dawka Zn w brzeczkiach piwowarskich mieści się w granicach 0,1–1 mg·dm<sup>-3</sup>. Z kolei De Nicola i in. [2009] podają, iż optymalne stężenie cynku dla wzrostu drożdży *Saccharomyces cerevisiae* wynosi 0,25–0,5 mg·dm<sup>-3</sup>, zaś dla glikolizy – 1–2 mg·dm<sup>-3</sup>. Na podstawie wyników badań prowadzonych w Zakładzie Technologii Fermentacji, dotyczących dynamiki wzrostu drożdży w Aparacie Bioscreen C [dane niepublikowane] oraz oceny stanu fizjologicznego biomasy, do badań wytypowano dwie dawki Zn (II) – 0,05 i 0,12 mg·dm<sup>-3</sup>.

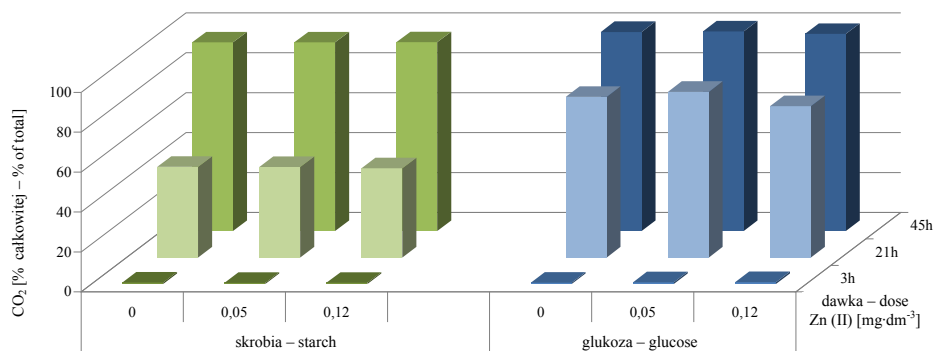
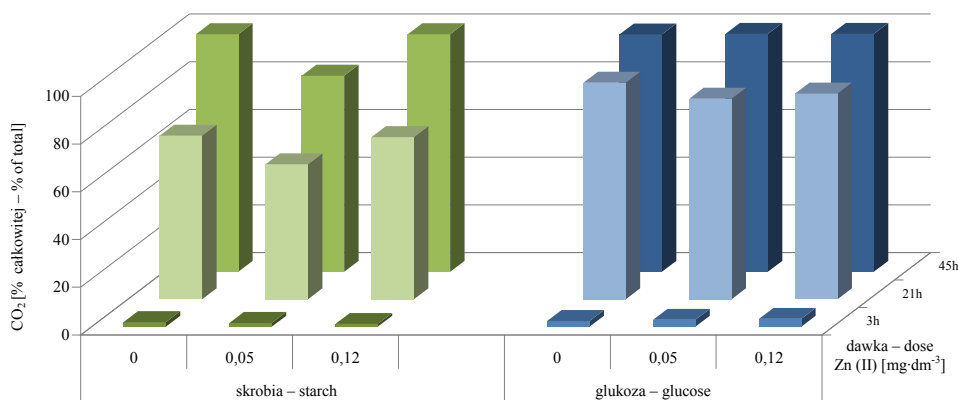
Proces fermentacji glukozy charakteryzował się lepszą dynamiką niż fermentacja zacierów kukurydzianych (rys. 1). Nie odnotowano istotnego wpływu dodatku Zn (II), niezależnie od dawki, na dynamikę fermentacji glukozy i skrobi z udziałem wszystkich badanych szczepów drożdży.

Suplementacja podłoży Zn (II) nie wpływała na zmianę wydajności etanolu z glukozy (średnio 0,42 g etanolu/g glukozy) w przypadku badanych szczepów, natomiast obniżała o blisko 6% (z 0,494 do 0,465 g etanolu/g skrobi) wydajność fermentacji skrobi przez drożdże *Saccharomyces cerevisiae* D2 (rys. 2). Drożdże *Saccharomyces cerevisiae* Safethanol 3035 uzyskiwały statystycznie istotnie większą (o 0,015 g etanolu/g skrobi) wydajność etanolu ze skrobi przy dodatku 0,12 mg Zn (II)/dm<sup>3</sup>, zaś *Saccharomyces diastaticus* ATCC 13007 (o 0,025 g etanolu/g skrobi) – w przypadku obu badanych dawek Zn (II). Zhao i in. [2009], badając wpływ ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O w stężeniach 0,01, 0,05 i 0,1 g·dm<sup>-3</sup> na przebieg fermentacji ciągłej syntetycznego podłoża z glukozą, największe stężenia etanolu uzyskiwali przy wzbogacaniu mediów 0,05 g·dm<sup>-3</sup> ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O.

Po fermentacji podłoży kukurydzianych oznaczano większe ilości ubocznych produktów fermentacji, tj. od 2,5 do 2,9 razy więcej glicerolu (rys. 3) i od 5,5 do 9,1 razy więcej kwasu bursztynowego (rys. 4) niż po fermentacji glukozy. Najmniejsze ilości badanych produktów ubocznych wytwarzał, niezależnie od składu podłoża, szczep drożdży gorzelniczych *Saccharomyces cerevisiae* D2 – z glukozy około 2,2 g·dm<sup>-3</sup> glicerolu i około 0,14 g·dm<sup>-3</sup> kwasu bursztynowego, zaś ze skrobi od 5,28 g·dm<sup>-3</sup> glicerolu przy dawce cynku 0,12 mg·dm<sup>-3</sup> do 5,52 g·dm<sup>-3</sup> w próbie kontrolnej oraz od 0,85 g·dm<sup>-3</sup> kwasu bursztynowego przy większej dawce cynku do 0,93 g·dm<sup>-3</sup> tego kwasu w próbie kontrolnej. We wszystkich skrobiowych próbach kontrolnych odnotowano większą zawartość kwasu bursztynowego niż w próbach skrobiowych z dodatkiem Zn (II).

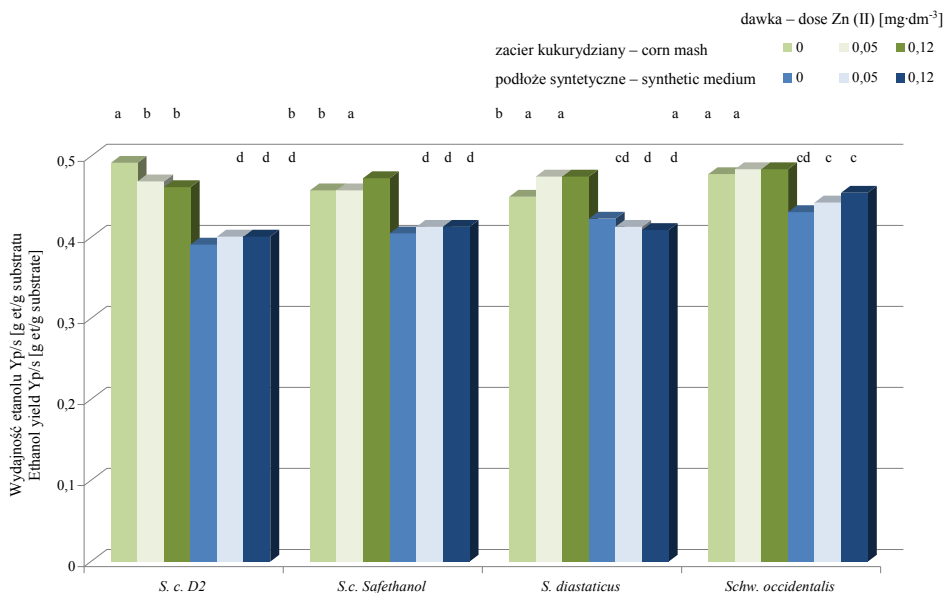
Wpływ Zn (II) na stan fizjologiczny biomasy wyrażony w postaci indeksu I<sub>f</sub>, czyli stosunku komórek pączkujących [%] do komórek nieaktywnych [%], był zróżnicowany w zależności od szczepu drożdży oraz medium fermentacyjnego (tab. 1). Tym niemniej, po 72 h procesu najkorzystniejszymi wartościami indeksu I<sub>f</sub> odznaczały się komórki wszystkich badanych szczepów drożdży pochodzące z prób fermentowanych z dodatkiem 0,12 mg·dm<sup>-3</sup> Zn (II), zarówno syntetycznych, jak i kukurydzianych.

a) *Saccharomyces cerevisiae* D2b) *Saccharomyces cerevisiae* Safethanol 3035

c) *Saccharomyces diastaticus* ATCC 13007d) *Schwanniomyces occidentalis* ATCC 48086

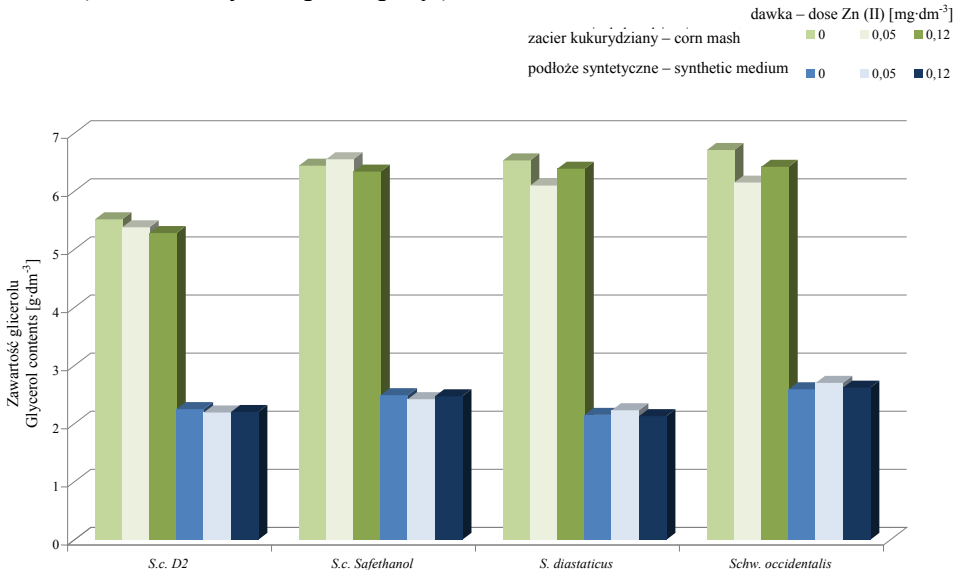
Rys. 1. Dynamika wydzielania CO<sub>2</sub> po 3, 21 i 45 h fermentacji skrobi i glukozy z podłoży wzbogaconych Zn (II) z udziałem drożdży: a) *Saccharomyces cerevisiae* D2, b) *Saccharomyces cerevisiae* Safethanol 3035, c) *Saccharomyces diastaticus* ATCC 13007, d) *Schwanniomyces occidentalis* ATCC 48086

Fig. 1. Dynamics of CO<sub>2</sub> release after 3, 21 and 45 h fermentation of starch and glucose from media with Zn (II) addition by yeast: a) *Saccharomyces cerevisiae* D2, b) *Saccharomyces cerevisiae* Safethanol 3035, c) *Saccharomyces diastaticus* ATCC 13007, d) *Schwanniomyces occidentalis* ATCC 48086



Rys. 2. Wydajność etanolu po fermentacji zacierów kukurydzianych i podłoży syntetycznych wzbogacanych w Zn (II) (a+d-grupy jednorodnie statystycznie)

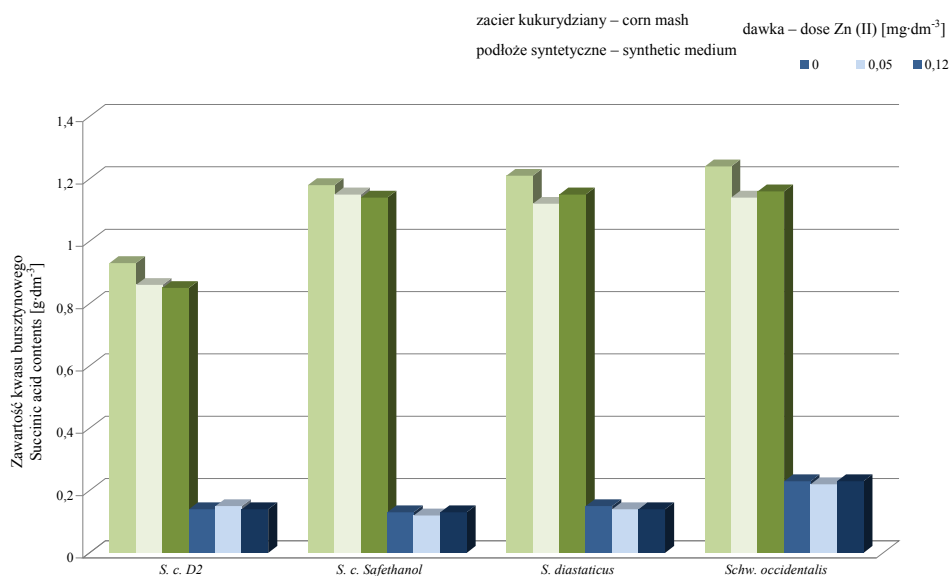
Fig. 2. Ethanol yield after fermentation of corn mashes and synthetic media with Zn (II) addition (a+d-statistically homogenous groups)



Rys. 3. Zawartość glicerolu po fermentacji zacierów kukurydzianych i podłoży syntetycznych wzbogacanych w Zn (II)

Fig. 3. Glycerol contents after fermentation of corn mashes and synthetic media with Zn (II) addition





Rys. 4. Zawartość kwasu bursztynowego po fermentacji zacierów kukurydzianych i podłoży syntetycznych wzbogacanych w Zn (II)

Fig. 4. Succinic acid contents after fermentation of corn mashes and synthetic media with Zn (II) addition

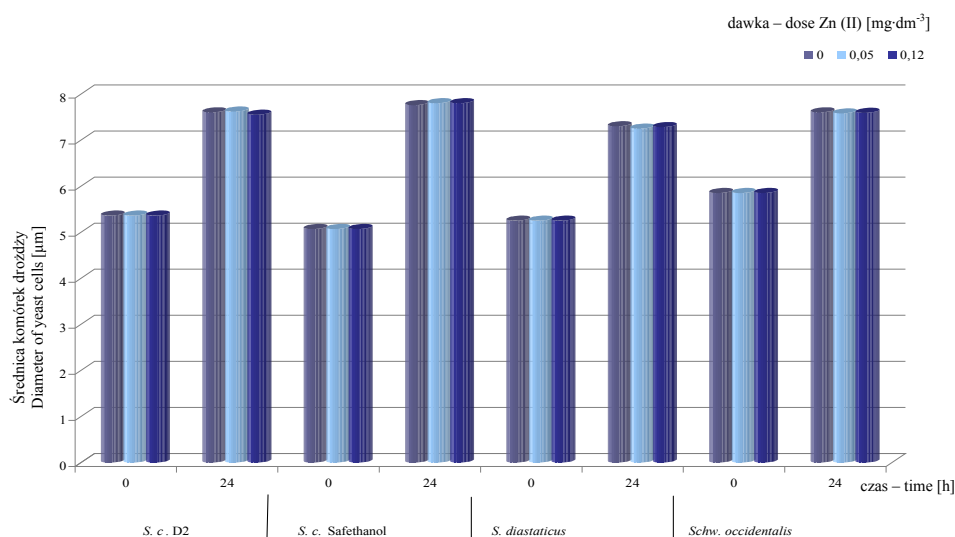
Tabela 1. Stan fizjologiczny komórek drożdży [indeks I<sub>f</sub>] podczas fermentacji podłoży wzbogacanych Zn (II)

Table 1. The physiological condition of yeast cells [index I<sub>f</sub>] during media with Zn (II) addition fermentation

Dawka Zn (II) Dose Zn (II) [mg·dm <sup>-3</sup> ]	0h	Zacier kukurydziany Corn mash			Podłoże syntetyczne Synthetic medium		
		24h	48h	72h	24h	48h	72h
<b><i>Saccharomyces cerevisiae</i> D2</b>							
0	16,1	11,9	0,8	0,1	15,0	1,2	0,2
0,05		14,7	0,8	0,1	16,6	2,5	0,4
0,12		29,9	0,9	0,3	34,2	2,8	1,0
<b><i>Saccharomyces cerevisiae</i> Safethanol 3035</b>							
0	46,6	5,6	2,5	0,1	12,8	8,1	2,2
0,05		5,1	3,2	0,1	20,4	11,4	2,5
0,12		15,9	3,3	0,9	21,0	10,5	5,6
<b><i>Saccharomyces diastaticus</i> ATCC 13007</b>							
0	16,0	11,5	4,7	0,5	0,2	4,4	1,4
0,05		2,3	6,1	1,0	0,1	5,4	2,7
0,12		5,3	5,6	1,1	2,2	6,0	2,6
<b><i>Schwanniomyces occidentalis</i> ATCC 48086</b>							
0	8	10,0	2,3	0,1	6,3	16,7	1,7
0,05		13,2	16,0	2,6	20,7	21,6	2,7
0,12		22,0	10,0	3,0	32,6	22,5	7,5

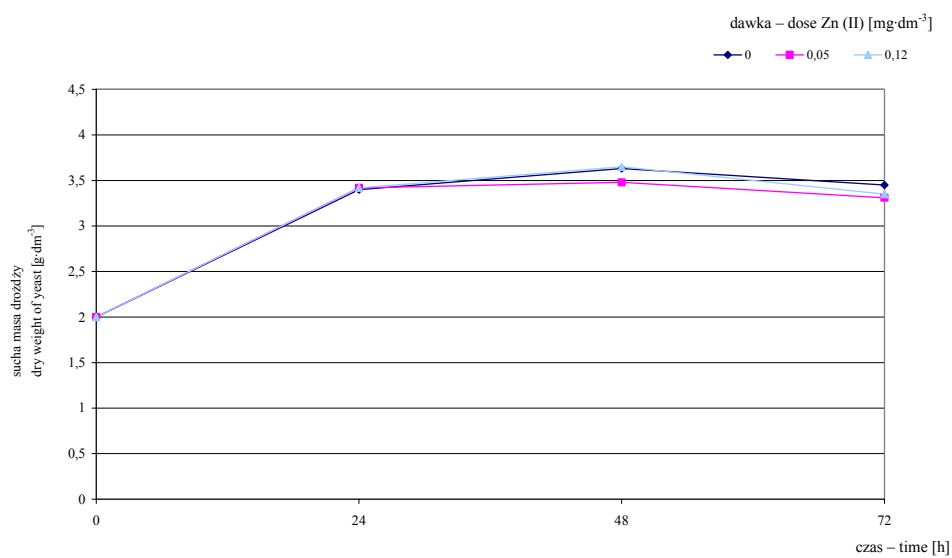
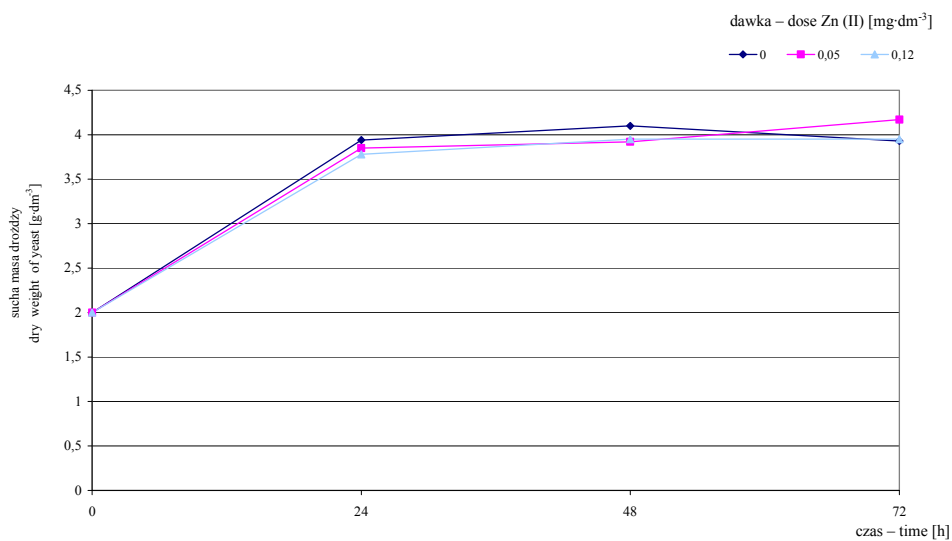
Średnia średnica komórek (rys. 5) wynosiła od 5  $\mu\text{m}$  (*Saccharomyces cerevisiae* Safethanol 3035) do 5,8  $\mu\text{m}$  (*Schwanniomyces occidentalis* ATCC 48086). Największe zmiany średnicy komórek badanych szczepów drożdży (powiększenie rozmiaru komórki od 30 do 54%) obserwowano po 24 h fermentacji. W ciągu kolejnych 48 h komórki drożdży nie zmieniały swego rozmiaru. Ponadto, nie wykazano istotnego wpływu dodatku Zn (II) na wielkość komórek drożdży.

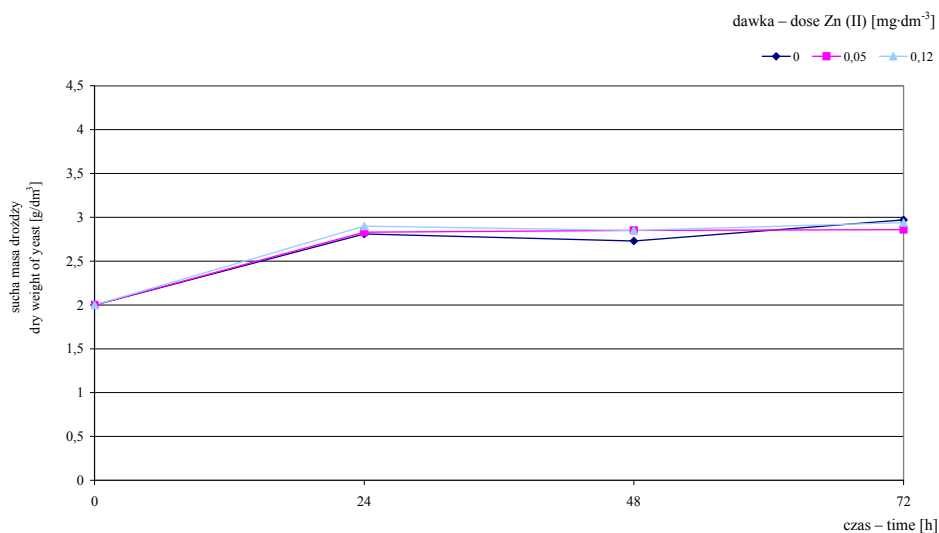
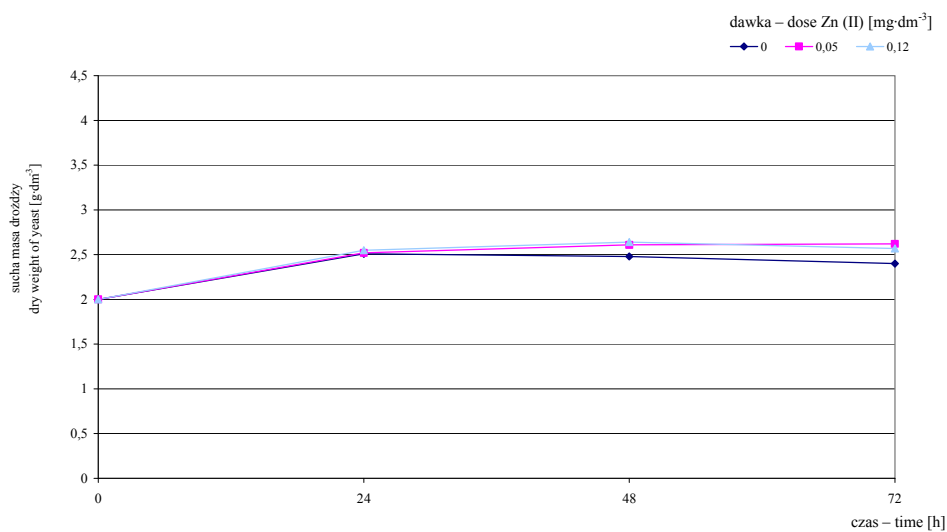
Największy (blisko dwukrotny) przyrost biomasy po 24 h fermentacji glukozy oznaczono w próbach z udziałem drożdży gorzelnicznych *Saccharomyces cerevisiae* Safethanol 3035 (rys. 6). Dodatek Zn (II) zarówno w dawce 0,5, jak i 0,12  $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$  Zn (II) do podłoży syntetycznych fermentowanych przez drożdże *Saccharomyces diastaticus* ATCC 13007 oraz *Schwanniomyces occidentalis* ATCC 48086 powodował większy przyrost biomasy w stosunku do prób kontrolnych.



Rys. 5. Porównanie średnicy komórek drożdży *Saccharomyces cerevisiae* D2, *Saccharomyces cerevisiae* Safethanol 3035, *Saccharomyces diastaticus* ATCC 13007 i *Schwanniomyces occidentalis* ATCC 48086 na początku i po 24 h fermentacji podłoży syntetycznych wzbogacanych w Zn (II)

Fig. 5. Comparison of yeast *Saccharomyces cerevisiae* D2, *Saccharomyces cerevisiae* Safethanol 3035, *Saccharomyces diastaticus* ATCC 13007 and *Schwanniomyces occidentalis* ATCC 48086 cells diameter at the beginning and after 24 h fermentation of synthetic media with Zn (II)

a) *Saccharomyces cerevisiae* D2b) *Saccharomyces cerevisiae* Safethanol 3035

c) *Saccharomyces diastaticus* ATCC 13007d) *Schwanniomyces occidentalis* ATCC 48086

Rys. 6. Przyrost biomasy drożdży: a) *Saccharomyces cerevisiae* D2, b) *Saccharomyces cerevisiae* Safethanol 3035, c) *Saccharomyces diastaticus* ATCC 13007, d) *Schwanniomyces occidentalis* ATCC 48086 podczas fermentacji podłoży syntetycznych wzbogacanych Zn (II)

Fig. 6. Increase of yeast a) *Saccharomyces cerevisiae* D2, b) *Saccharomyces cerevisiae* Safethanol 3035, c) *Saccharomyces diastaticus* ATCC 13007, d) *Schwanniomyces occidentalis* ATCC 48086 biomass during fermentation of synthetic media with Zn (II)

## WNIOSKI

Wzbogacanie podłoży Zn (II) nie wpływało na zmianę dynamiki fermentacji i wydajność etanolu z glukozy w przypadku wszystkich badanych szczepów drożdży, natomiast obniżało wydajność fermentacji skrobi przez przemysłowe drożdże gorzelnicze *Saccharomyces cerevisiae* D2. Drożdże *Saccharomyces cerevisiae* Safethanol 3035 uzyskiwały statystycznie istotnie większą wydajność etanolu ze skrobi przy dodatku  $0,12 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$  Zn (II), zaś *Saccharomyces diastaticus* ATCC 13007 – w przypadku obu badanych dawek Zn (II).

We wszystkich skrobiowych próbach kontrolnych odnotowano większą zawartość kwasu bursztynowego niż w próbach skrobiowych z dodatkiem Zn (II).

Najlepszym stanem fizjologicznym po zakończeniu fermentacji odznaczały się komórki wszystkich badanych szczepów drożdży, pochodzące z prób fermentowanych z dodatkiem  $0,12 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$  Zn (II), zarówno syntetycznych, jak i kukurydzianych.

Dodatek Zn (II) tak w dawce 0,5, jak i  $0,12 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$  Zn (II) do podłoży fermentowanych przez drożdże *Saccharomyces diastaticus* ATCC 13007 oraz *Schwanniomyces occidentalis* ATCC 48086 powodował większy przyrost biomasy w stosunku do prób kontrolnych.

Nie wykazano istotnego wpływu dodatku Zn (II) na wielkość komórek drożdży.

## PIŚMIENNICTWO

- Bromberg S.K., Bower P.A., Duncombe G.R., Ferhring J., Gerber I., Lau V.K., Tata M., 1997. Requirements for zinc, manganese, calcium and magnesium in wort, J. Amer. Soc. Brewing Chem. 55: 123–128.
- De Nicola R., Hall N., Bollag T., Thermogiannis G., Walker G.M., 2009. Zinc accumulation and utilization by wine yeasts. Inter. J. Wine Res., 1: 85–94.
- De Nicola R., Walker G.M., 2009. Accumulation and cellular distribution of zinc by brewing yeast. Enzyme Microb. Technol., 44: 210–216.
- Dodic S.N., Popov S.D., Markov S.L., 2001. Investigation of kinetics zinc biosorption by *Saccharomyces cerevisiae* cells. Nahrung/Food, 45(1): 59–61.
- Mochaba F., O'Connor-Cox E.S.C., Axcell B.C., 1996. Metal ion concentration and release by brewing yeast; characterization and implications. J. Amer. Soc. Brewing Chem., 54 (3): 155–163.
- Pasternakiewicz A., Tuszyński T., 1997. Effect of calcium, magnesium, cobalt (II), and zinc cations on the *Saccharomyces cerevisiae* growth. Pol. J. Food Nutr. Sci., 6/47, 4: 61–70.
- Poreda A., Antkiewicz P., Tuszyński T., Makarewicz M., 2009. Accumulation and release of metal ions by brewer's yeast during successive fermentations. J. Inst. Brew., 115 (1): 78–83.
- Stehlik-Tomas V., Zetić V.G., Stanzer D., Grba S., Vahčić N., 2004. Zinc, copper and manganese enrichment in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Food Technol. Biotechnol., 42 (2): 115–120.
- Tuszyński T., Makarewicz M., 1998. Wpływ jonów wapnia, magnezu, cynku i kobaltu (II) na wydajność fermentacji etanolowej. Chemia i Inżynieria Ekologiczna, 5 (8–9): 757–765.
- Tuszyński T., Makarewicz M., 2000. Zinc ion concentration in brewery yeast cells. Chemia i Inżynieria Ekologiczna, 7(10), 1105–1116.
- Tuszyński T., Pasternakiewicz A., 2000. Bioaccumulation of metal ions by yeast cells of *Saccharomyces cerevisiae*. Pol. J. Food Nutr. Sci., 9/50, 4: 31–39.
- Wang J., Chen C., 2006. Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: A review. Biotechnol. Adv., 24: 427–451.

- Yang Y., Zhou H.M., 2001. Effect of zinc on conformation stability of yeast alcohol dehydrogenase. *Biochem. (Moscow)*, 66 (1): 47–54.
- Zhao X.Q., Xue C., GE X.M., Yuan W.J., Wang W.J., Bai F.W., 2009. Impact of zinc supplementation on the improvement of ethanol tolerance and yield of self-flocculating yeast in continuous ethanol fermentation. *J. Biotechnol.*, 139: 55–60.

## FERMENTATIVE ACTIVITY OF DISTILLERY YEAST IN ZINC (II) PRESENCE

**Abstract.** The aim of this study was to attempt to assess the impact of Zn (II) (0,05 and 0,12 mg·dm<sup>-3</sup>) to media with glucose and corn mashes on the selected features and fermentation activity of distillery yeast. Zn (II) supplementation had no effect on changing the dynamics of fermentation and ethanol yield from glucose for all strains studied, while the efficiency of starch fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* D2 was decreased. *Saccharomyces cerevisiae* Safethanol 3035 yeast obtain greater ethanol yield from starch with added 0.12 mg·dm<sup>-3</sup> Zn (II) and *Saccharomyces diastaticus* ATCC 13007 – in both doses of Zn (II). Cells of all tested strains from samples fermented with Zn (II) at a dose of 0.12 mg·dm<sup>-3</sup> by the best physiological state was characterized. Appendix Zn (II) induced a greater increase in biomass of the yeast *Saccharomyces diastaticus* ATCC 13007 and *Schwanniomyces occidentalis* ATCC 48086. No significant effect of Zn (II) on the size yeast cells was observed.

**Key words:** ethanol, distillery yeast, corn, Zn (II)

Accepted for print – Zaakceptowano do druku: 30.03.2010

For citation – Do cytowania: Chmielewska J., Kawa-Rygielska J., 2010. Aktywność fermentacyjna drożdży gorzelnicznych w obecności cynku (II). *Acta Sci. Pol. Biotechnol.* 9(1), 3–14.

## WŁAŚCIWOŚCI FIZYKOCHEMICZNE SZYNEK SUROWO DOJRZEWAJĄCYCH Z DODATKIEM PROBIOTYKU\*

Monika Skwarek, Zbigniew J. Dolatowski

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

**Streszczenie.** Celem badań było przygotowanie technologii mięsnego produktu probiotycznego oraz określenie wpływu zastosowanej mikroflory na właściwości fizykochemiczne wyrobu. Materiałem badawczym były szynki wieprzowe i szczep bakterii probiotycznych *Lactobacillus casei* LOCK 0900 (zgłoszenie patentowe nr P-382761). Zakres badań obejmował produkcję i ocenę probiotycznych wyrobów surowo dojrzewających. Oceny fizykochemicznej dokonano w zakresie pomiaru parametrów barwy w systemie CIE L\*a\*b\* oraz CIE L\*C\*H<sup>0</sup>, kwasowości, ORP, wskaźnika TBARS, aktywności wody. Zmierzono względną zawartość Mb, MbO<sub>2</sub>, MetMb oraz ogólną zawartość barwników hemowych (OZB) w tkance mięśniowej. W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono wpływ dodatku szczepu probiotycznego na wzrost kwasowości wyrobu. Zastosowanie *Lactobacillus casei* LOCK 0900 w produkcji szynki surowo dojrzewającej spowodowało zmiany stopnia utlenienia tłuszczu, czego wskaźnikiem jest obniżenie wskaźnika TBARS, zmiany potencjału oksydacyjno-redukcyjnego, przemiany mioglobiny oraz parametrów barwy w porównaniu do próby bez dodatku probiotyku.

**Słowa kluczowe:** szynka dojrzewająca, *Lactobacillus casei*, właściwości fizykochemiczne

### WSTĘP

Wzrost świadomości społecznej, związanej z jakością oraz funkcjonalnością żywności, przyczyniają się do opracowania nowych, prozdrowotnych produktów spożywczych przez wiele jednostek produkcyjnych. Fermentowane, surowe wędliny dojrzewające należą do grupy bardzo wartościowych i atrakcyjnych produktów mięsnych. Produkty mięsne, często traktowane jako najważniejszy składnik żywności, mogłyby być dobrym źródłem bakterii probiotycznych, pozytywnie wpływających na funkcjonowanie

---

\*Szczep przygotowano w Zakładzie Higieny i Zarządzania Jakością SGGW w Warszawie. Praca wykonana w ramach projektu badawczego MNiSzW nr NN 312275435.

---

Adres do korespondencji – Corresponding author: Monika Skwarek, Katedra Technologii Mięsa i Zarządzania Jakością, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, ul. Skromna 8, 20-704 Lublin, e-mail; monika.skwarek@up.lublin.pl

organizmu i zdrowie człowieka. Zgodnie z obecnym stanem wiedzy dobroczynny wpływ tych drobnoustrojów polega m.in. na stymulacji systemu immunologicznego, rozkładzie substancji toksycznych, w tym również substancji rakotwórczych i prekursorów tych substancji oraz hamowaniu rozwoju wielu mikroorganizmów chorobotwórczych. W rozpatrywaniu terapeutycznych właściwości probiotycznych produktów żywnościowych zwraca się uwagę na antagonizm bakterii probiotycznych w stosunku do *Helicobacter pylori*, bakterii związanej z powstawaniem wrzodów żołądka i dwunastnicy [Anonim 2006, Coconnier i in. 1998, Libudzisz 1999, 2002].

Prozdrowotne właściwości produktu probiotycznego zależą od liczby żywych i aktywnych komórek bakterii probiotycznych w chwili spożycia (powinna utrzymywać się na minimalnym poziomie  $10^6$  jtk/g lub wyższym). Dzielne spożycie 100 gram takiego produktu zapewnia ilość wystarczającą do wywołania korzystnych efektów zdrowotnych [Libudzisz 2008, Ruiz-Moyano i in. 2008]. Brak technologicznych możliwości obniżenia początkowej liczby drobnoustrojów środowiskowych surowca mięsnego jest podstawowym problemem adaptacji i rozwoju dodanych kultur probiotycznych. Rozwój tych szczepów podczas procesów technologicznych (dojrzewania) może być dodatkowo hamowany obniżoną aktywnością wody, zakwaszeniem środowiska, dodatkiem związków azotowych oraz stężeniem soli [De Vuyst i in. 2008].

Poza bezpieczeństwem zdrowotnym wśród nadrzędnych kryteriów technologicznych uzyskania probiotycznych produktów mięsnych należy wziąć pod uwagę zachowanie pożądanej jakości technologicznej, właściwych cech sensorycznych, charakterystycznego smaku, aromatu oraz konsystencji. Nieliczne dotąd doniesienia naukowe wykazują, iż możliwe jest uzyskanie wyrobów surowo dojrzewających z dodatkiem probiotyku spełniających powyższe kryteria [Anonim 2007, Kołożyn-Krajewska i Dolatowski 2009]. Celem niniejszych badań było określenie wpływu dodatku probiotyku na właściwości fizykochemiczne surowo dojrzewającej szynki wieprzowej.

## MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Szynka surowo dojrzewająca wyprodukowana została w warunkach przemysłowych według receptury opracowanej przez autorów. Do wyrobu szynki użyto surowca 48 h po uboju, bez wad jakościowych, rasy świń Wielka Biała Polska. Mięśnie pozyskano z pięciu sztuk zwierząt o masie przyżyciowej ok. 120–140 kg, pochodzących z gospodarstw ekologicznych. Surowiec peklowano mieszanką peklującą w ilości 2,8%, dodatek związków azotowych zgodny z Rozporządzeniem Ministra Zdrowia z dnia 18 września 2008 r. [Dz.U. z dnia 3 października 2008 r. Nr 177, poz.1094]. Po upływie 48 h od peklowania, w wybranych próbach (tab. 1) zastosowano próbną „sterylizację” powierzchni mięsa ultradźwiękami [Dolatowski i Stasiak 2002, Stasiak i in. 2007], dodano glukozę, napar herbaty oraz szczep bakterii probiotycznych *Lactobacillus casei* LOCK 0900. Dojrzewanie prowadzono w temp. 18–19°C. Wyroby wędzono zimnym dymem. Oceny produktów dokonano po 4-tygodniowym dojrzewaniu.

Kwasowość czynną (wartość pH) mierzono wg PN-77/A-82058 za pomocą elektrody zespolonej ERH-111 (Elmetron) i pH-metru CPC-501 (Elmetron). Potencjał oksydacyjno-redukcyjny (ORP) mierzono wg metody Nam i Ahn [2003]. Pomiaru wskaźnika utlenienia tłuszczu – TBARS dokonano wg metody Pikul i in. [1989]. Aktywność wody oznaczono przy użyciu aparatu Novasina w temp. 20°C. Pomiaru parametrów barwy dokonano metodą odbiciową przy użyciu spektrofotometru sferycznego firmy X-Rite



z otworem pomiarowym o średnicy 25,4 mm. Stosowano źródło światła D65 i standardowy obserwator kolorymetryczny o polu widzenia 10°. Wyniki wyrażano w jednostkach CIE  $L^*a^*b^*$  oraz CIE  $L^*C^*H^0$ , gdzie współrzędna  $L^*$  określa jasność,  $a^*$  chromatyczność w zakresie czerwono-zielonym,  $b^*$  chromatyczność w zakresie żółto-niebieskim. Współrzędne te zostały przekształcone na współrzędne cylindryczne  $L^*C^*H^0$ , gdzie współrzędna  $L^*$  również określa jasność barwy,  $C^*$  całkowitą chromatyczność (intensywność lub nasycenie barwy), natomiast współrzędna  $H^0$  odcień barwy [Krzywicki 1982]. Względną zawartość mioglobiny (Mb), oksymoglobiny (MbO<sub>2</sub>), metmioglobiny (MetMb) oraz ogólną zawartość barwników hemowych (OZB) w tkance mięśniowej oznaczono, mierząc absorbcję ekstraktu barwników za pomocą spektrofotometru Nicole Evolution 300 (Thermo Elektron Corporation) i przeliczając na poszczególne formy mioglobiny [Krzywicki 1982].

Tabela 1. Warianty badawcze  
Table 1. Variants research

Warianty Variants	Dodatek mikroorganizmów Added probiotic strains	Inne dodatki i sposób postępowania Other allowances and the treatment
PK	–	Glukoza 0,4%
LG	<i>Lactobacillus casei</i> ŁOOCK 0900 2 ml/kg	Glukoza 0,4%
LGU	<i>Lactobacillus casei</i> ŁOOCK 0900 2 ml/kg	Glukoza 0,4%; Sterylizacja ultradźwiękami
L	<i>Lactobacillus casei</i> ŁOOCK 0900 2 ml/kg	–
LGH	<i>Lactobacillus casei</i> ŁOOCK 0900 2 ml/kg	Glukoza 0,4%, napar herbaty zielonej 15 ml/kg

Doświadczenie obejmujące 5 różnych wariantów wyrobów wykonano na mięsie z 5 sztuk świń. Wyniki badań są średnią arytmetyczną z trzech równoległych oznaczeń każdego ze wskaźników pomiaru. Określenia zmienności wyników dokonano, obliczając odchylenie standardowe (program „Statistica 9”).

## WYNIKI I DYSKUSJA

Wyniki badań fizykochemicznych szyniek surowo dojrzewających wskazują na ich znaczne zróżnicowanie w zależności od wariantów badawczych (tab. 2).

Najniższą wartość pH w produkcie (5,42) zanotowano dla próby LG (próba z dodatkiem *Lactobacillus casei* ŁOOCK 0900 i glukozy). Wyższymi, w porównaniu z próbą kontrolną, wartościami tego parametru (pH=5,63) cechowały się próby: z dodatkiem probiotyku, bez glukozy i próba z zastosowaniem ultradźwięków, probiotyku i glukozy. Badania kwasowości produktu wykazały znaczne obniżenie wartości pH prób: z dodatkiem szczepu probiotycznego *Lactobacillus casei* ŁOOCK 0900 i glukozy (5,42) oraz próby z dodatkiem probiotyku, glukozy i naparu herbaty (5,48) w porównaniu do próby kontrolnej.

Tabela 2. Właściwości fizykochemiczne wyrobów  
Table 2. Physiochemical properties of products

Wyróżniki Parameters	Warianty – Variants									
	PK		LG		LGU		L		LGH	
	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD
pH	5,63	0,01	5,42	0,02	5,82	0,01	5,94	0,05	5,48	0,01
ORP [mV]	330,30	0,92	324,37	4,17	330,53	0,64	327,20	1,27	342,10	0,35
TBARS [mg /kg]	1,25	0,02	0,99	0,06	0,84	0,05	1,11	0,00	0,97	0,04
$a_w$	0,94	0,002	0,95	0,002	0,95	0,002	0,93	0,002	0,91	0,002

$\bar{x}$  – wartość średnia, SD – odchylenie standardowe;  $\bar{x}$  – mean, SD – standard deviation

Potencjał oksydacyjno-redukcyjny produktu oscylował w przedziale od 324 mV w próbie z dodatkiem *Lactobacillus casei* ŁOCK 0900 i glukozy do 342 mV w przypadku próby zawierającej dodatkowo napar herbaty zielonej. Zaobserwowano zbliżone wartości ORP w przypadku próby kontrolnej (330,30 mV) i próby „sterylizowanej” ultradźwiękami (330,53 mV).

Najniższymi wartościami wskaźnika TBARS (tab. 2), na poziomie 0,84 mg MDA/kg produktu, charakteryzowała się próba „sterylizowana” ultradźwiękami, co mogło być spowodowane zahamowaniem aktywności bakterii odpowiedzialnych za utlenianie i przekształcanie lipidów. Najwyższe wartości tego parametru (1,25 mg MDA/kg produktu) wykazywała próba kontrolna. Zaobserwowano zbliżone wartości wskaźnika TBARS dla wariantów badawczych LG i LGH, odpowiednio 0,99 i 0,97 mg MDA/kg produktu.

Najniższą aktywność wody (tab. 2) odnotowano w przypadku próby z dodatkiem naparu herbaty ( $a_w=0,91$ ) oraz próby z dodatkiem *Lactobacillus casei* ŁOCK 0900 bez glukozy ( $a_w=0,93$ ). Wyższymi, w porównaniu do próby kontrolnej (0,94), wartościami  $a_w$  charakteryzowała się próba zawierająca *Lactobacillus casei* ŁOCK 0900 i glukozę ( $a_w=0,95$ ) oraz próba „sterylizowana” ultradźwiękami ( $a_w=0,95$ ).

Zmiany barwy mięsa, wiążące się z przemianami barwników mięśniowych, przedstawiono w tabeli 1. Analiza form mioglobiny wykazała najwyższą ogólną zawartość barwników hemowych w przypadku próby z dodatkiem *Lactobacillus casei* ŁOCK 0900, glukozy i naparu herbaty zielonej (2,26 mg/g tkanki). W pozostałych próbach zawartość ta mieściła się w przedziale od 0,65 do 1,78 mg/g tkanki.

Najniższą ogólną zawartością barwników hemowych charakteryzowała się próba z dodatkiem *Lactobacillus casei* ŁOCK 0900, bez glukozy (0,65 mg/g). Zawartość oznaczonych związków przemian mioglobiny i ich wzajemne proporcje były zbliżone w przypadku próby z *Lactobacillus casei* ŁOCK 0900 z glukozą i próby z *Lactobacillus casei* ŁOCK 0900 bez glukozy. Próby te charakteryzowały się najwyższym udziałem MetMb (65,5–69,1%), świadczącej o utlenieniu mioglobiny i stopniowej utracie czerwonej barwy. W pozostałych próbach zawartość metmioglobiny mieściła się w zakresie 43,35–53,02%. Najniższym procentowym udziałem MetMb w ogólnej zawartości barwników hemowych (43,35%) charakteryzowała się próba z dodatkiem *Lactobacillus casei* ŁOCK 0900, glukozy i naparu herbaty zielonej. Maksymalny udział formy oksy-

mioglobiny w ogólnej zawartości barwników hemowych, wynoszący 16,77%, oznaczono w przypadku próby z *Lactobacillus casei* LOCK 0900, glukozą i naparem herbaty. Zawartość ta była wyższa o 2% w porównaniu do próby kontrolnej (14,76%).

Tabela 3. Względna zawartość Mb, MbO<sub>2</sub>, MetMb oraz ogólna zawartość barwników hemowych w tkance mięśniowej (OZB)

Table 3. The relative content of Mb, Mb O<sub>2</sub>, MetMb and overall dye content of heme (OZB) in muscle tissue

Zawartość Content	Warianty – Variants									
	PK		LG		LGU		L		LGH	
	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD	$\bar{x}$	SD
Mb [%]	36,45	3,19	23,20	3,78	32,45	0,95	18,82	6,65	39,83	0,90
MbO <sub>2</sub> [%]	14,76	2,26	11,27	2,09	14,53	2,03	12,00	1,52	16,77	0,90
MetMb [%]	48,79	5,28	65,52	5,80	53,02	1,60	69,19	8,11	43,35	1,97
OZB [mg/g]	1,78	0,44	0,69	0,15	1,49	0,59	0,65	0,10	2,26	0,11

$\bar{x}$  – wartość średnia, SD – odchylenie standardowe;  $\bar{x}$  – mean, SD – standard deviation

Procentowy udział purpurowoczerwonej formy Mb mieścił się w zakresie od 18,82% w przypadku próby z *Lactobacillus casei* LOCK 0900 bez glukozy do 39,83% w próbie z probiotykiem, glukozą i naparem herbaty zielonej. W przypadku próby kontrolnej, bez dodatku probiotyku, udział Mb w ogólnej zawartości barwników hemowych wynosił 36,45%.

Wyniki badań parametrów barwy w jednostkach CIE L\*a\*b\* oraz CIE L\*C\*H<sup>0</sup> przedstawiono w tabeli 4. Wartości oznaczonego parametru L\* barwy, bezpośrednio po wycięciu prób, oscylowały w przedziale od 41,83 w przypadku próby kontrolnej do 51,13 w przypadku próby z *Lactobacillus casei* LOCK 0900, glukozą i naparem herbaty. W pozostałych próbach wartości te były zbliżone i wynosiły od 48,3 do 51,11. Wraz z upływem czasu działania światła dziennego obserwowano wzrost parametru L\* we wszystkich próbach, z wyjątkiem próby „sterylizowanej” ultradźwiękami, w przypadku której nastąpił niewielki spadek tego parametru. Największe zmiany parametru L\* (o 4,5 jednostki po 3 h naświetlania) w stosunku do wyrobu kontrolnego zanotowano dla próby z *Lactobacillus casei* LOCK 0900, bez dodatku glukozy. Wartość jasności dla tego wyrobu po 3 godzinach przetrzymywania w świetle dziennym wynosiła 54,82, podczas gdy dla wyrobu kontrolnego była ona równa 42,09.

Wartości parametru a\* (tab. 4) kształtowały się na poziomie od 6,16 w przypadku próby z *Lactobacillus casei* LOCK 0900 bez dodatku glukozy, do 7,91 w przypadku próby z zastosowaniem ultradźwięków. Najwyższymi wartościami tego parametru, zbliżonymi do siebie, charakteryzowały się próby: z dodatkiem *Lactobacillus casei* LOCK 0900 i glukozy (7,9) oraz sterylizowana ultradźwiękami, z dodatkiem *Lactobacillus casei* LOCK 0900 i glukozy (7,91).

Tabela 4. Parametry barwy CIE L\*a\*b\* oraz CIE L\*C\*H<sup>0</sup> w czasie przetrzymywania produktu w świetle dziennymTable 4. CIE L\*a\*b\* and CIE L\*C\*H<sup>0</sup> color parameters during mean products exposure to light

Parametry barwy Colour parameters	Warianty – Variants				
	PK	LG	LGU	L	LGH
Wyróżnik L* – Parameter L*					
0 h	41,83	51,11	48,63	50,36	51,13
1 h	44,08	49,23	47,6	53,17	51,76
1,5 h	40,55	48,61	44,9	49,5	47,65
2 h	43,16	52,47	46,69	52,91	53,46
2,5 h	45,07	53,49	46,29	53,36	51,92
3 h	42,09	51,7	47,87	54,82	52,43
Wyróżnik a* – Parameter a*					
0 h	6,29	7,9	7,91	6,16	6,59
0,5 h	5,58	6,94	9,14	6,09	4,11
1 h	4,20	7,17	7,23	3,99	4,89
1,5 h	6,12	4,86	6,51	3,76	3,58
2 h	4,76	4,36	6,41	4,72	3,85
2,5 h	3,61	4,55	6,78	4,07	2,81
3 h	4,37	5,36	5,75	3,66	2,35
Wyróżnik b* – Parameter b*					
0 h	4,60	6,60	6,32	5,93	11,02
0,5 h	5,85	6,20	8,15	7,53	10,65
1 h	5,04	7,18	7,76	7,34	10,58
1,5 h	6,37	7,91	6,09	7,44	10,06
2 h	6,60	8,21	6,88	8,69	11,07
2,5 h	6,18	9,96	7,51	8,62	10,38
3 h	7,05	10,86	6,82	9,46	9,64
Wyróżnik C* – Parameter C*					
0 h	7,82	10,41	10,14	8,56	12,84
0,5 h	8,10	9,31	12,29	9,68	11,43
1 h	6,60	10,15	10,67	8,36	11,66
1,5 h	8,84	9,32	8,93	8,38	10,70
2 h	8,14	9,32	9,43	9,93	11,73
2,5 h	7,16	10,97	10,19	9,58	10,76
3 h	8,31	12,14	8,97	10,15	9,94
Wyróżnik H <sup>0</sup> – Parameter H <sup>0</sup>					
0 h	35,89	39,10	38,16	43,98	59,22
0,5 h	46,15	41,81	41,65	51,05	69,00
1 h	50,35	44,93	46,41	61,46	65,26
1,5 h	46,31	57,59	42,83	62,94	70,57
2 h	54,22	62,12	47,22	61,32	70,65
2,5 h	59,75	66,05	47,70	64,55	74,81
3 h	58,14	63,69	49,38	68,87	76,64

We wszystkich próbach, w miarę upływu czasu działania światła dziennego na wyroby, następowało zmniejszenie wartości parametru a\* barwy. Największą zmianą tego parametru, w porównaniu do próby kontrolnej, charakteryzowała się próba z dodatkiem probiotyku, glukozy i naparu herbaty zielonej (zmiana o 3,01 jednostki). Wartość parametru a\* dla tej próby po 3 godzinach naświetlania wynosiła 2,35.

Wartości parametru  $b^*$ , bezpośrednio po wycięciu próbki, kształtowały się na zróżnicowanym poziomie od 4,60 w przypadku próby kontrolnej do 11,02 w próbie z dodatkiem probiotyku, glukozy i naparu herbaty zielonej. We wszystkich próbach, z wyjątkiem próby z dodatkiem *Lactobacillus casei* ŁOCK 0900, glukozy i naparu herbaty zaobserwowano wzrost wartości tego parametru pod wpływem działania światła dziennego.

Zróżnicowanie intensywności barwy, przedstawione za pomocą parametru  $C^*$ , kształtowało się na poziomie od 7,82 w przypadku próby kontrolnej do 12,82 w przypadku próby z probiotykiem, glukozą i naparem herbaty zielonej.

Wartości parametru  $H^0$ , określającego odcień barwy, różniły się znacznie w poszczególnych próbach. Najwyższą wartością parametru  $H^0$ , w porównaniu do próby kontrolnej (35,89), charakteryzowała się próba z dodatkiem *Lactobacillus casei* ŁOCK 0900, glukozy i naparu herbaty zielonej (59,22). Podczas trzygodzinnego naświetlania światłem dziennym zaobserwowano znaczny wzrost wartości tej współrzędnej we wszystkich próbach.

W wyniku przeprowadzonych badań fizykochemicznych szynek surowo dojrzewających z dodatkiem probiotyku zaobserwowano jego wpływ na kwasowość i inne parametry fizykochemiczne wyrobu. Wyższymi wartościami pH, w porównaniu do próby kontrolnej (bez dodatku probiotyku), charakteryzowały się warianty LGU i L. Dodawana glukoza jest fermentowana przez bakterie bezpośrednio do kwasu mlekowego, co wpływa na zakwaszenie środowiska. W przypadku próby L (bez dodatku glukozy) przyczyną wysokiej wartości pH może być zbyt niska zawartość glukozy w surowcu, niewystarczająca do zapewnienia efektywnej fermentacji i obniżenia wartości pH [Libudzisz 2008]. Natomiast w przypadku próby „sterylizowanej” ultradźwiękami przypuszcza się, że oddziaływanie pola ultradźwiękowego zniszczyło rodzimą mikroflorę mięsa, co było obserwowane w badaniach [Dolatowski i Stasiak 2002, Stasiak i in. 2007], a liczba następnie wprowadzonych bakterii probiotycznych mogła być niedostateczna, aby szybko i efektywnie przeprowadzić fermentację i doprowadzić do zakwaszenia środowiska w całej próbce.

Aktywność wody jest jednym z ważniejszych czynników decydujących o trwałości żywności. Wpływa na rozwój drobnoustrojów, aktywność enzymów, szybkość utleniania tłuszczu i barwników. Obniżona aktywność wody ( $a_w \leq 0,95$ ) w badanych szynkach jest wynikiem szybkości odparowania wody podczas dojrzewania i wędzenia, dodatku substancji osmotycznych (sól, węglowodany) oraz kultur bakteryjnych.

Z analizy wyników przeprowadzonych badań można sądzić, iż dodatek bakterii probiotycznych *Lactobacillus casei* ŁOCK 0900 w każdym z zastosowanych wariantów badawczych (LG, LGU, L, LGH) mógł wpłynąć na obniżenie wskaźnika TBARS w porównaniu do próby kontrolnej. Na podstawie analizy względnej zawartości Mb, MbO<sub>2</sub> i MetMb stwierdzono wpływ naparu herbaty zielonej na zahamowanie przemian prowadzących do utlenienia mioglobiny w porównaniu do pozostałych prób. Próba ta charakteryzowała się najwyższą ogólną zawartością barwników hemowych, największym procentowym udziałem form Mb i MbO<sub>2</sub> oraz najmniejszym udziałem formy MetMb, odpowiedzialnej za brunatnienie wyrobu.

Wyniki badań parametrów barwy w systemie CIE  $L^*a^*b^*$  oraz CIE  $L^*C^*H^0$  (tab. 4) sugerują, że bakterie probiotyczne wpływają na wzrost jasności barwy (parametru  $L^*$ ) w porównaniu do próby kontrolnej. Wzrost tego parametru w czasie ekspozycji na światło dzienne obserwowano we wszystkich wyrobach z wyjątkiem próby „sterylizowanej”

ultradźwiękami, w przypadku której nastąpił niewielki spadek parametru L\*. Największym rozjaśnieniem barwy (o 4,5 jednostki) charakteryzowała się próba z *Lactobacillus casei* LOCK 0900 bez dodatku glukozy.

## PODSUMOWANIE

Na podstawie wyników przeprowadzonych badań można stwierdzić, że zastosowanie probiotycznego szczepu *Lactobacillus casei* LOCK 0900 jest możliwe do produkcji szynki surowo dojrzewających. Dodatek glukozy w ilości 0,4% wpłynął na szybkość i efektywność procesu fermentacji. Przypuszcza się, iż dodatek *Lactobacillus casei* LOCK 0900 oddziaływał hamująco na oksydację lipidów, czego wskaźnikiem jest oznaczony wskaźnik TBARS. Wpływ dodatku naparu herbaty jako naturalnego przeciwutleniacza wpłynął na zmiany potencjału oksydacyjno-redukcyjnego, parametrów b\*, C\*, H<sup>0</sup> barwy, obniżenie aktywności wody i ogólnej zawartości barwników hemowych w tkance mięśniowej.

Badania dodatku bakterii probiotycznych w produkcji wędzonek surowo dojrzewających w naszym i innych krajach są we wstępnej fazie przygotowań technologicznych. W dostępnej literaturze brak jest wyników badań dotyczących ich wpływu zarówno na proces produkcyjny, jak i jakość fizykochemiczną.

## PIŚMIENNICTWO

- Anonim, 2007. Kiełbasy surowe o wartości prozdrowotnej. Mięso i Wędliny, 4: 42–47, [za:] Fleischwirtschaft 2006,10: 31–34.
- Arihara K., 2006. Strategies for desinging novel functional meat products. Meat Science, 74: 219–229.
- Coconnier M.H., Lievin V., Hemery E., Servin A.L., 1998. Antagonistic activity against *Helicobacter* infection in vitro and in vivo by the human *Lactobacillus acidophilus* strain LB. Applied Environmental Microbiology, 64: 4573–4580.
- De Vuyst L., Falony G., Leroy F., 2008. Probiotics in fermented sausages. Meat Science, 80: 75–78.
- Dolatowski Z.J., Stasiak D.M., 2002. Czystość mikrobiologiczna mięsa i szynki parzonej po obróbce ultradźwiękowej. Technologia Alimentaria, 1(1): 55–65.
- Kołożyn-Krajewska D., Dolatowski Z.J., 2009. Probiotics in fermented meat products. Acta Scientiarum Polonorum, Technologia Alimentaria, 8(2): 61–74.
- Krzywicki K., 1982. The determination of hem pigment in meat. Meat Science, 7: 29–35.
- Libudzisz Z., 1999. Probiotyki i prebiotyki w żywieniu człowieka. Przem. Spoż., 53, 1: 15–18.
- Libudzisz Z., 2002. Probiotyki i prebiotyki w fermentowanych napojach mlecznych. Pediatria Współczesna. Gastroenterologia, Hepatologia i Żywnienie Dziecka, 4: 1, 19–25.
- Libudzisz Z., 2008. Bakterie fermentacji mlekowej. Mikrobiologia Techniczna, tom 2, Wyd. Naukowe PWN, Warszawa, 49–58.
- Nam K.C., Ahn D.U., 2003. Effects of ascorbic acid antioxidants on the color of irradiated ground beef. Journal of Food Science, 68: 689–690.
- Pałacha Z., 2008. Aktywność wody ważny parametr trwałości żywności. Przem. Spoż., 4: 22–25.
- Pikul J., Leszczyński D.E., Kummerow F.A., 1989. Evaluation of three modified TBA methods for measuring lipid oxidation in chicken meat. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 37: 1309.

- Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 18 września 2008 r. w sprawie dozwolonych substancji dodatkowych. Dz. U. z dnia 3 października 2008 r. Nr 177, poz. 1094.
- Ruiz-Moyano S., Martin A., Benito M. J., Nevado F.P., de Guía Córdoba M., 2008. Screening of lactic acid bacteria and bifidobacteria for potencial probiotic use in Iberian dry fermented sausages. *Meat Science*, 80: 715–721.
- Stasiak D.M., Dolatowski Z.J., Kordowska-Wiater M., 2007. Ogólna liczba drobnoustrojów oraz *Salomonelli* na powierzchni skóry tuszek kurcząt brojlerów po sonikacji. *Med. Wet.*, 63(10): 1230–1233.
- Ziarno M., Zaręba D., 2008. Charakterystyka komercyjnych kultur startowych stosowanych w przetwórstwie mięsa. *Med. Wet.*, 64(9): 1078–1082.

### PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF RAW RIPENING HAMS WITH THE ADDITION OF PROBIOTIC

**Abstract.** The objective of the research was to prepare a meat product technology and to determine the effect of probiotic microflora on the physicochemical properties of the product. Research material were pork ham and probiotic bacteria strain *Lactobacillus casei* LOCK 0900 (patent No. P-382761). The scope of research included the production and evaluation of raw ripening probiotic products. Physicochemical evaluation was made by measuring of color parameters in the system of the CIE L \* a \* b \* and CIE L \* C \* H<sup>0</sup>, acidity, ORP, TBARS values, water activity. Measured the relative content of Mb, MbO<sub>2</sub>, MetMb and overall dye content of heme (OZB) in muscle tissue. Following this study found the development and influence of added probiotic strain on the growth of acidity of the product. Application of *Lactobacillus casei* LOCK 0900 production raw ham ripening resulted in changes in the oxidation of fats (which is expressed by a lower TBARS values), changes oxidation-reduction potential, transformation myoglobin and parameters of color compared to the sample without added probiotic.

**Key words:** ham ripening, *Lactobacillus casei*, physicochemical properties

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 30.03.2010

Do cytowania – For citation: Skwarek M., Dolatowski Z.J., 2010. Właściwości fizykochemiczne szynek surowo dojrzewających z dodatkiem probiotyku. *Acta Sci. Pol. Biotechnol.* 9(1), 15–24.





## LIPAZY PRODUKOWANE PRZEZ DROŻDŻE *YARROWIA LIPOLYTICA*

Jolanta Krzyczkowska, Izabela Stolarzewicz, Dorota Nowak,  
Ewa Białecka-Florjańczyk

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

**Streszczenie.** Praca miała na celu określenie zmian aktywności lipaz w poszczególnych fazach wzrostu drożdży *Yarrowia lipolytica* oraz dokonanie porównania i zestawienia aktywności lipaz zewnątrz- i wewnątrzkomórkowych. Podczas hodowli szczepu *Yarrowia lipolytica* KKP 379 w bioreaktorze dokonywano pomiaru gęstości optycznej komórek drożdży oraz określano aktywność lipolityczną frakcji supernatantu. Porównania aktywności lipaz zewnątrzkomórkowych (w supernatancie po hodowli) z lipazami znajdującymi się we wnętrzu komórek dokonywano, mierząc aktywność lipolityczną supernatantu powstałego po procesie częściowego uszkodzenia ściany komórkowej. Aktywność poszczególnych frakcji szacowano na podstawie stopnia hydrolizy oleinianu etylu.

Uzyskane wyniki pozwoliły stwierdzić, iż szczep drożdży *Yarrowia lipolytica* KKP 379 jest zdolny do produkcji zarówno lipaz zewnątrz-, jak i wewnątrzkomórkowych. Ilość lipaz wydzielanych do podłoża wzrasta w trakcie prowadzenia hodowli.

**Słowa kluczowe:** lipazy, aktywność lipolityczna, enzymy wewnątrzkomórkowe i zewnątrzkomórkowe, *Yarrowia lipolytica*

### WSTĘP

Lipazy (EC 3.1.1.3) stanowią grupę enzymów, które na granicy fazy wodno-lipidowej katalizują hydrolizę triacylogliceroli do glicerolu i długołańcuchowych kwasów tłuszczowych [Schmid i Verger 1998]. W ostatnich latach obserwowane jest rosnące zainteresowanie tymi enzymami, głównie ze względu na możliwość ich szerokiego biotechnologicznego zastosowania. Lipazy katalizują reakcje hydrolizy, estryfikacji i transestryfikacji różnych substratów [Villeneuve i in. 2000]. Ich przemysłowe zastosowanie dotyczy m.in. produkcji detergentów [Hasan i in. 2006], kosmetyków [Abate i in. 2004, Hasan i in. 2006], farmaceutyków [Vellard 2003, Houde i in. 2004] oraz żywności [Gandhi 1997]. Najszersze zastosowanie w przemyśle znajdują lipazy pochodzenia mikrobiologicznego. Dużą aktywnością lipolityczną cechują się m.in. niekonwencjo-

---

Adres do korespondencji – Corresponding author: Jolanta Krzyczkowska, Katedra Chemii, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa, e-mail: jolanta\_krzyczkowska@sggw.pl

nalne drożdże *Yarrowia lipolytica*, znane pod synonimami *Saccharomycopsis lipolytica*, *Candida lipolytica* czy *Mycotorula lipolytica* [Yu i in. 2007, Turki i in. 2010]. Sekrecja lipaz przez drożdże *Yarrowia lipolytica* po raz pierwszy odnotowana została już w 1948 roku [Yu i in. 2007]. Dalsze badania potwierdziły zdolność tych mikroorganizmów do produkcji lipaz zarówno zewnątrzkomórkowych, wewnątrzkomórkowych, jak i związanych z organellami komórkowymi. Zidentyfikowano trzy geny *Yarrowia lipolytica*: *LIP1*, *LIP2* oraz *LIP3* odpowiedzialne za wysoką aktywność lipolityczną tych drożdży, przy czym udowodniono, iż *LIP 2* koduje lipazy zewnątrzkomórkowe, zaś pozostałe dwa – enzymy wewnątrzkomórkowe [Vakhlou i Kour 2006]. Prowadzone w ostatnich latach badania nad osiąganiem wysokiej aktywności lipolitycznej drożdży *Yarrowia lipolytica* dotyczą m.in. optymalizacji ich warunków hodowli [Guerzoni i in. 2001], w tym doboru odpowiednich źródeł węgla i azotu w pożywce [Fickers i in. 2004], właściwego pH czy stosownego napowietrzania [Amaral i in. 2007]. Uwaga naukowców skupiona jest głównie na pozyskiwaniu lipaz zewnątrzkomórkowych [Destain i in. 1997, Fickers i in. 2004, Amaral i in. 2007], które w porównaniu z wewnątrzkomórkowymi [Adamczak i Bednarski 2004] są łatwiejsze do wydzielenia w czystej postaci.

Celem pracy było określenie zmian aktywności lipaz w poszczególnych fazach wzrostu drożdży *Yarrowia lipolytica* oraz porównanie i zestawienie aktywności lipaz wewnątrz- i zewnątrzkomórkowych.

## MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Materiał stosowany w badaniach stanowił szczep drożdży *Yarrowia lipolytica* KKP 379 pochodzący z Kolekcji Kultur Drobnoustrojów Przemysłowych Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego w Warszawie. Drożdże przechowywano w temperaturze 4°C, na skosach YPD (2% glukozy, 2% peptonu, 1% ekstraktu drożdżowego, pH=5) z dodatkiem 2% agaru.

### Hodowla drożdży

Hodowlę prowadzono w bioreaktorach BIOFLO 115 (New Brunswick Scientific Edison, N.I., USA) (o objętości roboczej 0,6 lub 1,5 dm<sup>3</sup>), wykorzystując płynne podłoże namnażające YPD z 1% dodatkiem oliwy z oliwek. Inokulum wprowadzane do bioreaktora pozyskano w wyniku hodowli dwóch prakultur: pierwszej 48-godzinnej, drugiej 24-godzinnej na podłożu YPD, w temperaturze 28°C. Namnażanie komórek w bioreaktorze odbywało się przez 24 h, w temperaturze 28°C, przy utrzymaniu kwasowości pożywki na poziomie nie niższym niż pH 5,0 za pomocą 16% roztworu wodorotlenku amonu; stosowana szybkość mieszania – 400 obr./min. W trakcie hodowli pobierano próbki, w których określano aktywność lipolityczną oraz gęstość optyczną (OD).

### Pomiar aktywności lipolitycznej

Aktywność lipolityczną drożdży określano na podstawie hydrolizy oleinianu etylu. W tym celu do szklanych fiolek o pojemności 3 ml wprowadzano 100 µl roztworu oleinianu etylu w acetonie (10 µmol), kolejno dodawano odpowiednią ilość buforu fosforanowego (50 mM) o pH 6,5 oraz supernatantu, komórek bądź supernatantu powstałego w wyniku częściowego uszkodzenia komórek, tak by całkowita objętość wprowadzona do fiołki stanowiła 1 ml. Reakcję prowadzono w temperaturze 30°C przez 15 min, sto-

sując mieszadło magnetyczne z łaźnią wodną. Po tym czasie reakcję przerywano poprzez dodatek 950  $\mu$ l roztworu kwasu siarkowego w etanolu (100/0,8; v/v). Całość mieszano na wortexie. Na dalszym etapie dodawano 50  $\mu$ l standardu wewnętrznego. Produkty reakcji ekstrahowano za pomocą 1 ml heksanu, po czym pobierano 200  $\mu$ l fazy heksanowej, dodawano po 25  $\mu$ l MSTFA (*N*-metylo-*N*-(trimetylosililo)-trifluoroacetamid) oraz pirydyny i tak przygotowane próbki wstawiano do łaźni wodnej o temperaturze 50°C na okres 20 minut. Po tym czasie prowadzono analizę na chromatografii gazowej HP 6890 II (inietor typu Split, detektor FID), stosując następujące parametry: temperatura inietora 280°C, temperatura detektora 290°C, program temperaturowy 200–225°C, przyrost 10°C/min, przepływ helu w kolumnie 2 ml/min, objętość nastroju 0,5  $\mu$ l.

Każdą próbkę przygotowano i analizowano w trzykrotnym powtórzeniu. Aktywność lipaz wyrażano w unitach – jeden unit (U) to ilość enzymu katalizująca przemianę 1  $\mu$ mola substratu w czasie 1 min.

#### Przygotowanie próbek do pomiaru aktywności lipolitycznej

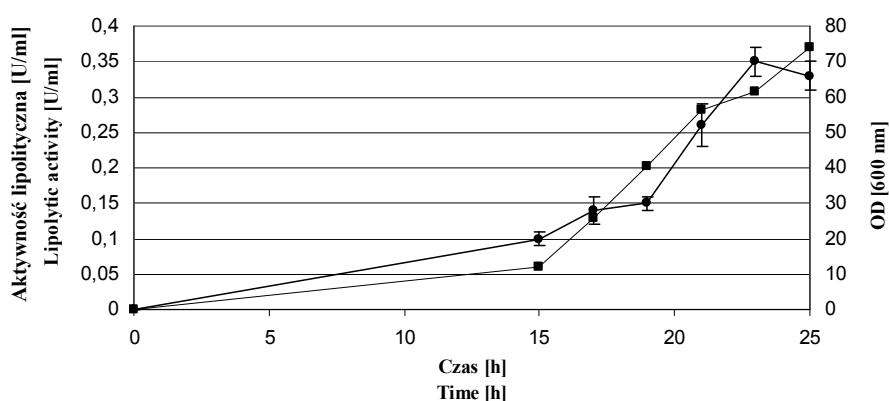
Ustalenie optymalnych warunków namnażania i skorelowanie aktywności lipolitycznej z fazami wzrostu drożdży pozwoliło w dalszej części pracy na przeprowadzenie hodowli w większej objętości (objętość robocza bioreaktora 1,5 dm<sup>3</sup>), zachowując optymalny z punktu widzenia analizowanej wcześniej aktywności 24-godzinny czas namnażania komórek. Hodowlę taką poddano kompleksowemu badaniu pod kątem aktywności lipolitycznej. Zbadano obecność lipaz w supernatancie (tab. 1, próbka nr 1) i komórkach (tab. 1, próbka nr 2) odwirowanych (3500xg; 10 min) bezpośrednio po zakończeniu hodowli. Określono aktywność traconą w wyniku trzykrotnego przemywania (każdorazowo porcjami 50 ml) komórek wodą (tab. 1, próbki nr 10, 11, 12). Z uwagi na brak możliwości technicznych jednorazowego wykonania analiz wszystkich próbek kolejne analizy aktywności lipolitycznej wykonywano na materiale poddanym wcześniejszemu zamrożeniu (-20°C). W celu porównania (w stosunku do próbek nr 1 i 2; tab. 1) oszacowano aktywność enzymów lipolitycznych w próbkach rozmrożonego supernatantu (tab. 1, próbka nr 3) i komórek (tab. 1, próbka nr 4 i 7). Aby przeanalizować aktywność wewnątrzkomórkową szczepu *Yarrowia lipolytica* KKP 379, w komórkach przeprowadzono dezintegrację ściany komórkowej. Dlatego odpowiednią naważkę komórek wortexowano przez 10 min z odpowiadającą masie komórek ilością szkolnych perełek, a następnie wirowano przez 10 min, stosując 5000 obr./min, a wzorując się na postępowaniu opisanym w pracy Dagbagli i Goksungur [2008]. Aktywność lipolityczna tak przygotowywanych próbek szacowana była zarówno w uszkodzonych komórkach (tab. 1, próbka nr 5), jak i supernatancie uwolnionym w trakcie ich 10-minutowego wirowania (tab. 1, próbka nr 6). Analogicznie przygotowano i wykonano analizy partii biomasy wcześniej poddanej trzykrotnemu przemyciu wodą (tab. 1, próbki nr 8 i 9).

#### Pomiar gęstości optycznej

Pomiaru gęstości optycznej (OD) dokonywano na spektrofotometrze BECKMAN DU-640B, przy długości fali 600 nm. Podczas hodowli do probówek typu eppendorf pobierano 1 ml kultury, którą następnie wirowano przez 5 min przy obrotach 3500xg. Supernatant zlewano znad osadu, a komórki zawieszano w 1 ml wody destylowanej. Zawiesinę wprowadzano do kuwety i dokonywano pomiaru OD.

## WYNIKI I OMÓWIENIE

Pierwszy etap przeprowadzonych doświadczeń miał na celu porównanie aktywności lipolitycznej zewnątrzkomórkowych lipaz wydzielanych przez drożdże *Yarrowia lipolytica* KKP 379 w poszczególnych fazach wzrostu tych mikroorganizmów. Podczas 25-godzinnej hodowli drożdży prowadzonej na małą skalę (w bioreaktorze o objętości roboczej 0,6 dm<sup>3</sup>) pobrano w odpowiednich odstępach czasu 6 próbek, w których oznaczono gęstość optyczną i aktywność lipolityczną supernatantu, otrzymanego po odwirowaniu komórek. Uzyskane wyniki przedstawiono na rysunku 1.



Rys. 1. Zewnątrzkomórkowa aktywność lipolityczna (◆) oraz gęstość optyczna (■) drożdży *Yarrowia lipolytica* KKP 379

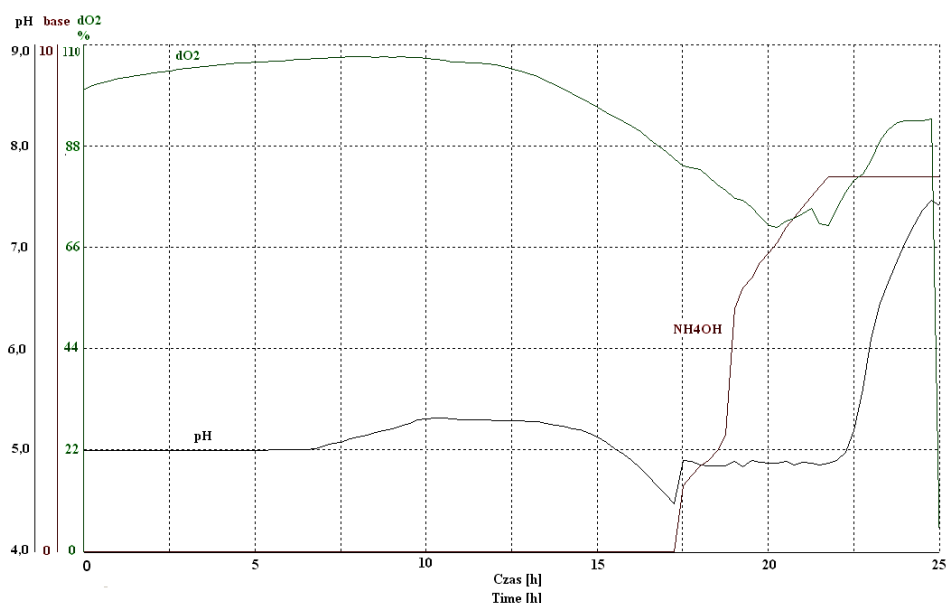
Fig. 1. Extracellular lipolytic activity (◆) and optical density (■) of yeast *Yarrowia lipolytica* KKP 379

W warunkach okresowej hodowli mikroorganizmów do 23 h obserwowano wzrost zewnątrzkomórkowej aktywności lipolitycznej. W 23. h odnotowano najwyższą aktywność w supernatancie ( $0,35 \pm 0,02$  U/ml). Wzrastający poziom zewnątrzkomórkowych enzymów lipolitycznych skorelowany jest ze wzrostem liczby komórek w podłożu, który szacowano na podstawie pomiarów wartości OD i który można powiązać z krzywymi:  $dO_2$ , pH i zużycia wodorotlenku amonu, zarejestrowanymi w trakcie hodowli drożdży w bioreaktorze (rys. 2).

Najwyższą zewnątrzkomórkową aktywność lipolityczną zaobserwowano w początkowej fazie zwolnionego wzrostu drożdży *Yarrowia lipolytica*. W tym stadium następował wzrost wartości pH spowodowany prawdopodobnie przyrostem liczby komórek martwych. Szacowany poziom lipaz zewnątrzkomórkowych mógł być więc po części skutkiem postępującej już proteolizy komórek [Pereira-Mairalles i in. 2000].

Wyniki te w dużym stopniu są zgodne z efektem doświadczeń przeprowadzonych przez Pereira-Mairalles i in. [2000]. Dokonując pomiaru aktywności lipolitycznej szczepu *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50682 hodowanego na podłożach z dodatkiem oliwy z oliwek lub glukozy, naukowcy zauważyli pewną prawidłowość. Niezależnie od zastosowanego podłoża, w początkowym okresie hodowli, nie odnotowywano zewnątrzkomórkowej aktywności lipolitycznej. Autorzy uważają, iż w czasie intensywnego

wzrostu komórek, któremu sprzyja duże stężenie substratów w podłożu, lipazy są produkowane, ale nie wydzielają się na zewnątrz, lecz kumulują w przestrzeni między ścianą a błoną komórkową. Sekrecja lipaz do podłoża następowała dopiero wówczas, gdy poziom źródeł węgla w podłożu obniżał się do 50%.



Rys. 2. Zmiany poszczególnych parametrów ( $dO_2$ , pH i ilości neutralizatora –  $NH_4OH$ ) mierzonych podczas hodowli okresowej drożdży *Yarrowia lipolytica* KKP 379

Fig. 2. Analysis of variance of the parameters ( $dO_2$ , pH,  $NH_4OH$ ) during the yeast growth *Yarrowia lipolytica* KKP 379 in batch process

Podobnie można interpretować wyniki uzyskane w tej pracy. Bardzo niska aktywność lipolityczna próbki supernatantu pobranej po 15 h ( $0,10 \pm 0,01$  U/ml) może wynikać z wysokiego jeszcze stężenia substratów (oliwy i glukozy) w pożywce. Sukcesywny spadek dostępności źródeł węgla spowodowany intensywnym wzrostem komórek (faza wzrostu wykładniczego), szczególnie między 15. a 17. h hodowli (dwukrotny wzrost OD z 12,2 do 25,8), wywołuje konieczność uwalniania enzymów w celu utrzymania funkcji życiowych komórek.

Aby uzyskać szczegółowe informacje na temat lipaz produkowanych przez drożdże *Yarrowia lipolytica* KKP 379, w tym lipaz wydzielanych i kumulowanych na zewnątrz i we wnętrzu komórek, materiał badawczy pochodzący z 24-godzinnej hodowli w bioreaktorze (o objętości roboczej  $1,5 \text{ dm}^3$ ) poddano szczegółowej analizie aktywności lipolitycznej, opisaną w metodyce. Otrzymane wyniki, wyrażone w U/g biomasy, zestawiono w tabeli 1.

Analiza przedstawionych w tabeli 1 danych umożliwia porównanie ilości lipaz wydzielanych na zewnątrz z ilością enzymów kumulowanych we wnętrzu komórek, daje pogląd na temat wpływu zamrażania na aktywność lipolityczną próbek oraz umożliwia procentowe oszacowanie strat aktywności w wyniku kilkakrotnego przemywania komórek wodą.

Tabela 1. Aktywność lipolityczna poszczególnych próbek 24-godzinnej hodowli drożdży *Yarrowia lipolytica* KKP 379Table 1. Lipolytic activity different samples of yeast *Yarrowia lipolytica* KKP 379

Nr próbki No.	Rodzaj próbki Samples	Aktywność lipolityczna (U/g biomasy) Lipolytic activity (U/g biomass)
1.	Supernatant – Supernatant	21,25 <sup>(±1,13)</sup>
2.	Komórki – Cells	1,30 <sup>(±0,04)</sup>
3.	Supernatant po rozmrożeniu – Defrosted supernatant	14,50 <sup>(±2,56)</sup>
4.	Komórki po rozmrożeniu – Defrosted cells	4,53 <sup>(±0,79)</sup>
5.	Komórki (rozmrożone) po uszkodzeniu ściany komórkowej – Defrosted cells after cell wall destruction	5,10 <sup>(±0,10)</sup>
6.	Supernatant powstały w wyniku uszkodzenia ściany komórkowej Supernatant after cell wall destruction	0,35 <sup>(±0,03)</sup>
7.	Komórki (rozmrożone) 3-krotnie przemyte wodą Defrosted cells, after three washes in water	3,32 <sup>(±0,09)</sup>
8.	Komórki (rozmrożone) 3-krotnie przemyte wodą, po uszkodzeniu ściany komórkowej Defrosted cells, three washes in water, after cell wall destruction	3,95 <sup>(±0,08)</sup>
9.	Supernatant powstały po uszkodzeniu ściany komórkowej komórek rozmrożonych, 3-krotnie przemytych wodą – Supernatant after cell wall destruction, three washes in water	0,31 <sup>(±0,07)</sup>
10.	Woda z pierwszego przemycia komórek Water from first cells washes	0,26 <sup>(±0,05)</sup>
11.	Woda z drugiego przemycia komórek Water from second cells washes	0,11 <sup>(±0,03)</sup>
12.	Woda z trzeciego przemycia komórek Water from third cells washes	0,10 <sup>(±0,06)</sup>

(±) – odchylenie standardowe

(±) – standard deviation

W 24-godzinnej hodowli komórek na podłożu YPD z 1% dodatkiem oliwy z oliwek aktywność supernatantu powstałego w wyniku uszkodzenia komórek w trakcie wortełkowania ze szklanymi perełkami (próbka nr 6), będąca miarą obecności enzymów wewnątrzkomórkowych, stanowi ok. 2,5% aktywności lipaz zewnątrzkomórkowych, wydzielonych do podłoża (próbka nr 3); obie wartości odniesione do próbek rozmrożonych. Częściowe naruszenie ściany komórkowej w wyniku zamrażania bądź celowe uszkodzenie wywołane dezintegracją przy udziale szklanych perełek powoduje uwolnienie części enzymów wewnątrzkomórkowych i wzrost aktywności lipolitycznej próbek, z wartości  $1,30 \pm 0,04$  U/g biomasy w wypadku całych, nieuszkodzonych komórek otrzymanych bezpośrednio po zakończonej hodowli (próbka nr 2) do  $4,53 \pm 0,79$  U/g w odniesieniu do komórek rozmrożonych (próbka nr 4), po  $5,10 \pm 0,10$  U/g biomasy u komórek wirowanych ze szklanymi perełkami (próbka nr 5). Porównywalny wzrost aktywności, na skutek dezintegracji, obserwowano również w przypadku komórek poddawanych uprzednio przemyciu (próbki nr 7 i 8) – wzrost aktywności o ok. 19%.

Zamrażanie wpływa negatywnie na poziom aktywności lipolitycznej supernatantu. W wyniku kilkudniowego mrożenia w temperaturze minus 20°C tracone jest, w przeliczeniu na g biomasy, ok. 32% aktywności (spadek z wartości  $21,25 \pm 1,13$  U/g – próbka nr 1 do  $14,5 \pm 2,56$  U/g – próbka nr 3).

Przemywanie komórek wodą prowadzi również do utraty części enzymów lipolitycznych (próbki nr 10, 11, 12). Jednokrotne obmycie komórek wodą powoduje straty 20% aktywności, przy dwustopniowym przemywaniu tracone jest 28,5%, zaś trzykrotne zawieszenie komórek w wodzie, a następnie ich odwirowanie skutkuje aż 36,2% utratą aktywności – wszystkie wartości aktywności odniesione do g namnożonej biomasy.

## WNIOSKI

1. Szczep drożdży *Yarrowia lipolytica* KKP 379 jest zdolny do produkcji lipaz zewnątrz- i wewnątrzkomórkowych.
2. Poziom lipaz wydzielanych do podłoża (zewnątrzkomórkowych) wzrasta w trakcie prowadzenia hodowli i jest skorelowany z fazami wzrostu badanego szczepu drożdży.
3. Mrożenie powoduje częściową utratę aktywności lipolitycznej próbek supernatantu.
4. Częściowe uszkodzenie ściany komórkowej drożdży w wyniku zamrażania bądź celowe naruszenie struktury komórki, będące wynikiem dezintegracji z zastosowaniem szklanych perełek, uwalnia część enzymów wewnątrzkomórkowych i skutkuje (13–19%) wzrostem aktywności lipolitycznej próbek.

## PIŚMIENNICTWO

- Abate A., Brenna E., Fuganti C., Gatti F., Serra S., 2004. Lipase-catalysed preparation of enantiomerically enriched odorants. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 32: 33–51.
- Adamczak M., Bednarski W., 2004. Enhanced activity of intracellular lipases from *Rhizomucor miehei* and *Yarrowia lipolytica* by immobilization on biomass support particles. *Process Biochemistry*, 39: 1347–1361.
- Amaral P.F.F., Almeida A.P.R., Peixoto T., Rocha-Leao M.H.M., Coutinho J.A.P., Coelho M.A.Z., 2007. Beneficial effects of enhanced aeration using perfluorodecalin in *Yarrowia lipolytica* cultures for lipase production. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 23: 339–344.
- Dagbagli S., Goksungur Y., 2008. Optimization of  $\beta$ -galactosidase production using *Kluyveromyces lactis* NRRL Y-8279 by response surface methodology. *Electronic Journal of Biotechnology*, 11: 4.
- Destain J., Roblain D., Thonart P., 1997. Improvement of lipase production from *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnology Letters*, 19, 2: 105–107.
- Fickers P., Nicaud J.M., Gaillardin C., Destain J., Thonart P., 2004. Carbon and nitrogen sources modulate lipase production in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Applied Microbiology*, 96: 742–749.
- Gandhi N., 1997. Applications of lipase. *Jaocs*, 74, 6: 621–632.
- Guerzoni M.E., Lanciotti R., Vannini L., Galgano F., Favati F., Gardini F., Suzzi G., 2001. Variability of the lipolytic activity in *Yarrowia lipolytica* and its dependence on environmental conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 69: 79–89.
- Hasan F., Shah A., Hameed A., 2006. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, 39: 235–251.

- Houde A., Kademi A., Leblanc D., 2004. Lipases and their industrial applications. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 118: 155–170.
- Pereira-Meirelles F.V., Rocha-Leao M.H.M., Sant'Anna Jr. G., 2000. Lipase location in *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnology Letters*, 22: 71–75.
- Schmid R.D., Verger R., 1998. Lipases: Interfacial enzymes with attractive applications. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 37: 1608–1633.
- Turki S., Ayed A., Chalghoumi N., Weekers F., Thonart P., Kallel H., 2010. An enhanced process for the production of a highly purified extracellular lipase in the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 160: 1371–1385.
- Vakhlu J., Kour J., 2006. Yeast lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. *Electronic Journal of Biotechnology*, 9, 1: 69–85.
- Vellard M., 2003. The enzyme as drug: application of enzymes as pharmaceuticals. *Current Opinion in Biotechnology*, 14, 4: 444–450.
- Villeneuve P., Muderhwa J., Graille J., Haas M., 2000. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 9: 113–148.
- Yu M., Qin S., Tan T., 2007. Purification and characterization of the extracellular lipase Lip2 from *Yarrowia lipolytica*. *Process Biochemistry*, 42: 384–391.

#### LIPASES PRODUCE BY YEAST *YARROWIA LIPOLYTICA*

**Abstract.** The aim of this investigation was to report the lipase location in yeast *Yarrowia lipolytica* KKP 379 and relationship extracellular lipase activity with cell growth. During yeast culture in bioreactor, optical density (OD) and enzymatic activity of supernatant were measured. Intracellular lipase activity was determined before and after cell wall damage. Comparison and details for *Yarrowia lipolytica* KKP 379 lipase activity was determined by the chromatographic method, using ethyl oleate as substrate. The results showed that the yeast *Yarrowia lipolytica* KKP 379 produce extra- and intracellular lipase. Extracellular lipase activity is cell growth dependent.

**Key words:** lipase, lipolytic activity, extra- and intracellular enzymes, *Yarrowia lipolytica*

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 30.03.2010

Do cytowania – For citation: Krzyczkowska J., Stolarzewicz I., Nowak D., Białecka-Florjańczyk E., 2010. Lipazy produkowane przez drożdże *Yarrowia lipolytica*. *Acta Sci. Pol. Biotechnol.* 9(1), 25–32.



## SPIS TREŚCI CONTENTS

**Joanna Chmielewska, Joanna Kawa-Rygielska**

Aktywność fermentacyjna drożdży gorzelnicznych w obecności cynku (II)..... 3  
Fermentative activity of distillery yeast in zinc (II) presence

**Monika Skwarek, Zbigniew J. Dolatowski**

Właściwości fizykochemiczne szynek surowo dojrzewających z dodatkiem  
probiotyku..... 15  
Physicochemical properties of raw ripening hams with the addition of probiotic

**Jolanta Krzyczkowska, Izabela Stolarzewicz, Dorota Nowak,  
Ewa Bialecka-Florjańczyk**

Lipazy produkowane przez drożdże *Yarrowia lipolytica* ..... 25  
Lipases produce by yeast *Yarrowia lipolytica*