

ACTA SCIENTIARUM POLONORUM

Czasopismo naukowe założone w 2001 roku przez polskie uczelnie rolnicze

Biotechnologia

Biotechnologia

7(2) 2008



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), Edward Niedźwiecki (Szczecin),
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)

Korekta:

Janina Szydłowska
mgr Elżbieta Winiarska-Grabosz

Łamanie

Halina Sebzda

Projekt okładki

Daniel Morzyński

ISSN 1644-065X

*Wydanie publikacji dofinansowane ze środków Uniwersytetu Przyrodniczego
we Wrocławiu*

© Copyright by Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu,
Wrocław 2008

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. druk. 2,75
Druk i oprawa: Wydawnictwo Tekst Sp. z o.o.
ul. Kossaka 72, 85-307 Bydgoszcz

BIOSYNTETA KWASU SZCZAWIOWEGO Z PORAFINACYJNYCH KWASÓW TŁUSZCZOWYCH PRZEZ *ASPERGILLUS NIGER* W HODOWLACH PÓLCIĄGŁYCH*

Izabela Musiał, Waldemar Rymowicz, Danuta Witkowska

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Streszczenie. Celem pracy jest ocena wpływu stężenia N i P w podłożu hodowlanym na dynamikę i wydajność procesu produkcji kwasu szczawiowego z porafinacyjnych kwasów tłuszczowych przez szczep *A. niger* XP w hodowlach półciągłych w warunkach obniżonego pH do 4,0. Stężenie N i P w podłożu hodowlanym miało wpływ na koncentrację biomasy, stężenie kwasu szczawiowego i wydajność kwasu szczawiowego w kolejnych cyklach hodowlanych hodowli półciągłej. Stężenie biomasy kształtowało się w sposób zróżnicowany i wynosiło od 6,5 do 30,5 gdm⁻³, gdy w podłożu było odpowiednio 0,5 i 1,5 gdm⁻³ NH₄NO₃. Najwyższe stężenie kwasu szczawiowego (56,2 gdm⁻³) uzyskano w hodowli zawierającej w podłożu 1 gdm⁻³ NH₄NO₃ i 0,5 gdm⁻³ KH₂PO₄. Najwyższą wydajność 1,97 gg⁻¹ osiągnięto w cyklu 1 hodowli w podłożu zawierającym 0,5 g/l NH₄NO₃. Objętościowa szybkość produkcji kwasu szczawiowego wahała się w szerokich granicach od 1,8 do 6,78 gdm⁻³d⁻¹.

Słowa kluczowe: kwas szczawiowy, *Aspergillus niger*, hodowle półciągłe

WPROWADZENIE

Właściwości redukujące kwasu szczawiowego sprawiają, że jest on szeroko stosowany w przemyśle, głównie metalurgicznym, jako czynnik ługujący tlenki metali ciężkich z minerałów oraz rud [Ambikadevi i Lalithambika 2000, Mulligan i in. 2004, Strasser i in. 1994]. Kwas szczawiowy produkowany jest obecnie metodami chemicznymi, a do jego syntezy najczęściej stosuje się sole kwasu mrówkowego, z których w wyniku ogrzewania powstają odpowiednie tlenki, znajdujące się z kolei pod wpływem kwasu siarkowego. Kwas szczawiowy może również powstać w reakcji utleniania polisacharydów (głównie celulozy) za pomocą kwasu azotowego [Ambikadevi i Lalithambika 2000].

*Badania realizowane w ramach projektu badawczego nr 2PO6T 11326 finansowanego przez KBN w latach 2004–2006.

Adres do korespondencji – Corresponding author: Izabela Musiał, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, ul. C.K. Norwida 25/27, 50–375 Wrocław, e-mail: Izabela.Musial@wnoz.up.wroc.pl

W celu obniżenia kosztów produkcji i ochrony środowiska naturalnego szuka się nowych dróg otrzymywania kwasu szczawiowego. Duże zainteresowanie wzbudzają metody biotechnologiczne. Jednym z najbardziej efektywnych producentów kwasu szczawiowego są grzyby z gatunku *Aspergillus niger* [Guru i in. 2001]. Biosynteza kwasu szczawiowego przez grzyby *A. niger* zależy od odczynu środowiska hodowlanego i w podłożach zawierających cukry jako źródło węgla zachodzi najintensywniej w odczynie bliskim neutralnemu. W takich warunkach dochodzi do indukcji hydrolazy szczawiooctanowej, która rozkłada szczawiooctan do kwasu szczawiowego i octowego [Kubicek i in. 1988]. W pH kwaśnym głównym produktem metabolizmu *A. niger* jest kwas cytrynowy [Leangon i in. 1999, Santoro i in. 1999]. W naszych wcześniejszych badaniach stwierdzono, że niektóre szczepy *A. niger* produkują duże ilości kwasu szczawiowego z substratów tłuszczowych w pH w zakresie 4–5 [Musiał i in. 2005, Musiał i in. 2006, Rymowicz i Lenart 2003, Rymowicz i Lenart 2004A, Rymowicz i Lenart 2004B]. W większości prac poświęconych biosyntezie kwasu szczawiowego surowcem do jego produkcji są węglowodany, takie jak sacharoza, glukoza, laktoza oraz węglowodanowe surowce odpadowe z przemysłu spożywczego i z rolnictwa, jak melasa buraczana, serwatka czy słodkie ziemniaki [Guru i in. 2001, Leangon i in. 1999, Santoro i in. 1999, Strasser i in. 1994]. Główny problem przy produkcji kwasu szczawiowego z użyciem sacharozy i glukozy polega na tym, że duża część użytego cukru zostaje zamieniona w kwas glukonowy, który jest niepożądanym produktem ubocznym [Cameselle i in. 1998, Santoro i in. 1999]. Dobrym źródłem węgla do produkcji kwasu szczawiowego okazała się laktoza, z której *A. niger* produkował tylko kwas szczawiovowy w przeciwieństwie do procesu z użyciem sacharozy, gdzie syntetyzowany był zarówno kwas glukonowy, jak i cytrynowy, co powodowało obniżenie wydajności procesu do $0,3 \text{ g g}^{-1}$. W procesach fermentacji laktozy kwas szczawiovowy stanowił jedyny produkt fermentacji, przez co wydajność kwasu szczawiovowego była dwukrotnie większa w porównaniu z sacharozą [Bohlmann i in. 1998, Santoro i in. 1999]. Najwyższe ilości kwasu szczawiovowego uzyskiwano w hodowlach z substratów lipidowych. W procesach na oleju rzepakowym grzyby *A. niger* XP, w ciągu 7-dobowych hodowli wgłębnych, produkowały wysokie ilości kwasu szczawiovowego dochodzące do 68 g dm^{-3} . Ponadto, proces taki charakteryzował się wysoką homogennością, a produktywność i wydajność kwasu szczawiovowego z substratów tłuszczowych była znacznie wyższa w porównaniu do procesów prowadzonych w podłożach z dodatkiem sacharydów i z udziałem innych szczepów produkcyjnych *A. niger* [Rymowicz i Lenart 2003]. Bohlman i wsp. [1998] wykazali, że obecność 25 g/l kwasu szczawiovowego w początkowej fazie procesu biosyntezy tego kwasu z serwatki – obniżała produktywność kwasu o 50%, zaś 45 g/l w podłożu całkowicie hamowało proces. Wysokie stężenia kwasu szczawiovowego w podłożu produkcyjnym zawierającym lipidy nie powodują inhibicji biosyntezy tego kwasu [Rymowicz i Lenart 2003, Rymowicz i Lenart 2004A, Rymowicz i Lenart 2004B]. Wszystkie opisane dotychczas badania procesu biosyntezy kwasu szczawiovowego z substratów tłuszczowych dotyczą procesów okresowych [Musiał i in. 2005, Musiał i in. 2006, Rymowicz i Lenart 2003, Rymowicz i Lenart 2004A, Rymowicz i Lenart 2004B]. Dlatego podjęto próbę opracowania przyjaznej środowisku technologii produkcji kwasu szczawiovowego w hodowli półciągłej, ograniczającej zużycie wody i tym samym ilości powstających ścieków.

Celem niniejszej pracy jest ocena wpływu stężenia azotu i fosforu na dynamikę oraz wydajność procesu biosyntezy kwasu szczawiowego przez szczep *A. niger* XP z porafinacyjnych kwasów tłuszczowych w hodowlach półciągłych.

MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Mikroorganizmy. W badaniach wykorzystano szczep *A. niger* XP – mutant UV, który pochodził z kolekcji Akademii Ekonomicznej we Wrocławiu. Szczep przechowywano na skosach ziemniaczanych w temp. 4°C.

Podłoża hodowlane. Podłoże inokulacyjne zawierało (gdm⁻³): porafinacyjne kwasy tłuszczowe [produkt odpadowy przemysłu tłuszczowego zawierający % (w/w) wolne kwasy tłuszczowe: 9,4 C_{16:0}, 3,3 C_{18:0}, 48,1 C_{18:1}, 31,2 C_{18:2}, 5,3 C_{18:3}, 0,8 C_{20:1}, 0,8 C_{22:1}] – 30; KH₂PO₄ – 2; NH₄NO₃ – 1; MgSO₄ · 7H₂O – 0,3; metanol 15; wodę wodociągową 1 dm³. Podłoże do produkcji kwasu szczawiowego zawierało (gdm⁻³): porafinacyjne kwasy tłuszczowe – 30; KH₂PO₄ – od 0,25 do 0,75; NH₄NO₃ – od 0,5 do 1,5; MgSO₄ · 7H₂O – 0,3; FeSO₄ · 7H₂O – 0,248; MnSO₄ · 7H₂O – 0,038; Span 20 – 0,75; wodę destylowaną 1 dm³.

Techniki hodowlane. Podłoże inokulacyjne szczepiono zawiesiną zarodników sporządzoną w 0,9% NaCl zawierającym 0,1% Tween 80, tak aby w 1 cm³ podłoża było ok. 10⁶ zarodników.

Hodowle inokulacyjne prowadzono przez 3 doby w kolbach stożkowych o objętości 300 cm³, zawierających 50 cm³ podłoża inokulacyjnego, na wstrząsarce typu G-10 firmy New Brunswick, w temp. 30°C i przy szybkości mieszania 160 rpm. Tak przygotowanym inokulum szczepiono podłoża produkcyjne w bioreaktorze. Hodowle produkcyjne prowadzono w 5-litrowym bioreaktorze typu BIOFLO III firmy New Brunswick, zawierającym 2,5 dm³ podłoża produkcyjnego, przy szybkości mieszania 500 rpm, szybkości napowietrzania 1 vvm i pH 4,0, utrzymywanym automatycznie za pomocą 40% KOH.

Po zakończeniu hodowli stacjonarnej (cykl 1) odbierano 1,0 dm³ podłoża wraz z komórkami grzybni i uzupełniono taką samą objętością świeżego podłoża. W ten sposób przeprowadzono trzy następnym cykle hodowlane (cykl 2., 3. i 4.).

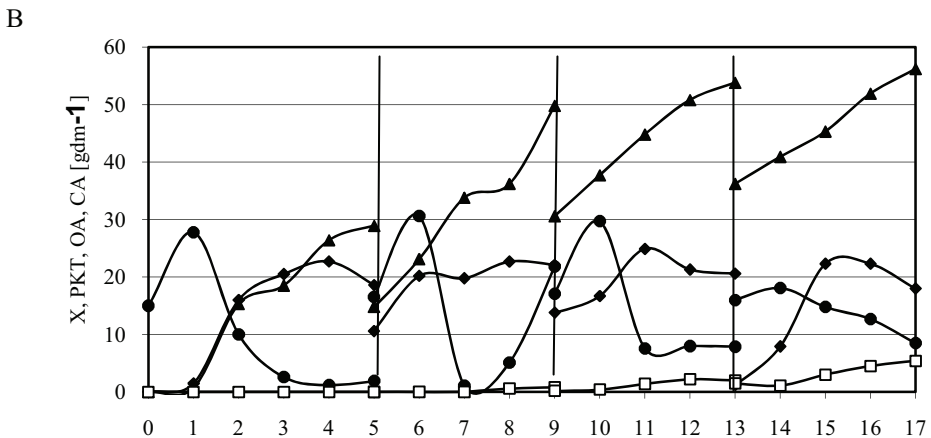
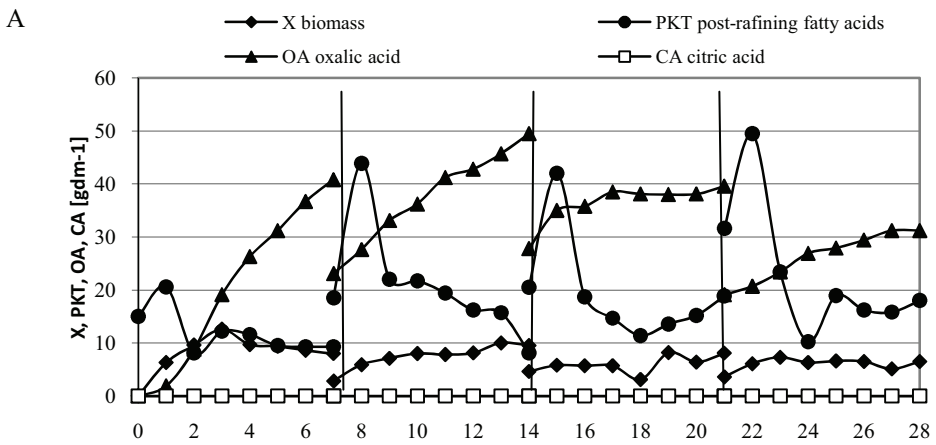
Metody analityczne. Biomase oznaczano wagowo. Porafinacyjne kwasy tłuszczowe oznaczano wagowo, w tym celu 10 cm³ zawiesiny komórek poddawano dwukrotnej ekstrakcji eterem naftowym, wirowano (5 min, 4000 rpm) i frakcję eterową zawierającą kwasy tłuszczowe przenoszono do naczynek wagowych. Po odparowaniu eteru naftowego w temp. 50°C, naczynka dosuszano w wagosuszarce w temp. 105°C. Kwasy organiczne (kwas szczawiowy, cytrynowy) oznaczano techniką HPLC na kolumnie Aminex HPX87H, połączonej z detektorem UV, przy długości fali 210 nm. Szybkość przepływu fazy ciekłej (20 mM H₂SO₄) przez kolumnę wynosiła 0,6 cm³min⁻¹. Oznaczenia prowadzono w temperaturze pokojowej.

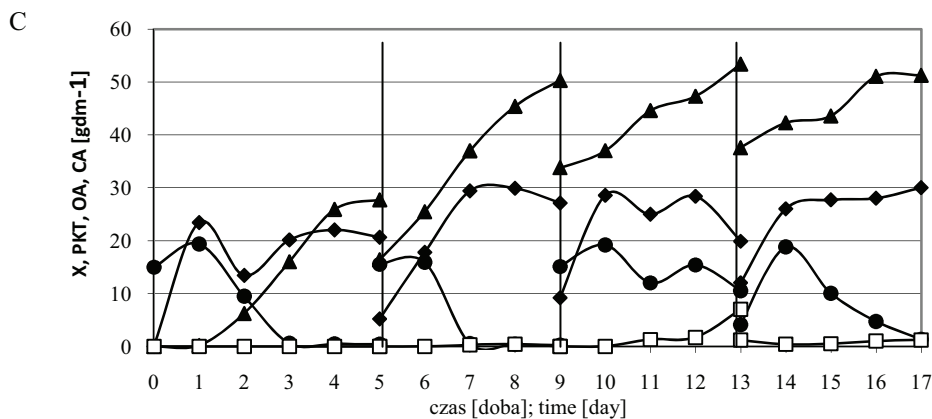
WYNIKI I DISKUSJA

Przeprowadzono trzy półciągłe procesy produkcji kwasu szczawiowego z porafinacyjnych kwasów tłuszczowych przez szczep *A. niger* XP. W celu zwiększenia ilości biomasy pleśni *A. niger* XP w kolejnych hodowlach dodawano zróżnicowane ilości

źródła azotu i fosforu w podłożu hodowlanym, odpowiednio: w pierwszej hodowli $0,5 \text{ gdm}^{-3} \text{ NH}_4\text{NO}_3$ i $0,25 \text{ gdm}^{-3} \text{ KH}_2\text{PO}_4$; w drugiej hodowli $1,0 \text{ gdm}^{-3} \text{ NH}_4\text{NO}_3$ i $0,5 \text{ gdm}^{-3} \text{ KH}_2\text{PO}_4$ i w trzeciej hodowli $1,5 \text{ gdm}^{-3} \text{ NH}_4\text{NO}_3$ i $0,75 \text{ gdm}^{-3} \text{ KH}_2\text{PO}_4$. Kwasy tłuszczowe dodawano w dwóch porcjach: na początku hodowli 15 g/l oraz po 24 h hodowli również 15 g/l . Pierwsza hodowla trwała 28 dni , co siedem dni wymieniano litr podłoża. Druga i trzecia trwały po 17 dni , w tym cykl 1. trwał 5 dob , a w trzech kolejnych cyklach podłoże wymieniano co 4 doby .

Jednocześnie ze wzrostem stężenia N i P w podłożu hodowlanym wzrastała ilość biomasy w zakresie od $6,5$ do $30,5 \text{ gdm}^{-3}$ (rys. 1). Także koncentracja biomasy w kolejnych cyklach półciągłej hodowli była zróżnicowana i wahała się w wariancie A od $6,5$ do $9,7 \text{ gdm}^{-3}$, od $18,0$ do $20,3 \text{ gdm}^{-3}$ w wariancie B i w wariancie C od $20,7$ do $30,5 \text{ gdm}^{-3}$.





Rys. 1. Przebieg procesu biosyntezy kwasu szczawiowego przez szczep *A. niger* XP w hodowlach półciągłych w podłożu zawierającym 30 gdm⁻³ porafinacyjnych kwasów tłuszczowych i (A) 0,5 gdm⁻³ NH₄NO₃ i 0,25 gdm⁻³ KH₂PO₄, (B) 1,0 gdm⁻³ NH₄NO₃ i 0,5 gdm⁻³ KH₂PO₄, (C) 1,5 gdm⁻³ NH₄NO₃ i 0,75 gdm⁻³ KH₂PO₄

Fig. 1. Course of oxalic acid biosynthesis by *A. niger* XP in semicontinuous culture in medium with 30 gdm⁻³ post-refining fatty acids and (A) 0,5 gdm⁻³ NH₄NO₃ and 0,25 gdm⁻³ KH₂PO₄, (B) 1,0 gdm⁻³ NH₄NO₃ and 0,5 gdm⁻³ KH₂PO₄, (C) 1,5 gdm⁻³ NH₄NO₃ and 0,75 gdm⁻³ KH₂PO₄

Kwas szczawiowy stanowił główny produkt biosyntezy we wszystkich trzech półciągłych hodowlach (rys. 1). Maksymalne stężenie kwasu szczawiowego 56,2 gdm⁻³ uzyskano w 4. cyklu hodowlanym, w którym dodawano 1,0 gdm⁻³ NH₄NO₃ i 0,5 gdm⁻³ KH₂PO₄. Rymowicz i Lenart [2003] po przeprowadzeniu siedmiodobowego okresowego procesu biosyntezy kwasu szczawiowego z wykorzystaniem surowego oleju rzepakowego i porafinacyjnych kwasów tłuszczowych, w pH = 4,0 i stężeniu substratu tłuszczowego 50 gdm⁻³, uzyskali stężenie kwasu szczawiowego 68,1 g/dm⁻³. Natomiast podczas zmiany pH do 5,0 nastąpiło niewielkie obniżenie ilości szczawianu do 66,1 gdm⁻³.

W badaniach własnych szybkość objętościowa produkcji kwasu szczawiowego zmniejszała się w kolejnych cyklach pierwszej hodowli, a w dwóch pozostałych hodowlach obniżała się od 3 cyklu produkcyjnego (tab. 1). Wahała się w szerokich granicach od 1,8 do 7,0 gdm⁻³d⁻¹. Według Rymowicza i Lenart [2003] produktywność kwasu szczawiowego z surowego oleju rzepakowego i porafinacyjnych kwasów tłuszczowych w hodowlach okresowych liczyła odpowiednio: 9,4 i 9,6 gdm⁻³d⁻¹. W hodowlach okresowych prowadzonych w podłożach z węglowodanami szybkość objętościowa produkcji kwasu szczawiowego również była wyższa i wynosiła od 3,9 do 9,0 gdm⁻³d⁻¹ [Bohlmann i in. 1998, Cameselle i in. 1998, Strasser i in. 1994].

Poprzednie nasze badania wykazały, że zastosowanie substratów tłuszczowych do produkcji kwasu szczawiowego pozwala na uzyskanie wysokiej czystości procesu [Musiał i in. 2005, Rymowicz i Lenart 2003, Rymowicz i Lenart 2004A, Rymowicz i Lenart 2004B]. Najwyższą czystością (100%) charakteryzował się proces biosyntezy kwasu szczawiowego, gdzie zastosowano najniższe ilości azotu i fosforu (rys. 1). Zwiększenie ilości azotu w podłożu produkcyjnym powodowało wzrost zawartości kwasu cytrynowego, ubocznego produktu w tym procesie, do 7 gdm⁻³ (rys. 1) i obniżenie współczynnika selektywności do 0,93 (tab. 2).

Tabela 1. Wpływ składu podłoża produkcyjnego na szybkość objętościową produkcji i szybkość właściwą produkcji kwasu szczawiowego przez *A. niger* XP w kolejnych cyklach hodowli półciągłych

Table 1. Effect of the medium composition on the volumetric production rate and specific production rate of oxalic acid by *A. niger* XP in cycles of semicontinuous cultures

Stężenie NH_4NO_3 w podłożu [gdm^{-3}] Concentration NH_4NO_3 in medium [gdm^{-3}]	Cykl 1 Cycle 1	Cykl 2 Cycle 2	Cykl 3 Cycle 3	Cykl 4 Cycle 4
		Q_{OA} [$\text{gdm}^{-3}\text{d}^{-1}$]		
0,5	5,80	3,70	1,90	1,80
1,0	5,78	7,00	4,64	4,00
1,5	5,50	6,78	3,92	2,74
	Q_{OA} [$\text{gg}^{-1}\text{d}^{-1}$]			
0,5	0,59	0,37	0,23	0,28
1,0	0,31	0,35	0,22	0,22
1,5	0,27	0,25	0,13	0,09

Tabela 2. Selektywność procesu biosyntezy kwasu szczawiowego z porafinacyjnych kwasów tłuszczowych przez *A. niger* XP w hodowlach półciągłych

Table 2. Selectivity of oxalic acid biosynthesis from pos-refining fatty acids by *A. niger* XP in semicontinuous cultures

Stężenie NH_4NO_3 w podłożu [gdm^{-3}] Concentration NH_4NO_3 in medium [gdm^{-3}]	(OA/(OA+CA))*			
	Cykl 1 Cycle 1	Cykl 2 Cycle 2	Cykl 3 Cycle 3	Cykl 4 Cycle 4
0,5	1,00	1,00	1,00	1,00
1,0	1,00	0,99	0,97	0,93
1,5	1,00	0,99	0,98	0,98

* współczynnik selektywności procesu biosyntezy liczony jako stosunek stężenia kwasu szczawiowego (OA) do sumy stężeń kwasu szczawiowego i cytrynowego (CA)

factor of selectivity of oxalic acid (OA) biosynthesis as a ratio the oxalic acid concentration to the sum oxalic and citric acids(CA) concentrations

Stężenie azotu i fosforu w podłożu hodowlanym miało istotny wpływ na wydajność kwasu szczawiowego. W zależności od wariantu hodowli i cyklu hodowlanego parametr ten był w zakresie od 0,27 do 1,36 gg^{-1} (tab. 3). Według Rymowicza i Lenart [2003] wydajność procesu biosyntezy kwasu szczawiowego z substratów tłuszczowych przez szczep *A. niger* XP w hodowlach okresowych była wyższa i wynosiła 1,66 gg^{-1} . Natomiast w porównaniu z procesami prowadzonymi w podłożach zawierających węglowodany wydajność procesu biosyntezy kwasu szczawiowego z kwasów tłuszczowych była około trzykrotnie wyższa. Według Bohlmann i in. [1998] oraz Santoro i in. [1999] w hodowlach prowadzonych w podłożu zawierającym laktozę wydajność kwasu szczawiowego wynosiła odpowiednio 0,54 i 0,4 gg^{-3} .

Tabela 3. Wpływ składu podłoża na wydajność produkcji kwasu szczawiowego przez *A. niger* XP w kolejnych cyklach hodowli półciągłychTable 3. Effect of the medium composition on the oxalic acid yield in relation to the consuming substrate and the oxalic acid yield in relation to the initial substrate concentration in cycles of semicontinuous cultures of *A. niger* XP

	Cykl 1 Cycle 1	Cykl 2 Cycle 2	Cykl 3 Cycle 3	Cykl 4 Cycle 4
Stężenie NH_4NO_3 w podłożu [gdm^{-3}] Concentration NH_4NO_3 in medium [gdm^{-3}]				
	Y^* [gg^{-1}]			
0,5	1,97	1,03	0,81	0,44
1,0	1,03	1,20	0,96	0,99
1,5	0,93	1,11	1,00	0,42
	Y_C^{**} [gg^{-1}]			
0,5	1,36	0,78	0,38	0,27
1,0	0,96	1,11	0,72	0,64
1,5	0,92	0,97	0,63	0,40

* Y – wydajność kwasu szczawiowego (g kwasu szczawiowego/g zutylizowanego substratu) Y – yield of oxalic acid (g oxalic acid/g oil consumed)** Y_C – wydajność całkowita kwasu szczawiowego (g kwasu szczawiowego/g wprowadzonego substratu) Y_C – total yield of oxalic acid (g oxalic acid/g oil added)

Podczas kolejnych wymian podłoża produkcyjnego w hodowlach półciągłych synteza kwasu szczawiowego uległa zahamowaniu. Analiza wyników pozwala na stwierdzenie, że dla procesu produkcji kwasu szczawiowego z substratów tłuszczowych bardziej efektywne wydają się być hodowle okresowe i okresowe z zasilaniem. Obniżenie aktywności kwasotwórczej grzybni *A. niger* XP w hodowlach półciągłych mogło być spowodowane zniszczeniem komórek grzybni w tak długim procesie, jak również nagromadzeniem kwasu szczawiowego czy innych szkodliwych metabolitów. Najnowsze doniesienia przedstawiają nowe możliwości intensyfikacji produkcji kwasu szczawiowego. Mandal i in. [2005] unieruchamiali zarodniki szczepu *A. niger* NCIM548 w piance poliuretanowej, technika ta pozwoliła na zwiększenie produkcji kwasu szczawiowego z glukozy w hodowlach wstrząsanych w stosunku do procesów z wolnymi komórkami. Autorzy ci wykazali, że unieruchomione formy *A. niger* NCIM548 zachowują zdolność do biosyntezy kwasu w trakcie 7 cykli hodowlanych, z których każdy trwał 10 dni. Wyniki te zachęcają do dalszych badań dotyczących opracowania efektywnego półciągłego systemu hodowlanego z wykorzystaniem immobilizowanych form grzybni do biosyntezy kwasu szczawiowego z substratów lipidowych lub zastosowania bioreaktora membranowego.

PIŚMIENNICTWO

- Ambikadevi V.R., Lalithambika M., 2000. Effect of organic acids on ferric iron removal from iron – stained kaolinite, *Appl. Clay Science*, 16, 133–145.
- Bohlmann J.T., Cameselle C., Núñez M. J., Lema J.M., 1998. Oxalic acid production by *Aspergillus niger*, part II: Optimisation of fermentation with milk whey as carbon source, *Bioprocess Engineering*, 19, 337–342.
- Cameselle C., Bohlmann J.T., Núñez M. J., Lema J.M., 1998. Oxalic acid production by *Aspergillus niger*, part I: Influence of sucrose and milk whey as carbon source, *Bioprocess Engineering*, 19, 247–252.
- Cunningham J.E., Kuiack C., 1992. Production of citric and oxalic acid and solubilization of calcium phosphate by *Penicillium bilaii*, *Applied Environmental Microbiology*, 58 (5), 1451–1458.
- Guru M., Bilgesu A.Y., Pamuk V., 2001. Production of oxalic acid from sugar beet molasses by formed nitrogen oxides, *Bioresource Technol.*, 77, 81–86.
- Kubicek C., Schrefel – Kunar G., Wohrer W., Rohr M., (1988. Evidence for a cytoplasmic pathway of oxalate biosynthesis in *Aspergillus niger*, *Applied and Environmental Microbiology*, 3, 633–637.
- Leangon S., Maddox I. S., Brooks J. D., 1999. Influence of the glycolytic rate on production of citric acid and oxalate acid by *Aspergillus niger* in solid state fermentation, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 15, 493–495.
- Mandal S.K., Banerjee P. C., 2005. Submerged production of oxalic acid from glucose by immobilized *Aspergillus niger*, *Process Biochemistry*, 40, 1605–1610.
- Mulligan C.N., Kamali M., Gibbs B.F., 2004. Bioleaching of heavy metals from a low – grade mining ore using *Aspergillus niger*, *J. Hazardous Materials*, 110, 77–84.
- Musiał I., Rymowicz W., Lenart D., Witkowska D., 2005. Wykorzystanie porafinacyjnych kwasów tłuszczowych do biosyntezy kwasu szczawiowego przez *Aspergillus niger* w warunkach obniżonego pH. *Biotechnologia*, 2(2), 37–45.
- Musiał I., Rymowicz W., Witkowska D., 2006. Effect of Span 20 concentration on oxalic acid production from post-refining fatty acids by *Aspergillus niger* XP. *Chemical Papers*, 60(5), 388–390.
- Pernet J.C. 1991. Oxalic acid [In:] *Encyclopedia of Chemical Technology*. Ed. Kirk, R.E., Othmer D.F., 9, 661–674, New York: Interscience Publisher Inc.
- Rymowicz W., Lenart D., 2003. Oxalic acid production from lipids by a mutant of *Aspergillus niger* at different pH, *Biotechnology Letters*, 25, 955–958.
- Rymowicz W., Lenart D., 2004. Comparison of different strains of *Aspergillus niger* for oxalic acid production from lipid substrates, *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities, Biotechnology*, Volume 7, Issue 2.
- Rymowicz W., Lenart D., 2004. Enhanced production of oxalic acid in *Aspergillus niger* by the addition of methanol, *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities, Biotechnology*, Volume 7, Issue 2.
- Santoro R., Cameselle, S. Rodriguez – Couto S., Sanromán Á., 1999. Influence of milk whey, nitrogen and phosphorus concentration on oxalic acid production by *Aspergillus niger*, *Bioprocess Engineering*, 20, 1–5.
- Strasser H., Burgstaller W., Schinner F., 1994. High – yield production of oxalic acid for metal leaching processes by *Aspergillus niger*, *FEMS Microbiol. Lett.*, 119, 365–370.

OXALIC ACID PRODUCTION FROM POST-REFINING FATTY ACIDS BY *ASPERGILLUS NIGER* IN SEMICONTINUOUS CULTURE

Abstract. The aim of the studies was to evaluate the influence of N and P concentrations on dynamic and yield of oxalic acid biosynthesis from post-refining fatty acids by *Aspergillus niger* XP in semicontinuous cultures at low pH 4,0. Three semicontinuous cultures were carried out with *A. niger* XP, in media containing post-refining fatty acids as the only carbon and energy source. Ability of oxalate biosynthesis in media containing different levels of NH_4NO_3 and KH_2PO_4 was evaluated. In all cultures ability of utilization of post-refining fatty acids and production of oxalic acid were observed, however with different dynamics and yield. Biomass concentration in cultures varied from $6,5 \text{ gdm}^{-3}$ in media containing $0,5 \text{ gdm}^{-3} \text{ NH}_4\text{NO}_3$ to $30,5 \text{ gdm}^{-3}$ in media containing $1,5 \text{ gdm}^{-3} \text{ NH}_4\text{NO}_3$. The highest concentration of oxalic acid $56,2 \text{ gdm}^{-3}$ was obtained in medium with $1 \text{ gdm}^{-3} \text{ NH}_4\text{NO}_3$ and $0,5 \text{ gdm}^{-3} \text{ KH}_2\text{PO}_4$. The highest yield $1,97 \text{ gg}^{-1}$ was obtained in 1st cycle in medium with $0,5 \text{ g/l NH}_4\text{NO}_3$. Volumetric oxalic acid production rate varied significantly from 1,8 do $7,0 \text{ gdm}^{-3}\text{d}^{-1}$.

Key words: oxalic acid, *Aspergillus niger*, semicontinuous culture

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 30.06.2008

Do cytowania – For citation: Musiał I., Rymowicz W., Witkowska D., 2008. Biosynteza kwasu szczawiowego z porafinacyjnych kwasów tłuszczowych przez *Aspergillus niger* w hodowlach półciągłych. Acta Sci. Pol. Biotechnol. 7(2), 3–11.

FERMENTACJA W STAŁYM ZŁOŻU WYTŁOKÓW Z ARONII I WIESIOŁKA JAKO METODA OTRZYMYWANIA PRZECIWIUTLENIACZY FENOLOWYCH

Hanna Miskiewicz, Andrzej Jakubowski

Politechnika Łódzka

Streszczenie. W pracy badano możliwość wykorzystania SSF przy udziale grzybów nitkowatych *Rhizopus oligosporus* jako metody pozyskiwania przeciwutleniaczy fenolowych z mieszanin wytlóków z aronii i wiesiołka. Fermentacji poddano dwa warianty złożeń, różniące się zawartością badanych surowców: złoże P9 zawierało ww. składniki w stosunku wagowym 9:1, a złoże P5 – 5:5. W wyniku fermentacji uzyskano ok. 67% wzrost zawartości fenoli rozpuszczalnych w wodzie (druga doba, złoże P9 i czwarta doba, złoże P5) oraz dwukrotny wzrost ich aktywności przeciwutleniającej względem syntetycznych rodników DPPH, dla obydwu wariantów złożeń. β -Glukozydaza syntetyzowana w procesie fermentacji przez *R. oligosporus* uwalniała przeciwutleniacze fenolowe z ich kompleksów z cukrami. Fenole zawarte w próbach fermentacyjnych z wczesnej fazy procesu inaktywowały α -amylazę trzustkową. Przedstawiony sposób postępowania pozwala na wartościowsze niż dotychczas wykorzystanie badanych surowców odpadowych, takich jak wytloki z aronii i wiesiołka.

Słowa kluczowe: przeciwutleniacze fenolowe, wytloki z aronii i wiesiołka, *Rhizopus oligosporus*, SSF

WSTĘP

Zintegrowane biorafinerie umożliwiają kompleksową i bezodpadową (neutralną dla środowiska naturalnego) konwersję tanich, odnawialnych surowców (głównie biomasy roślinnej) w różnorodne produkty o wartości dodanej. Pozwalają one także wykorzystać te surowce odnawialne, które pomimo zawartości szeregu cennych składników stanowią jak dotąd kłopotliwy odpad po produkcji żywności. Należą do nich m.in. wytloki z owoców i warzyw. Tematyka badań, których wyniki przedstawia niniejsza publikacja, skupia się właśnie na odpadowych surowcach, takich jak wytloki z aronii i z wiesiołka.

Wytloki aroniowe są odpadem pochodzącym z przemysłowej obróbki owoców aronii. Zawierają one średnio ok. 90,8% s.m. Wszystkie składniki włókna roślinnego tych

wytłoków stanowią 95,8% suchej masy. Najwięcej jest celulozy (33,14%), niewiele mniej hemicelulozy (32,08%). Zawartość lignin wynosi 23,03% a pektyn 7,52% [Nawirska i in. 2004]. Wykorzystuje się je do produkcji barwników antocyjanowych lub służy do wyciągów z wysypiskach śmieci, gdzie stanowią duży problem ekologiczny [Onesiak 2000].

Wytłoki z wiesiołka to odpad produkcyjny po tłoczeniu oleju wiesiołkowego. Zawierają one w suchej masie: ok. 23,9% białka, 23,1% błonnika, 5,5% tłuszczu, 6,6% popiołu i 40,9% wyciągowych związków bezazotowych. Z uwagi na znaczną zawartość białka mogą być wykorzystane jako źródło azotu [Kulasek i in. 1998].

Na drodze biologicznej konwersji odpadów owocowych i warzywnych, zawierających rozpuszczalne cukry i inne podatne na hydrolizę składniki oraz błonnik, można otrzymać szereg bardziej wartościowych produktów, bogatych w polifenole roślinne [Correia i in. 2004a, c].

Fenolowe składniki roślinne mają właściwości prozdrowotne i można uważać je za potencjalne przeciwutleniacze, które charakteryzują się m.in. zdolnością zmiatania wolnych rodników oraz chelatowania jonów metali katalizujących peroksydację tłuszczów [Bravo 1998].

Diety bogate w warzywa i owoce (źródła fenolowych składników roślinnych) obniżają występowanie chorób degeneracyjnych, nowotworowych i układu krążenia [Kris-Etherton i in. 2002]. Roślinne fenole występują w formie glikozydów o niskiej aktywności biologicznej. Enzymatyczna hydroliza uwalnia aglikony tych związków, które są bardziej aktywne niż glikozydowo związane fenole [Zheng 2000]. Hydrolizę wiązań glikozydowych katalizuje m.in. β -glukozydaza, produkowana przez grzyby, bakterie i rośliny [Murashima i in. 2002].

Grzyby z gatunku *Rhizopus oligosporus*, znane również jako pleśń tempe, posiadają status GRAS i są powszechnie stosowane do produkcji żywności fermentowanej, gdyż dobrze rosną na resztkach owocowych. Wcześniejsze badania wykazały, że wytwarzają one z dobrą wydajnością β -glukozydazę, dzięki czemu są zdolne do hydrolizy glikozydów fenolowych, zwiększając tym samym ich wartość biologiczną [Zheng i in. 1998].

CEL PRACY

Celem prezentowanej pracy było zbadanie możliwości wykorzystania fermentacji w stałym złożu (SSF – Solid State Fermentation) przy udziale grzybów strzępkowych *R. oligosporus* jako metody pozyskiwania przeciwutleniaczy fenolowych z wytłoków aroniowych, połączonych z wytłokami z wiesiołka.

MATERIAŁ I METODY

Surowiec

Prowadzono biologiczną konwersję dwóch odpadowych surowców naturalnych: wytłoków z aronii i wiesiołka („Agro-Pharm” Sp. z o.o. w Tuszninie).

Material biologiczny

W procesie fermentacji stosowano grzyby strzępkowe z gatunku *Rhizopus oligosporus* NRRL 2710. Szczep przechowywano na skosach dekstrozowo-agarowych (PDA) w temp. 4°C. Kultury uaktywniano przez przesiew ich na świeże podłoże PDA i inkubację w temp. 37°C w czasie 7 dób.

Warunki procesu

Fermentację prowadzono w stałym złożu o grubości 1,5 cm i wilgotności 65% (temp. 37°C, czas 12 dób). Przygotowano dwa warianty ziół, różniące się zawartością wytłoków z aronii i wiesiołka: złoże P9 zawierało ww. składniki w stosunku wagowym 9:1, a złoże P5 – 5:5. Dodatkowo uzupełniono je ekstraktem sojowym Difco i CaCO₃ (po 5%). Sterylne złoże szczepiono zawiesiną spor o gęstości 10⁶ jtk/cm³ w ilości 1%.

Próby z każdego wariantu hodowli pobierano co 2 doby i liofilizowano.

Ekstrakty wodne

1 g liofilizowanej próbki fermentacyjnej zawieszano w 10 cm³ wody destylowanej, homogenizowano przez 1 min i odwirowywano w wirówce firmy Beckman (15000 rpm, 4°C, 20 min). Przed wykonaniem oznaczenia supernatant dializowano 48 godz. wobec wody destylowanej, w temp. 4°C.

Oznaczanie aktywności α -amylazy

Aktywność α -amylazy oznaczano metodą Worthington [McCue 2003]. 0,5 cm³ ekstraktu wodnego po dializie i 0,5 cm³ 1% roztworu skrobi rozpuszczalnej w 0,1 M buforze cytrynianowym o pH 4,8 inkubowano w temp. 50°C w czasie 20 minut. Reakcję przerywano przez dodanie 1 cm³ roztworu DNS, całość inkubowano 5 min we wrzącej łaźni wodnej. Po schłodzeniu uzupełniano wodą destylowaną do objętości 10 cm³, dokładnie mieszano i absorbancję mierzono przy długości fali λ 540 nm, wobec próby odczynnikowej, zawierającej wodę destylowaną zamiast ekstraktu. Krzywą wzorcową wykonano dla maltozy. Za jednostkę aktywności α -amylazy przyjęto taką ilość enzymu, która uwalnia 1 μ mol maltozy z substratu w czasie 1 min w standardowych warunkach reakcji.

Oznaczanie aktywności β -glukozydazy

Aktywność β -glukozydazy oznaczano inkubując w czasie 15 min w temp. 50°C, 0,5 cm³ roztworu salicyny (Aldrich S30-5, Niemcy) w 0,05 M buforze octanowym o pH 4,5 z 0,5 cm³ odpowiednio rozcieńczonego w tym buforze ekstraktu po dializie. Reakcję przerywano przez dodanie 1 cm³ alkalicznego roztworu DNS, całość inkubowano przez 5 min we wrzącej łaźni wodnej. Po schłodzeniu uzupełniano wodą destylowaną do objętości 10 cm³, dokładnie mieszano i absorbancję mierzono przy długości fali λ 540 nm, wobec próby odczynnikowej, zawierającej wodę destylowaną zamiast ekstraktu. Krzywą wzorcową wykonano dla glukozy. Za jednostkę aktywności β -glukozydazy przyjęto taką ilość enzymu, która uwalnia z substratu 1 μ mol cukrów redukujących w przeliczeniu na glukozę w czasie 1 min, w standardowych warunkach reakcji.

Oznaczanie aktywności lakkazy

Aktywność lakkazy oznaczano przez pomiar przyrostu absorbancji formy utlenionej czerwieni fenolowej, będącej produktem reakcji. Do mieszaniny reakcyjnej zawierającej 0,1 cm³ 0,1% roztworu czerwieni fenolowej, 0,1 cm³ 1mM roztworu MnSO₄ i 0,5 cm³ 0,05 M buforu cytrynianowego o pH 4,5 dodawano 0,2 cm³ ekstraktu. Absorbancję mierzono przy długości fali λ 610 nm, w odstępach 1-minutowych przez 10 min, wobec próby kontrolnej, zawierającej wodę destylowaną zamiast ekstraktu. Za jednostkę aktywności lakkazy przyjęto przyrost absorbancji o 0,01 w czasie 1 minuty. Wynik podawano w przeliczeniu na 1 g próby.

Oznaczanie polifenoli ogółem

Zawartość polifenoli ogółem w ekstraktach wodnych prób fermentacyjnych oznaczano metodą zmodyfikowaną przez Shetty [Vattem i in. 2002]. 1 cm³ odpowiednio rozcieńczonego ekstraktu mieszano z 1 cm³ 95% etanolu, 5 cm³ wody destylowanej i 0,5 cm³ 50% (v/v) odczynnika Folin-Ciocalteu. Próby mieszano i inkubowano 5 min w temp. pokojowej, następnie dodawano 1 cm³ Na₂CO₃ i inkubowano 60 min w ciemnym miejscu. Absorbancję mierzono przy długości fali λ 725 nm, wobec próby kontrolnej zawierającej zamiast ekstraktu wodę destylowaną. Zawartość polifenoli ogółem przeliczano na podstawie krzywej wzorcowej sporządzonej dla katechiny i wyrażano w mg katechiny/g s.m.

Oznaczanie aktywności przeciwutleniającej polifenoli z DPPH [Vattem i in. 2002]

Miarą aktywności przeciwutleniającej fenoli jest stopień redukcji wolnych, syntetycznych rodników DPPH (1,1-difenylo-2-pikrylohydrazyl, Sigma D-9132) w próbce badanej wyrażony w %. Do 3 cm³ 60 μ M DPPH w 95% etanolu dodawano 0,5 cm³ ekstraktu wodnego i wykonywano pomiar absorbancji przy długości fali λ 517 nm. Odczyty porównywano z próbą kontrolną, która zawierała 0,5 cm³ etanolu zamiast ekstraktu. Próby badane oraz próbę kontrolną mierzono wobec etanolu. Stopień redukcji DPPH w % obliczano według wzoru (absorbancja próby kontrolnej – absorbancja próby badanej)/(absorbancja próby kontrolnej) x 100.

Oznaczanie aktywności przeciwutleniającej polifenoli z β -karotenem [Vattem i in. 2002]

1 cm³ roztworu β -karotenu w chloroformie, o stężeniu 0,2 mg/cm³, wprowadzano do okrągłodennych odbieralników. Chloroform odparowywano na wyparce próżniowej w 40°C przez 5 minut. β -Karoten przylegający do ścianek rozpuszczano w 20 μ l czystego kwasu linolowego i 184 μ l Tween 40. Następnie dodawano 50 cm³ 50 mM roztworu nadtlenu wodoru i mieszano energicznie aż do wytworzenia emulsji. Po 5 cm³ tej emulsji przenoszono do probówek zawierających po 100 μ l badanego ekstraktu wodnego. Próby mieszano 1 min i inkubowano w 50°C przez 30 minut. Następnie odczytywano absorbancję przy λ 470 nm i porównywano z próbą kontrolną, która zawierała 100 μ l wody destylowanej zamiast ekstraktu. Aktywność przeciwutleniającą (APF – Antioxidant Protection Factor) obliczano jako iloraz absorbancji próby właściwej i kontrolnej.

Oznaczanie wpływu składników fenolowych na aktywność α -amylazy trzustkowej

Wpływ zawartych w fermentowanych wytlókach składników fenolowych na aktywność α -amylazy trzustki wieprzowej badano, inkubując 0,25 ml ekstraktu badanej próby

fermentacyjnej, poddanej 15 min. autoklawowaniu (w celu inaktywacji enzymów obecnych w ekstraktach) z 0,25 ml preparatu α -amylazy (65 mg Kreonu – preparatu farmaceutycznego enzymów trzustkowych o aktywności α -amylazy 8000 j. Ph. Eur. niemieckiej firmy Solvay Pharmaceuticals GmbH, rozpuszczonego w 25 ml 0,02 M buforu fosforanowego o pH 6,9), w czasie 30 min w temp. 37°C. Następnie próby rozcieńczano 50 razy. Aktywność α -amylazy zarówno wyjściową, jak i po działaniu związków fenolowych oznaczano metodą Worthington [McCue i in. 2003].

WYNIKI I DISKUSJA

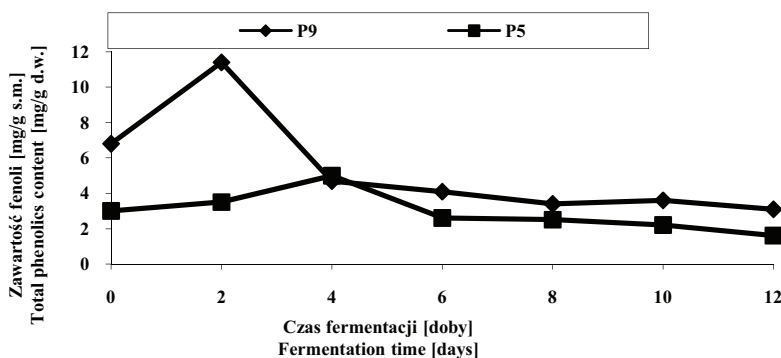
W celu zbadania możliwości wykorzystania wycieków z aronii i wiesiołka do produkcji wartościowych dodatków do żywności o podwyższonej zawartości przeciwutleniających fenolowych przeprowadzono 12-dobowe fermentacje w stałym złożu przy udziale *R. oligosporus*. Stosowano dwa warianty podłoży: podłoże P9 (9 g wycieków z aronii i 1 g wycieków z wiesiołka) oraz podłoże P5 (5 g wycieków z aronii i 5 g wycieków z wiesiołka). Proces prowadzono na płytkach Petriego w temp. 37°C. Z uwagi na niską zawartość białka rozpuszczalnego w surowcu (0,32 mg/g s.m.) dla lepszego wzrostu *R. oligosporus* – złoża fermentacyjne wzbogacono źródłem azotu w formie ekstraktu sojowego Difco.

Wycieki z aronii i wiesiołka okazały się dobrym źródłem składników pokarmowych dla *R. oligosporus*. Już po drugiej dobie inkubacji obserwowano intensywny jego wzrost. Jasnoszara grzybnia pokrywała całą powierzchnię złoża i przerastała je na całej grubości. Po czwartej dobie grzybnia przybierała kolor brudnoszary i w miarę upływu czasu ciemniała.

Zmiany zawartości wolnych fenoli w złożu fermentacyjnym

Zmiany zawartości fenoli ogółem w ekstraktach wodnych prób fermentacyjnych ilustruje rysunek 1. Niska zawartość wolnych fenoli w złożach przed fermentacją sugeruje, że naturalne polifenole występują w większości w formie związanej (nierozpuszczalnej). Po dwóch dobach fermentacji złoże P9 całkowita zawartość polifenoli wzrosła o 68% (od 6,8 mg/g s.m. do 11,4 mg/g s.m.). Po czterech dobach w złożu P5 uzyskano wzrost o 66% (od 3,0 mg/g s.m. do 5,0 mg/g s.m.). Następnie obserwowano gwałtowny ich spadek poniżej wartości wyjściowych w czwartej (do 4,7 mg/g s.m. złoże P9) i szóstej (do 2,6 mg/g s.m. złoże P5) dobie fermentacji. Po dwunastu dobach procesu zawartość fenoli w badanych złożach wynosiła odpowiednio 3,1 mg/g s.m. i 1,6 mg/g s.m.

Dwukrotnie niższa zawartość fenoli w złożu P5 w stosunku do złoża P9 wynika z prawie dwukrotnie niższej zawartości wycieków z aronii w tym złożu.

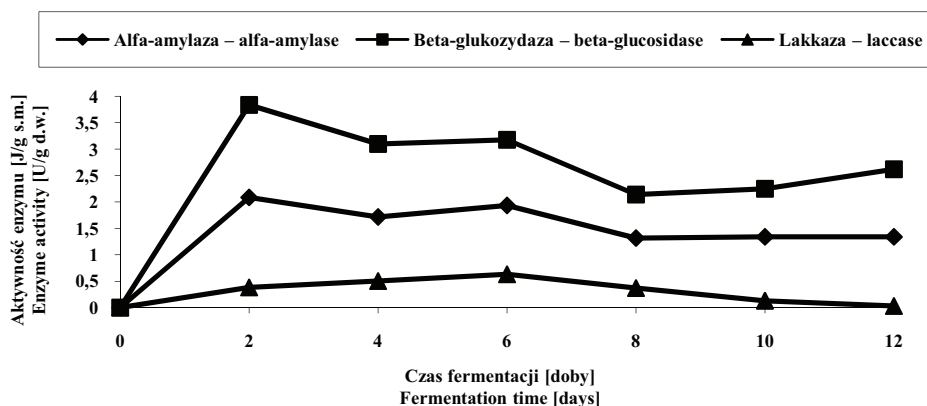


Rys. 1. Zmiany zawartości fenoli ogółem w próbach fermentacyjnych złoza P9 i P5

Fig. 1. Changes in total phenolics content for substrates P9 and P5

Dynamika biosyntezy enzymów przez badany szczep *R. oligosporus* w procesie fermentacji w złożu P9 i P5

W badanych warunkach fermentacji szczep *R. oligosporus* NRRL 2710 w złożu P9 w drugiej dobie syntetyzował z najwyższą wydajnością: α -amylazę i β -glukozydazę (rys. 2). W czwartej dobie procesu obserwowano spadek aktywności ww. enzymów, zaś w szóstej dobie najwyższą wydajność biosyntezy lakkazy i niewielki przyrost aktywności α -amylazy i β -glukozydazy. Ósma doba fermentacji charakteryzowała się obniżeniem wydajności biosyntezy α -amylazy, β -glukozydazy i lakkazy.

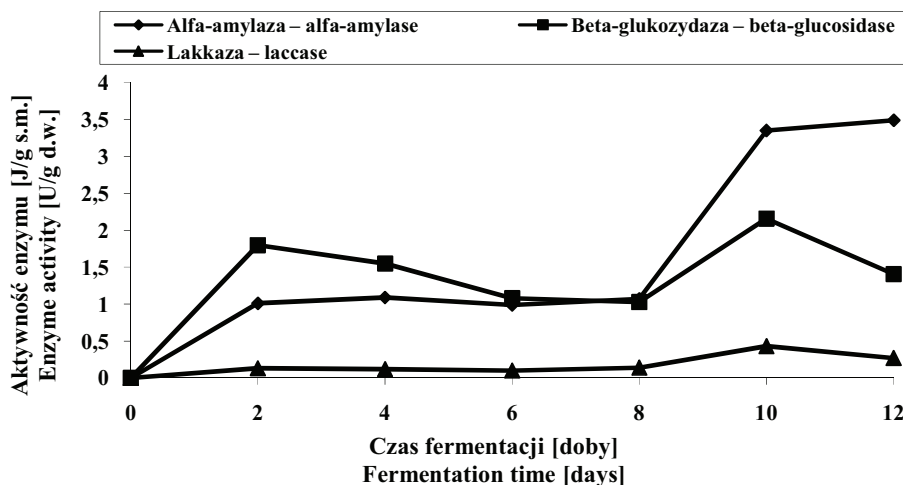


Rys. 2. Dynamika biosyntezy enzymów *R. oligosporus* w procesie fermentacji złoza P9

Fig. 2. Dynamics of biosynthesis of *R. oligosporus* enzymes during fermentation of substrate P9

Pod koniec procesu (dwunasta doba) obserwowano wzrost wydajności biosyntezy β -glukozydazy.

Podobnie kształtowała się dynamika biosyntezy (choć z około dwukrotnie niższą wydajnością) α -amylazy i β -glukozydazy do czwartej doby hodowli na złożu P5 (rys. 3).

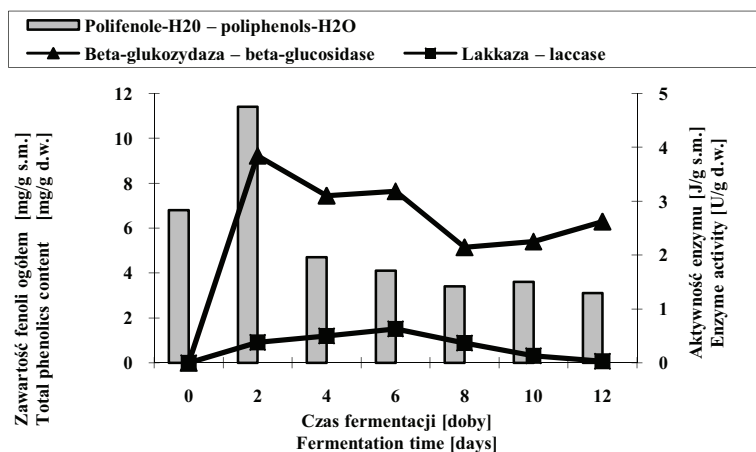
Rys. 3. Dynamika biosyntezy enzymów *R. oligosporus* w procesie fermentacji złoża P5Fig. 3. Dynamics biosynthesis *R. oligosporus* enzymes during fermentation substrate P5

W przyjętych warunkach fermentacji *R. oligosporus* syntetyzował z maksymalną wydajnością badane enzymy w dziesiątej dobie procesu. Aktywność α -amylazy w złożu P5 była prawie trzykrotnie wyższa w porównaniu do aktywności w złożu P9 i utrzymywała się na tak wysokim poziomie aż do końca hodowli.

Niska zawartość azotu w złożu P9 oraz po wykorzystaniu go przez grzyb w złożu P5 mogła być powodem intensywnej biosyntezy glikozydaz odpowiednio w drugiej i dziesiątej dobie fermentacji, gdyż dzięki tym enzymom zastosowany szczep *R. oligosporus* mógł wykorzystać glikozydy do uzyskania niezbędnej energii. Energia ta posłużyła do syntezy enzymów katalizujących polimeryzację fenoli, której efektem był wzrost aktywności przeciwutleniającej. Także Vatterm i Shetty sugerowali, że polimeryzacja fenoli podczas pleśniowego bioprocessu może być spowodowana stresem związanym z wykorzystaniem składników odżywczych [Vatterm i in. 2002].

Korelacja pomiędzy zawartością fenoli ogółem w ekstraktach wodnych prób fermentacyjnych i biosyntezą wybranych enzymów *Rhizopus oligosporus*

Wzrost zawartości fenoli ogółem w złożu P9 pokrywał się z najwyższą wydajnością biosyntezy β -glukozydazy w drugiej dobie procesu (rys. 4). Dobra korelacja zawartości fenoli rozpuszczalnych w wodzie z najwyższą aktywnością β -glukozydazy sugeruje, że enzym ten uwalnia fenole z ich glikozydów w fermentowanych wytłokach. Gwałtownemu spadkowi zawartości fenoli w czwartej dobie procesu towarzyszyła biosynteza lakkazy. W tej fazie procesu rozpoczęła się remobilizacja aglikonów fenolowych (dimeryzacja) do funkcjonalnych difenyli.

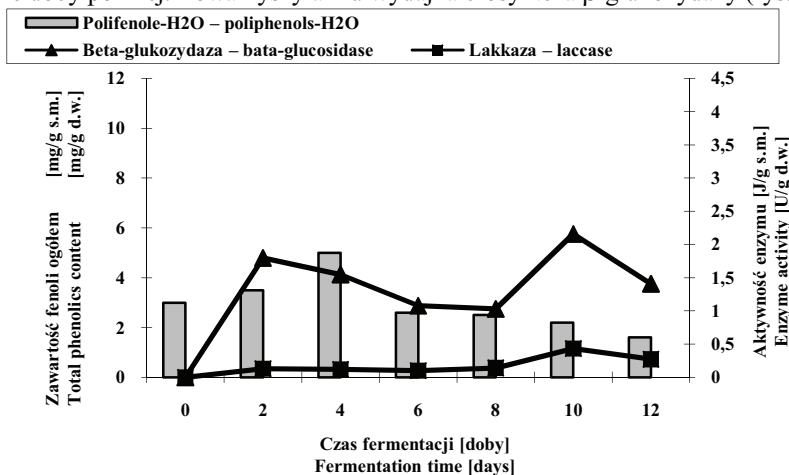


Rys. 4. Korelacja pomiędzy zawartością fenoli ogółem w złożu P9 i biosyntezą wybranych enzymów *R. oligosporus*

Fig. 4. Correlation between total phenolics content for substrate P9 and biosynthesis of selected *R. oligosporus* enzymes

Niektóre wolne fenole mogą być toksyczne dla wzrostu grzybów i wówczas uruchamiają one biosyntezę lakkazy, która powoduje ich detoksyfikację poprzez utlenianie i polimeryzację do form polimerów fenolowych, łatwiej utylizowanych przez grzyby strzępkowe. Powstałe polimery fenolowe były trudniej rozpuszczalne w wodzie. Na końcowym etapie fermentacji β -glikozydaza wykazywała aktywność na dużo niższym poziomie, ale nadal brała udział w remobilizacji polimerów fenolowych substratu.

Podobny poziom wzrostu zawartości związków fenolowych w złożu P5 obserwowano o dwie doby później. Towarzyszyła mu wydajna biosynteza β -glikozydazy (rys. 5).



Rys. 5. Korelacja pomiędzy zawartością fenoli ogółem w złożu P5 i biosyntezą wybranych enzymów *R. oligosporus*

Fig. 5. Correlation between total phenolics content for substrate P5 and biosynthesis of selected *R. oligosporus* enzymes

Szczep *R. oligosporus* dopiero w dziesiątej dobie procesu syntetyzował z najwyższą wydajnością lakkazę (była ona niższa w porównaniu do wydajności uzyskanej na złożu P9) i β -glukozydazę.

Po wyczerpaniu się obecnych w wytłokach aroniowych łatwiej przyswajalnych glikozydów oraz składników lipidowych – badany szczep *R. oligosporus* syntetyzował β -glukozydazę z większą wydajnością (8–10 doba) w celu wykorzystania trudniej przyswajalnych glikozydów wiesiołka. Najwyższa w tej fazie fermentacji aktywność lakkazy była związana z detoksyfikacją rozpuszczalnych w wodzie wolnych fenoli poprzez ich utlenianie i polimeryzację do trudno rozpuszczalnych polimerów fenolowych.

Wyniki te sugerują, że β -glukozydaza odgrywała ważną rolę w mobilizowaniu wolnych fenoli produkowanych podczas biokonwersji odpadów z aronii i wiesiołka w stałym złożu przy udziale *R. oligosporus*. Podobne trendy obserwowano podczas hodowli *R. oligosporus* w stałym złożu na odpadach z przetwórstwa ananasa [Correia i in. 2004c], guawy [Correia i in. 2004a] i żurawiny [Vattem i in. 2002].

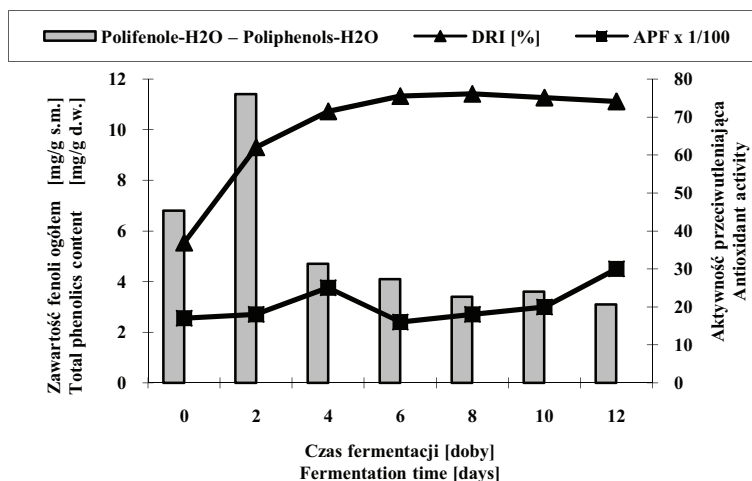
Korelacja pomiędzy zawartością fenoli ogółem w ekstraktach wodnych prób fermentacyjnych i ich aktywnością przeciwutleniającą

Aktywność przeciwutleniającą polifenoli wyekstrahowanych wodą z prób fermentacyjnych oceniano dwiema metodami. W metodzie z DPPH mierzono zdolność otrzymanych ekstraktów do zmiatania wolnych, syntetycznych rodników DPPH (DRI – DPPH Radical Inhibition). Natomiast w metodzie z β -karotenem określano zdolność przeciwutleniaczy do ochrony β -karotenu przed utlenianiem (APF – Antioxidant Protection Factor) i możliwość działania przeciwutleniacza na granicy faz lipid-woda.

Aktywność fenoli zawartych w wodnych ekstraktach prób fermentacyjnych złoża P9, w wygaszaniu wolnych rodników DPPH, wykazywała do szóstej doby procesu silną tendencję wzrostową (od 36,9% do ok. 75,5%), po czym wzrost tej aktywności był nieco słabszy. Po dwunastu dobach fermentacji osiągnęła ona wartość 74,1%, czyli około 2-krotnie wyższą w stosunku do próby wyjściowej (rys. 6). Z dynamicznym wzrostem aktywności przeciwrodnikowej dobrze korelował gwałtowny spadek zawartości fenoli rozpuszczalnych w wodzie.

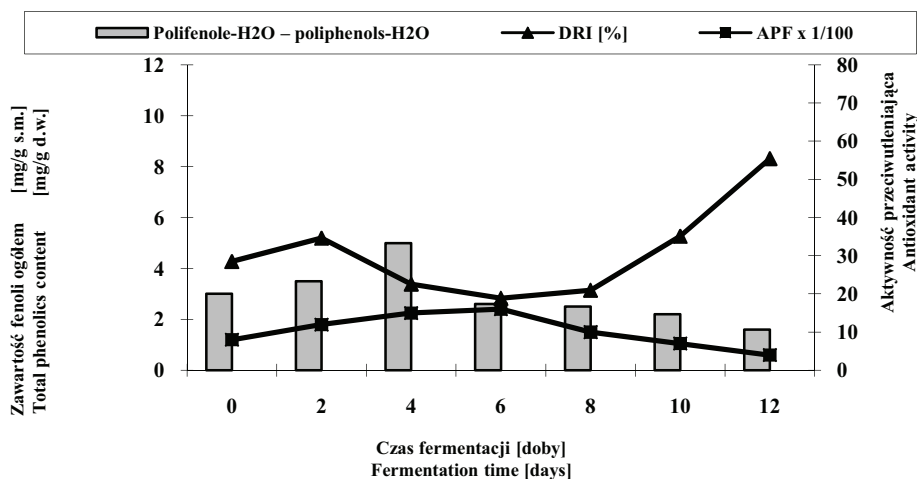
Aktywność przeciwutleniająca ww. fenoli, mierzona względem β -karotenu wzrastała do czwartej doby procesu (od 0,17 do 0,25), po czym następował jej spadek do wartości zbliżonej do wyjściowej oraz ponowny wzrost do wartości maksymalnej (0,3) w dwunastej dobie procesu.

Uzyskane wyniki wskazują, że przeciwutleniacze z wcześniejszej fazy procesu miały charakter hydrofobowy (4 doba). Świadczy o tym wzrost aktywności przeciwutleniającej wobec β -karotenu. Zdolność fenoli w ekstraktach wodnych prób fermentacyjnych złoża P5 do zmiatania wolnych rodników DPPH, do drugiej doby procesu, wykazywała tendencję wzrostową (od 28,5% do ok. 34,6%), po czym do szóstej doby obserwowano spadek do 18,9% i ponowny jej wzrost, po dwunastu dobach, kiedy to osiągnęła wartość 55,4%, czyli około 2-krotnie wyższą w stosunku do wartości wyjściowej (rys. 7).



Rys. 6. Korelacja pomiędzy zawartością fenoli ogółem w złożu P9 i ich aktywnością przeciwutleniającą

Fig. 6. Correlation between total phenolics content for substrate P9 and their antioxidant activity



Rys. 7. Korelacja pomiędzy zawartością fenoli ogółem w złożu P5 i ich aktywnością przeciwutleniającą

Fig. 7. Correlation between total phenolics content for substrate P5 and their antioxidant activity

Aktywność przeciwutleniająca polifenoli występujących w złożu P5, mierzona względem β -karotenu, do szóstej doby procesu wzrastała (od 0,08 do 0,16), po czym obserwowano jej spadek do wartości poniżej wyjściowej, aż do dwunastej doby procesu, kiedy osiągnęła wartość 0,04. W podłożu P5 bogatszym w składniki lipidowe, w szóstej dobie, obserwowano dwukrotny wzrost aktywności przeciwutleniającej wobec β -karotenu i wyraźny spadek zawartości fenoli rozpuszczalnych. Wraz ze zmianą środowiska (wyczerpywaniem się składników lipidowych) na bardziej hydrofilowe, natura

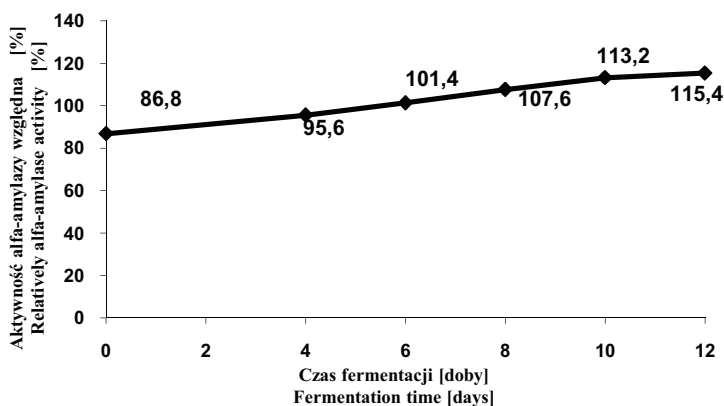
przeciwutleniaczy zmieniała się i wówczas obserwowano wyraźny wzrost aktywności przeciwrodnikowej wobec DPPH (dwunasta doba).

Polimery fenolowe słabo rozpuszczalne w wodzie wykazywały dużo wyższą aktywność przeciwutleniającą niż monomery. W zależności od zmian zachodzących w podłożu podczas fermentacji zmieniał się ogólny charakter przeciwutleniaczy, z hydrofobowego na hydrofilowy lub odwrotnie. Przeciwutleniacze obecne we wczesnej fazie wzrostu były bardziej hydrofobowe i dlatego bardziej aktywne wobec β -karotenu. Podobne obserwacje opisali Correia i in. [2004c].

Wpływ fenoli obecnych w ekstraktach wodnych prób fermentacyjnych na aktywność α -amylazy trzustkowej w warunkach *in vitro*

W zależności od struktury związków fenolowych mogą one reagować z enzymami, zmieniając ich rozpuszczalność i aktywność. Spadek aktywności enzymu zależy od stężenia, liczby i pozycji grup hydroksylowych związków fenolowych.

W prezentowanej pracy badano wpływ ekstraktów fenoli z fermentowanego złoża P9 na aktywność α -amylazy trzustkowej. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że związki fenolowe zawarte w ekstraktach złoża P9, fermentowanego w czasie sześciu dób, hamowały aktywność α -amylazy trzustkowej, podczas gdy fenole obecne w ekstraktach złoża fermentowanego dłużej (od 7 do 12 doby) aktywowały ten enzym (rys. 8).



Rys. 8. Wpływ fenoli ekstraktów wodnych prób fermentacyjnych złoża P9 na aktywność α -amylazy trzustkowej w warunkach *in vitro*

Fig. 8. Effect of phenolics occurring in aqueous extracts from fermented substrate P9 on the pancreas α -amylase activity *in vitro*

Polifenole zawarte w próbach fermentacyjnych, otrzymanych po dwunastu dobach procesu, korzystnie wpływały na aktywność ww. enzymu, powodując wzrost jego aktywności o 15,4%. Stwierdzono również, że intensywność hamowania aktywności badanego enzymu była skorelowana z maksymalną zawartością fenoli ogółem i prawdopodobnie była związana z ich strukturą. Nie była ona natomiast skorelowana z aktywnością przeciwrodnikową, mierzoną wobec DPPH. Obserwacje te są zgodne z wynikami

badań Correia i in. [2004b], którzy wskazują na możliwość zastosowania naturalnych, fenolowych inhibitorów α -amylazy w walce z cukrzycą.

WNIOSKI

1. Podczas fermentacji wyłoków z aronii i wiesiołka w stałym złożu stwierdzono wyraźną korelację pomiędzy zawartością fenoli ogółem i aktywnością β -glukozydazy, a także pomiędzy stężeniem polimerów fenolowych i wydajnością biosyntezy lakkazy.

2. Polimery fenolowe wykazywały wyższą aktywność przeciwutleniającą niż monomery.

3. Przewutleniające powstające we wcześniejszej fazie procesu miały bardziej hydrofobowy charakter niż przeciwutleniające generowane w drugiej fazie fermentacji.

4. Biokonwersja wyłoków z aronii i wiesiołka przy udziale *R. oligosporus* powodowała ponad 2-krotny wzrost ich aktywności przeciwutleniającej.

5. Fenole zawarte w próbach fermentacyjnych z wczesnej fazy procesu inaktywowały α -amylazę trzuskową, natomiast polifenole wykazujące znaczną aktywność przeciwutleniającą aktywowały badany enzym.

6. Przeprowadzone badania wykazały możliwość otrzymywania przeciwutleniaczy fenolowych – produktów o wartości dodanej, z wyłoków z aronii połączonych z wyłokami z wiesiołka na drodze SSF, co stwarza szansę na ich bardziej racjonalne niż dotychczas wykorzystanie w zintegrowanej biorafinerii.

PIŚMIENNICTWO

- Bravo L., 1998. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutr. Rev.*, 56, 317–333.
- Correia R.T.P., McCue P., Magalhaes M.M.A., Macedo G.R., Shetty K., 2004a. Phenolic antioxidant enrichment of soy flour-supplemented guava waste by *Rhizopus oligosporus* – mediated solid-state bioprocessing *Journal of Food Biochem.*, 28, 404–418.
- Correia R.T.P., McCue P., Vattem D.A., Magalhaes M.M.A., Macedo G.R. Shetty K., 2004b. Amylase and Helicobacter pylori inhibition by phenolic extracts of pineapple wastes bioprocessed by *Rhizopus oligosporus*. *Journal of Food Biochemistry*, 28, 419–434.
- Correia R.T.P., McCue P., Magalhaes M.M.A., Macedo G.R., Shetty K., 2004c. Production of phenolic antioxidants by the solid-state bioconversion of pineapple waste mixed with soy flour using *Rhizopus oligosporus*. *Process Biochemistry*, 39, 2167–2172.
- Kulasek G., Bałasińska B., 1998. Substancje biologicznie czynne beztluszczowej masy nasion wiesiołka (*Oenothera* sp.). Zbiór prac III Sympozjum n.t.: Olej z nasion wiesiołka i inne oleje zawierające kwasy N-6 lub N-3 w profilaktyce i terapii. Sulejów 15–16 maja 1998. 150–153.
- Kris-Etherton P.M., Hocker K.D., Bonamone A., Coval S.M., Binkoski A.E., Hilpert K.F., et al., 2002. Bioactive compounds in for solid-state fungal state bioprocessing of foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *Am. J. Med.*, 113, 71–88.
- Nawirska A., Kwaśniewska M., 2004. Frakcje błonnika w wyłokach z owoców. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.*, 3(1), 13–20.
- McCue P., Shetty K., 2003a. Role of carbohydrate-cleaving enzymes in phenolic antioxidant mobilization from whole soybean fermented with *Rhizopus oligosporus*. *Food Biotechnology*, 17, 27–37.

- Murashima K., Nishimura Y., Nakamura Y., Koga J., Moriya T., Sumida N., et al. 2002. Purification and characterization of new endo-1,4- β -D-glucanases from *Rhizopus oryzae*. *Enzyme Microbiol. Technol.*, 30, 319–326.
- Onesiak K., 2000. Aronia i jej żywieniowo-lecznicze znaczenie. *Żywność, Żywnienie, Prawo a Zdrowie*. Nr 3, str. 326.
- Vattem D.A., Shetty K., 2002. Solid-state production of phenolic antioxidants from cranberry pomace by *Rhizopus oligosporus*. *Food Biotechnol.*, 16, 189–210.
- Zheng Z., Shetty K., 1998. Solid-state production of beneficial fungi as the indicator of growth. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 783–787.
- Zheng Z., Shetty K., 2000. Solid-state bioconversion of phenolic from cranberry pomace and role of *Lentinus edodes* β -glucosidase. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 895–900.

SOLID-STATE PRODUCTION OF PHENOLIC ANTIOXIDANTS FROM MIXTURES OF ARONIA POMACE AND EVENING PRIMOSE WASTE

Abstract. This paper reports on application of SSF conducted by *Rhizopus oligosporus* for production of phenolic antioxidants from mixtures of aronia pomace and evening primose cake. The fungus was grown on two substrates: (P9) 9g of aronia pomace and 1 g of evening primose waste, and (P5) 5 g of aronia pomace and 5 g of evening primose cake. Changes in concentration of phenolics extractable with water were correlated with changes in β -glucosidase activity and polymeric phenolics content was correlated with the yield of laccase biosynthesis. Antioxidant activity increased two-fold after 12 day fermentation of both P5 and P9. Phenolics produced in the early stage of the SSF process inhibited the porcine pancreatic α -amylase while polymeric phenolics with high antioxidant capacity activated this enzyme. SSF, conducted under presented conditions, increased the value of aronia pomace and evening primose cake.

Key words: phenolic antioxidants, melanocarpa pomace, *Rhizopus oligosporus*, SSF

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 30.06.2008

Do cytowania – For citation: Miskiewicz H, Jakubowski A., 2008. Fermentacja w stałym złożu wycieków z aronii i wiesiołka jako metoda otrzymywania przeciwutleniaczy fenolowych. *Acta Sci. Pol. Biotechnol.* 7(2), 13–25.

WZROST I ENZYMATYCZNA AKTYWNOŚĆ DROŹDŹY W MLEKU RÓŻNYCH GATUNKÓW PRZEŻUWACZY*

Marek Szoltyśnik, Monika Żelazko, Xymena Połomska,
Maria Wojtatowicz, Józefa Chrzanowska

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Streszczenie. Przedmiotem badań były szczepy drożdży *Candida kefyr* PIIIb, *Candida sphaerica* FII7a oraz *Yarrowia lipolytica* JIIIc wyizolowane z polskich serów z przerostem pleśniowym Rokpol. Badane drożdże wprowadzono do mleka krowiego, koziego i owczego w celu określenia ich cech technologicznych jako potencjalnych kultur wspomagających w produkcji serów wytwarzanych z mleka różnych gatunków zwierząt. Zaszczepione próby mleka inkubowano w temp. pokojowej przez 12 dni. Podczas inkubacji monitorowano wzrost drożdży, pH, oraz poziom azotu rozpuszczalnego w pH 4,6. W 12. dniu inkubacji oceniono w mleku poziom kwasów organicznych oraz zmiany degradacyjne białek i lipidów. Próbę kontrolną stanowiło mleko bez dodatku drożdży. Wykazano, że w każdym mleku lepiej rozwijały się drożdże *C. sphaerica* FII7a i *C. kefyr* PIIIb niż *Y. lipolytica* JIIIc, które osiągały liczebność na poziomie 10^7 - 10^8 j.t.k.mL⁻¹, podczas gdy populacja tego ostatniego szczepu była niższa średnio o jeden rząd logarytmiczny. We wszystkich rodzajach mleka wzrost drożdży *Y. lipolytica* JIIIc wiązał się spadkiem zawartości kwasu cytrynowego. Natomiast podczas wzrostu dwóch pozostałych szczepów *Candida kefyr* PIIIb i *Candida sphaerica* FII7a obserwowano niewielki przyrost zawartości kwasów: octowego, mlekowego i propionowego. Największe zmiany degradacyjne białek mleka wykazano w próbach, do których wprowadzono drożdże *Y. lipolytica* JIIIc. Proteazy tych drożdży w równym stopniu degradowały białka mleka krowiego, koziego, jak i owczego. Również ich lipazy spowodowały największy rozkład tłuszczu mleka różnych gatunków przeżuwaczy, uwalniając znaczne ilości wolnych kwasów tłuszczowych krótko- i średniołańcuchowych, a także kwasu palmitynowego i oleinowego. Z tego względu szczep tych drożdży może być wykorzystany do produkcji serów z każdego rodzaju mleka, zwłaszcza serów miękkich.

Słowa kluczowe: drożdże, wzrost, mleko, kwasy organiczne, proteoliza, lipoliza

*Praca wykonana w ramach projektu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego Nr 2 P06T 050 28.

WSTĘP

Drożdże stanowią stały składnik mikroflory wielu produktów mleczarskich [Jacobsen i Narvhus 1996, Mayoral i in. 2005, Gardini i in. 2006]. Dostępność białka, tłuszczu, cukru i soli mineralnych, a także zdolność drożdży do wzrostu w niskich temperaturach i przy wysokim zasoleniu powodują, że mleko i jego przetwory są dobrym środowiskiem do rozwoju tych mikroorganizmów [Mayoral i in. 2005]. Ich obecność nie pozostaje jednak bez wpływu na jakość produktów [Fleet 1992, Addis i in. 2001]. Enzymy zewnątrzkomórkowe wydzielane przez drożdże uczestniczą w degradacji białek i lipidów mleka [Chrzanowska i Wojtatowicz 2001, Suzzi i in. 2001, Florez i Mayo 2006, Czajgucka i in. 2006]. Powstające w ten sposób wolne aminokwasy i kwasy tłuszczowe służą jako substraty do syntezy związków aromatycznych [Jollivet i in. 1994, Molimard i in. 1996, Cichosz 1997, Gardini i in. 1999, Pandey i in. 1999, McSweeney i Sousa 2000]. Cukry i kwasy organiczne asymilowane w procesach fermentacji przekształcane są do wtórnych metabolitów, wydzielanych do środowiska, powodując zmiany kwasowości. Przemiany te wpływają na kształtowanie się cech organoleptycznych, nadając produktom charakterystyczny smak i zapach. Z tego względu od lat prowadzone są prace nad wykorzystaniem wyselekcjonowanych szczepów drożdży jako serowarskich kultur wspomagających [van den Tempel i Jacobsen 2000, Ferreira i Viljoen 2003]. Zmiany zachodzące w mleku pod wpływem drożdży mogą rzutować jednak na rozwój bakterii fermentacji mlekowej, wprowadzanej do mleka w postaci szczepionek [Eliskases-Lechner i Ginzinger 1995, Gadaga i in. 2001, Alvarez-Martin 2008]. Rozwój drożdży może prowadzić także do powstawania wad, takich jak gorzki lub owocowy posmak, zmiana barwy oraz tekstury.

Różnice w składzie oraz dostępności poszczególnych komponentów obserwowane pomiędzy mlekiem krowim, kozim i owczym mogą wpływać na rozwój mikroflory odpowiedzialnej za kształtowanie cech jakościowych produktów mleczarskich. Wprowadzenie do praktyki przemysłowej wyselekcjonowanych szczepów drożdży, jako potencjalnych kultur wspomagających, wymaga zatem oceny ich wzrostu i aktywności hydrolitycznej w mleku nie tylko krowim, ale i innych gatunków zwierząt, coraz częściej wykorzystywanym także w Polsce jako surowiec serowarski.

MATERIAŁ I METODY

Przedmiotem badań były szczepy drożdży *Candida kefir* PII1b, *C. sphaerica* FII7a, oraz *Yarrowia lipolytica* JII1c wyizolowane z serów z przerostem pleśniowym Rokpol [Wojtatowicz i in. 2001] i pochodzące z kolekcji Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu.

Drożdże namnożono w 20 mL podłoża YCG zawierającego (g L^{-1}): ekstrakt drożdżowy – 1,7; kazeinę – 2,0; glukozę – 10, w kolbach o objętości 200 mL, na wytrząsarce w temp. 28°C przez 48 h. Po zakończeniu hodowli oznaczano gęstość komórek, a następnie biomasę odwirowano i wprowadzono do sterylnego mleka do uzyskania końcowego stężenia 10^5 j.t.k. mL^{-1} . Zaszczepione próby mleka krowiego, koziego i owczego o objętości 500 mL inkubowano w temp. pokojowej przez 12 dni. Próbę kontrolną stanowiło mleko bez dodatku drożdży. Podczas inkubacji monitorowano wzrost drożdży, pH oraz poziom azotu rozpuszczalnego i całkowitego. W 12. dniu inkubacji oceniono ponadto poziom kwasów organicznych oraz zmiany degradacyjne

białek i lipidów mleka. Ogólną liczbę drożdży oznaczano metodą płytkową na podłożu OGY o składzie (g L^{-1}): agar – 15,0; ekstrakt drożdżowy – 5,0; glukoza – 20,0; chlorowodorek oksytetracykliny – 0,1. Płytki inkubowano w temp. 30°C , przez 72 godziny.

Zmiany pH mleka w trakcie inkubacji oznaczano za pomocą pH-metru inoLab.

Stopień degradacji białek określono ilościowo, poprzez pomiar przyrostu zawartości związków azotowych rozpuszczalnych w pH 4,6 metodą Kjeldahla [Zmarlicki 1981] i wolnych grup aminowych, których poziom oznaczono przy użyciu kwasu trójnitrobenzenosulfonowego (TNBS) wg zmodyfikowanej metody Kuchroo i in. [1983]. Stopień zaawansowania procesów proteolizy śledzono także metodą elektroforezy wg Andrews [1983], którą prowadzono w 12,5% żelu poliakrylamidowym, w buforze TRIS-Glicyna o pH 8,3. Żele wybarwiano barwnikiem Coomassie Blue w 50% roztworze metanolu zawierającego 1,25% TCA.

Zmiany lipolityczne kontrolowano na podstawie o pomiaru przyrostu wolnych kwasów tłuszczowych wydzielonych z mleka wg Deeth'a i in. [1983]. Analizowane związki ekstrahowano z mleka mieszaniną heksan-eter dwuetylowy (1:1; v/v), a następnie adsorbowano na obojętnym tlenku glinu. Z fazy stacjonarnej kwasu uwalniano przy użyciu eteru dwuizopropylowego zawierającego 6% kwasu mrówkowego. Otrzymane wolne kwasy tłuszczowe przeprowadzano w pochodne metylowe, a następnie poddawano analizie chromatograficznej (GC/MS) w następujących warunkach: kolumna kapilarna Agilent DB-225 MS, 60 m x 250 μm x 0,25 μm , temperatura kolumny 140°C (5 min) do 240°C ($4^{\circ}\text{C min}^{-1}$), gaz nośny-hel ($20\text{cm}^3\text{s}^{-1}$), nastrzyk $1\mu\text{L}$, 260°C , split 100:1.

Kwasy organiczne ekstrahowano z mleka acetonitrylem wg Roostita i Fleet [1996] i rozdzielano przy wykorzystaniu wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC), na kolumnie Aminex HPX-87H, w temp. $55\text{--}60^{\circ}\text{C}$, w gradiencie 0,07–0,10% (v/v) kwasu ortofosforowego, przy szybkości przepływu $0,5\text{ mL min}^{-1}$.

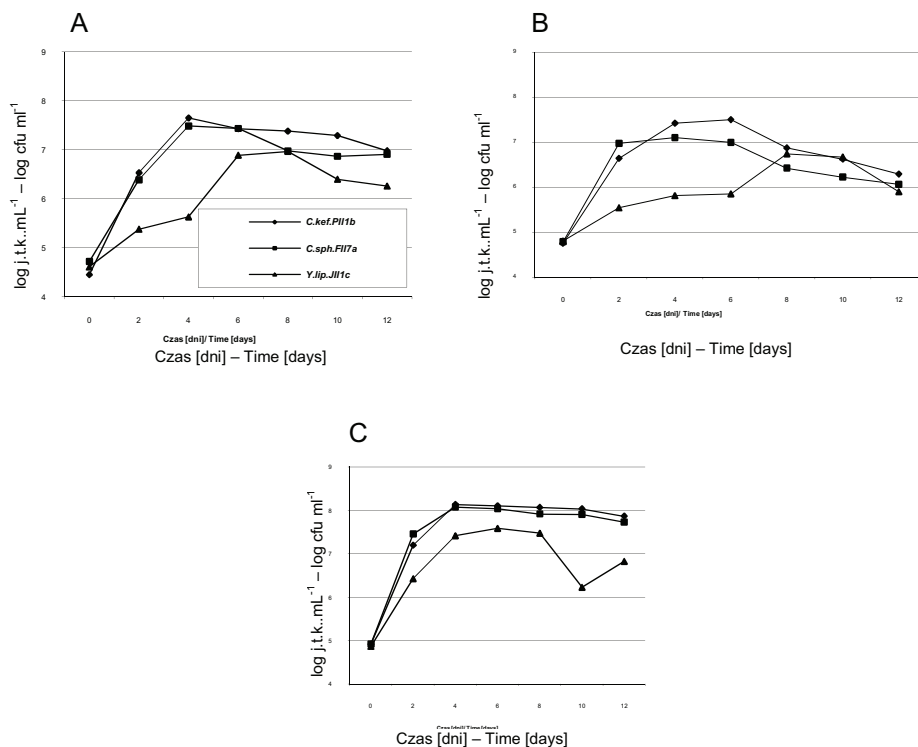
OMÓWIENIE I DYSKUSJA WYNIKÓW

Wyselekcjonowane z polskich serów pleśniowych Rokpol szczepy drożdży *C. kefyri* PIIIb, *C. sphaerica* FII7a oraz *Y. lipolytica* JIIIc zostały wprowadzone do mleka krowiego, koziego i owczego. W celu określenia ich przydatności technologicznej badano ich wzrost w tym środowisku oraz monitorowano poziom degradacji białek i tłuszczu.

W trakcie 12-dniowej inkubacji zaobserwowano zróżnicowaną dynamikę wzrostu poszczególnych szczepów (rys. 1). Początkowa liczebność analizowanych drożdży w mleku krowim, kozim i owczym była zbliżona i zawierała się w przedziale $5,3\text{--}8,5\cdot 10^4$ j.t.k.mL⁻¹. Większy wzrost drożdży w pierwszych dniach inkubacji zaobserwowano w próbach, do których wprowadzono szczepy z rodzaju *Candida*. Maksymalną wielkość ich populacji w granicach $1,1\cdot 10^7\text{--}1,4\cdot 10^8$ j.t.k.mL⁻¹ w mleku wszystkich badanych gatunków przeżuwały stwierdzono już w drugim lub czwartym dniu. W kolejnych dniach inkubowania mleka krowiego i owczego obserwowano niewielki spadek ich ilości. W mleku kozim redukcja ta była większa i przekraczała jeden rząd logarytmiczny. Odminną kinetykę wzrostu wykazywały drożdże *Y. lipolytica* JIIIc, których maksymalna liczebność ($4,8\cdot 10^6\text{--}3,9\cdot 10^7$ j.t.k.mL⁻¹) niezależnie od rodzaju mleka spadała szóstego lub ósmego dnia prowadzenia doświadczenia.

Otrzymane wyniki są zgodne z doniesieniami innych autorów [Roostita i Fleet 1996, Gadaga i in. 2001, Szołtysik i in. 2006], którzy wykazali, że szczepy drożdży izolowane z produktów mleczarskich wykazują zdolności do wzrostu w mleku, osiągając jednak

zróznicowany poziom liczebności. Ich odmienna kinetyka wzrostu w tym środowisku skorelowana jest z ich różną zdolnością asymilacji laktozy, którą wśród badanych szczepów wykazywały: *C. kefyry* PII1b i *C. sphaerica* FII7a [Roostita i Fleet 1996, Juszczyk 2002].

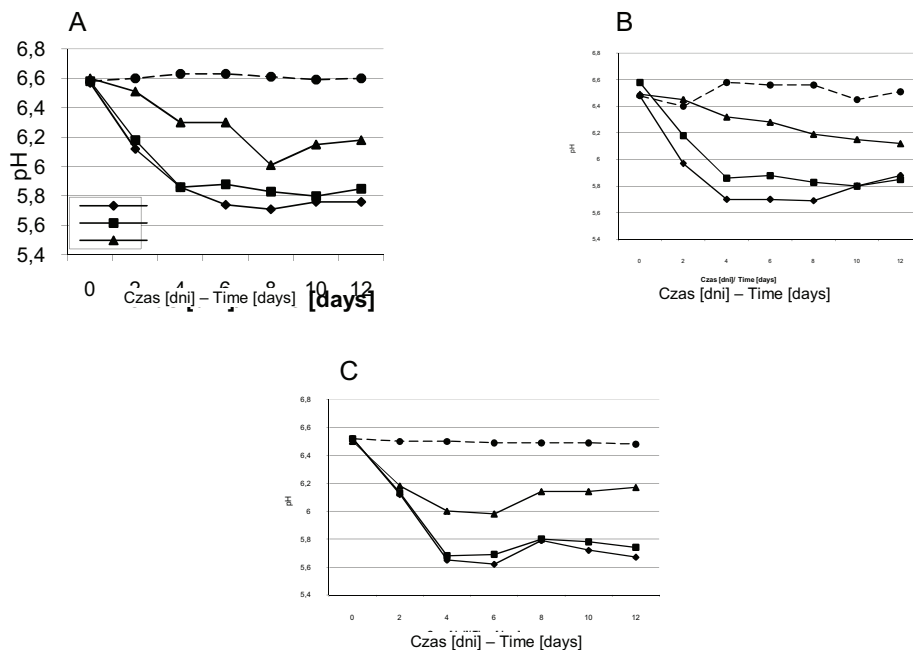


Rys. 1. Wzrost wybranych szczepów drożdży w mleku krowim (A), kozim (B), owczym (C)
Fig. 1. Growth of selected strains of yeast in bovine (A), caprine (B), ovine (C) milk

Zwiększeniu liczebności drożdży w mleku towarzyszył przyrost jego kwasowości (rys. 2). Wprowadzenie do mleka drożdży *C. kefyry* PII1b i *C. sphaerica* FII7a powodowało jego zakwaszenie do poziomu pH 5,6–5,8, natomiast w trakcie wzrostu drożdży *Y. lipolytica* III1c obserwowany spadek pH nie przekraczał wartości 6,0. W próbach kontrolnych mleka krowiego, koziego i owczego pH utrzymywało się na stałym poziomie.

Po dwunastu dniach inkubacji drożdży w każdym z rodzajów mleka oznaczono obecność kwasów organicznych (tab. 1). We wszystkich próbach mleka zaszczerpionego *C. kefyry* PII1b i *C. sphaerica* FII7a zaobserwowano niewielki wzrost zawartości kwasów octowego, mlekowego i propionowego. Podobne wyniki otrzymywali również Besançon i in. [1992], Roostita i Fleet [1996] i Czajgucka [2002]. Badane drożdże wykazywały także zdolność do utylizacji wybranych kwasów organicznych. Wzrost *Y. lipolytica* III1c wiązał się głównie z wykorzystaniem obecnego w środowisku kwasu cytrynowego.

Obserwacje te potwierdzają wyniki badań Besançon i in. [1992], Roostita i Fleet [1996], oraz Freitas i in. [1999], którzy analizując zmiany spowodowane obecnością drożdży w mleku kozim i owczym, wykazali ubytek tego samego kwasu. Wszystkie badane szczepy drożdży wykazywały także zdolność do utylizowania kwasu bursztynowego i mrówkowego.



Rys. 2. Zmiany pH w mleku: krowim (A), kozim (B), owczym (C) inkubowanym z wybranymi szczepami drożdży

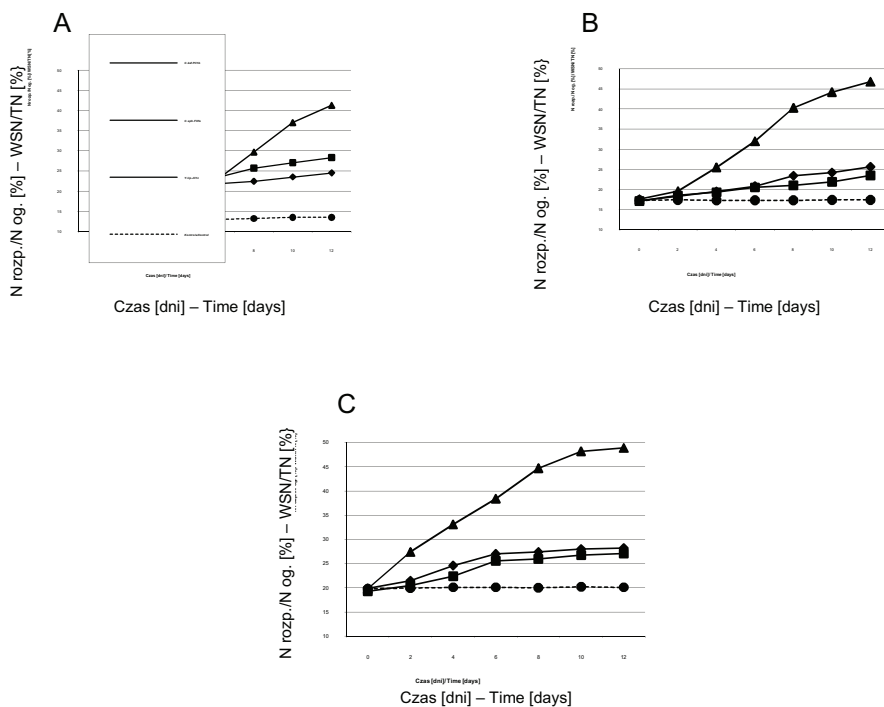
Fig. 2. Changes of pH of bovine (A), caprine (B), ovine (C) milk incubated with selected strains of yeast

W trakcie 12-dniowej inkubacji mleka pochodzącego od różnych gatunków przeżuwaczy analizowano ilościowo i jakościowo zmiany proteolityczne. Proces degradacji białek śledzono poprzez pomiar zawartości azotu rozpuszczalnego w pH 4,6 wyrażonego w % azotu ogólnego oraz oznaczając przyrost zawartości wolnych grup aminowych we frakcji rozpuszczalnej w tym samym pH. Rozkład białka monitorowano również przy użyciu metody elektroforezy w żelu poliakrylamidowym.

Wyniki, jakie uzyskano dla prób, do których wprowadzono analizowane drożdże, wskazują na duże różnice w głębokości zmian degradacyjnych białek, wynikające z różnych uzdolnień hydrolitycznych poszczególnych szczepów. Początkowa zawartość azotu rozpuszczalnego w mleku kontrolnym pochodzącym od różnych gatunków przeżuwaczy wynosiła dla mleka krowiego 12,9%, koziego 17,3%, a owczego 19,8% (rys. 3) i nie zmieniała się przez cały okres inkubacji.

Tabela 1. Zawartość kwasów organicznych [mg 100 mL⁻¹] w mleku zaszczerpionym drożdżami po 12 dniach inkubacji
 Table 1. Contents of organic acids [mg 100 mL⁻¹] in milk after 12 days of incubation with yeasts

Kwas organiczny Organic acid	Mleko – Milk						Owece – Ovine					
	Krowie – Bovine			Kozie – Caprine			Control	<i>C. kefyr</i> PIIIb	<i>C. sphaerica</i> FI17a	<i>Y. lipolytica</i> JIIIc		
Mrówkowy Formic	0,450	0,350	0,250	0,054	0,34	0,250	0,310	0,042	0,500	0,470	0,440	0,038
Octowy Acetic	0,020	0,089	0,041	0,021	0,025	0,135	0,039	0,037	0,022	0,126	0,115	0,029
Propionowy Propionic	0,012	0,032	0,032	0,013	0,012	0,032	0,037	0,010	0,022	0,890	0,223	0,017
Mlekowy Lactic	0,700	1,18	1,58	0,046	0,600	1,900	1,670	0,400	1,080	2,960	3,030	0,058
Bursztynowy Succinic	0,170	0,013	0,013	0,015	0,21	0,200	0,013	0,031	0,290	0,280	0,270	0,051
Cytrynowy Citric	3,400	3,210	3,200	0,094	2,90	2,510	2,56	0,078	4,700	4,470	4,010	0,110



Rys. 3. Zmiany zawartości azotu rozpuszczalnego w pH 4,6 w mleku krowim (A), kozim (B), owczym (C), podczas wzrostu drożdży

Fig. 3. Changes of nitrogen soluble at pH 4.6 contents in bovine (A), caprine (B), ovine (C) milk during incubation with yeasts

Największe tempo przyrostu zawartości azotu rozpuszczalnego w pH 4,6 wykazano w próbach mleka zaszczerpionego drożdżami *Y. lipolytica* JIII1c. Po 12 dniach inkubacji poziom rozpuszczalnych związków azotowych we wszystkich próbach zawierających te drożdże był najwyższy i mieścił się w przedziale 41–49%. Uwzględniając jednak różnicę pomiędzy końcowym a początkowym stężeniem azotu rozpuszczalnego w mleku poszczególnych gatunków przeżuwaczy inkubowanym z tym szczepem drożdży, stwierdzono, że jego proteazy w podobnym stopniu degradowały białka mleka tak krowiego, jak i koziego oraz owczego.

W licznych doniesieniach twierdzono, że wśród drożdży izolowanych z serów największe uzdolnienia proteolityczne wykazują szczepy z gatunku *Y. lipolytica* [Wyder i Puhan 1999, van den Tempel i Jacobsen 2000]. W grupie enzymów proteolitycznych wydzielanych przez ten gatunek obecne są: proteinaza serynowa, aktywna w środowisku zasadowym, oraz proteinaza aspartylowa, aktywna w środowisku kwaśnym. Niektóre szczepy wykazują zdolność do syntezy proteinaz aktywnych w środowisku obojętnym [Ogrydziak 1993]. Wielu autorów potwierdziło również wysoką aktywność kazeinolityczną tych drożdży, wykorzystując je jako kultury starterowe wspomagające w produkcji serów dojrzewających [van den Tempel i Jacobsen 2000, Ferreira i Viljoen 2003, Gardini i in. 2006, Czajgucka i in. 2006, Sołtysik i in. 2006].

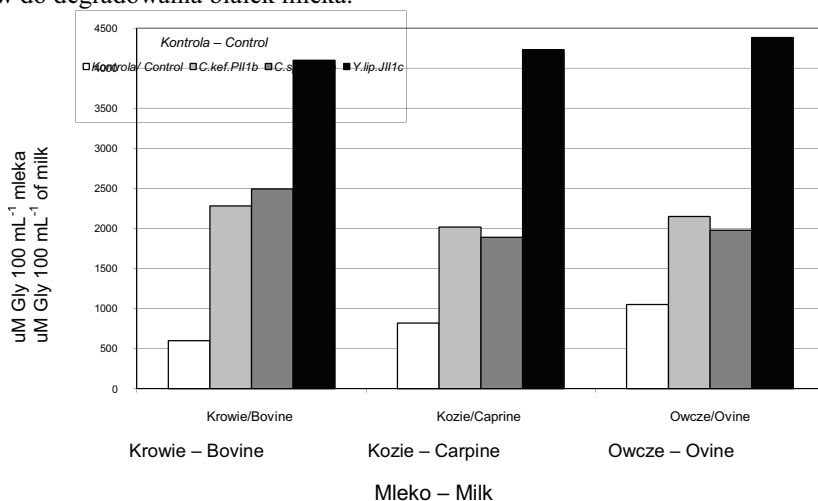
Pozostałe testowane szczepy drożdży *C. kefir* PII1b i *C. sphaerica* FII7a przyczyniły się do znacznie słabszego tempa degradowania białek mleka. W próbach mleka, do których zostały one wprowadzane, stężenie rozpuszczalnych związków azotowych, jakie wykazano pod koniec inkubacji, zawierało się w przedziale 23,6–28,2%.

Analizując poziom proteolizy w mleku różnych gatunków przeżuwaczy, wykazano większą podatność białek mleka krowiego niż koziego i owczego na działanie proteaz drożdży z rodzaju *Candida*. Przyrost azotu rozpuszczalnego, jaki odnotowano w mleku kozim pod koniec inkubacji, zawierał się w przedziale od 11,6 do 15,4%, podczas gdy w dwóch pozostałych surowcach nie przekraczał 9%.

Wśród szczepów należących do gatunków *C. sphaerica* i *C. kefir* izolowanych z serów pleśniowych stwierdza się duże zróżnicowanie w poziomie ich zewnątrzkomórkowej aktywności proteolitycznej [Choisy i in. 1987, Devoyod 1990, Lopez-Diaz i in. 1995, Roostita i Fleet 1996, Cosentino i in. 2001]. W wielu doniesieniach potwierdzano natomiast ich wysokie uzdolnienia do syntezy wewnątrzkomórkowych amino- i karboksypeptydaz, których aktywność ujawnia się dopiero po autolizie komórek [Nuez i in. 1981, Lenoir 1984, van den Tempel i Jakobsen 2000].

Różnice jakie zaobserwowano pomiędzy badanymi próbami zaszczepionego mleka w poziomie zawartości rozpuszczalnych związków azotowych, potwierdzono w trakcie ilościowego oznaczenia wolnych grup aminowych we frakcji rozpuszczalnej w pH 4,6 (rys. 4).

Najlepszymi uzdolnieniami do hydrolizowania wiązań peptydowych białek mleka i generowania wolnych grup aminowych charakteryzował się szczep drożdży *Y. lipolytica* JIIIc. W próbach mleka krowiego, koziego i owczego, do których został on wprowadzany, zawartość wolnych grup aminowych była zbliżona i pod koniec inkubacji zawierała się w przedziale 4100–4400 $\mu\text{M Gly}100 \text{ mL}^{-1}$. W obecności pozostałych badanych drożdży *C. kefir* PII1b i *C. sphaerica* FII7a zawartość wolnych grup aminowych była blisko dwukrotnie niższa, co potwierdza znacznie słabsze uzdolnienia tych szczepów do degradowania białek mleka.

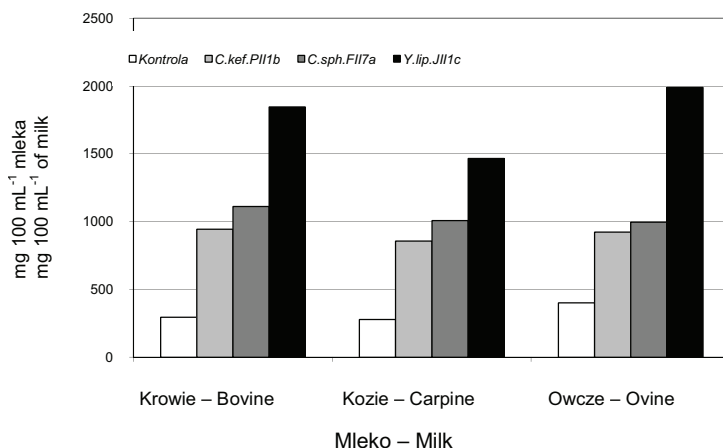


Rys. 4. Zawartość wolnych grup aminowych w mleku zaszczepionym drożdżami po 12 dniach inkubacji

Fig. 4. Contents of free amino groups in milk after 12 days incubation with yeasts

Oprócz właściwości proteolitycznych bardzo ważną cechą określającą przydatność drożdży w przetwórstwie mleka jest ich zdolność do syntezy zewnątrz- i wewnątrzkomórkowych enzymów lipolitycznych [Novotny i in. 1988, Hadeball 1991]. Hydroliza triacylogliceroli, przeprowadzana przez lipazy, prowadzi do nagromadzenia się wolnych kwasów tłuszczowych, które bezpośrednio przyczyniają się do kształtowania smaku i zapachu produktów mleczarskich. Związki te mogą być także prekursorami metyloketonów, drugorzędowych alkoholi czy estrów, które również wpływają na ostateczne cechy organoleptyczne tych produktów [Jollivet i in. 1994, Molimard i in. 1996, Cichosz 1997, Gardini i in. 1999, Pandey i in. 1999, McSweeney i Sousa 2000].

Rozkład tłuszczu w mleku trzech gatunków przeżuwaczy monitorowano w oparciu o analizę przyrostu zawartości wolnych kwasów tłuszczowych (WKT) oznaczonych metodą chromatografii gazowej. Podczas dwunastodniowej inkubacji mleka zaszczipionego drożdżami *Y. lipolytica* JII1c, *C. kefir* PII1b i *C. sphaerica* FII7a zaobserwowano zróżnicowany przyrost WKT. W próbach mleka z dodatkiem szczepu *Y. lipolytica* JII1c wykazano najwyższą zawartość WKT, jakkolwiek ich stężenie w mleku krowim, kozim i owczym było różne. Tłuszcz mleka owczego i krowiego stanowił znacznie lepszy substrat niż mleka koziego dla lipaz tych drożdży, gdyż końcowy poziom WKT był w tych próbach wyższy i wynosił odpowiednio 1845 i 1991 mg 100mL⁻¹ (rys. 6).



Rys. 6. Całkowita zawartość wolnych kwasów tłuszczowych w mleku zaszczipionym drożdżami po 12 dniach inkubacji

Fig. 6. Total content of free fatty acids in milk after 12 days incubation with yeasts

W grupie drożdży izolowanych z serów szczepy należące do gatunku *Y. lipolytica* charakteryzują się najwyższą aktywnością lipolityczną [Novotny i in. 1988, Hadeball 1991]. Jak wykazano w licznych badaniach, gatunek ten zdolny jest do syntezy tak zewnątrz- jak i wewnątrzkomórkowych lipaz, a także lipaz związanych ze ścianą komórkową, [Pereira-Meirelles i in. 1997 i 2000, Barth i Gaillardin 1997]. Enzymy te wykazują duże podobieństwo do analogicznych hydrolaz pochodzenia grzybowego [Pignede i in. 2000]. U drożdży tych stwierdza się także występowanie termostabilnej esterazy zdolnej do uwalniania z triacylogliceroli kwasów zestryfikowanych głównie w pozycji sn-1 [Mattey i Adoga 1991].

Tabela 2. Zawartość wolnych kwasów tłuszczowych [mg 100 mL⁻¹] w mleku zaszczipionym drożdżami po 12 dniach inkubacji
 Table 2. Content of individual free fatty acids [mg 100 mL⁻¹] in milk after 12 days of incubation with yeasts

Kwas tłuszczowy Fatty acid	Mleko – Milk													
	Krowie – Bovine						Kozie – Caprine						Owce – Ovine	
	Kontrola	<i>C. kefyr</i>	<i>C. sphærica</i>	<i>Y. lipolytica</i>	Kontrola	<i>C. kefyr</i>	<i>C. sphærica</i>	<i>Y. lipolytica</i>	Kontrola	<i>C. kefyr</i>	<i>C. sphærica</i>	<i>Y. lipolytica</i>	Kontrola	<i>C. kefyr</i>
C ₄	2,3	110,1	56,3	120,6	1,6	124,3	61,4	147,2	6,9	134,2	61,3	162,3		
C ₆	2,4	60,33	68,2	122,3	1,9	53,4	62,3	124,3	5,2	58,2	44,2	142,2		
C ₈	2,6	61,2	87,4	92,3	1,4	64,5	90,3	56,2	4,7	63,0	91,3	73,4		
C ₁₀	2,5	62,1	51,3	87,3	1,9	20,1	30,6	37,4	4,4	59,2	73,4	85,4		
C ₁₂	3,3	246,8	96,28	204,3	2,8	120,4	73,4	196,3	5,9	242,3	57,2	250,7		
C ₁₄	9,5	132,6	84,3	197,3	10,1	140,3	63,1	156,1	19,8	127,3	72,1	204,6		
C ₁₆	115,0	153,2	184,5	402,3	102,7	135,4	110,3	323,4	135,0	195,5	201,2	396,0		
C _{18:0}	46,2	164,2	192,6	306,4	45,6	111,3	156,6	242,3	77,8	174,4	156,1	297,4		
C _{18:1}	97,8	294,1	302,6	334,6	101,3	224,1	261,3	302,3	120,2	374,1	384,1	375,1		
C _{18:2}	13,1	40,3	64,2	94,3	10,4	40,5	37,8	83,4	32,7	94,6	89,3	103,4		

Znacznie słabsze tempo hydrolizowania tłuszczu w mleku obserwowano po wprowadzeniu do niego dwóch pozostałych testowanych szczepów: *C. kefyry* PIIIb i *C. sphaerica* FII7a. W 12. dniu stężenie WKT, jakie stwierdzono w próbach mleka krowiego, koziego i owczego inkubowanego z ich dodatkiem było niższe i kształtowało się na zbliżonym poziomie 856–1111 mg 100 mL⁻¹.

W analizowanych próbach mleka stwierdzono również zróżnicowanie w ilości nagromadzonych poszczególnych kwasów tłuszczowych (tab. 2).

Największe znaczenie w kształtowaniu cech sensorycznych wielu produktów mleczarskich mają uwalniane z tłuszczu mlecznego kwasy krótko- i średniołańcuchowe [Fox i in. 1995]. Największe uzdolnienia do hydrolizowania wiązań estrowych tworzonych przez krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe, tj. masłowy i kapronowy, wykazywały drożdże z gatunku *Y. lipolytica* JIIIc (tab. 2). Wysokie stężenie kwasu masłowego stwierdzono także w próbach, do których wprowadzono drożdże *C. kefyry* PIIIb.

Analizując przyrost kwasów o średniej długości łańcucha węglowego takich jak: laurynowy i mirystynowy, wzrost ich stężenia zaobserwowano po wprowadzeniu do każdego mleka szczepów *Y. lipolytica* JIIIc i *C. kefyry* PIIIb.

We wszystkich rodzajach mleka udział drożdży *Y. lipolytica* JIIIc powodował również uwalnianie znacznych ilości długołańcuchowych nasyconych kwasów tłuszczowych takich jak: palmitynowy i oleinowy.

Uzyskane w tej pracy wyniki są zbieżne z danymi uzyskanymi przez Roostita i Fleet [1996], którzy w swoich badaniach wykazali, że hydroliza tłuszczu mleka krowiego prowadzona w serach dojrzewających z udziałem drożdży z gatunku *Y. lipolytica* przyczyniała się do znacznego nagromadzenia kwasów: masłowego, mirystynowego, stearynowego i oleinowego.

WNIOSKI

1. Drożdże *C. kefyry* PIIIb i *C. sphaerica* FII7a wykazywały lepszą dynamikę wzrostu we wszystkich rodzajach mleka (krowim, kozim i owczym) niż drożdże *Y. lipolytica* JIIIc.

2. Największe zmiany proteolityczne oraz lipolityczne w każdym mleku powodowały drożdże *Y. lipolytica* JIIIc.

3. Lipazy drożdży *Y. lipolytica* JIIIc oraz *C. kefyry* PIIIb cechowały się podobną swoistością wobec tłuszczu każdego rodzaju mleka.

4. Wzrost *Y. lipolytica* JIIIc w mleku wiązał się ze spadkiem zawartości kwasu cytrynowego, natomiast w obecności *C. kefyry* PIIIb i *C. sphaerica* FII7a następował niewielki wzrost zawartości kwasu octowego, mlekowego i propionowego.

5. Szczep *Y. lipolytica* JIIIc ze względu na wysoką aktywność hydrolityczną może być wykorzystany jako kultura wspomagająca do produkcji serów z każdego rodzaju mleka, zwłaszcza serów miękkich.

PIŚMIENNICTWO

Addis E., Fleet G.H., Cox J.M., Kolak D., Leung T., 2001. The growth, properties and interactions of yeasts and bacteria associated with the maturation of Camembert and blueveined cheese. *Int. J. Food Microbiol.*, 69, 25–36.

- Álvarez-Martin P., Flórez A.B., Hernández-Baranco A., Mayo B., 2008. Interaction between dairy yeast and lactic acid bacteria strains during milk fermentation. *Food Control*, 19, 62–70.
- Andrews A.T., 1983. Proteinases in normal bovine milk and their action on caseins. *J. Dairy Res.*, 50, 45–55.
- Barth G., Gaillardin C., 1997. Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microbiol. Rev.*, 19, 219–327.
- Besançon X., Smet C., Chabaliere C., Rivemale M., Revelbel J.P., Ratomahenina R., Galzy P., 1992. Study of surface yeast flora of Roquefort cheese. *Int. J. Food Microbiol.*, 17, 9–18.
- Cichosz G., 1997. Czynniki determinujące cechy sensoryczne serów dojrzewających. *Lipoliza, Przegląd Mleczarski*, 325–329.
- Cosentino S., Fadda M.E., Deplano M., Mulargia A.F., Palmas F., 2001. Yeasts associated with Sardinian ewe's dairy products. *Int. J. Food Microbiol.*, 69, 53–58.
- Choisy C., Gueguen M., Lenoir J., Schmidt J.L., 1987. The ripening of cheese – microbiological aspects. In *Cheese Making: Science and Technology*. Eck A. ed., Lavoisier, New York.
- Chrzanowska J., Wojtatowicz M., 2001. Pozytywne i negatywne aspekty obecności drożdży w produktach mleczarskich. *Przegląd Mleczarski*, 5, 230–233.
- Czajgucka A., 2002. Charakterystyka uzdolnień hydrolitycznych szczepów drożdży wydzielonych z serów pleśniowych. Praca doktorska wykonana w Katedrze Technologii Surowców Zwierzęcych i Zarządzania Jakością, Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu.
- Czajgucka A., Chrzanowska J., Juszczyk P., Szoltysek M., Połomska X., Wojtatowicz M., 2006. Wzrost drożdży w modelowym serze i ich wpływ na degradację białek i tłuszczu. *Acta Sci. Pol., Biotechnologia* 5, 95–103.
- Deeth H.C., Fitz-Gerald C.H., Snow A.J., 1983. A gas chromatographic method for the quantitative determination of free fatty acids in milk and milk products. *J. Dairy Sci. Technol.*, 18, 230–233.
- Devoyod J.J., 1990. Yeasts in cheese-making, [In:] *Yeast Technology*, Spencer J.F.T., Spencer D.M eds., Springer, Verlag.
- Eliskases-Lechner F., Ginzinger W., 1995. The yeast flora of surface ripened cheeses. *Milchwissenschaft*, 50, 458–462.
- Fleet G., 1992. Spoilage Yeast's. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 12, 1–44.
- Ferreira A.D., Viljoen B.C., 2003. Yeasts as adjunct starters in matured Cheddar cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 86, 131–140.
- Florez A.B., Mayo B., 2006. Microbial diversity and succession during the manufacture and ripening of traditional Spanish blue-veined Cabrales cheese, as determined PCR-DGGE. *Int. J. Food Microbiol* 110, 165–171.
- Fox P.F., Singh T.K., McSweeney P.L.H., 1995. *Chemistry of Structure-Function Relationships in cheese*. Malin E.L., Tunick M.H eds., Plenum Press, New York.
- Freitas A.C., Pintado A.E., Pintado M., E., Malcata F. X., 1999. Organic acids produced by lactobacilly, enterococci and yeasts isolated from Picante cheese. *Eur. Food Res. Technol.*, 209, 434–438.
- Gardini F., Lanciotti R., Guerzoni M.E., Torriani, S., 1999. Evaluation of aroma production and survival of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Lactobacillus acidophilus* in fermented milks. *Int. Dairy J.*, 9, 125–134.
- Gardini F., Tofalo R., Belletti N., Iucci L., Suzzi G, Torriani S., Guerzoni M.E., Lanciotti R., 2006. Characterization of yeasts involved in the ripening of Pecorino Crotonese cheese. *Food Microbiol.*, 23, 641–648.
- Gadaga T.H., Mutukumira A.N., Narvhus J.A., 2001. The growth and interaction of yeasts and lactic acid bacteria isolated from Zimbabwean naturally fermented milk in UHT milk. *Int. J. Food Microbiol.*, 68, 21–32.

- Gdula A., Chrzanowska J., Szoltyś M., Kieźel X., Wojtatowicz M., 2002. Factors affecting hydrolytic enzymes production by *Yarrowia lipolytica* strains. *Biotechnologia* 1, 2002, 81–88.
- Hadeball W., 1991. Production of lipase by *Yarrowia lipolytica*. *Acta Biotechnol.*, 11, 159–167.
- Jacobsen M., Narvhus J., 1996. Yeast and their possible beneficial and negative effects on the quality of dairy products. *Int. Dairy J.*, 6., 755–768.
- Jollivet N., Chataud J., Vayssier Y., Bensoussan M., Belin J.M., 1994. Production of volatile compounds in model milk and cheese media by eight strains of *Geotrichum candidum*. *J. Dairy Res.*, 61, 241–248.
- Juszczak P., 2002. Charakterystyka mikroflory drożdżowej z serów z przerostem pleśni. Praca doktorska wykonana w Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu.
- Kuchroo C.N., Rahilly J., Fox P.F., 1983. Assessment of proteolysis in cheese by reaction with trinitrobenzene sulphonic acid. *Ir. J. Food Sci. Technol.* 7, 129–133.
- Lenoir J., 1984. The surface flora and its role in the ripening of cheese. IDF, Bulletin, Brussels, Belgium, 171, 3–20.
- Lopez-Diaz T.M., Alonso C., Santos J., Garcia M.L., Moreno B., 1995. Microbiological changes during manufacture and ripening of a naturally ripened blue cheese (Valdone, Spain). *Milchwissenschaft*, 50, 381–384.
- Mattey M., Adoga G., 1991. Low molecular thermostable enzymes. *Enzyme Microb. Technol.*, 13, 525.
- Mayoral M.B., Martin R., Sanz A., Hernández P.E., González, Garcia T., 2005. Detection of *Kyuyveromyces marxianus* and other spoilage yeasts in yoghurt using PCR-culture technique. *Int. J. Food. Microbiol.*, 105, 27–34.
- McSweeney P.L.H., Sousa M.J., 2000. Biochemical pathways for the production of flavor compounds in cheese during ripening: A review. *Le Lait*, 80, 293–324.
- Molimard P., Spinnler H.E., 1996. Review: Compounds involved in the flavor of surface mold ripened cheese: origins and properties. *J. Dairy Sci.*, 79, 169–184.
- Novotny C., Dolezalova L., Musil P., Novak M., 1988. The production of lipases by some *Candida* and *Yarrowia* yeasts. *J. Basic Microbiol.*, 28, 221–227.
- Nuez M., Medina M., Gaya P., Diaz-Amado C., 1998. Les levures et les moisissures dans le fromage bleu de Cabrales. *Le Lait*, 61, 62–79.
- Pandey A., Benjamin S., Soccol C.R., Nigam P., Krieger N., Soccol V.T., 1999. The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnol. App. Biochem.*, 29, 119–131.
- Pereira-Meirelles F.V., Rocha-Leao M.H.M., Sant'Anna Jr.G.L., 1997. A stable lipase from *Candida lipolytica*: cultivation conditions and crude enzyme characteristics. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 63-65, 73–85.
- Pereira-Meirelles F.V., Rocha-Leao M.H.M., Sant'Anna Jr.G.L., 2000. Lipase location in *Yarrowia lipolytica* cells. *Biotechnol. Letters*, 22, 71–75.
- Pignede G., Wang H., Fudalej F., Gaillardin C., Seman M. Nicaud J.M., 2000. Characterisation of an extracellular lipase encoded by LIP2 in *Yarrowia lipolytica*. *J. Bacteriol.*, 82, 2802–2810.
- Roostita R., Fleet G.H., 1996. Growth of yeasts in milk and associated changes to milk composition. *Int. J. Food Microbiol.*, 31, 205–219.
- Suzzi G., Lanorte M.T., Galgano F., Andrighetto C., Lombardi A., Lanciotti R., Guerzoni M.E., 2001. Proteolytic, lipolytic and molecular characterization of *Yarrowia lipolytica* isolated from cheese. *Int. J. Food Microbiol.*, 69, 69–71.
- Szoltyś M., Żelazko M., Rak L., Połomska X., Dąbrowska A., Wojtatowicz M., Chrzanowska J., 2006. Zdolność drożdży *Yarrowia lipolytica* pochodzących z sera do wytwarzania amin biogennych w mleku. *Acta Sci. Pol., Biotechnologia* 5, 87–94.

- van den Tempel, T. Jakobsen M., 2000. The technological characteristics of *Debaryomyces hansenii* and *Yarrowia lipolytica* and their potential as starter cultures for production of Danablu. *Int. Dairy J.*, 10, 263–270.
- Wojtatowicz M., Chrzanowska J., Juszczyk P., Skiba A., Gdula A., 2001. Identification and biochemical characteristic of yeast microflora of Rokpol cheese. *Int. J. Food Microbiol.*, 69, 135–140.
- Wyder M.T., Puhan Z., 1999. Role of selected yeasts in cheese ripening: an evaluation in aseptic cheese curd slurries. *Int. Dairy J.*, 9, 117–122.
- Zmarlicki St., 1981. Ćwiczenia z analizy mleka i produktów mlecznych. Skrypt SGGW, Akademii Rolniczej w Warszawie, Warszawa.

THE GROWTH AND ENZYMATIC ACTIVITY OF YEASTS IN MILK OF DIFFERENT ANIMALS

Abstract. The purpose of this study was to examine three yeast strains: *Candida kefyr* PII1b, *Candida sphaerica* FII7a and *Yarrowia lipolytica* JIIIc, isolated from Polish mould cheese Rokpol as potential cheese adjunct cultures. The strains were introduced aseptically to cow, goat and sheep milk and the effect of their hydrolytic enzymes on the milk components degradation was evaluated during yeast growth. Inoculated milk samples were incubated at room temperature for 12 days. During that time yeast growth in milk was monitored. The pH and level of nitrogen soluble at pH 4.6 were also determined. After 12 days of milk incubation with yeasts concentration of organic acids and the level of protein and lipid degradation were evaluated. The control were bovine, caprine and ovine milk samples incubated without yeasts. It was shown that *Candida kefyr* PII1b and *Candida sphaerica* FII7a exhibited better growth in each kind of milk than *Y. lipolytica* JIIIc. The population of two former yeast strains reached the level of 10^7 - 10^8 cfu mL⁻¹, whereas the population of *Y. lipolytica* was about one logarithmic cycle lower. The growth of *Y. lipolytica* JIIIc in every milk sample was accompanied with utilization of citric acid. In the milk samples inoculated with *Candida kefyr* PII1b and *Candida sphaerica* FII7a insignificant increase of acetic, lactic and propionic acids concentration was observed. The highest rate of milk proteins degradation was caused by *Y. lipolytica* JIIIc. This strain exhibited also the highest lipolytic activity against fat, causing significant release of short – and medium- chain fatty acids especially butyric and capric acids as well as two long-chain fatty acids as palmitic and oleic. Yeast *Y. lipolytica* JIIIc is the most promising adjunct culture for soft cheese production from each kind of milk.

Key words: yeast, growth, milk, organic acids, proteolysis, lipolysis

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 30.06.2008

Do cytowania – For citation: Szołtysik M., Żelazko M., Połomska X., Wojtatowicz M., Chrzanowska J., 2008. Wzrost i enzymatyczna aktywność drożdży w mleku różnych gatunków przeżuwaczy. *Acta Sci. Pol. Biotechnol.* 7(2), 27–41.

SPIS TREŚCI CONTENTS

Izabela Musiał, Waldemar Rymowicz, Danuta Witkowska

Biosynteza kwasu szczawiowego z porafinacyjnych kwasów tłuszczowych przez *Aspergillus niger* w hodowlach półciągłych 3
Oxalic acid production from post-refining fatty acids by *Aspergillus niger* in semicontinuous culture

Hanna Miszkiewicz, Andrzej Jakubowski

Fermentacja w stałym złożu wyłoków z aronii i wiesiołka jako metoda otrzymywania przeciwutleniaczy fenolowych 13
Solid-state production of phenolic antioxidants from mixtures of aronia pomace and evening primrose waste

Marek Szoltyś, Monika Żelazko, Xymena Połomska,

Maria Wojtatowicz, Józefa Chrzanowska

Wzrost i enzymatyczna aktywność drożdży w mleku różnych gatunków przeżuwaczy 27
The growth and enzymatic activity of yeasts in milk of different animals