

ACTA SCIENTIARUM POLONORUM

Czasopismo naukowe założone w 2001 roku przez polskie uczelnie rolnicze

Biotechnologia

Biotechnologia

Biotechnology

9(3) 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), Mikołaj Protasowicki (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)

Opracowanie redakcyjne i korekta:

Janina Szydłowska
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 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. 2,8. Ark. druk. 2,25
Druk i oprawa: F.P.H. „ELMA”

KONCEPCJA WYKORZYSTANIA GLICERYNY ODPADEWEJ Z PRODUKCJI BIODIESLA JAKO ŹRÓDŁA WĘGLA DLA DROŹDŹY *CANDIDA UTILIS* W KULTURZE MIESZANEJ Z BAKTERIAMI OCTOWYMI

Edyta Lipińska, Stanisław Błażej, Krzysztof Markowski

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Streszczenie. W niniejszym opracowaniu przedstawiono koncepcję wykorzystania gliceryny odpadowej jako składnika podłoża hodowlanego do produkcji biomasy drożdży paszowych w kulturze mieszanej z bakteriami octowymi. Hodowla biomasy komórkowej drożdży *Candida utilis* w podłożach z glicerolem jako głównym źródłem węgla daje możliwość otrzymywania wartościowego białka paszowego (SCP). Z kolei bakterie octowe jako obligatoryjne aeroby chętnie przeprowadzają biotransformację glicerolu do dihydroksyacetonu (DHA) – wspólnego związku w metabolizmie drożdży i bakterii octowych. Wykorzystanie glicerolu do produkcji biomasy drożdży paszowych zawsze wymaga etapu enzymatycznego przekształcenia tego substratu pod wpływem dehydrogenazy glicerolowej do DHA. Na podstawie tych przesłanek można sądzić, że koncepcja wykorzystania potencjału biochemicznego mieszanej kultury drożdży i bakterii octowych może być bardziej efektywna do utylizacji glicerolu z produkcji biodiesla niż przy udziale monokultury drożdży *C. utilis*, a otrzymana w ten sposób biomasa komórkowa będzie spełniała kryteria cennego źródła białka do suplementacji żywności i pasz.

Słowa kluczowe: biodiesel, glicerol, *Candida utilis*, SCP, bakterie octowe, dihydroksyaceton

WSTĘP

Od kilku lat obserwuje się w Europie i na świecie znaczny wzrost produkcji biodiesla. Jego produkcja w 2008 r. wyniosła nieco ponad 14 mln ton i była o przeszło 50% wyższa niż w roku 2007. W Unii Europejskiej wyprodukowano w 2008 r. ponad 7,7 mln ton biodiesla (prawie 40% więcej niż rok wcześniej) i stanowiło to ponad 50% produkcji rynku światowego. W Polsce produkcja wyniosła 268 tys. ton i wzrosła 2,5-krotnie

Adres do korespondencji – Corresponding author: Edyta Lipińska, Zakład Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, ul. Nowoursynowska 159c, 02-776 Warszawa, e-mail: edyta_lipinska@sggw.pl

w porównaniu do roku 2007, co dało nam 2% udziału w światowym rynku [www.ebb-eu.org, www.biofuels-platform.ch].

Wzrost produkcji biodiesla na świecie spowodowany jest przez wiele czynników. Główną siłą napędową, która przyczyniła się do zwrócenia uwagi na wykorzystanie surowców roślinnych do otrzymywania paliw płynnych, były problemy zaopatrzenia w ropę naftową, a także nadwyżka produkcji roślinnej [Podkówa 2004, Fangrui i Milford 1999].

W związku z rosnącą produkcją biodiesla wzrasta ryzyko zanieczyszczenia środowiska produktami ubocznymi tego procesu, zwłaszcza glicerolem, którego w najbliższej przyszłości może powstawać w Europie ok. 1 mln ton rocznie [Rosiak 2008, www.biofuels-platform.ch]. Zagospodarowanie tak dużej ilości taniego surowca może stanowić problem i wymaga poszukiwania nowych metod jego waloryzacji w cenniejsze produkty. Jednym z interesujących rozwiązań jest wykorzystywanie glicerolu jako źródła węgla i energii w procesach mikrobiologicznych. Glicerol był z powodzeniem wykorzystywany w biotechnologii do produkcji np.: kwasu cytrynowego, kwasu bursztynowego, wodoru i alkoholu etylowego, dihydroksyacetonu, erytroli oraz biomasy drożdży paszowych [Stasiak-Różańska i in. 2010, Rymowicz i in. 2007]. Jednym z racjonalnych kierunków utylizacji tego związku jest biosynteza białka mikrobiologicznego (SCP), przy udziale drożdży i wykorzystaniu w tej postaci jako dodatku paszowego [Robinson i in. 2000]. Taka sytuacja spowodowana jest głównie przez wyeliminowanie mączki kostnej z produkcji pasz, w związku z ryzykiem wystąpienia choroby BSE oraz zaostrzeniem regulacji w zakresie wykorzystania i upraw roślin GMO w Unii Europejskiej, a w szczególności soi genetycznie modyfikowanej. Biomasa komórkowa drożdży posiada również dodatkową zaletę, a mianowicie bogata jest w białko o dobrze zbilansowanym składzie aminokwasowym [Stasińska 1999]. Białko występujące w komórkach drożdży zawiera dużą ilość lizyny, której niedobór często stwierdza się w diecie ludzi i zwierząt [Błażej 2006, Hui i Khachatourians 1995, www.ebb-eu.org, www.biofuels-platform.ch].

PRODUKTY UBOCZNE POWSTAJĄCE PRZY OTRZYMYWANIU BIODIESLA

Przetwarzanie rzepaku na paliwo realizowane jest na dwóch etapach. Pierwszy polega na przetworzeniu rzepaku na olej, a drugi na estryfikacji oleju na paliwo [Moser 2009, Fukuda i in. 2001]. Proces otrzymywania oleju rzepakowego jako surowca do produkcji estrów składa się z trzech podstawowych operacji technologicznych: rozdrabniania nasion rzepaku, tłoczenia oleju i filtracji oleju. Zabiegi te mogą być prowadzone w małych olejarniach o niewielkich zdolnościach przerobowych (0,1–0,5 ton nasion w ciągu godziny), jak również w olejarniach przemysłowych o znacznie większej wydajności sięgającej nawet 50 000 ton rocznie. W zakładach olejarskich o dużych zdolnościach przerobowych proces pozyskiwania oleju z nasion jest uzupełniony o dodatkowe procesy. Ekstrakcja, bielnie i ponowna filtracja zwiększa uzysk oleju z nasion. Rafinacja oczyszcza olej poprzez usunięcie fosfolipidów, barwników, białek, kwasów tłuszczowych, produktów utleniania oraz śladowych ilości metali [Bocheński 2003]. Kolejnym etapem procesu produkcji biodiesla jest transestryfikacja. Olej znajdujący się w ogrzewanym zbiorniku poddawany jest działaniu roztworu ługu i metanolu w temperaturze około 50°C. Reakcja

składników przebiega w czasie kilku godzin. Produkt dzieli się na dwie warstwy – górną estrową i dolną glicerynową [Bocheński 2003].

Według Tysa i in. [2003] produkcja biopaliw z rzepaku związana jest z powstawaniem produktów ubocznych, tj. fazy glicerynowej, słomy i wyłoku rzepakowego. Faza glicerynowa stanowi 10–20% oleju rzepakowego wykorzystanego do transestryfikacji. W jej składzie znajduje się 50% czystego glicerolu, 20% kwasów tłuszczowych, 10% metanolu, 5% katalizatora, a pozostałe 15% stanowią zanieczyszczenia w postaci mydeł, mono- i diglicerydów, fosfolipidów, substancji barwnych oraz wody. Technologia przerobu pozostałości glicerynowej jest złożona. Na początku odparowuje się metanol, aby użyć go ponownie w procesie transestryfikacji. Później odkwasza się mydła i oddziela kwasy tłuszczowe przy użyciu kwasu solnego lub fosforowego [Bocheński 2003]. W ten sposób otrzymuje się glicerynę surową, składającą się w 80% z glicerolu i 10% soli, natomiast resztę stanowi woda. Glicerynę surową kolejno poddaje się neutralizacji, oczyszczaniu, zagęszczaniu i destylacji pod obniżonym ciśnieniem do stężenia około 99% [Tys i in. 2003]. Tak otrzymana czysta gliceryna po spełnieniu wymagań fizykochemicznych może być stosowana w przemyśle spożywczym, kosmetycznym, farmaceutycznym lub chemicznym [Podkówka 2004].

SPOSOBY WYKORZYSTANIA GLICEROLU

Chemiczne metody utylizacji glicerolu

Otrzymana w procesie produkcji biodiesla czysta gliceryna jest wykorzystywana w przemyśle chemicznym jako substrat do produkcji innych związków chemicznych. Przykładem takich związków są: epichlorohydryna, stanowiąca składnik żywic epoksydowych, trieter (1,2,3-tri-tert-butoksypropan) otrzymany w reakcji gliceryny z izobutaniem, jak również trioctany gliceryny. Komponenty te charakteryzują się bardzo wysoką liczbą oktanową (powyżej 100) i dzięki temu mogą być zastosowane jako alternatywne dodatki tlenowe wprowadzane do benzyn. Ciekawym sposobem wykorzystania gliceryny jest również opracowana w Instytucie Chemii Przemysłowej w Warszawie synteza dwóch rodzajów plastyfikatorów: triestrów gliceryny i kwasu benzoowego oraz benzoesanu 1,2-dioksolanu gliceryny. Właściwości aplikacyjne otrzymanych plastyfikatorów są porównywalne ze stosowanym powszechnie ftalanem di-izooktylowym [Gaca 2006]. Pochodne gliceryny uzyskane na drodze syntezy chemicznej znajdują również zastosowanie w przemyśle spożywczym. Przykładem są poliglicerole i ich estry, które stanowią ważny dodatek do szorteningów i margaryn. Z kolei w przemyśle farmaceutycznym nitrogliceryna stosowana jest jako lek nasercowy, a także może mieć ważne znaczenie w sektorze wojskowym [Podkówka 2004].

Biologiczne metody utylizacji glicerolu

Glicerol może być wykorzystywany w żywieniu zwierząt gospodarskich takich jak krowy, owce, świnie, kurczęta, jednak w ilości nieprzekraczającej 10% dawki paszy. Jego pozytywne działanie polega głównie na zwiększeniu spożycia paszy, najprawdopodobniej dzięki słodkiemu smakowi i lepszej strukturze paszy. Nawet przy wysokiej dawce, która wynosiła 30%, nie stwierdzono jego szkodliwego działania na zwierzęta. Wyjątek stanowiły kurczęta, u których zaobserwowano patologiczne zmiany wątroby i nerek

[Hanczakowski 2008]. W małych przetwórnicy, gdzie nieopłacalne jest budowanie instalacji oczyszczającej fazę glicerynową oraz nie jest zorganizowany jej skup, utylizacji można dokonać poprzez wstępne usunięcie metanolu i rozcieńczenie wodą w stosunku 1:100. Tak przygotowaną ciecz można dodać do gnojówki i wykorzystać jako nawóz organiczny [Tys i in. 2003, Gaca 2006]. Surowca bogatego w metanol nie można stosować jako nawozu bezpośrednio, ponieważ może to doprowadzić do zanieczyszczenia środowiska czy wybuchu w urządzeniach, które na ogół nie są przystosowane do wykorzystania substancji lotnych, wybuchowych i palnych [Gaca 2006].

Spalanie fazy glicerynowej

Według Cieślukowskiego i in. [2006] faza glicerynowa powstająca w procesie transestryfikacji oleju rzepakowego może stanowić składnik mieszanki paliwowej dostarczanej do pieców, ponieważ jej wartość opałowa wynosi około $30 \text{ MJ}\cdot\text{kg}^{-1}$. Przeprowadzone badania wskazują na możliwość bezdymnego spalania mieszaniny koloidalnej (ok. 35% fazy glicerynowej i 65% zużytego oleju silnikowego – mineralnego) bez osadów na palenisku i w kominie. Rozwarstwienia składników unika się przez wstępne podgrzanie mieszaniny do temperatury 60°C .

Mikrobiologiczne metody utylizacji glicerolu

Według Rywińskiej [2008] odpadowy glicerol może być wykorzystany jako źródło węgla i energii w procesie biosyntezy kwasu cytrynowego przez mutant octanowego *Yarrowia lipolytica* Wratistlavia AWG7 w hodowli okresowo zasilanej (fed-batch). W czasie 140 h hodowli w bioreaktorze badany szczep wyprodukował nieco ponad $130 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ kwasu cytrynowego z szybkością i wydajnością wynoszącą odpowiednio $0,95 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$ i $0,67 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$. Przeprowadzony proces fermentacji charakteryzował się wysoką czystością, po pierwsze z uwagi na niską zawartość kwasu izocytrynowego, wynoszącą $2,7 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$, jak również innych metabolitów cyklu Krebsa, tj. kwasu jabłkowego, kwasu α -ketoglutarynowego i fumarowego, których stężenie nie przekroczyło $6 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$. Po drugie, ze względu na niskie stężenie polioli, takich jak erytrol i mannitol, których stężenie na końcu procesu wynosiło odpowiednio $9,8$ i $2,7 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$. Zauważono również brak wpływu zanieczyszczeń występujących w glicerolu odpadowym na szybkość procesu. Również Rymowicz [2008] wykorzystał glicerol jako substrat do biosyntezy kwasu cytrynowego. Zastosowano w tym celu ten sam szczep drożdży *Y. lipolytica*, które immobilizowano w żelach chitozanowych oraz poliwinylalkoholowych. Produkcja kwasu cytrynowego przez drożdże pułapkowane w tych żelach po 7-dobowej hodowli z napowietrzaniem kształtowała się na poziomie $17,5$ – $17,9 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$, jednak była niższa niż w hodowli z komórkami wolnymi.

Glicerol znalazł zastosowanie w syntezie związków chemicznych na drodze mikrobiologicznej przy udziale komórek bakterii. Beztlenowce przetrwalnikujące *Clostridium butyricum* szczep DSM 5431 wykorzystano do produkcji 1,3-propandiolu (1,3-PD). W czasie 50 h hodowli w bioreaktorze w warunkach anaerobowych, otrzymano $70 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ 1,3-propandiolu [Reimann i Biebl 1996]. Do biosyntezy 1,3-propandiolu z glicerolu wykorzystano również gatunki *Enterobacter agglomerans* [Barbirato i in. 1995] i *Klebsiella pneumoniae* [Chuloo i in. 2009, Bin Bin i in. 2009]. Glicerol, który jest produktem ubocznym w procesie produkcji biodiesla, zastosowano do biosyntezy 2,3-butanodiolu przez *Klebsiella pneumoniae* [Petrov i Petrova 2009], kwasu bursztynowego

przez *Basfia succiniciproducens* [Edzard i in. 2009], oraz wodoru i etanolu przez *Enterobacter aerogenes* [Ito i in. 2005].

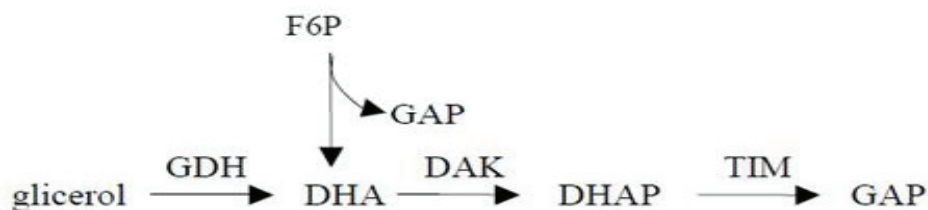
BIOKONWERSJA GLICEROLU DO DIHYDROKSYACETONU PRZEZ BAKTERIE OCTOWE

Cechą charakterystyczną bakterii octowych jest produkcja kwasu octowego z etanolu, a także wysoka tolerancja na stężenie tego kwasu. Inne produkty aktywności metabolicznej wytwarzane przez te bakterie to: celuloza, kwas glukonowy, L-ryboza i dihydroksyaceton (DHA). Metabolity wydzielane są na zewnątrz komórek, a przez to można je bezpośrednio wyodrębnić z podłoża hodowlanego.

Dihydroksyaceton znalazł zastosowanie w przemyśle farmaceutycznym, spożywczym i chemicznym [Stasiak i Błażej 2009, Erni i in. 2006]. Związek ten powstaje w reakcji utleniania glicerolu, która jest katalizowana przez związany z błoną komórkową enzym – dehydrogenazę glicerolową (EC 1.1.1.6) [Chmiel 1998]. Dzięki takiej lokalizacji enzymu wymagający nakładów energetycznych transport substratów do komórki i produktów komórki do podłoża nie jest konieczny [Gatgens i in. 2007].

Według przedstawionych w latach 40. badań metabolizm glicerolu, jako jedyne źródła węgla dla bakterii z gatunków *Gluconacetobacter xylinus* i *Gluconobacter oxydans*, może być realizowany na dwa sposoby zależne od pH podłoża [Erni i in. 2006].

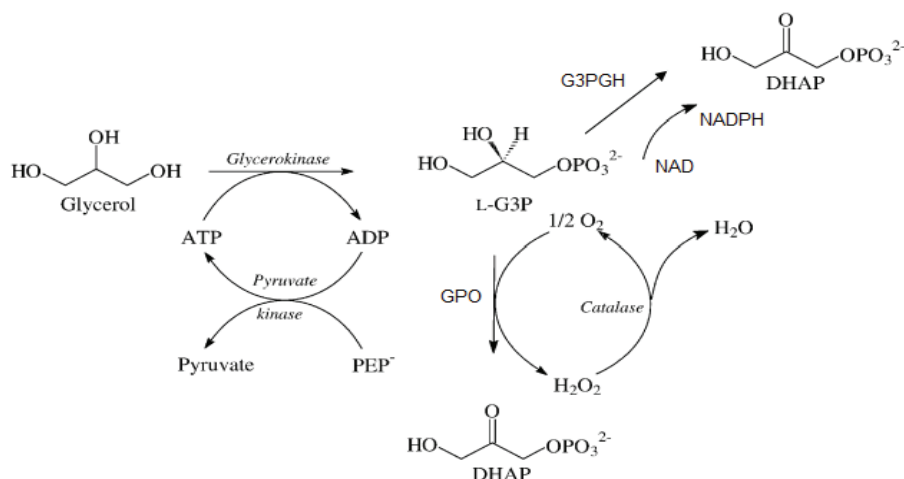
Pierwszy sposób metabolizmu jest niezależny od adenozyntrifosforanu (ATP) oraz jonów magnezu Mg^{2+} i polega na bezpośredniej konwersji glicerolu przez błonową dehydrogenazę do DHA. Reakcja zachodzi przy pH 5–5,5 [Gatgens i in. 2007]. W tych warunkach glicerol jest wykorzystywany przez bakterie, a powstający DHA zostaje uwolniony do podłoża lub dalej jest metabolizowany przez komórki bakterii. Proces ten przedstawiono na rysunku 1.



Rys. 1. Metabolizm glicerolu przez bakterie: GDH – dehydrogenaza glicerolowa; DAK – kinaza dihydroksyacetonowa; TIM – izomeraza triozofosforanowa; F6P – fruktozo-6-fosforan; GAP – fosforan-3-gliceraldehydu; DHAP – fosfodihydroksyaceton [Erni i in. 2006]

Fig. 1. Glycerol metabolism by bacteria: GDY – glycerol dehydrogenase; DAK – dihydroxyacetone kinase, TIM – izomerase triphosphate, F6P – fructoso-6-phosphate, GAP – phosphate-3-glyceraldehyde; DHAP – phosphodihydroxyacetone [Erni et al. 2006]

Drugi szlak, przedstawiony na rysunku 2, przebiega przy pH 8,5–10 i polega na utworzeniu 3-fosfoglicerolu w obecności ATP, jonów magnezu Mg^{2+} i kinazy glicerolowej [Hettwer i in. 2002].



Rys. 2. Metabolizm glicerolu przez bakterie kwasu octowego w pH 8,5. G3PGH – dehydrogenaza 3-fosfoglicerolowa; GPO – oksydaza 3-fosfoglicerolowa; L-G3P – 3-fosfoglicerol; DHAP – fosfodihydroksyacetone; ATP – adenosynotrifosforan; ADP – adenosynodifosforan; PEP – fosfoenolopirogronian [Hettwer i in. 2002, Holst i in. 1985]

Fig. 2. Glycerol metabolism by acetic acid bacteria in pH 8,5: G3PGH – glycerol-3-phosphate dehydrogenase; GPO – glycerol-3-phosphate oxidase; L-G3P – 3-phosphoglycerol; DHAP – phosphodihydroxyacetone; ATP – adenosynotriphosphate; ADP – adenosynodiphosphate; PEP – phosphoenolopyruvate [Hettwer i et al. 2002, Holst i et al. 1985]

Kinaza glicerolowa katalizuje fosforylację glicerolu do 3-fosfoglicerolu, który następnie może być przekształcany przez oksydazę 3-fosfoglicerolową (rys. 2) lub dehydrogenazę-3-fosfoglicerolową do fosfodihydroksyacetone (DHAP). W szeregu przemian biochemicznych ufosforylowany DHA przekształcony zostaje w fruktozo-1,6-difosforan, następnie powstaje glukozo-6-fosforan, który włączany jest w cykl pentozofosforanowy [Hettwer i in. 2002].

Zwiększenie wydajności biotransformacji można uzyskiwać, stosując immobilizowane komórki bakterii lub enzymy. Pozwala to na zachowanie swoistości substratu i aktywności immobilizowanej biomasy przez dłuższy czas [Bednarski i Repts 2003]. W przypadku produkcji DHA ogranicza to uciążliwe procesy nadoksydacji DHA do DHAP [Tkač i in. 2001]. W badaniach Stasiak-Różańskiej i in. [2008] wykorzystano immobilizowane komórki bakterii *Gluconacetobacter xylinus* do produkcji dihydroksyacetone z glicerolu. Najwięcej DHA, tj. 10,93 mg·cm⁻³ otrzymano po 36 h hodowli w pH 5,0 z podłoża zawierającego 10% glicerolu. Zaobserwowano również, że wzrost kwasowości czynnej podłoża do wartości pH 7,0 lub 8,0 (optymalnego dla aktywności lub stabilności dehydrogenazy glicerolowej) wpłynął istotnie na zwiększenie stężenia DHA w podłożach zawierających 3% albo 5% glicerolu. Efektem przedłużenia procesu biotransformacji glicerolu do DHA, powyżej 36 h było zmniejszenie stężenia DHA w podłożu fermentacyjnym przy jednoczesnym obniżeniu zawartości glicerolu, co świadczyło o postępującym procesie utleniania zarówno substratu, jak i produktu.

CHARAKTERYSTYKA I WYKORZYSTANIE BIAŁKA MIKROBIOLOGICZNEGO (SCP)

Drożdże są bogatym źródłem białka o wysokiej wartości odżywczej. Jego zawartość w biomacie komórkowej wynosi od 45 do 75%. Białko drożdży charakteryzuje się dużą zawartością niektórych aminokwasów egzogennych, szczególnie lizyny. Jej udział w białku *S. cerevisiae* i *C. utilis* wynosi 8,2 oraz 7,1 g/100 g białka. Aminokwasami ograniczającymi są aminokwasy siarkowe, tj. metionina i cysteina. Drożdże są bogatym źródłem witamin z grupy B (szczególnie tiaminy, ryboflawiny, pirydoksyny i niacyny) oraz ergosterolu (prekursora witaminy D2) [Błażej 2006]. Drożdże *Saccharomyces cerevisiae* i *Candida utilis* są uznane za bezpieczne dla człowieka i wpisane na amerykańską listę GRAS (ang. Generally Recognized as Safe) [Robinson i in. 2000]. W doświadczeniach żywieniowych wykazano, że biomasa drożdży charakteryzuje się na ogół niską strawnością [Błażej i Duszkiewicz-Reinhard 2004]. Przyczyną takiego stanu jest budowa ściany komórkowej, która jest czynnikiem ograniczającym powszechne wykorzystanie drożdży w żywieniu, ponieważ zawiera ona wiele związków opornych na działanie soków trawiennych i utrudniających wykorzystanie przez organizm ludzki lub zwierzęcy składników znajdujących się wewnątrz komórki. Poza tym biomasa drożdży zawiera stosunkowo dużą ilość kwasów nukleinowych, bo ok. 8–10% w 100 g suchej substancji. Związki te nie są wykorzystywane przez organizm, mogą natomiast obciążać bilans energetyczny, gdyż są rozkładane w wątrobie do kwasu moczowego [Parajo i in. 1995]. Duża zawartość kwasów nukleinowych w biomacie nie odgrywa tak istotnej roli w żywieniu zwierząt, ponieważ zwierzęta wytwarzają enzym urykazę, który rozkłada kwas moczowy do alantoiny [Parajo i in. 1995]. Strawność biomasy drożdży można zwiększyć poprzez destrukcję ściany komórkowej i usunięcie nadmiaru kwasów nukleinowych [Błażej i Duszkiewicz-Reinhard 2004]. Drożdże mogą być również wykorzystywane do produkcji preparatów poprawiających zdrowie. Ma to związek z występowaniem w ścianie komórkowej drożdży oligomannanów, które stymulują rozwój pożądaných bakterii kwasu mlekowego. W wyniku aktywności metabolicznej bakterii mlekowych utrudniony staje się wzrost bakterii gnilnych i proteolitycznych. Ponadto oligomannany mogą unieruchamiać w swojej strukturze niektóre szczepy patogennych bakterii (m.in. *Staphylococcus* i *Clostridium*) [Mardarowicz 1997]. Dodawanie drożdży do paszy dla zwierząt nie tylko wzbogaca ją w białko, ale również w ważne składniki mineralne, tj. wapń, fosfor, potas, magnez, miedź, mangan, cynk, żelazo. Występowanie poszczególnych składników mineralnych oraz ich stężenie w komórce drożdży jest ściśle uzależnione od rodzaju zastosowanego podłoża hodowlanego. Ma to związek ze zdolnością drożdży do pobierania pierwiastków z podłoża często w ilościach przekraczających ich fizjologiczne zapotrzebowanie [Tuszyński i Pasternakiewicz 2000, Mardarowicz 1997]. Tym samym pojawia się perspektywa szerszego wykorzystania drożdży do produkcji gotowych preparatów białkowo-mineralnych lub dodatków do żywności wzbogacających diety w deficytowe pierwiastki, np. magnez [Błażej i Duszkiewicz-Reinhard 2004, Gardner 2003].

Produkcja drożdży paszowych opiera się głównie na surowcach węglowodanowych, takich jak: melasa, wywar melasowy, ługi posulfitowe, odpady skrobiowe i ligninocelulozowe, serwatka lub odpady z przemysłu owocowo-warzywnego. Do produkcji drożdży wykorzystuje się również alkohole takie jak metanol lub etanol, a także węglowodory. W ostatnich latach coraz częściej mówi się o wykorzystaniu alternatywnych, niekonwen-

cyjonalnych surowców do produkcji biomasy drożdżowej. Są to odpady z przemysłu tłuszczowego, mięsnego, wytloki z pomarańczy oraz zmielone odpady muszli krewetkowych, które stanowią dobre źródło węgla i energii dla drożdży takich jak: *Candida utilis*, *Candida tropicalis*, *Trichosporon cutaneum* czy *Yarrowia lipolytica* [Juszczuk i in. 2005].

Drożdże paszowe *Candida utilis* należą do rodziny *Saccharomycetaceae* i są jednokomórkowymi grzybami [Kurtzman i Fell 1998]. Rodzaj *Candida* stanowi formę przejściową między drożdżami a pleśniami. Rozmnażają się przez pączkowanie oraz charakteryzują się zdolnością do wytwarzania mniej lub bardziej rozgałęzionej grzybni. Pseudogrzybnia zawiera najczęściej konidia, których sposób osadzenia na grzybni i kształt są charakterystyczne dla poszczególnych gatunków. Optymalna temperatura ich rozwoju wynosi 25–30°C, natomiast pH mieści się w zakresie 4,0–6,0. Kształt i wielkość komórek uzależnione są od warunków hodowli oraz stanu odżywienia [Kurtzman i Fell 1998]. Drożdże *Candida* są typowymi tlenowcami. Przy intensywnym napowietrzaniu produkują minimalne ilości alkoholu lub go wcale nie produkują, natomiast intensywnie się rozmnażają [Barnett i in. 2000]. Najczęściej przyjmują kształty od elipsoidalnego do silnie wydłużonego, występują pojedynczo lub parami. Wykazują zdolność fermentacji niektórych cukrów, wśród nich glukozy i sacharozy. Charakteryzują się możliwością wzrostu w podłożach zawierających jako jedyne źródło węgla glukozę. Ponadto asymilują sacharozę, maltozę, celobiozę, trehalozę, rafinozę, inulinę, cytryniany, glicerol i etanol [Kurtzman i Fell 1998].

Produkcja biomasy z tych surowców możliwa jest dzięki reakcjom anaplerotycznym (dopełniającym) cyklu Krebsa [Stryer i in. 2005]. Podstawowym szlakiem tych reakcji jest cykl glioksalowy. Gdy cukry w pożywce hodowlanej są wyczerpane, reakcje cyklu Krebsa zostają zahamowane na poziomie izocytrynianu, a metabolizm odbywa się w cyklu glioksalowym. Wówczas jako źródło węgla komórki mogą wykorzystać np. aldehyd octowy, etanol czy glicerol. Związki te są przekształcane do acetylo-CoA, a dalej w cyklu TCA do izocytrynianu, glioksalanu, a następnie jabłczanu w reakcjach kolejno katalizowanych przez syntazę i liazę cytrynianową oraz syntazę jabłczanową. W cyklu glioksalowym zostaje pominięty etap tworzenia pirogronianu jako metabolitu pośredniego [Libudzisz i in. 2008], jak również reakcje dekarboksylacji zachodzące w cyklu kwasu cytrynowego [Stryer i in. 2005].

W badaniach Juszczuk i in. [2005] oceniono zdolność różnych gatunków drożdży, tj. *Candida utilis*, *Candida robusta*, *Candida tropicalis*, *Yarrowia lipolytica* do produkcji biomasy z glicerolu opadowego w podłożu o zróżnicowanym pH. Zbadano również kinetykę wzrostu i wydajność biomasy wybranych szczepów drożdży w bioreaktorze mieszadłowym. Na podstawie otrzymanych wyników [Juszczuk i in. 2005] stwierdzono, że glicerol otrzymany przy produkcji biopaliw jest utylizowany przez drożdże w zakresie pH 3,5–6,5 i może być wykorzystywany do produkcji biomasy komórkowej. Biorąc pod uwagę wydajność biomasy, zawartość białka, produktywność i wydajność całkowitą, stwierdzono, że najlepszym producentem biomasy z glicerolu opadowego w tych warunkach był szczep *Y. lipolytica* ATCC 8661 UV'1. Na uwagę zasługuje również powszechnie znany gatunek *Candida utilis*, który znajduje się na liście GRAS jako drożdże uznane za bezpieczne dla naszego zdrowia. Ich niewielkie wymagania pokarmowe, tlenowe warunki wzrostu oraz biomasa bogata w składniki odżywcze sytuuje je w grupie najcenniejszych drobnoustrojów przemysłowych. Porównując tlenowy metabolizm *C. utilis* z warunkami wzrostu bakterii octowych (głównie szczepów z rodzajów *Gluconobacter*

i *Gluconacetobacter* w zakresie pH, temperatury, stopnia natlenienia oraz wymagań pokarmowych), wydaje się, że zastosowanie mieszanej kultury drożdżowo-bakteryjnej tych szczepów może być alternatywną metodą utylizacji odpadu glicerynowego powstającego przy produkcji biopaliw.

PODSUMOWANIE

Wzrost produkcji biopaliw na świecie w ostatnich latach znacząco wpłynął na podaż glicerolu. Spośród wielu metod jego zagospodarowania najbardziej interesująca wydaje się jego utylizacja w procesach mikrobiologicznych. Dzięki nim możliwa jest waloryzacja taniego surowca – glicerolu do cennego i pożądanego przez rynek paszowy produktu, jakim jest białko mikrobiologiczne (SCP).

Na podstawie przeprowadzonej analizy potencjałów biochemicznych drożdży i bakterii octowych można stwierdzić, że istnieje możliwość wykorzystania mieszanej kultury drobnoustrojów do utylizacji glicerolu powstałego w procesie produkcji biodiesla.

Zarówno drożdże, jak i bakterie octowe są organizmami tlenowymi. Bakterie z gatunków *Gluconacetobacter xylinus* lub *Gluconobacter oxydans* mogą wykorzystywać zawarty w podłożu glicerol do produkcji w warunkach tlenowych dihydroksyacetonu. DHA jest ketotriozą, która łatwo podlega fosforylacji do fosfodihydroksyacetonu. Drożdże *Candida utilis* w aerobowych warunkach wzrostu podczas produkcji biomasy przeprowadzają proces utleniania biologicznego, który obejmuje glikolizę, przemiany cyklu Krebsa oraz przekazywanie protonów i elektronów poprzez przenośniki łańcucha oddechowego w mitochondriach. Podczas glikolizy z fruktozo-1,6-difosforanu powstają dwa izomery, tj. fosfodihydroksyaceton i aldehyd-3-fosfoglicerynowy. W tym fragmencie glikolizy możliwe jest wykorzystanie przez drożdże dihydroksyacetonu, który został wyprodukowany przez bakterie octowe w kulturze mieszanej z drożdżami. DHA znajdujący się w podłożu hodowlanym pobierany jest przez drożdże za pomocą systemu translokacji grupowej i podczas tego procesu ulega fosforylacji do fosfodihydroksyacetonu. Tak otrzymany związek trafia do cytozolu, gdzie ma miejsce glikoliza. Następnie fosfodihydroksyaceton przekształcany jest przez izomerazę triozofosforanową do aldehydu 3-fosfoglicerynowego, który bierze udział w dalszych reakcjach glikolizy. Drożdże *Candida utilis* mogą również bezpośrednio wykorzystywać glicerol z podłoża hodowlanego jako źródło węgla i energii. Jest to możliwe dzięki reakcjom dopełniającym cyklu Krebsa, z których podstawowym szlakiem jest cykl gliksalowy.

Koncepcja wykorzystania wspólnych dróg metabolizmu drożdży paszowych i bakterii octowych w kulturze mieszanej do utylizacji glicerolu z produkcji biodiesla rysuje perspektywę otrzymania zarówno wartościowej biomasy komórkowej do celów żywieniowych, jak i zagospodarowania coraz większych ilości odpadów przemysłu paliwowego.

PIŚMIENNICTWO

- Barbirato F., Camarasa-Claret C., Grivet J. P., Bories A., 1995. Glycerol fermentation by a new 1,3-propanediol-producing microorganism: *Enterobacter agglomerans*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 43, 786–793.
- Barnett J.A., Payne R.W., Yarrow D., 2000. Yeast. Characteristics and Identification. Cambridge University Press, UK, 40-46, 53, 70–71, 532.
- Bednarski W., Rejs A., 2003. Biotechnologia Żywności. Wyd. II., WNT, Warszawa, 218–222, 446–457.
- Bin Bin Ma, Xiao Lin Xu, Gen Lin Zhang, Li Wei Wang, Min Wu, Chun Li, 2009. Microbial Production of 1,3-Propanediol by *Klebsiella pneumoniae* XJPD-Li under Different Aeration Strategies. Appl. Biochem. Biotechnol., 152, 127–134.
- Błażej St., Duszkiewicz-Reinhard W., 2004. Biomasa komórkowa drożdży, jako potencjalne źródło biopleksów magnezu. Pol. J. Food Nutr. Sci., Vol. 13/54 No. 3, 223–232.
- Błażej St., 2006. Studia nad pozyskiwaniem biopleksów z biomasy drożdży *Candida utilis* wzbogaconych magnezem. Wyd. SGGW, Warszawa, 14–19.
- Bocheński C.I., 2003. Biodiesel paliwo rolnicze. Wyd. SGGW, Warszawa, 80–85, 95–96.
- Chmiel A., 1998. Biotechnologia – podstawy mikrobiologiczne i biochemiczne. Wyd. III., PWN, Warszawa, 34–36, 204–210.
- Chuloo M., Jae-Hyeong A., Seung W. K., Byoung-In S., Youngsoo U., 2009. Effect of Biodiesel-derived Raw Glycerol on 1,3-Propanediol Production by Different Microorganisms. Appl. Biochem. Biotechnol. DOI 10.1007/s12010-009-8859-6.
- Cieślakowski B., Juliszewski T., Łapczyńska-Kordon B., 2006. Utylizacja na cele energetyczne produktów ubocznych technologii biopaliwowej. Inż. Rol., 12, 6–8.
- Edzard S., Torsten R., Jochen T., 2009. Continuous cultivation approach for fermentative succinic acid production from crude glycerol by *Basfia succiniciproducens* DD1. Biotechnol. Lett., 31, 1947–1951.
- Erni B., Siebold C., Christen S., Srinivas A., Oberholzer A., Baumann U., 2006. Small substrate, big surprise: fold, function and phylogeny of dihydroxyacetone kinases. Cell. Mol. Life. Sci., 63, 890–900.
- Fangrui M., Milford A.H., 1999. Biodiesel production: a review. Bioresource Technol., 70, 1–15.
- Fukuda H., Kondo A., Noda H., 2001. Biodiesel Fuel Production by Transesterification of Oils. J. Biosci. Bioengin., Vol. 92, No. 5, 405–416.
- Gaca J., 2006. Faza glicerynowa po produkcji biodiesla – odpad czy cenny surowiec? Czysta Energia, 11/2006: 25–28.
- Gardner R.C., 2003. Genes for magnesium transport. Curr. Opin. Plant Biol., 6, 263–267.
- Gatgens C., Degner U., Bringer-Meyer S., Herrmann U., 2007. Biotransformation of glycerol to dihydroxyacetone by recombinant *Gluconobacter oxydans* DSM 2343. Appl. Microbiol. Biotechnol., 76, 553–559.
- Hanczakowski P., 2008. Wykorzystanie glicerolu pozostałego po produkcji biopaliw w żywieniu zwierząt gospodarskich. Wiad. Zoot., R. XLVI, 2, 17–20.
- Hettwer J., Oldenburg H., Flaschel E., 2002. Enzymic routes to dihydroxyacetone phosphate or immediate precursors. J. Molec. Catal.: Enzym., 19/20, 215–222.
- Holst O., Lundback H., Mattiasson B., 1985. Hydrogen peroxide as an oxygen source for immobilized *Gluconobacter oxydans* converting glycerol to dihydroxyacetone. Appl. Microbiol. Biotechnol., 22, 382–388.
- Hui J.M., Khachatourians G., 1995. Food Biotechnology: Microorganisms. Wiley-Vch, USA, 297–337.

- Ito T., Yutaka Nakashimada Y., Koichiro Senba K., Matsui T., Nishio N., 2005. Hydrogen and Ethanol Production from Glycerol-Containing Wastes Discharged after Biodiesel Manufacturing Process. *J. Biosci. Bioeng.*, 100 (3), 260–265.
- Juszczak P., Musiał I., Rymowicz W., 2005. Dobór szczepów drożdży do produkcji biomasy z glicerolu odpadowego. *Acta Sci. Pol., Biotechnol.*, 4 (1-2), 65–76.
- Kurtzman C.P., Fell J.W., 1998. *The yeast, a taxonomic study*. Elsevier Science, BV, New York, 112.
- Libudzisz Z., Kowal K., Żakowska Z., 2008. *Mikrobiologia techniczna tom 2*. Wyd. Naukowe PWN, 59–61, 120–125.
- Mardarowicz L., 1997. Drożdże w żywieniu drobiu. *Pol. Drobiar.*, 9, 14–16.
- Moser R.B., 2009. Biodiesel production, properties, and feedstocks. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 45, 229–266.
- Parajo J.C., Santos V., Dominguez H., Vazquez M., 1995. NH₄OH – based pretreatment for improving the nutritional quality of single-cell protein (SCP). *Appl. Bioch. Biotechnol.*, 55, 133–149.
- Petrov K., Petrova P., 2009. High production of 2,3-butanediol from glycerol by *Klebsiella pneumoniae* G31. *Apel. Microbiol. Biotechnol.*, 84, 659–665.
- Podkówka W., 2004. Biopaliwo. Gliceryna pasza z rzepaku. Wyd. Akademii Techniczno-Rolniczej w Bydgoszczy, 18, 173.
- Reimann A., Biebl H., 1996. Production of 1,3-propandiol by *Clostridium butyricum* DSM 5431 and product tolerant mutants in fedbatch culture feeding strategy for glycerol and ammonium. *Biotechnol. Lett.*, 18, 827–832.
- Robinson R.K., Batt C.A., Patel P.D., 2000. *Encyclop(a)edia of food microbiology*. Academic Press. A Harcourt Science and Technology Company, 352–359.
- Rosiak E., 2008. Wzrost produkcji biopaliw z olejów roślinnych. *Przem. Spoż.*, 1, 14–15.
- Rymowicz W., Rywińska A., Żarkowska B., 2007. Biosynthesis of citric acid from crude glycerol by *Yarrowia lipolytica* in repeated-batch cultivations. *J. Biotechnol.*, 131, 149–150.
- Rymowicz W., 2008. Biosynteza kwasu cytrynowego z glicerolu przez drożdże *Yarrowia lipolytica* immobilizowane w chitozanie i poliwinylalkoholu. *Acta Sci. Pol., Biotechnol.*, 7(3), 17–26.
- Rywińska A., 2008. Wykorzystanie glicerolu odpadowego do biosyntezy kwasu cytrynowego przez *Yarrowia lipolytica* Wratislavia AWG 7. *Acta Sci. Pol., Biotechnol.*, 7(4), 13–22.
- Stasiak L., Błażej St., 2009. Acetic acid bacteria – perspectives of application in biotechnology. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 59, 1, 17–23.
- Stasiak-Różańska L., Błażej St., Ratz A., 2010. Investigation into the optimization of parameters of glycerol biotransformation to dihydroxyacetone with the use of immobilized cells of *Gluconobacter xylinus*. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 60 (3).
- Stasińska B., 1999. Chemiczne metody izolacji białek z komórek drożdży spożywczych. *Biotechnol.*, 2, 120–129.
- Stryer L., Tymoczko L.J., Berg M.J., 2005. *Biochemia*. Wyd. Naukowe PWN, 485, 431.
- Tkač J., Navratil M., Strudik E., Gemeiner P., 2001. Monitoring of dihydroxyacetone production during oxydation of glycerol by immobilized *Gluconobacter oxydans* cells with an enzyme biosensor. *Enzyme. Microbiol. Technol.*, 28, 383–388.
- 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.
- Tys J., Piekarski W., Jackowska I., Kaczor A., Zajac G., Starobrat P., 2003. Technologiczne i ekonomiczne uwarunkowania produkcji biopaliw z rzepaku. *Acta Agrophysica*, 99, 70–72, 87.
- www.ebb-eu.org - European Biodiesel Board
www.biofuels-platform.ch - Biofuels Platform

POSSIBILITY OF USING GLYCEROL FROM BIODIESEL PRODUCTION AS A SOURCE OF CARBON IN MIXED CULTURE *CANDIDA UTILIS* YEAST AND ACETIC ACID BACTERIA

Abstract. The increase of biodiesel production on the world and in Poland causes necessity to find out an effective way to collect obtained in technological process wasted which includes glycerin. The culture of biomass cells *Candida utilis* yeast strain growing in mediums with glycerin as main source of carbon gives a possibility to obtain fully worth feed protein (SCP). On the other hand feed yeasts as obligatory aerobes make with an easy way biotransformation of glycerin to dihydroxyacetone (DHA) – common compound during metabolism of yeasts and acetic acid bacteria. Used glycerin to the production of biomass fodder yeasts each time demands enzymatic step to transform these substrates by the influence of glycerin dehydrogenized to DHA. Based on these data it could be said that idea to use potential biochemist mixture of yeasts and acetic acid cultures could be more effective for utilization of glycerin from production of biodiesel than with a participation of monoculture yeasts type *C. utilis*. Obtained biomass of cell will keep criteria of worthily source of proteins as supplement to feeds.

Key words: biodiesel, glycerin, *Candida utilis*, SCP, acetic acid bacteria, dihydroxyacetone

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 30.09.2010

Do cytowania – For citation: Lipińska E., Błażej S., Markowski K., 2010. Koncepcja wykorzystania gliceryny odpadowej z produkcji biodiesla jako źródła węgla dla drożdży *Candida utilis* w kulturze mieszanej z bakteriami octowymi. Acta Sci. Pol. Biotechnol., 9(3), 3–14.

PORÓWNANIE HODOWLI CIĄGLYCH MUTANTÓW *TRICHODERMA REESEI RUT-C30*, *TRICHODERMA REESEI 18/14*, *TRICHODERMA REESEI 18/15* NA PODŁOŻU Z NIEROZCIEŃCZONĄ SERWATKĄ WZBOGACONĄ W SOLE MINERALNE

Marta Wesołowska-Trojanowska, Zdzisław Targoński

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Streszczenie. Porównano produkcję enzymów zewnątrzkomórkowych przez mutanty *Trichoderma reesei RUT-C30*, *Trichoderma reesei 18/14*, *Trichoderma reesei 18/15* użyte do hodowli ciągłych na podłożu z nierozcieńczoną serwatką wzbogaconą w sole mineralne. Najwyższe aktywności celulaz oznaczone metodą FPU i ksylanaz wykazywały filtry z hodowli ciągłej *Trichoderma reesei 18/15* przy niskich aktywnościach proteaz.

Słowa kluczowe: celulazy, ksylanazy, *Trichoderma reesei RUT-C30*, *Trichoderma reesei 18/14*, *Trichoderma reesei 18/15*, serwatka, hodowla ciągła

WSTĘP

Trichoderma reesei, znana również jako *Hypocrea jecorina*, należy do mezofilnych grzybów nitkowatych z klasy *Ascomycetes*. Jest uważana za jednego z najbardziej wydajnych producentów ksylanaz i celulaz. Efektywne zdolności wydzielnicze oraz tanie i łatwe metody hodowli sprawiają, że *Trichoderma reesei* jest wykorzystywana do produkcji enzymów, w szczególności enzymów celulolitycznych i ksylanolitycznych, na dużą skalę. Enzymy te mają różnorodne zastosowania w przemyśle spożywczym i paszowym, a ostatnio są również wykorzystywane w przemyśle włókienniczym oraz celulozowo-papierniczym [Nakari-Setälä i in. 1995, Xiong i in. 2004].

Wydajna produkcja enzymów celulolitycznych przez *Trichoderma reesei* jest uzależniona w dużej mierze od obecności w podłożu induktora tych enzymów, który na ogół pełni także rolę źródła węgla i energii. Najlepszymi induktorami celulaz są czysta celuloza, sophoroza czy czysta laktoza. Te substraty są jednak zbyt drogie, by wykorzystywać je do produkcji celulaz na skalę przemysłową.

Adres do korespondencji – Corresponding author: Marta Wesołowska-Trojanowska, Katedra Biotechnologii, Żywności Człowieka i Towaroznawstwa Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, ul. Skromna 8, 20-704 Lublin, e-mail: marta.wesolowska-trojanowska@up.lublin.pl

Serwatka jest produktem ubocznym powstającym w produkcji serów, twarogów, kazeiny lub innych preparatów białek mleka. Skład chemiczny serwatki zależy od składu chemicznego mleka [Kulkarni i in. 1999].

Wyróżnia się serwatkę: podpuszczkową (pochodzącą ze skrzepu podpuszczkowego mleka), kwasową (ze skrzepu kwasowego) oraz kazeinową. Serwatka podpuszczkowa zawiera więcej białka i laktozy oraz mniej kwasu mlekowego i wapnia niż serwatka kwasowa. Pod względem zawartości tłuszczu wyróżnia się serwatkę tłustą i chudą (poniżej 0,1% tłuszczu) [Gawel 1979].

Serwatka w swoim składzie zawiera laktozę. Według Gänzle i Haase [2008] laktoza jest ważnym substratem reakcji chemicznych (hydrolizy, oksydacji, redukcji, izomeryzacji, transgalaktozylacji), dzięki czemu zwiększa się jej wartość użytkowa i funkcjonalna. Ponadto cukier ten jest dobrym źródłem węgla w hodowlach grzybów syntetyzujących celulazę i ksylanazę. Dlatego celem autorów niniejszej pracy było porównanie uzdolnień do produkcji enzymów celulolitycznych i ksylanolitycznych metodą ciągłą przez trzy mutanty: *Trichoderma reesei* RUT-C30, *Trichoderma reesei* 18/14 i *Trichoderma reesei* 18/15 na podłożu z serwatką.

MATERIAŁY I METODY

Material biologiczny: mutanty *Trichoderma reesei*

W badaniach wykorzystano mutanty *Trichoderma reesei* o symbolach RUT-C30, 18/14 (VTT-D-78085) i 18/15 (VTT-D-79124) znajdujące się w kolekcji drobnoustrojów Katedry Biotechnologii, Żywienia Człowieka i Towaroznawstwa Żywności, Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie, a pochodzące z VTT-Collection of Industrial Microorganisms, Technical Research Centre of Finland.

Jako materiał do doświadczeń wykorzystano ciecze pochodzące otrzymane w wyniku hodowli wyżej wymienionych mutantów. Mutanty przechowywano na skosach brzeźkowych w temperaturze 2°C i okresowo przeszczepiano.

Podłoże hodowlane

Do hodowli *Trichoderma reesei* wykorzystano podłoże według Mandel i Weber [1969] o następującym składzie (mg x dm⁻³): KH₂PO₄ (2 000); MgSO₄ (300); (NH₄)₂SO₄ (1 400); CaCl₂ (300); Tween 80 (1 000); ekstrakt drożdżowy (1 000); roztwór mikroelementów (0,5 cm³ x dm⁻³) zawierający: FeSO₄ x 7H₂O (5 000 mg x dm⁻³); MnSO₄ x H₂O (1 960 mg x dm⁻³); ZnCl₂ (1 660 mg x dm⁻³); CaCl₂ (2 000 mg x dm⁻³). Końcową wartość pH pożywki po sterylizacji ustalono na poziomie 5,0.

Wstępne przygotowanie serwatki

Serwatkę pobierano bezpośrednio z linii produkcyjnej serów podpuszczkowych w OSM Lublin. Następnie poddawano ją sterylizacji w autoklawie w temperaturze 110°C przez 30 minut. Po ostudzeniu całość sączono przez sączek z wielokrotnie złożonej chusty nylonowej, w celu usunięcia części frakcji białkowych, a następnie wykorzystano jako podłoże hodowlane w formie nierozcieńczonej, wzbogaconej w sole mineralne (NH₄)₂SO₄ i MgSO₄ x 7H₂O w stężeniu 1000 mg x dm⁻³, dla każdej soli. Końcową wartość pH pożywki po sterylizacji ustalono na poziomie 5,5.

PRZYGOTOWANIE INOCULUM PO HODOWLI

Hodowle inokulacyjne *Trichoderma reesei* RUT-C30, 18/14 i 18/15 prowadzono w kolbach Erlenmayera o pojemności 0,5 dm³, zawierających 0,1 dm³ pożywki według Mandel i Weber [1969]. Jako źródło węgla stosowano laktozę w stężeniu 4 g x dm⁻³. Kolby zamykano korkami będącymi jednocześnie filtrami mikrobiologicznymi i sterylizowano w autoklawie w temperaturze 110°C przez 30 minut. Po ochłodzeniu pożywki szczepiono odpowiednio grzybnią *Trichoderma reesei* RUT-C30, 18/14 i 18/15, zawartą na kawałkach o powierzchni 1 cm² ze skosu brzeczkowego. Następnie umieszczano je w pokoju termostatowym na wstrząsarce rotacyjnej (220 obr./min) i inkubowano w temperaturze 27°C, aż do całkowitego wykorzystania źródła węgla (4–6 dob).

Hodowle ciągłe w bioreaktorze

Hodowle ciągłe ww. szczepów prowadzono w bioreaktorze Bioflo III firmy New Brunswick Scientific Co. Inc. o pojemności roboczej 5 dm³. Bioreaktor napełniono pożywką, w wyżej wymienionej ilości, którą stanowiła nierozcieńczona serwatka wzbogacona w sole mineralne (NH₄)₂SO₄ i MgSO₄ x 7H₂O w stężeniu 10 g/dm³, sterylizowano w autoklawie w temperaturze 110°C przez 30 minut i szczepiono wcześniej przygotowanym inokulum w ilości 200 cm³. Po wyczerpaniu laktozy w podłożu bioreaktor zasilano w sposób ciągły nierozcieńczoną serwatką, dostosowując szybkość zasilania do poszczególnych mutantów, wymieniając od 700 do 1 000 ml pożywki na dobę. Co 24 godziny nadmiar płynu hodowlanego odbierano tak, by zachować wyjściową ilość podłoża hodowlanego. Pobrane próbki płynu pohodowlanego wirowano w wirówce firmy Sigma Laboratory Centrifuge 4K15 przy prędkości 9 000 obr./min przez 10 min, celem oddzielenia biomasy od roztworu, a w otrzymanym filtracie oznaczano aktywności enzymatyczne, zawartość cukrów redukujących. Parametry pracy bioreaktora podczas hodowli były następujące: temperatura 27°C, pH 4,0, prędkość obrotowa mieszadła 300 obr./min, napowietrzanie 0,8 dm³ / min x dm³ podłoża.

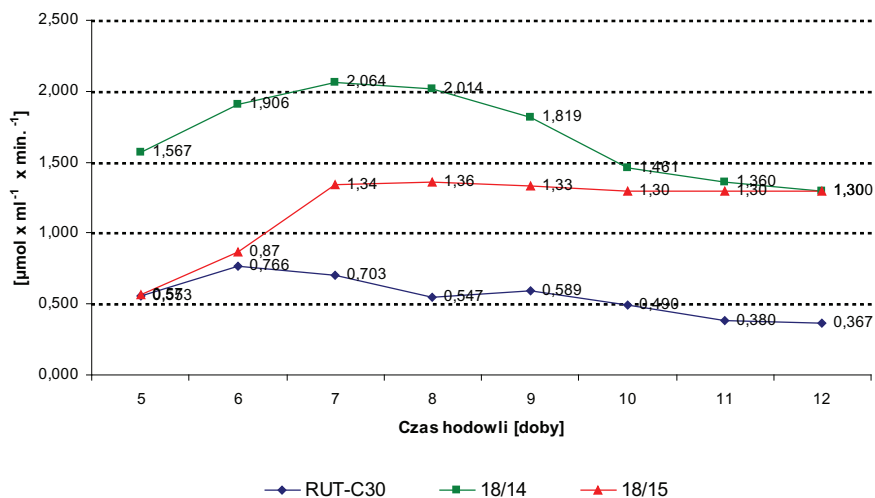
Metody analityczne

W filtracie pohodowlanym oznaczano zawartości cukrów redukujących metodą z kwasem 3,5-dinitrosalicylowym według Miller [1959] oraz oznaczano następujące aktywności enzymów: ogólną aktywność celulolityczną oznaczano wobec bibuły filtracyjnej jako substratu według metody opisanej przez Ghose [1987] i wyrażono w jednostkach FPU, aktywności ksylanolityczne oznaczano według metody Biely i in. [1980], aktywności proteolityczne oznaczano według metody podanej przez Lovrien i in. [1985], aktywności chitynolityczne oznaczano według metody podanej przez Lunt i Kent [1960], aktywności β-1,3-glukanazy (laminarynazy) oznaczano według metody podanej przez Targońskiego i Szajera [1977].

OMÓWIENIE WYNIKÓW

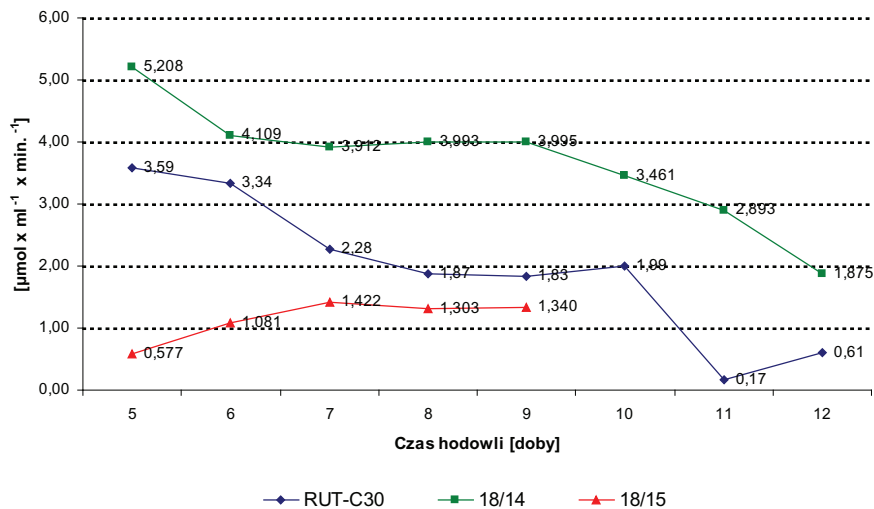
Na pierwszym etapie badań porównano dynamikę produkcji trzech enzymów zewnątrzkomórkowych, tj. celulaz, ksylanaz i proteaz przez *Trichoderma reesei* RUT-C30, *Trichoderma reesei* 18/14 i *Trichoderma reesei* 18/15 na podłożu z nierozcieńczoną serwatką z dodatkiem soli mineralnych. Hodowle ciągłe przeprowadzono w bioreaktorze, a wyniki

pomiarów aktywności enzymatycznych supernatantów przedstawiono na rysunkach 1, 2, 3 oraz w tabelach 1, 2 i 3.



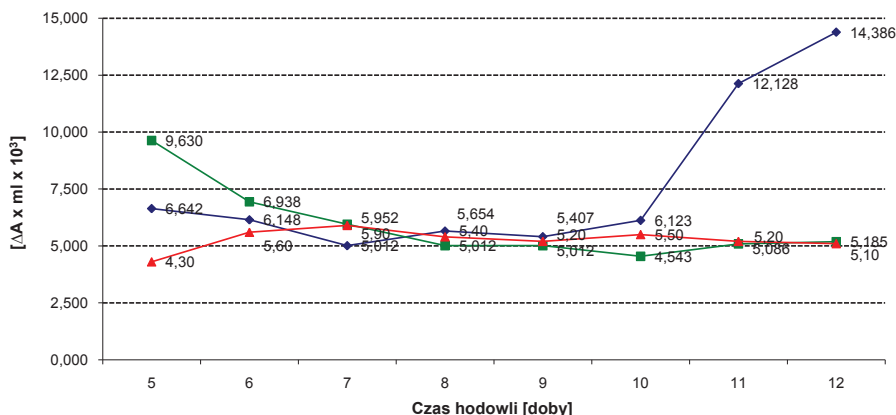
Rys. 1. Dynamika nagromadzania celulaz oznaczanych metodą FPU podczas hodowli ciągłych *Trichoderma reesei* RUT-C30, *Trichoderma reesei* 18/14 i *Trichoderma reesei* 18/15 na nierozcieńczonej serwatce wzbogaconej w sole mineralne

Fig. 1. Dynamics of cellulase accumulation determined by *Trichoderma reesei* RUT-C30, *Trichoderma reesei* 18/14 and *Trichoderma reesei* 18/15 under continuous cultivations in a medium containing undiluted whey with mineral salts fortification



Rys. 2. Dynamika nagromadzania ksylanaz podczas hodowli ciągłych *Trichoderma reesei* RUT-C30, *Trichoderma reesei* 18/14 i *Trichoderma reesei* 18/15 na nierozcieńczonej serwatce wzbogaconej w sole mineralne

Fig. 2. Dynamics of xylanase accumulation determined by *Trichoderma reesei* RUT-C30, *Trichoderma reesei* 18/14 and *Trichoderma reesei* 18/15 under continuous cultivations in a medium containing undiluted whey with mineral salts fortification



Rys. 3. Dynamika nagromadzenia proteaz podczas hodowli ciągłych *Trichoderma reesei* RUT-C30, *Trichoderma reesei* 18/14 i *Trichoderma reesei* 18/15 na nierozcieńczonej serwatce wzbogaconej w sole mineralne

Fig. 3. Dynamics of protease accumulation determined by *Trichoderma reesei* RUT-C30, *Trichoderma reesei* 18/14 and *Trichoderma reesei* 18/15 under continuous cultivations in a medium containing undiluted whey with mineral salts fortification

Pomiary aktywności celulaz i ksylanaz wykonywano dla filtratów, w których stężenie cukrów redukujących było stosunkowo niskie, w przeciwnym razie wyniki pomiarów aktywności ww. enzymów zawierałyby duże błędy. Dlatego wyniki badań przedstawiono od 5. doby hodowli.

Porównanie wyników przedstawionych na rysunku 1 pokazuje, iż aktywności celulaz określone metodą FPU uzyskały wartość maksymalną w 7. dobie (0,76 j. w 8. dobie (2,064 j. FPU) i w 9. dobie (1,36 j. FPU) odpowiednio w przypadku mutantu *Trichoderma reesei* RUT-C30, *Trichoderma reesei* 18/14 i *Trichoderma reesei* 18/15. Po tym czasie nastąpił spadek tych aktywności. Stwierdzono, iż mutant *Trichoderma reesei* 18/14 odznaczał się znacznie wolniejszym wzrostem niż pozostałe mutanty, ale za to okazał się bardzo dobrym producentem celulaz, mimo że pod koniec hodowli w filtratach pochodzących zaobserwowano wzrastające ilości cukrów redukujących, co świadczyło o występowaniu procesów litycznych lub szybkość podawania serwatki była zbyt duża.

Z kolei supernatanty otrzymane po hodowli *Trichoderma reesei* RUT-C-30 wykazywały wzrastające aktywności ksylanaz w początkowych okresach hodowli ciągłej, po czym ulegały obniżeniu. Grzybnia ww. mutantu podczas hodowli ciągłej nie ulegała lizie, a poziom cukrów redukujących w podłożu hodowlanym utrzymywał się na stałym stosunkowo niskim poziomie. Aktywności ksylanolityczne supernatantów otrzymanych po hodowli *Trichoderma reesei* 18/14 w początkowej fazie trwania eksperymentu wahały się w granicach 4,109 $\mu\text{mol/ml} \times \text{min}$. Natomiast po kilku dobach hodowli ciągłej zaobserwowano spadek o 50% (2,893 $\mu\text{mol} \times \text{min}$) tych aktywności. Najniższe aktywności ksylanaz (1,422 $\mu\text{mol/ml} \times \text{min}$ w 8. dobie) przy niskiej aktywności proteaz supernatantów zanotowano w przypadku mutantu *Trichoderma reesei* 18/15 (rys. 2).

Podczas ciągłych hodowli grzybnia nie tylko się namnaża, ale także ulega autolizie. Aktywności enzymów proteolitycznych, laminarynazy i chitynazy w supernatantach mogą być miarą procesów autolitycznych zachodzących podczas hodowli ciągłych. Ponadto wysoka aktywność proteaz może mieć wpływ na aktywności innych enzymów występujących w supernatantach. Dlatego na kolejnym etapie badań dokonano pomiarów aktywności ww. enzymów w supernatantach otrzymanych z hodowli ciągłych badanych szczepów *Trichoderma reesei*.

Z przedstawionych na rysunku 3 danych wynika, iż aktywności proteolityczne supernatantów otrzymanych z hodowli *Trichoderma reesei* RUT-C30 w początkowej fazie hodowli ciągłej były niskie, ale w kolejnych dobach ulegały znacznemu podwyższeniu (14,386 jednostek) i wielokrotnie przewyższały aktywności proteolityczne supernatantów otrzymanych z hodowli *Trichoderma reesei* 18/14 i *Trichoderma reesei* 18/15 (4,3–5,9 jednostek). Tak wysokie aktywności proteolityczne supernatantów mogą tłumaczyć stopniowo obniżające się aktywności celulaz, a w szczególności ksyłanaz podczas trwania hodowli ciągłej badanych szczepów.

Aktywności laminarynazy supernatantów otrzymanych z hodowli *Trichoderma reesei* RUT-C30 i *Trichoderma reesei* 18/14 narastały w pierwszych dobach hodowli, po czym uległy obniżeniu, co ilustrują tabele 1 i 2.

Tabela 1. Wyniki pomiarów aktywności enzymatycznych filtratów pohodowlanych, zawartości cukrów redukujących otrzymanych z hodowli ciągłych *Trichoderma reesei* RUT-C30 na nierozcieńczonej serwatce z dodatkiem 10 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ i $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, pH wyjściowe =5,5

Table 1. Results of enzyme activity, reducing sugars measured in postculture filtrates obtained in *Trichoderma reesei* RUT-C30 under continuous cultivations in a medium containing undiluted whey with 10 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, initial pH=5,5

Czas hodowli Culture time [doby] [days]	Zawartość cukrów redukujących Reducing sugar content [mg/ml]	Aktywności chitynazy Chitinase activity [nmol/ml x min]	Aktywności laminarynazy Laminarinase activity [μmol/ml x min]
4	5,88	0,342	7,67
5	3,58	0,318	6,56
6	6,94	0,382	7,26
7	7,30	0,423	8,69
8	8,40	0,442	4,84
9	9,55	0,511	4,33
10	8,82	0,394	3,56
11	7,75	0,388	2,34
12	3,24	0,194	1,12
13	2,98	0,247	1,46

Tabela 2. Wyniki pomiarów aktywności enzymatycznych filtratów pohodowlanych, zawartości cukrów redukujących otrzymanych z hodowli ciągłych *Trichoderma reesei* 18/14 na nierozcieńczonej serwatce z dodatkiem 10 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ i $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, pH wyjściowe = 5,5

Table 2. Results of enzyme activity, reducing sugars measured in postculture filtrates obtained in *Trichoderma reesei* 18/14 under continuous cultivations in a medium containing undiluted whey with 10 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, initial pH=5,5

Czas hodowli Culture time [doby] [days]	Zawartość cukrów redukujących Reducing sugar content [mg/ml]	Aktywności chitynazy Chitinase activity [nmol/ml x min.]	Aktywności laminarynazy Laminarinase activity [μmol/ml x min.]
6	3,28	0,283	3,544
7	5,94	0,029	4,579
8	6,74	0,008	4,162
9	7,60	0,000	3,866
10	7,45	0,000	4,522
11	7,79	0,000	2,906
12	7,79	0,000	2,339
13	11,59	0,000	2,733

Tabela 3. Wyniki pomiarów aktywności enzymatycznych filtratów pohodowlanych, zawartości cukrów redukujących otrzymanych z hodowli ciągłych *Trichoderma reesei* 18/15 na nierozcieńczonej serwatce z dodatkiem 10 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ i $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, pH wyjściowe = 5,5

Table 3. Results of enzyme activity, reducing sugars measured in postculture filtrates obtained in *Trichoderma reesei* 18/15 under continuous cultivations in a medium containing undiluted whey with 10 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, initial pH=5,5

Czas hodowli Culture time [doby] [days]	Zawartość cukrów redukujących Reducing sugar content [mg/ml]	Aktywności chitynazy Chitinase activity [nmol/ml x min]	Aktywności laminarynazy Laminarinase activity [μmol/ml x min]
1	30,90	–	–
2	24,70	–	–
3	18,40	–	–
4	13,00	–	–
5	2,10	0,167	–
6	0,00	–	–
7	1,30	–	–
8	1,20	0,200	–
9	1,10	–	–
10	0,76	0,120	–
11	1,45	–	–
12	1,35	0,125	–
13	1,30	–	–
14	1,30	0,110	–

Natomiast najwyższe aktywności chitynaz supernatantów uzyskano z hodowli *Trichoderma reesei* RUT-C30, a najniższe z hodowli *Trichoderma reesei* 18/14 (tab. 1 i tab. 2). Przedstawione dane dotyczące aktywności laminarynazy i chitynazy w supernatantach wskazują, że podczas hodowli ciągłych nie narastały procesy autolityczne grzybni, a nawet obserwowano niższe aktywności ww. enzymów pod koniec hodowli. Zanikanie aktywności chitynolitycznej podczas hodowli *Trichoderma reesei* 18/14, wiązało się ze wzrostem zawartości cukrów redukujących, co może świadczyć o zbyt szybkim zasilaniu hodowli ciągłej serwatką, a jednocześnie represji produkcji chitynaz w obecności cukrów redukujących (tab. 3).

DYSKUSJA NAD WYNIKAMI

Najwięcej informacji na temat produkcji celulaz i ksylanaz na podłożu z serwatką dostarczają prace Wesołowskiej-Trojanowskiej i in. [2005], Janasa i in. [2002] oraz Bailey i in. [1993].

Wesołowska-Trojanowska i in. [2005] prowadzili badania mające na celu porównanie hodowli okresowych *Trichoderma reesei* M-7 na podłożu z czystą laktozą i surową serwatką. Hodowle prowadzono w bioreaktorze Bioflo III firmy New Brunswick Scientific Co. Inc. o pojemności 5 dm³ na podłożu według Mandels i Weber [1969] o podwójnym stężeniu składników z 4-procentowym dodatkiem laktozy. Pożywkę szczepiono inokulum w ilości 0,2 dm³. Jako drugie podłoże posłużyła słodka serwatka zawierająca ok. 4% laktozy z dodatkiem soli mineralnych, tj. (NH₄)₂SO₄ i MgSO₄ w stężeniu 1000 mg x dm³. Po hodowli na serwatce aktywności celulaz były 3,5 razy niższe, a ksylanaz 4 razy niższe niż po hodowli *Trichoderma reesei* M-7 na podłożu z czystą laktozą. Czas osiągnięcia maksymalnych aktywności zarówno celulaz, jak i ksylanaz był nieco krótszy, gdy podłożem do hodowli *Trichoderma reesei* M-7 była serwatka.

Na uwagę zasługują również wyniki badań prowadzonych przez Bailey i in. [1993]. Przedstawiają one produkcję enzymów ksylanolitycznych na podłożach z różnymi źródłami węgla przez *Trichoderma reesei* RUT-C30 (VTT-D-86271). Hodowle prowadzono w fermentorze Chemap Cf 3000 o pojemności 10 dm³. Pożywkę zaszczerpiono inokulum w ilości 1 dm³. Jako źródło węgla zastosowano ksylan z buku w ilości 3000 mg x dm³ oraz suszone i namoczone ziarna zbóż w ilości 1500 mg x dm³. pH przez cały czas trwania hodowli utrzymywano na poziomie 4,0–7,5. Wyniki tych badań dowiodły, iż wysokie wartości pH, tj. 7,0 sprzyjały produkcji ksylanaz. Natomiast przy pH powyżej 7,5 obserwowano niewielką produkcję enzymów ksylanolitycznych, co wiąże się z niewielkim wzrostem mutantu *Trichoderma reesei* RUT-C30 przy tak wysokim pH. Hodowle na podłożu z ksylanem z buku charakteryzowały się niską aktywnością enzymów celulolitycznych. Na podstawie tych wyników badań można stwierdzić, iż produkcja ksylanaz przez mutantu *Trichoderma reesei* RUT-C30 jest uzależniona od wartości pH podłoża hodowlanego. Wysokie pH powyżej 6,0 jest ważnym czynnikiem przy produkcji tychże enzymów.

Badania nad otrzymywaniem ksylanaz na podłożach o różnych źródłach węgla prowadził też Janas i in. [2002]. W pracy tej badano możliwość zastąpienia laktozy 1-procentowym ksylanem z brzozy firmy Sigma podczas hodowli okresowych dwóch mutantów *Trichoderma reesei* w temperaturze 34°C. Badania wykazały, iż zastosowanie ksylanu

jako źródła węgla spowodowało 9- i 7-krotne podwyższenie aktywności ksylanolitycznej z jednoczesnym obniżeniem aktywności celulolitycznych w stosunku do podłoża zawierającego laktozę.

Trudno jest porównać hodowle prowadzone w różnych objętościach czy też przy różnych źródłach węgla. Jednak badacze dowiedli, iż czynnikami mającymi wpływ na produkcję celulaz i ksylanaz przez szczepy *Trichoderma reesei* są: skład podłoża hodowlanego, pH, temperatura oraz rodzaj hodowli.

Z uwagi na brak piśmiennictwa dotyczącego produkcji celulaz przez *Trichoderma reesei* na serwatce postanowiono prześledzić czynniki wpływające na produkcję innych enzymów zewnątrzkomórkowych przez wybrane drożdże i grzyby.

Do interesujących wniosków doszli Murad i Foda [1992], którzy stwierdzili, że sódka serwatka lub permeat są doskonałym podłożem do hodowli drożdży *Kluyveromyces lactis* NRRL 1137, będących bardzo dobrym producentem endopoligalakturonazy. Badacze ci hodowali *Kluyveromyces lactis* na różnych podłożach, tzn. na słodkiej serwatce, słonej (zawierającej 10% NaCl), słonej rozcieńczonej (1:1), słonej rozcieńczonej (1:2), oraz słodkim i słonym permeacie. Hodowle prowadzone były w warunkach wstrząsanych w temperaturze 28°C, przy pH 4,3–5,3. Wyżej wymienione podłoża wzbogacano różnymi źródłami azotu, takimi jak mocznik, ekstrakt drożdżowy, pepton i jako podłoże kontrolne zastosowano permeat bez dodatku źródła azotu. Stwierdzono, że największa produkcja endopoligalakturonazy wystąpiła na podłożu ze słodką serwatką zawierającą 4% laktozy po trzech dniach inkubacji w temperaturze 30°C, przy pH 5,0. Natomiast obecność chlorku sodu w stężeniu 5–10% w podłożu całkowicie zahamowała produkcję enzymów. Ponadto uczeni zanotowali, że jedynie dodatek ekstraktu drożdżowego lub peptonu do podłoża spowodował wyraźny wzrost produkcji enzymów w porównaniu z kontrolnym podłożem – czystym permeatem.

Interesujący eksperyment wykonał Bajpai i in. [1991], wykorzystując serwatkę jako źródło węgla do produkcji α -amylazy (EC 3.2.1.1; 1,4- α -D glukan glukanohydrolazy) przez *Bacillus* sp. Do badań użyto *Bacillus* sp. TCRDC-MI wyizolowanego i opisanego przez Bajpai i in. [1990a, 1990b, 1991]. Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono, że największa produkcja α -amylazy występowała, gdy do podłoża z serwatką dodawano oddzielnie 2% skrobi kukurydzianej, 3% glutenu, 0,1% $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 0,1% KH_2PO_4 i 0,2% NaCl. Najwyższą aktywność α -amylazy na serwatce w hodowlach wstrząsanych zanotowano po 72 godzinach eksperymentu i kształtowała się ona na poziomie 2,690 DUN ml⁻¹, przy pH podłoża 7,0. Natomiast w przypadku hodowli fermentorowej najwyższą aktywność α -amylazy otrzymano po 30 godzinach i wahała się ona w granicach 2,360 DUN ml⁻¹.

Ciekawe doświadczenie przeprowadzili również Donaghy i McKay [1993], którzy wykorzystali drożdżopodobny gatunek grzyba *Auresobasidium pullulans*, rosnący na serwatce do produkcji zewnątrzkomórkowych proteaz. Maksymalną aktywność proteaz zanotowano przy pH 9,5–10,5 i temperaturze 41°C.

Powyższy przykład pokazuje, iż serwatka może być wykorzystywana jako podłoże do hodowli producentów proteaz, z racji obecności w niej znaczących ilości białka i polipeptydów. Rola proteaz w produkcji celulaz i ksylanaz jest niezmiernie ważna zarówno w komórce grzyba, jak i w podłożu hodowlanym. Wewnątrzkomórkowe proteazy biorą udział w ograniczonej proteolizie, która stanowi jeden z kluczowych mechanizmów posttranslacyjnej modyfikacji białek, ale także mogą powodować w zależności od stanu

fizjologicznego komórki głębszą degradację białek. Do końca nie jest też wyjaśniony wpływ proteaz na celulazy zewnątrzkomórkowe, które uważa się, iż ulegają nieznacznej degradacji pod wpływem rodzimych proteaz [Janas 1997]. Wstępne eksperymenty z produkcją celulaz i ksylanaz przez *Trichoderma reesei* M-7 na podłożu z laktozą i z serwatką pokazały, iż w tym drugim przypadku – niskiej aktywności celulaz i ksylanaz towarzyszyły wysokie aktywności proteolityczne filtratów pochodzących. Dlatego też należy podjąć kolejne badania nad modyfikacją składu serwatki m.in. poprzez usunięcie części białek, by poprawić produktywność celulaz i ksylanaz *Trichodermy reesei* hodowanej na podłożu z serwatką.

WNIOSKI

1. Mutanty *Trichoderma reesei* RUT-C30, *Trichoderma reesei* 18/14 i *Trichoderma reesei* 18/15 użyte do hodowli ciągłych na podłożu z serwatką produkowały zróżnicowane ilości enzymów zewnątrzkomórkowych, przy czym najwyższe aktywności FPU i ksylanaz wykazywały filtraty po hodowli ciągłej *Trichoderma reesei* 18/15 przy niskich aktywnościach proteaz.

2. W filtratach pochodzących z badanych szczepów *Trichoderma reesei* stwierdzono aktywności enzymów litycznych, tj. laminarynazy, chitynazy i proteaz, które mogą powodować procesy lityczne grzybni i wpływać na jej zdolność do namnażania się i produkcję enzymów zewnątrzkomórkowych.

3. Obecność znaczących ilości enzymów proteolitycznych w płynach hodowlanych może powodować degradację białek enzymatycznych, przez co obniżać ich aktywności enzymatyczne.

PIŚMIENNICTWO

- Alessandro M., Federico F., 1980. Partial purification and characterization of a yeast extracellular acid protease. *Journal of Dairy Science.*, 63, 1397–1402.
- Bailey M. J., Buchert J., Viikari L., 1993. Effect of pH on production of xylanase by *Trichoderma reesei* on xylan – and cellulose – based media. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 40, 224–229.
- Bajpai P., Verma N., Bajpai P.K., 1990a. Culture conditions for production of thermostable α -amylase by *Bacillus* sp. 25A and properties of the enzyme. *J. Microb. Biotechnol.*, 5, 1, 39–52.
- Bajpai P., Neer J., Bajpai P.K., 1990b. Clarification of bacterial broth containing high α -amylase activity. *Biotechnol. Tech.*, 4, 4, 227–232.
- Bajpai P., Verma N., Neer J., Bajpai P.K., 1991. Utilization of cheese whey for production of α -amylase enzyme. *Journal of Biotechnol.*, 18, 265–270.
- Bajpai P., Gera R.K., Bajpai P.K., 1992. Optimization studies for the production of α -amylase using cheese whey medium. *Enzyme Microb. Technol.*, 14, 679–683.
- Biely P., Vrsanska M., Kratky Z., 1980. Xylan degrading enzymes of the yeast *Cryptococcus albidus*. *Eur. J. Biochem.*, 108, 313–321.
- Donaghy J., Mc Kay A.M., 1992. Extracellular carboxyesterase activity of *Fusarium graminearum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 37, 742–744.
- Donaghy J.A., Mc Kay A.M., 1993. Production and properties of an alkaline protease by *Aureobasidium pullulans*. *Journal of Appl. Bacteriol.*, 74, 662–666.

- Gänzle M.G., Haase G., 2008. Lactose: Crystallization, hydrolysis and value – added derivatives. *Ind. Dairy J.*, 18, 685–694.
- Gaweł J., 1979. Studia nad fermentacją etanolową laktozy w serwatce i jej koncentratkach przez drożdże z rodzaju *Kluyveromyces*. Zeszyty Naukowe Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie. Rozprawy naukowe. Instytut Żywności, 117, 5–65.
- Ghose T.K., 1987. Measurement of cellulase activities. *Pure and Appl. Chem.*, 59, 257–268.
- Janas P., 1997. Produkcja celulaz, ksylanaz i enzymów litycznych przez wybrane mutanty *Trichoderma reesei* w hodowlach okresowych i ciągłych (praca doktorska). UMCS Lublin.
- Janas P., Gustaw W., Targoński Z., Udeh K., Mleko S., 2002. Zastosowanie substratów lignino-celulozowych do otrzymywania preparatów enzymów ksylanolitycznych o niskiej zawartości celulaz. *Biotechnol.*, 1, 5–17.
- König J., Grasser R., Pikor H., Vogel K., 2002. Determination of xylanase, β -glukanase and cellulase activity. *Anal. Bioanal. Chem.*, 374, 80–87.
- Kulkarni N., Shendye A., Rao M., 1999. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiology Reviews.*, 23, 411–456.
- Lovrien R.E., Gusek T., Hart B., 1985. Cellulase and protease specific activities of commercially available cellulase preparations. *J. Appl. Biochem.*, 7, 258–272.
- Lunt M.R., Kent P., 1960. A chitinase system from *Carcinus meamas*. *Biochim. Biophys. Acta*, 44, 371–373.
- Mandels M., Weber J., 1969. The production of cellulase, [in:] Cellulase and their application. *Adv. Chem. Ser.*, G.J. Hajny, E.T. Reese, (eds.), 95, 391–413.
- Miller G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal. Chem.*, 31, 426–428.
- Murad H.A., Foda M.S., 1992. Production of yeast polygalacturonase on dairy wastes. *Bioresource Technol.*, 41, 250–297.
- Nakari-Setälä T., Penttilä M., 1995. Production of *Trichoderma reesei* cellulases on glucose – containing media. *Environmental Microbiol.*, 61, 10, 3650–3655.
- Targoński Z., Szajer S., 1977. Synthesis of cellulase by *Fusarium esp.* in different culture conditions. *Acta Microbiol.*, 3, 273–279.
- Tsujibo H., Miyamoto K., Hasegawa T., Inamori Y., 1990. Purification and characterization of two types of alkaline serine proteases produced by an alkalophilic actinomyces. *Journal of Appl. Bacteriol.*, 69, 520–529.
- Wesołowska-Trojanowska M., Targoński Z., Udeh K., 2005. Porównanie hodowli okresowych *Trichoderma reesei* M-7 na podłożu z czystą laktozą i serwatką. *Acta Sci. Pol., Biotechnol.*, 4, 1–2, 21–32.
- Xiong H. von Weymarn N., Leisola M., Turunen O., 2004. Influence of pH on the production of xylanases by *Trichoderma reesei* RUT C-30. *Process Biochemistry*, 39, 6, 729–733.

**COMPARATIVE STUDIES OF MUTANTS *TRICHODERMA REESEI RUT-C30*,
TRICHODERMA REESEI 18/14 AND *TRICHODERMA REESEI 18/15* UNDER
CONTINUOUS CULTIVATIONS IN A MEDIUM CONTAINING UNDILUTED
WHEY WITH MINERAL SALTS FORTIFICATION**

Abstract. Comparing the production of extracellular enzymes by the examined mutants *Trichoderma reesei RUT-C30*, *Trichoderma reesei 18/14*, *Trichoderma reesei 18/15* under continuous cultivations in a medium containing undiluted whey with mineral salts fortification, it was found that the strain *Trichoderma reesei 18/15* showed the highest FPU and xylanolytic activities with low proteolytic activity after continuous cultivation.

Key words: celulase, xylanase *Trichoderma reesei RUT-C30*, *Trichoderma reesei 18/14* and *Trichoderma reesei 18/15*, whey, continuous cultivation

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 30.09.2010

Do cytowania – For citation: Wesółowska-Trojanowska M., Targoński Z., 2010. Porównanie hodowli ciągłych mutantów *Trichoderma reesei RUT-C30*, *Trichoderma reesei 18/14*, *Trichoderma reesei 18/15* na podłożu z nierozcieńczoną serwatką wzbogaconą w sole mineralne. Acta Sci. Pol. Biotechnol., 9(3), 15–26.

AKTYWNOŚĆ PRZECIWUTLENIAJĄCA ENZYMATYCZNYCH HYDROLIZATÓW PREPARATU FOSWITYNOWEGO OTRZYMANEGO Z JAJ KURZYCH

Aleksandra Zambrowicz, Tadeusz Trziszka

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Streszczenie. Przedmiotem badań była ocena właściwości przeciwutleniających hydrolizatów preparatu foswitynowego z jaj kurzych. Hydrolizę prowadzono z udziałem trypsyny wołowej i z proteazy z *A. melleus*. Wyznaczono stopień hydrolizy (DH), stężenie wolnych grup aminowych i przedstawiono profile RP-HPLC uzyskanych peptydów. W produktach oznaczano: zdolność do wymiatania wolnych rodników DPPH, chelatowania jonów żelaza (II) (FRAP) oraz siłę redukującą. Finalny stopień hydrolizy wyniósł: 33,7 i 23,2% odpowiednio dla proteazy z *A. melleus* i dla trypsyny. Potwierdzono to analizą przyrostu wolnych grup aminowych, których końcowe stężenie osiągnęło: $3816 \mu\text{M} \cdot \text{g}^{-1}$ i $1198,5 \mu\text{M} \cdot \text{g}^{-1}$ dla proteazy z *A. melleus* i dla trypsyny. 24-godz. hydrolizat trypsynowy ($0,27 \mu\text{M Trolox} \cdot \text{mg}^{-1}$) wykazał większą zdolność wymiatania wolnych rodników DPPH niż hydrolizat otrzymany proteazą z *A. melleus* ($0,21 \mu\text{M Trolox} \cdot \text{mg}^{-1}$). Uzyskane hydrolizaty charakteryzowały się bardzo wysoką zdolnością chelatowania jonów Fe (II). Najwyższy poziom tej aktywności wynoszący: $1466,3 \mu\text{g Fe}^{2+} \cdot \text{mg}^{-1}$ uzyskano dla hydrolizatu (24-godz.) otrzymanego z zastosowaniem proteazy z *A. melleus*.

Słowa kluczowe: foswityna, hydrolizat, aktywność przeciwutleniająca, DPPH, FRAP

WSTĘP

Wolne rodniki są niezbędnymi mediatorami wielu kluczowych reakcji biologicznych. Mogą również niszczyć makrocząsteczki, wywołując stres oksydacyjny, którego konsekwencjami są: fragmentacja lipidów lub ich zmiany strukturalne, denaturacja białek, zaburzenia w mechanizmach replikacji DNA oraz deformacje organelli komórkowych [Brera i in. 2000, Alsan i Ozben 2004]. Patologiczna reakcja tych procesów prowadzi do rozwoju np. łagodnych i złośliwych nowotworów [Czczot i in. 2006].

* Praca wykonana w ramach Projektu Rozwojowego Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego nr R0502103.

Adres do korespondencji – Corresponding author: Aleksandra Zambrowicz, Katedra Technologii Surowców Zwierzęcych i Zarządzania Jakością, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, ul. Norwida 25/27, 50-375 Wrocław, e-mail: graskiewicz@o2.pl.

Wolne rodniki są też przyczyną oksydacji lipidów w produktach żywnościowych. Prowadzi to do utraty właściwości zdrowotnych, poprzez powstawanie toksycznych produktów reakcji utleniania, a także do pogorszenia cech sensorycznych żywności. Ze względu na wysoką efektywność działania syntetyczne przeciwutleniacze takie jak: butylohydroksyanizol, butylohydroksytoluen czy galusan propylu należą do najczęściej stosowanych substancji zapobiegających tym procesom w przemyśle spożywczym [Park i in. 2001]. Jednakże konsument, ze względu na coraz większą świadomość tego, że spożywanie naturalnej żywności może ograniczyć ryzyko występowania chorób dietozależnych, wykazuje coraz mniejsze zainteresowanie produktami spożywczymi z dodatkiem syntetycznych konserwantów.

Alternatywą dla tych substancji są związki pochodzenia naturalnego, np. hydrolizaty białek żywnościowych. W wielu badaniach stwierdzono, że hydrolizaty β -konglicyniny, miofibryli wołowych czy owoalbuminy wykazują wysoką aktywność przeciwutleniającą [Chen i in. 1995, Saiga i in. 2003, Davalõs i in. 2004].

Aktywność przeciwutleniająca peptydów uwarunkowana jest ich masą cząsteczkową oraz rodzajem i pozycją reszt aminokwasowych zawartych w strukturze [Park i in. 2001]. Aktywność ta wynika między innymi z obecności takich aminokwasów jak histydyna, tyrozyna i tryptofan, które wykazują zdolność do łatwego odszczepiania wodoru, będącego donorem elektronu dla wolnego rodnika dążącego do przyjęcia stabilnej formy poprzez ich sparowanie. W większości przeciwutleniających peptydów znajduje się strategiczna strefa obejmująca wyżej wymienione reszty aminokwasowe [Park i in. 2001].

Celem pracy było otrzymanie enzymatycznych hydrolizatów preparatu foswitynowego i określenie ich aktywności przeciwutleniającej.

MATERIAŁY I METODY

Enzymy: trypsyna wołowa TPCK i proteaza z *Aspergillus melleus* typ XXIII firmy Sigma. **Substrat** stanowił preparat foswitynowy otrzymany w procesie izolacji lecytyny, wg zmodyfikowanej metody Castellani i in. [2006] z żółtek jaj niosek linii Lohman Brown.

Izolacja preparatu foswitynowego. Żółtko rozcieńczano 1% NaCl (1:1 w/v) i poddano wirowaniu (1 750 x g, t = 10 min). Osad przechowywano w temp. -12°C przez 7 dni. Następnie granule rozmrożono i poddano działaniu 1,75 M NaCl (1:1,5 w/v), przez 12 h w 4°C. Po tym czasie, w procesie wirowania (17 000 RCF; 15 min, T = 4°C), odrzucono górną warstwę tłuszczową. We frakcji wodno-białkowej obniżono siłę jonową poprzez dodanie H₂O (1:4 v/v) i pozostawiono na 12 h w 4°C. Następnie zawiesinę wirowano (17 000 RCF; 15 min, T = 4°C), osad liofilizowano.

Przed rozpoczęciem hydrolizy preparat foswitynowy poddano defosforylacji. Naważkę liofilizatu rozpuszczano w 0,4 N NaOH (1:40 w/v) i inkubowano przez 3 godz. w 37°C. Następnie roztwór neutralizowano 1 N HCl, dializowano do wody przez 48 h i liofilizowano. Tak przygotowany preparat foswitynowy poddano hydrolizie enzymatycznej.

Hydroliza enzymatyczna. Reakcję rozpoczynano poprzez dodatek enzymów w stosunku: E:S = 1:50 (w/w) do roztworu białka o stężeniu 5 mg · mL⁻¹ w 0,2 M buforze Tris-HCl o pH 8,3. Hydrolizę prowadzono w temp. 37°C przez 0,5; 1; 2; 3; 4 i 24 h. Po tym

czasie reakcję przerywano poprzez ogrzanie prób we wrzącej łaźni w temp. 100°C przez 15 min. Następnie hydrolizaty, po schłodzeniu, wirowano (5 500 obr. · min⁻¹, t = 15 min, T = pokojowa). Supernatanty liofilizowano i przechowywano w temp. 4°C.

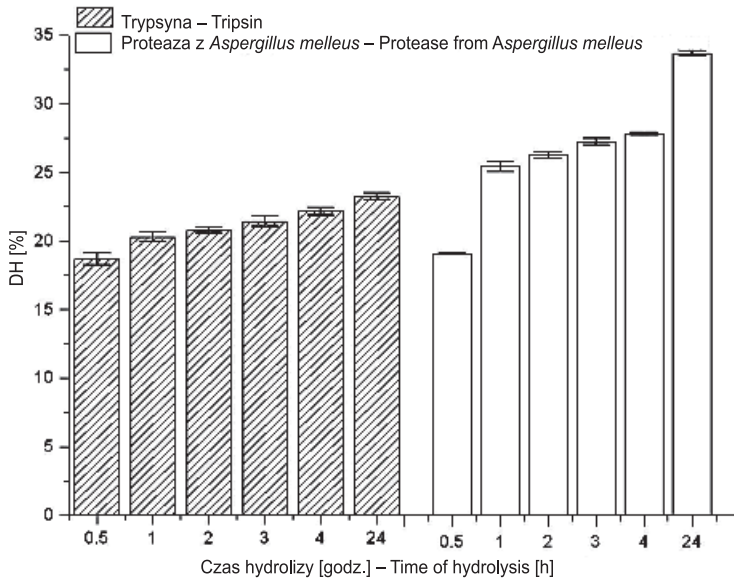
Stożenie hydrolizy (DH%) oceniono poprzez określenie stężenia peptydów rozpuszczalnych w 10% kwasie trichlorooctowym (TCA) wg Silvestre [1997] i wolnych grup aminowych oznaczanych przy użyciu kwasu trinitrobenzenosulfonowego (TNBS, Sigma) wg Kuchroo i Ramilly [1983]. Przebieg hydrolizy oceniano także poprzez analizę profili peptydowych metodą chromatografii cieczowej (RP-HPLC) w aparacie firmy Agilent Technologies. Rozdział prowadzono z zastosowaniem kolumny: Zorbax XDB C18 (250 x 4,5 mm) w fazie startowej A (0,1% TFA w H₂O), w temp. 30°C, przepływie v = 1 mL · min⁻¹ i gradientie fazy B (0,1% TFA w ACN) wynoszącym: 2% B /min od 0% (5 minuta rozdziału) do 100%. Absorbancję monitorowano przy długości fali: A₂₃₀.

Stężenie białka oznaczano spektrofotometrycznie wg Whitaker i Granum [1980] oraz kolorymetryczną metodą wg Lowry i in. [1951].

Aktywność przeciwutleniająca oceniano na podstawie zdolności enzymatycznych hydrolizatów do: wymiatania wolnych rodników 2,2-difenylo-1-pikrylhydrazylowych (DPPH) wg Yen i Chen [1995], redukcji stopnia utlenienia jonów Fe³⁺ do Fe²⁺ (FRAP) wg Benzie i Strain [1996] oraz do chelatowania jonów Fe²⁺ wg Xu i in. [2007].

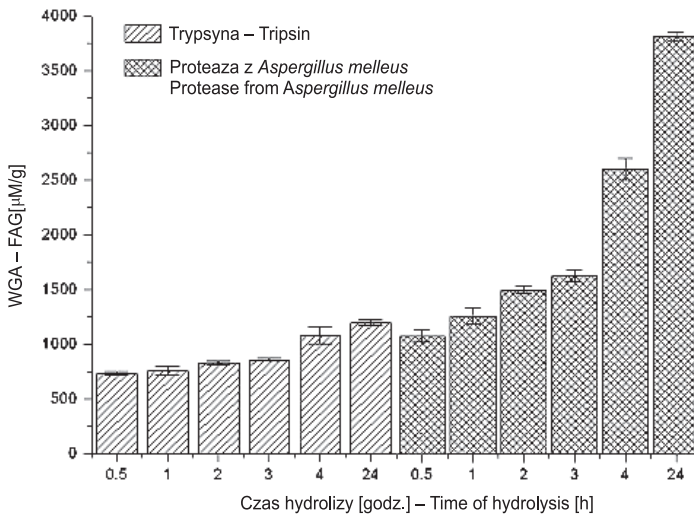
WYNIKI I Dyskusja

Preparat foswitynowy wykazał zróżnicowaną podatność na działanie zastosowanych enzymów proteolitycznych (rys. 1 i 2). Bardziej efektywnym w jego degradacji był enzym z *A. melleus*, dla którego osiągnięto DH wynoszące 33,7%. Natomiast trypsyna degradowała ten preparat na poziomie 23,2%. Towarzyszył temu też przyrost wolnych grup aminowych w trakcie reakcji. Po 24-godzinnej hydrolizie stężenie tych grup osiągnęło poziom: 3 816 μM · g⁻¹ i 1 198,5 μM · g⁻¹ odpowiednio dla enzymu z *A. melleus* i dla trypsyny. Uzyskane wyniki znajdują potwierdzenie w literaturze, w której zarówno enzymy pochodzenia mikrobiologicznego, np. *Newlase F*, *Alcalase*, jak i enzymy trawienne ssaków efektywnie wykorzystywane są do hydrolizy białek żółtka jaja [Park i in. 2001, Yoshii i in. 2001, Xu i in. 2007]. Zdolność enzymu do hydrolizy wynika z jego specyficzności, a podatność hydrolizowanego białka zależy od sekwencji aminokwasowej [Clemente 2000]. Uzyskane niższe wartości DH i stężenia wolnych grup aminowych w hydrolizatach trypsynowych można uzasadnić tym, iż trypsyna wykazuje tylko zdolność do hydrolizy wiązań peptydowych po resztach lizyny i argininy [Żelazko i in. 2007]. Zastosowanie różnych enzymów proteolitycznych pozwoliło na uzyskanie zróżnicowanych produktów degradacji, o czym świadczą przedstawione profile chromatograficzne peptydów (odmienne czasy retencji szczytów peptydowych (rys. 3A i 3B)). Preparat foswitynowy wykazał się znacznie wyższą opornością na działanie trypsyny w porównaniu z innymi białkami jaja. W badaniach przeprowadzonych na preparacie albuminowym oraz całym białku jaja przez Graszkievicz i in. [2010] i Miguel i in. [2004] uzyskano DH odpowiednio: 95,8 i 78,6%. Należy to tłumaczyć tym, że foswityna, ważne białko żółtka jaja, zawiera wysoką zawartość fosfoseryny, która nadaje charakter hydrofobowy cząsteczce, przez co utrudniony jest jej kontakt z enzymem [Xu i in. 2007].



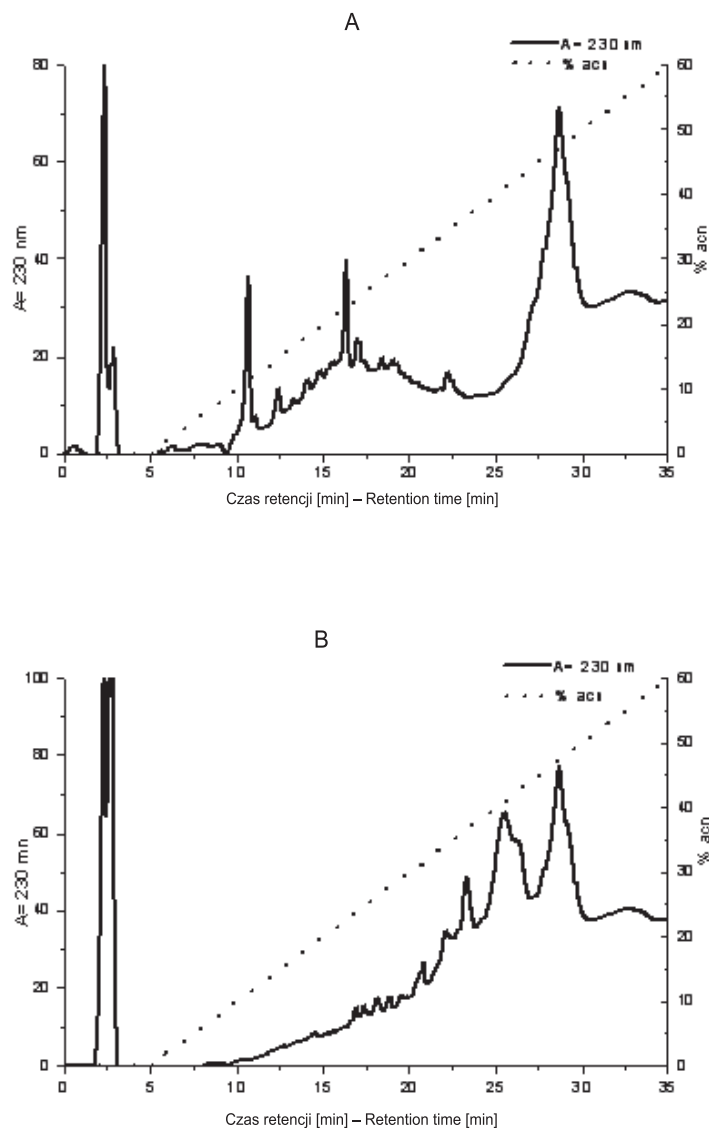
Rys. 1. Stopień hydrolizy preparatu foswitynowego z trypsyną i proteazą z *A. melleus* po różnych czasach reakcji

Fig. 1. Degree of hydrolysis of phosvitin preparation with trypsin and protease from *A. melleus* after different times



Rys. 2. Zmiany zawartości wolnych grup aminowych (WGA) w hydrolizatach preparatu foswitynowego

Fig. 2. Changes in free amino groups contents (FAG) in phosvitin hydrolysate preparation



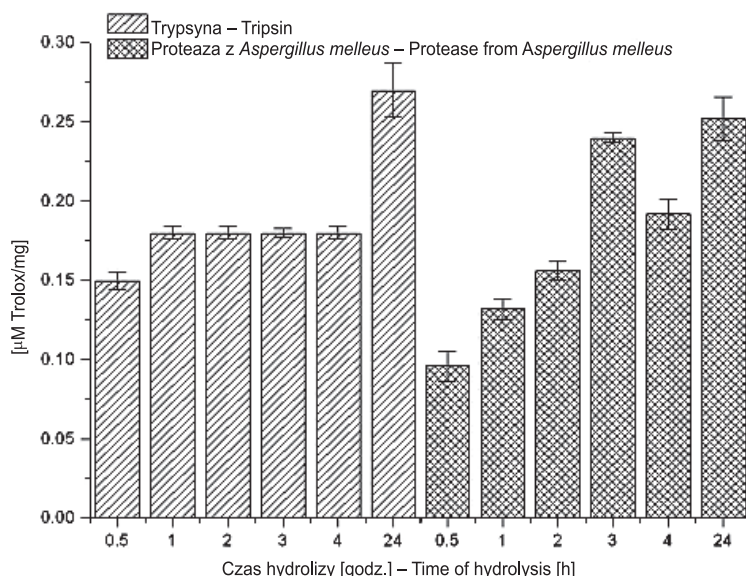
Rys. 3. Profile peptydowe (RP-HPLC) hydrolizatów preparatu foswitynowego A) z proteazą z *A. melleus*; B) z trypsyną

Fig. 3. RP-HPLC peptide profiles of phosvitin hydrolysate preparation A) with protease from *A. melleus*; B) with trypsin

Przy ocenie zdolności do wymiatania wolnych rodników DPPH przez hydrolizaty zaznaczyły się wyraźne różnice w poziomie aktywności i stopniu degradacji białka.

Najwyższą aktywność wymiatania wolnych rodników DPPH wynoszącą: $0,27 \mu\text{M Trolox} \cdot \text{mg}^{-1}$ i $0,21 \mu\text{M Troloxu} \cdot \text{mg}^{-1}$ uzyskano dla 24-godzinnych hydrolizatów trypsynowego i z udziałem proteazy z *A. melleus* (rys. 4). Natomiast produkty częściowej degra-

dadzi preparatu foswitynowego wykazały nieco niższą zdolność do wymiatania wolnych rodników DPPH. Podobne wyniki uzyskali Xu i in. [2007] dla frakcji trypsynowych hydrolizatów foswityny, które wykazały zdolność do wymiatania wolnych rodników DPPH w 17,5%. Jest to zgodne z twierdzeniem Iwaniaka i Minkiewicza [2007], według których trypsyna jest odpowiednim enzymem służącym generowaniu przeciwutleniających peptydów. Poprzez uwalnianie reszty lizyny na C-końcu fragmentu białkowego trypsyna nadaje peptydowi właściwości przeciwutleniające. Także Tsuge i in. [1991] wyizolowali z hydrolizatu protein białka jaja antyoksydacyjny fragment posiadający na N-końcu łańcucha peptydowego resztę lizyny (Ala-His-Lys), potwierdzając rolę tego aminokwasu w kształtowaniu aktywności przeciwutleniającej.



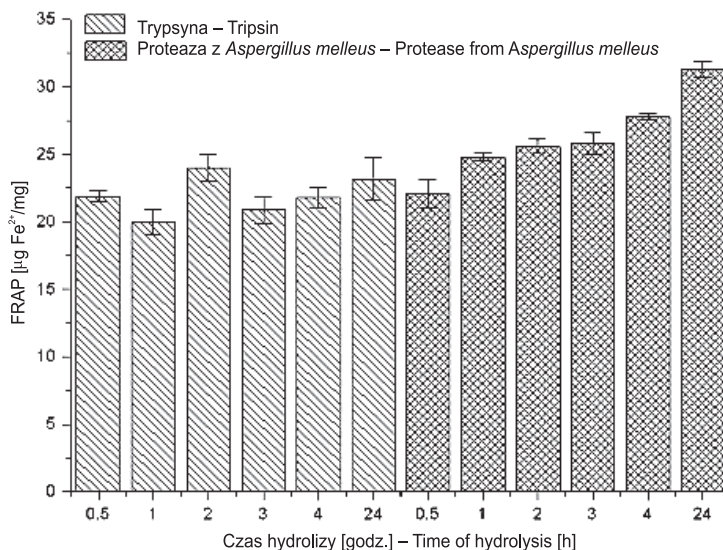
Rys. 4. Zdolność wymiatania wolnych rodników DPPH hydrolizatów preparatu foswitynowego z trypsyną i z proteazą z *A. melleus*

Fig. 4. Free radical (DPPH) scavenging activity of phosvitin hydrolysate preparation with trypsin and with protease from *A. melleus*

Przy ocenie zdolności redukującej nie stwierdzono w hydrolizatach trypsynowych wpływu czasu hydrolizy na wzrost tej aktywności, dla której uzyskano poziom w zakresie od: 20 do 24 $\mu\text{g Fe}^{2+} \cdot \text{mg}^{-1}$ (rys. 5). Natomiast w przypadku hydrolizatów z proteazą z *A. melleus* zdolność redukująca wzrastała, osiągając końcową wartość równą: 31,3 $\mu\text{g Fe}^{2+} \cdot \text{mg}^{-1}$. Wyniki te podważają stwierdzenie Flaczyk [2005], według której hydrolizaty białek zwierzęcych wykazują niewielką zdolność redukującą w porównaniu z preparatami roślinnymi. Podobnie Zambrowicz [2009] wykazała nieznaczną aktywność redukującą (5 $\mu\text{g Fe}^{2+} \cdot \text{mg}^{-1}$) hydrolizatów preparatu owoalbuminowego.

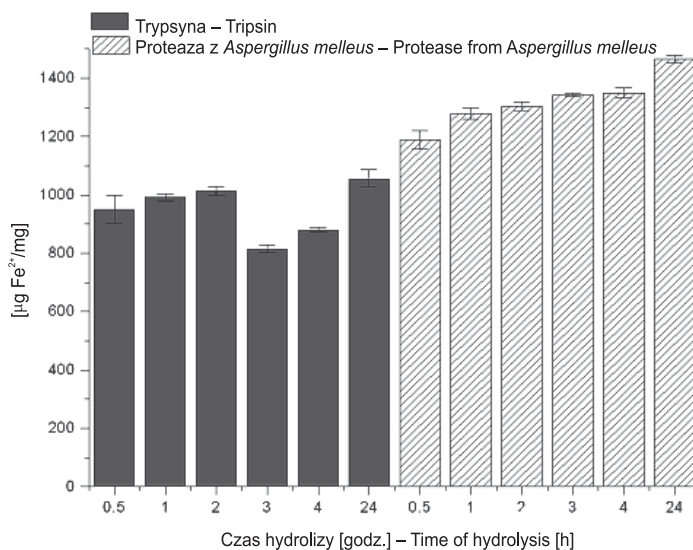
Badane hydrolizaty wykazały wysoką zdolność do chelatowania jonów metali. Najwyższą aktywność chelatowania jonów Fe^{2+} uzyskano dla 24-godzinnej hydrolizatu uzyskanego z udziałem proteazy z *A. melleus*, której wartość wyniosła: 1466,3 $\mu\text{g Fe}^{2+} \cdot \text{mg}^{-1}$

(rys. 6). Natomiast dla 24-godzinnej hydrolizatu trypsynowego poziom tej aktywności był ponad 30% niższy.



Rys. 5. Zdolność do redukcji stopnia utlenienia jonów żelaza (FRAP) hydrolizatów preparatu fosfitynowego z trypsyną i z proteazą z *A. melleus*

Fig. 5. The ferric reducing ability (FRAP) of phosphitin hydrolysate preparation with trypsin and protease from *A. melleus*



Rys. 6. Zdolność chelatowania jonów żelaza (II) hydrolizatów preparatu fosfitynowego otrzymanych z trypsyną i z proteazą z *A. melleus*

Fig. 6. Chelating activity on iron (II) of phosphitin hydrolysate preparation with trypsin and protease from *A. melleus*

Hydroliza foswityny trypsyną prowadzi do otrzymania małych peptydów posiadających fosfoserynowe ligandy, które znacznie łatwiej i silniej wiążą jony żelaza niż sama foswityna, co potwierdzają wyniki badań Xu i in. [2007].

Foswityna, poprzez zdolność do chelatowania jonów metali, które propagują reakcję utleniania, jest przeciwutleniaczem. Dzięki temu także jest nośnikiem poprawiającym przyswajanie metali (np. jonów żelaza) przez organizm. Ze względu na to, że stanowi białko odporne na hydrolizę, biodostępność żelaza przez nie związanego jest bardzo ograniczona [Choi i in. 2005]. Dlatego hydroliza foswityny w celu wytworzenia m.in. peptydów o zdolności wiązania jonów żelaza jest w pełni uzasadniona.

WNIOSKI

1. Proteaza z *A. melleus* wykazała wyższą zdolność proteolityczną niż trypsyna w procesie hydrolizy preparatu foswitynowego.
2. Zastosowanie enzymów o odmiennej specyficzności pozwoliło na otrzymanie zróżnicowanych produktów degradacji preparatu foswitynowego.
3. Możliwe jest otrzymanie z preparatu foswitynowego hydrolizatów wykazujących aktywność przeciwutleniającą, której poziom zależy od rodzaju zastosowanego enzymu i czasu trwania reakcji hydrolizy.

PIŚMIENNICTWO

- Alsan M., Ozben T., 2004. Reactive oxygen and nitrogen species in Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res.*, 2, 111–119.
- Benzie I.F.F., Strain J.J., 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant Power": the FRAP assay. *Anal. Biochem.*, 293, 70–76.
- Brera B., Serrano A., de Ceballos M.L., 2000. β -amyloid peptides are cytotoxic to astrocytes in culture: a role for oxidative stress. *Neurobiol. Dis.*, 7, 395–405.
- Castellani O., Belhomme C., David-Briand E., Guérin-Dubiard C., Anton M., 2006. Oil-in-water emulsion properties and interfacial characteristics of hen egg yolk phosvitin. *Food Hydrocolloids*, 20, 35–43.
- Chen H.M., Muramoto K., Yamauchi F., 1995. Structural analysis of antioxidative peptides from soybean β -conglycinin. *J. Agric. Food Chem.*, 43, 574–578.
- Choi I., Jung, C., Choi H., Kim C., Ha H., 2005. Effectiveness of phosvitin peptides on enhancing bioavailability of calcium and its accumulation in bones. *Food Chem.*, 93, 577–583.
- Clemente A., 2000. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. *Trends Food Sci. Technol.*, 11: 254–262.
- Czczot A., Ścibior D., Skrzycki M., Podsiad M., 2006. Aktywność enzymów antyoksydacyjnych u chorych z marskością wątroby. *Wiadomości Lekarskie*, LIX, 11–12, 762–766.
- Davalòs A., Miguel M., Bartolome B., López-Fandiño R., 2004. Antioxidant activity of peptides derived from egg white proteins by enzymatic hydrolysis. *J. Food Prot.*, 67, 1939–1944.
- Flaczyk E., 2005. Właściwości przeciwutleniające enzymatycznych i kwasowych hydrolizatów białkowych ze szczególnym uwzględnieniem ich aktywności wobec cholesterolu. *Roczniki Akademii Rolniczej w Poznaniu*, 361, 1–39.
- Graszkiewicz A., Żelazko M., Trziszka T., 2010. Application of pancreatic enzymes in hydrolysis of egg-white proteins. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 60, 1, 57–61.

- Iwaniak A., Minkiewicz P., 2007. Proteins as the source of physiologically and functionally active peptides. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.*, 6, 3, 5–15.
- Kuchroo C.N., Ramilly J., Fox P.F., 1983. Assessment of proteolysis in cheese of reaction with trinitrobenzene sulphonic-acid. *Irish J. Food Sci. Technol.*, 7, 129–133.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randal R.J., 1951. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265–275.
- Miguel M., Recio I., Gomez-Ruiz J.A., Ramos M., Lopez-Fandino R., 2004. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of peptides derived from egg white proteins by enzymatic hydrolysis. *J. Food Prot.*, 67, 1914–1920.
- Park P.J., Jung W.K., Nam K.S., Shahidi F., Kim S.K., 2001. Purification and characterization of antioxidative peptides from protein hydrolysate of lectin-free egg yolk. *JAOCS*, 78, 6, 651–656.
- Saiga A., Tanabe S., Nishimura T., 2003. Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 3661–3667.
- Silvestre M.P.C., 1997. Review of methods for the analysis of protein hydrolysates. *Food Chem.*, 60, 263–271.
- Tsuge N., Eikawa Y., Nomura Y., Yamamoto M., Sugisawa K., 1991. Antioxidative activity of peptides prepared by enzymatic hydrolysis of egg white albumin. *Nippon Nogeikagaku Kassi*, 65, 1635–1641.
- Whitaker J.R., Granum P.E., 1980. An absolute method for protein determination based on difference in absorbance at 235 and 280. *Anal. Biochem.*, 109, 156–159.
- Xu X., Katayama S., Mine Y., 2007. Antioxidant activity of tryptic digest of hen egg yolk phosphatidylcholine. *J. Sci. Food Agric.*, 87, 2604–2608.
- Yen G.C., Chen H.Y., 1995. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *J. Agric. Food Chem.*, 43, 27–32.
- Yoshii H., Tachi N., Ohba R., Sakamura O., Takeyama H., Itani T., 2001. Antihypertensive effect of ACE inhibitory oligopeptides from chicken egg yolks. *Comp. Biochem. Phys.*, (C), 128, 27–33.
- Zambowicz A., 2009. Wytwarzanie bioaktywnych peptydów z białek jaja na drodze hydrolizy enzymatycznej. Praca doktorska wykonana w Katedrze Technologii Surowców Zwierzęcych i Zarządzania Jakością Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu.
- Żelazko M., Chrzanowska J., Polanowski A., 2007. Pancreatic proteinases species diversity and the appending feeding and biotechnological implications. *Biotechnol.*, 1, 107–120.

THE ANTIOXIDANT ACTIVITY OF ENZYMATIC HYDROLYSATES OF PHOSVITIN PREPARATION OBTAINED FROM HEN EGGS

Abstract. The antioxidative properties of hen egg phosvitin hydrolysate preparations were studied. Hydrolysis was performed using the bovine trypsin and protease from *A. melleus*. The progress and kinetics of the hydrolysis were analyzed by monitoring the degree of hydrolysis (DH), free amino group content and the RP-HPLC profiles of resulted peptides. The radical scavenging capacity on DPPH, ferric reducing activity (FRAP) and chelating activity on iron (II) were measured.

The degrees of hydrolysis of final hydrolysates were 33,7% and 23,2% for protease from *A. melleus* and trypsin, respectively. The progress of reaction was also confirmed by determination of the free amino group content, which finally reached $3816 \mu\text{M} \cdot \text{g}^{-1}$ and $1198,5 \mu\text{M} \cdot \text{g}^{-1}$ for protease from *A. melleus* and trypsin. The twenty four-hour tryptic hydrolysate ($0,27 \mu\text{M Trolox} \cdot \text{mg}^{-1}$) exhibited stronger scavenging activity on DPPH free radicals than that of protease from *A. melleus* ($0,21 \mu\text{M Trolox} \cdot \text{mg}^{-1}$). The hydrolysates exhibited also very strong chelating activity on iron (II). The hydrolysate with protease from *A. melleus* (24 -h) showed the highest level of this activity: $1466,3 \mu\text{g Fe}^{2+} \cdot \text{mg}^{-1}$.

Key words: phosvitin, hydrolysate, antioxidant activity, DPPH, FRAP

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 30.09.2010

Do cytowania – For citation: Zambrowicz A., Trziszka T., 2010. Aktywność przeciwutleniająca enzymatycznych hydrolizatów preparatu foswitynowego otrzymanego z jaj kurzych. Acta Sci. Pol. Biotechnol., 9(3), 27–36.

SPIS TREŚCI CONTENTS

Edyta Lipińska, Stanisław Błażej, Krzysztof Markowski

- Koncepcja wykorzystania gliceryny odpadowej z produkcji biodiesla jako źródła węgla dla drożdży *Candida utilis* w kulturze mieszanej z bakteriami octowymi 3
- Possibility of using glycerol from biodiesel production as a source of carbon in mixed culture *Candida utilis* yeast and acetic acid bacteria

Marta Wesołowska-Trojanowska, Zdzisław Targoński

- Porównanie hodowli ciągłych mutantów *Trichoderma reesei* RUT-C30, *Trichoderma reesei* 18/14, *Trichoderma reesei* 18/15 na podłożu z nierozcieńczoną serwatką wzbogaconą w sole mineralne 15
- Comparative studies of mutants *Trichoderma reesei* RUT-C30, *Trichoderma reesei* 18/14 and *Trichoderma reesei* 18/15 under continuous cultivations in a medium containing undiluted whey with mineral salts fortification

Aleksandra Zambrowicz, Tadeusz Trziszka

- Aktywność przeciwutleniająca enzymatycznych hydrolizatów preparatu foswitynowego otrzymanego z jaj kurzych 27
- The antioxidant activity of enzymatic hydrolysates of phosvitin preparation obtained from hen eggs