

ACTA SCIENTIARUM POLONORUM

Czasopismo naukowe założone w 2001 roku przez polskie uczelnie rolnicze

Biotechnologia

Biotechnologia

Biotechnology

12 (2) 2013



Bydgoszcz Kraków Lublin Olsztyn
Poznań Siedlce Szczecin Warszawa Wrocław

Executive Board of *Acta Scientiarum Polonorum*

Jerzy Sobota (Wrocław) – chairman

Wiesław Nagórko (Warszawa), Janusz Falkowski (Olsztyn), Florian Gambuś (Kraków),
Franciszek Kluza (Lublin), Janusz Prusiński (Bydgoszcz), Stanisław Socha (Siedlce),
Waldemar Uchman (Poznań), Bogdan Lasota (Szczecin)

Scientific Board of *Biotechnology*

Danuta Witkowska (Wrocław University of Environmental and Life Sciences, Poland) – chairman
e-mail: danuta.witkowska@up.wroc.pl

Włodzimierz Bednarski (University of Warmia and Mazury, Olsztyn, Poland),
Włodzimierz Grajek (Poznań University of Life Sciences, Poland), Anna Maraz (Corvinus
University Budapest, Hungary), Zdzisław Targoński (Lublin University of Life Science, Poland)
Vesna Zechner-Krpan (University of Zagreb, Croatia)

Covered by: Agro, Ulrich's Database, Copernicus Index, EBSCOhost

ISSN 1644–065X (print) ISSN 2083–8654 (on-line)

Print edition is an original (reference) edition

Cover design
Daniel Morzyński

Text editor
Ewa Jaworska, e-mail: ewa.jaworska@up.wroc.pl

© Copyright by Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
Sopocka 23, 50-344 Wrocław, Poland
e-mail: wyd@up.wroc.pl <http://www.up.wroc.pl>

Printed: 150 + 16 copies Publishing sheets: 2,9 Printing sheets: 2,5

Druk i oprawa: Drukarnia PRINT Sp. j.
Z. Przyborowski, H. Ambroży
ul. Wykładowa 62, 51-520 Wrocław

Szanowni Państwo,

Przekazujemy Państwu kolejny zeszyt ACTA SCIENTARUM POLONORUM serii Biotechnologia, czasopisma naukowego wydawanego przez wszystkie polskie uczelnie rolnicze i przyrodnicze w 14 seriach. Seria Biotechnologia ukazuje się nakładem Wydawnictwa Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu od 2002 roku.

Czasopismo nasze publikuje oryginalne prace z zakresu biotechnologii drobnoustrojów, roślin i zwierząt, z naciskiem na aspekty praktyczne. Publikowane są oryginalne prace badawcze, a także artykuły o charakterze monograficznym, w języku polskim lub angielskim ze streszczeniami w obu językach. Wszystkie opisy rysunków i tabel są dwujęzyczne. Prace są recenzowane przez najlepszych specjalistów z danej dziedziny.

Od 2007 roku czasopismo wydawane jest jako kwartalnik. Wymogi redakcyjne oraz szczegóły dotyczące przygotowania artykułu można znaleźć na stronie www.acta.media.pl

Zespół Redakcyjny

Dear Readers,

It is great pleasure to introduce you the next issue of ACTA SCIENTARUM POLONORUM Biotechnologia, a scientific journal published by all polish universities of environmental sciences. The series of Biotechnologia is released by publishing house of Wroclaw University of Environmental and Life Sciences since 2002.

The journal publishes original papers in the field of biotechnology of microorganisms, plants and animals with emphasis on practical aspects. There are published both original research articles and monographs, in Polish or English, with abstracts in both languages. The all figures' and tables' captions are bilingual. The papers are reviewed by the best specialists in the field. This issue is also dominated by the application problems.

Since 2007 the journal has been published as quarterly. The editorial requirements and details concerning the instruction for authors can be found et: www.media.pl.

Editorial Team

DOBÓR PODŁOŻA INOKULACYJNEGO DO PRODUKCJI KETOKWASÓW PRZEZ DROŹDŻE *YARROWIA LIPOLYTICA*

Krzysztof Cybulski, Ludwika Tomaszewska, Anita Rywińska

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Streszczenie. Celem pracy była ocena wpływu podłoża inokulacyjnego (YNB lub podłoże mineralne) oraz rodzaju wprowadzonego namoku kukurydzianego (sypki lub płynny) na biosyntezę kwasu pirogronowego i α -ketoglutazarowego z glicerolu odpadowego przez drożdże *Yarrowia lipolytica* A-10. Hodowle okresowe były prowadzone do wyczerpania substratu ($100 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ glicerolu) i trwały 68–118 godz. Drożdże produkowały od 30,4 do $35,8 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ kwasu pirogronowego oraz od 14,4 do $17,9 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ α -ketoglutazarowego. Przy zastosowaniu YNB jako podłoża inokulacyjnego uzyskano wyższe wartości szybkości objętościowej produkcji obu kwasów. Wydajność produkcji kwasu α -ketoglutazarowego była zbliżona we wszystkich wariantach hodowlanych, natomiast najwyższą wartość tego parametru dla kwasu pirogronowego, $0,35 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$, uzyskano przy wykorzystaniu mineralnego podłoża inokulacyjnego i namoku płynnego. Najwyższą procentową zawartość białka, około 38%, oznaczono w biomasie drożdży i otrzymano, używając podłoża mineralnego.

Słowa kluczowe: *Yarrowia lipolytica*, kwas pirogronowy, kwas α -ketoglutazarowy, glicerol odpadowy

WSTĘP

Ketokwasy takie jak kwas α -ketoglutazarowy (KGA) i pirogronowy (PA) pełnią istotną rolę w metabolizmie komórkowym. Pięciowęglowy KGA powstaje jako produkt pośredni cyklu Krebsa w reakcji dekarboksylacji izocytrynianu z udziałem dehydrogenazy izocytrynianowej lub na drodze deaminacji kwasu glutaminowego. Jego rola w komórkach mikroorganizmów polega na swoistym łączeniu metabolizmu aminokwasów, węglowodanów, węglowodorów i tłuszczów [Sauer i in. 2008]. Natomiast PA, inaczej kwas 2-oksopropanowy, jest końcowym produktem glikolizy. Powstaje pośrednio z aldehydu 3-fosfoglicerynowego, który jest produktem metabolizmu węglowodanów i lipidów.

© Copyright by Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Adres do korespondencji – Corresponding author: Krzysztof Cybulski, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Wydział Nauk o Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, ul. Chelmońskiego 37/41, 51-630 Wrocław, adres e-mail: cybulski.krzysiek@gmail.com

Pirogronian jest również wykorzystywany w organizmie do syntezy glukozy jako podstawowy substrat w glukoneogenezie.

Oprócz pełnienia ważnych funkcji metabolicznych wymienione ketokwasy mają szerokie zastosowanie w przemyśle. KGA wykorzystuje się jako substrat w syntezie chemicznej związków heterocyklicznych, składnik suplementów diety oraz dodatek do odżywek dla kulturystów [Chernyavskaya i in. 2000]. KGA w połączeniu z 5-hydroksymetylenofurfurałem jest doskonałym antyoksydantem pozwalającym obniżyć tzw. stres oksydacyjny spowodowany wolnymi rodnikami [Moser i in. 2007]. Barrett i Yousaf [2008] opisali termiczną kondensację KGA z trójpodstawionymi cząsteczkami glicerolu: 1,2,4-butantriolem lub 1,2,6-heksantriolem. Powstający poli(triol- α -ketoglutaranu) okazał się elastomerem o zróżnicowanych właściwościach chemicznych oraz mechanicznych i może znaleźć zastosowanie w biomedycynie, inżynierii tkankowej, a także – ze względu na biodegradowalność – może być wykorzystywany jako nośnik leków. Żywiec chitozanowe modyfikowane KGA mogą służyć jako sorbent usprawniający usuwanie barwników oraz jonów Cu^{2+} z roztworów wodnych [Zhou i in. 2009, Gong i in. 2010]. PA jest używany przede wszystkim jako substrat przy syntezie chemicznej farmaceutyków, między innymi L-tyrozyny, 4-dihydroksyfenylo-L-alaniny, kwasu N-acetylo-D-neuraminowego i (R)-fenyloacetylokarabinolu [Yamada i in. 1972, Gunawan i in. 2007, Lee i in. 2007, Lütke-Eversloh i in. 2007]. Kwas ten znajduje również zastosowanie jako suplement diety wspomagający kontrolę masy ciała, antyoksydant i nutraceutyk w leczeniu cukrzycy typu drugiego [Stanko i in. 1992, McCarty 2000, Koh-Banerjee i in. 2005, Wang i in. 2007]. Roufs [1996] dowiódł, że stosowanie pirogronianu wapnia napędza metabolizm tłuszczów w ludzkim organizmie, przyspieszając tym samym proces odchudzania. PA jest również cennym substratem do produkcji polimerów, kosmetyków, dodatków do żywności, a w niedługim czasie być może przypraw nadających kwaśny smak potrawom [Li i in. 2001].

Obecnie KGA i PA produkowane są przemysłowo na drodze syntezy chemicznej. Proces charakteryzuje się niską wydajnością, wysokimi kosztami odczynników, dużym nakładem energii i powstawaniem niebezpiecznych dla środowiska naturalnego odpadów. Wykorzystanie w tym celu mikroorganizmów może spowodować, że proces produkcji tych kwasów okaże się dużo bardziej atrakcyjny, szczególnie w aspekcie zagospodarowania odpadowych produktów z przemysłu jako źródła węgla i energii w procesie. Liczne pozycje literaturowe donoszą o możliwości wykorzystania bakterii i drożdży w biosyntezie kwasu α -ketoglutarowego i pirogronowego z glukozy lub węglowodorów [Li i in. 2001, Xu i in. 2008, Otto i in. 2011]. Najczęściej wymienianym producentem ketokwasów wśród drożdży jest *Torulopsis glabrata*. Warto jednak zaznaczyć, że gatunek ten jest auksotrofem aż czterech witamin, a proces nadprodukcji KGA i PA możliwy jest tylko w złożonej, dobrze zbilansowanej pożywce. Skromniejsze wymagania pokarmowe prezentują drożdże z gatunku *Y. lipolytica* będące auksotrofem wyłącznie w stosunku do tiaminy (witamina B₁) i posiadające zdolność do utylizacji szerokiego spektrum substratów [Coelho i in. 2010]. Dodatkowo, drożdże te odporne są na wysokie stężenie glukozy, glicerolu, NaCl oraz składników mineralnych i pierwiastków śladowych w środowisku, zwłaszcza manganu i żelaza, co jest ważne przy stosowaniu podłoża naturalnych.

Pierwsze wzmianki o zastosowaniu drożdży *Y. lipolytica* do produkcji KGA pojawiły się w roku 1969, kiedy Tsugawa i in. opracowali proces biosyntezy KGA, używając jako źródła węgla 8% n-parafin. Zastosowany szczep – *Candida lipolytica* AJ5004 (w 1980 r.

przemianowany na *Y. lipolytica* AJ5004) pozwalał na otrzymanie $46 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ KGA w czasie 72 godz. Na początku lat 70. badano także zdolność do biosyntezy KGA z alkanów [Finogenova i in. 2005]. Uzyskano $108,7 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ tego kwasu z wydajnością $1,2 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$. Do badania biosyntezy KGA i PA przez drożdże *Y. lipolytica* powrócono w na przełomie XX i XXI w. Otrzymano m.in. $49 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ KGA z etanolu [Chernyavskaya i in. 2000], $39,2 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ KGA z glicerolu [Zhou i in. 2010] oraz $61,3 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ PA z glicerolu [Morgunov i in. 2004].

Celem pracy jest ocena wpływu stosowanego podłoża inokulacyjnego oraz postaci wprowadzonej do podłoża tiaminy na wydajność i efektywność produkcji PA i KGA z odpadowego glicerolu przy udziale drożdży *Y. lipolytica* A-10.

MATERIAŁ I METODY

Mikroorganizm. W badaniach zastosowano dziki (naturalny) szczep drożdży *Y. lipolytica* A-10 pochodzący z kolekcji własnej Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Szczep przechowywano na skosach z podłożem YM w temperaturze 4°C .

Podłoża. Zastosowano dwa podłoża inokulacyjne: na bazie gotowego podłoża YNB (Yeast Nitrogen Base) [Sigma-Aldrich 2012] oraz podłoże zawierające sole mineralne. Skład podłoża inokulacyjnego **YNB** obejmował ($\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$): glicerol kosmetyczny – 50; YNB – 0,67; woda destylowana do 1 litra. Podłoże inokulacyjne **mineralne** miało skład ($\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$): glicerol kosmetyczny – 50; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 5; KH_2PO_4 – 1,0; $\text{MgSO}_4 \cdot (7\text{H}_2\text{O})$ – 0,7; NaCl – 0,5; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot (4\text{H}_2\text{O})$ – 0,4; K_2HPO_4 – 0,1; chlorowodorek tiaminy – $0,5 \mu\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$; woda destylowana do 1 litra. W skład podłoża produkcyjnego wchodziły ($\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$): glicerol odpadowy – 100; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 10; KH_2PO_4 – 2; $\text{MgSO}_4 \cdot (7\text{H}_2\text{O})$ – 1,4; NaCl – 1,0; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot (4\text{H}_2\text{O})$ – 0,8; jako źródło tiaminy zastosowano namok kukurydziany w formie sypkiej lub płynnej (Sigma-Aldrich) – 0,02; woda wodociągowa do 1 litra. Podłoża sterylizowano w 121°C przez 20 minut.

Surowiec. Do badań używano oczyszczonego glicerolu odpadowego pochodzącego z produkcji biodiesla (rafineria Trzebinia – Grupa Lotos) zawierającego 76% (v/w) glicerolu i 4% (v/w) NaCl. W badaniach używano $131,5 \text{ g}$ glicerolu odpadowego jako ekwiwalent 100 g czystego glicerolu.

Warunki hodowli. Hodowle inokulacyjne prowadzono w 250 cm^3 kolbach Erlenmayera zawierających 100 cm^3 odpowiedniego podłoża. Namnażanie biomasy prowadzono przez 72 godziny w temperaturze 30°C na wstrząsarce typu CERTOMAT IS (Sartorius Stedim Biotech GmbH) przy 140 rpm. Do zaszczepienia podłoża produkcyjnego używano 200 cm^3 medium inokulacyjnego. Biosynteza ketokwasów prowadzona była w 5-litrowym bioreaktorze Biostat B+ (Sartorius, Niemcy) przy objętości roboczej 2 dm^3 , napowietrzaniu $0,6 \text{ vvm}$, w temperaturze 30°C . Szybkość mieszania wynosiła 800 rpm, a odczyn podłoża w trakcie procesu utrzymywano automatycznie na poziomie $\text{pH} = 3,5$ poprzez dodatek 40% NaOH.

Metody analityczne. Biomaseę oznaczano metodą wagową – separowano na filtrze membranowym Millipore o porowatości $0,45 \mu\text{m}$, przemywano wodą destylowaną i dosuszano do stałej masy w temperaturze 105°C . Stężenie białka w biomasie określano metodą biuretową [Stewart 1975]. Stężenie glicerolu, kwasu pirogronowego i α -ketoglutarowego

oznaczano metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) na kolumnie HyperRez XP carbohydrate H⁺ (Dionex, UltiMate 3000 Series) podłączonej do dwóch detektorów: UV ($\lambda = 210$ nm) i IR w temperaturze 65°C. Analiza prowadzona była przy szybkości przepływu fazy ciekłej (25 mM kwas trifluoroctowy; TFA) wynoszącej $0,6 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$.

SPIS UŻYTYCH SYMBOLI

PA – kwas pirogronowy – pyruvic acid

KGA – kwas α -ketoglutazarowy – α -ketoglutaric acid

Q_{KGA} – objętościowa szybkość produkcji kwasu α -ketoglutazarowego – volumetric α -ketoglutaric acid production rate [$\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}\text{h}^{-1}$]

Q_{PA} – objętościowa szybkość produkcji kwasu pirogronowego – volumetric pyruvic acid production rate [$\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}\text{h}^{-1}$]

Y_{KGA} – wydajność całkowita produkcji kwasu α -ketoglutazarowego – total yield of α -ketoglutaric acid [$\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$]

Y_{PA} – wydajność całkowita produkcji kwasu pirogronowego – total yield of pyruvic acid [$\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$]

WYNIKI I OMÓWIENIE

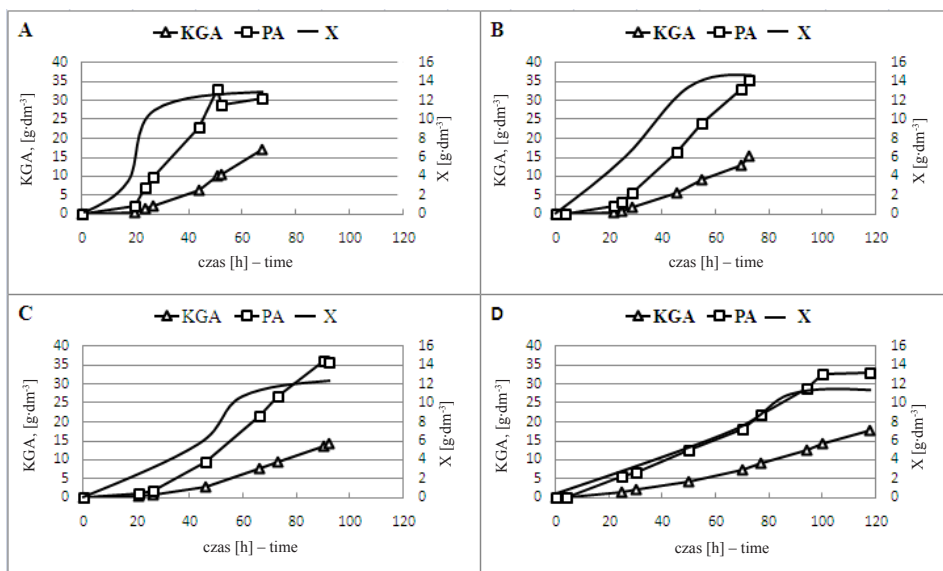
Nadprodukcja KGA i PA przez drożdże *Y. lipolytica* jest możliwa w warunkach limitacji wzrostu stężeniem tiaminy, przy nadmiarze źródła węgla i azotu. Tiamina jest kofaktorem kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej oraz dehydrogenazy α -ketoglutazarowej enzymów, które odpowiadają za dalsze przemiany PA i KGA w komórce. Jako źródło tiaminy w niniejszej pracy zastosowano namok kukurydziany w formie płynnej oraz sypkiej. Przeprowadzono cztery hodowle okresowe w podłożu zawierającym $100 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ glicerolu, różniące się postacią wprowadzonego namoku kukurydzianego oraz zastosowanym podłożem inokulacyjnym (YNB oraz podłoże mineralne) (tab. 1).

Tabela 1. Symbol hodowli, rodzaj zastosowanego podłoża inokulacyjnego i namoku kukurydzianego

Table 1. Symbol of culture, type of seed culture medium and corn steep used

Symbol hodowli Batch symbol	Podłoże inokulacyjne Seed culture medium	Namok kukurydziany Corn steep
A	YNB	płynny liquor
B	YNB	sypki powder
C	mineralne mineral	płynny liquor
D	mineralne mineral	sypki powder

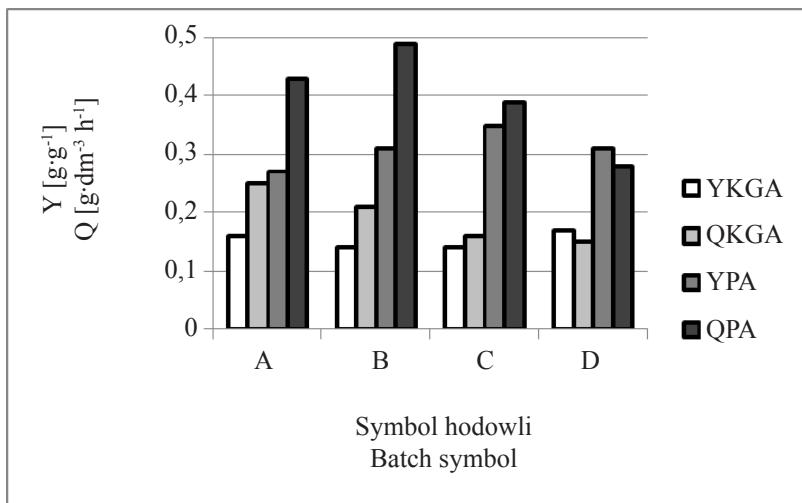
Hodowle prowadzono do całkowitego wyczerpania źródła węgla. Przy zastosowaniu podłoża inokulacyjnego z YNB całkowite wyczerpanie glicerolu w pożywce nastąpiło w 68.–73. godz., natomiast dla podłoża mineralnego czas ten wynosił 92–118 godz. (rys. 1). Warto zauważyć, że krótszy czas utylizacji substratu (68 i 92 godz.) był atrybutem hodowli zawierających w składzie namok kukurydziany w formie płynnej. Hodowle inokulowane komórkami wyrosłymi w podłożu YNB charakteryzowały się również wyższym stężeniem biomasy w fazie stacjonarnej – 13 i 14,2 g · dm⁻³ (A i B) w porównaniu z pozostałymi, w których stężenie komórek drożdży wynosiło odpowiednio 12,1 i 11,5 g · dm⁻³ (C i D) (rys. 1). Wyższe stężenie biomasy oraz krótszy czas hodowli A i B może wynikać z obecności w podłożu YNB wielu niezbędnych dla komórek drożdży substancji odżywczych i wzrostowych, podczas gdy w skład podłoża mineralnego wchodzi jedynie sole mineralne. Zbliżone końcowe stężenie biomasy, 11,73 g · dm⁻³, uzyskali Zhou i in. [2010] podczas biosyntezy KGA przez szczep drożdży *Y. lipolytica* WSH-Z06 w podłożu również zawierającym 100 g · dm⁻³ glicerolu, jednak proces trwał znacznie dłużej, bo aż 144 godz.



Rys. 1. Produkcja biomasy [X], kwasu α -ketoglutazarowego [KGA] i kwasu pirogronowego [PA] z glicerolu przez *Y. lipolytica* A-10 w hodowli okresowej z zastosowaniem podłoża inokulacyjnego YNB (wykres A, B) i mineralnego (wykres C, D). Jako źródła tiaminy użyto namoku kukurydzianego płynnego (wykres A, C) lub namoku kukurydzianego sypkiego (wykres B, D)

Fig. 1. Biomass [X], α -ketoglutaric acid [KGA] and pyruvic acid [PA] production from glycerol during batch culture of *Y. lipolytica* A-10 using YNB (chart A, B) and mineral (chart C, D) seed culture medium. As a source of thiamine a liquid corn steep liquor (chart A, C) or a powder of corn steep (chart B, D) was used

Produkcja PA i KGA przebiegała najwydajniej w hodowlach inokulowanych komórkami wyrosłymi w podłożu mineralnym. Najwyższe stężenie PA, $35,8 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$, oznaczono w 92. godz. hodowli z namokiem płynnym (hodowla C), natomiast najwięcej KGA, $17,9 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$, w hodowli D z namokiem sypkim w 118. godz. (rys. 1). Wydajność produkcji PA wynosiła $0,35 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$, zaś KGA $0,17 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$. Jednak w tych procesach ze względu na długi czas hodowli nie uzyskano zadowalających wartości szybkości objętościowej produkcji wymienionych kwasów (Q_{PA} , Q_{KGA}). Najwyższą wartość Q_{PA} , $0,49 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$, uzyskano w hodowli B, z kolei najwyższą wartość tego parametru dla KGA, $0,25 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$, w hodowli A (rys. 2).



Rys. 2. Wydajność i szybkość objętościowa produkcji kwasu pirogronowego i α -ketoglutarynowego z glicerolu odpadowego przez szczep *Y. lipolytica* A-10

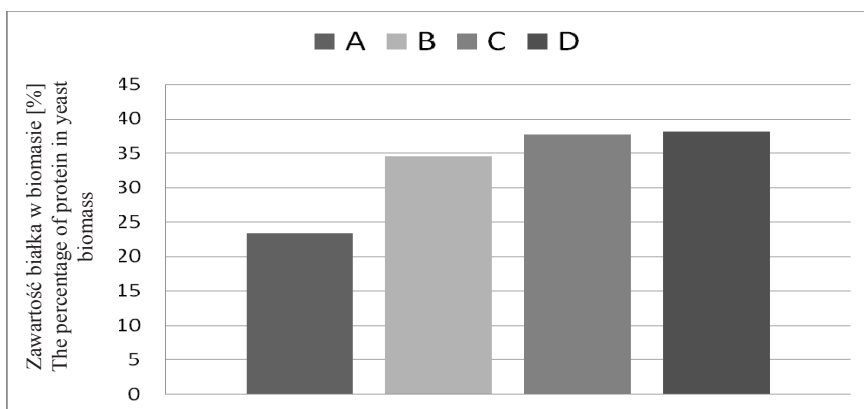
Fig. 2. Yield and volumetric production rate of PA and KGA by *Y. lipolytica* A-10 strain from crude glycerol

Drożdże *Y. lipolytica* są naturalnymi auktrotrofami tiaminy, jak podają dane literaturowe, stężenie tej witaminy niezbędne do ich prawidłowego wzrostu wynosi $200 \mu\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$, podczas gdy biosynteza ketokwasów jest możliwa w obecności ilości tej witaminy nieprzekraczającej kilku mikrogramów w litrze [Chernyavskaya i in. 2000]. W niniejszej pracy w hodowlach A i B zastosowano podłoże inokulacyjne sporządzone na bazie gotowego podłoża YNB, które zawiera niezbędne mikroelementy i witaminy, w tym tiaminę. Wprowadzona do podłoża objętość inokulum (200 cm^3) generowała w podłożu produkcyjnym stężenie tiaminy na poziomie $4 \mu\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$, co w konsekwencji mogło być przyczyną niższych, w porównaniu z hodowlami C i D (z mineralnym podłożem inokulacyjnym), stężeń uzyskanych ketokwasów, tym bardziej że podłoże produkcyjne dodatkowo wzbogacono w namok kukurydziany jako dodatkowe źródło tiaminy. Substancja ta używana jest zwykle w procesach biotechnologicznych jako źródło azotu, zawiera liczne aminokwasy, ale również mikroelementy oraz niektóre witaminy. Według danych literaturowych stężenie tiaminy w namoku kukurydzianym zawiera się w przedziale od $0,09$ do $0,3 \text{ mg}$ w 100 g namoku [Corn Refiners Association Inc. 1975, Zabriskie i in. 1982]. W niniejszych badaniach namok dodawano jednak w niewielkim stężeniu, $0,02 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$, co oznacza, że dodatkowa ilość wprowadzonej

tiaminy nie przekraczała $0,06 \mu\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$. Całkowite stężenie tiaminy w hodowlach A i B wynosiło więc około $4,06 \mu\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$. Jest prawdopodobne, że zastosowanie mniejszej ilości inokulum (5%) lub bardziej rozcieńczonego podłoża YNB pozwoli na uzyskanie wyższych stężeń badanych kwasów. Mineralne podłoże inokulacyjne zawierało zaledwie $0,5 \mu\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$ tej witaminy (hodowle C i D), co oznacza, że po wprowadzeniu 200 cm^3 inokulum do podłoża produkcyjnego ($1,8 \text{ dm}^3$) stężenie tiaminy wynosiło $0,05 \mu\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$. Po uwzględnieniu ilości tiaminy w namoku kukurydzianym całkowite stężenie tej witaminy w bioreaktorze było zdecydowanie niższe, około $0,11 \mu\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$, niż w hodowlach A i B. Jak wspomniano, niższe stężenie tiaminy w hodowlach C i D skutkowało wyższymi stężeniami PA i KGA. Uzyskane wyniki szybkości objętościowej produkcji KGA i PA jednoznacznie wskazują, że zdecydowanie korzystniejsze jest stosowanie płynnego namoku kukurydzianego (hodowle A i C) niż namoku w formie sypkiej (B i D). Użycie namoku sypkiego skutkowało dłuższą fazą wzrostu drożdży, a tym samym wydłużeniem czasu hodowli, co widoczne jest na rysunku 1. Może być to spowodowane faktem, iż podczas suszenia rozpyłowego namoku część witamin ulega rozkładowi i w konsekwencji jest ich mniej, ponadto namok płynny lepiej się rozpuszcza i w efekcie składniki w nim zawarte są łatwiej przyswajalne przez komórki drożdży.

Synteza i wydzielanie obu kwasów do środowiska, w przypadku glukozy jako źródła węgla, rozpoczynają się równolegle i trwają aż do wyczerpania źródła węgla, a kwasy produkowane są w proporcji 75–80% PA do 20–25% KGA [Finogenova i in. 2005]. Jak wynika z prezentowanych w niniejszej pracy wyników, w przypadku glicerolu i zastosowanych warunków hodowlanych stosunek ten nieznacznie się różni na korzyść KGA, którego udział w puli produkowanych kwasów wynosi od 30 do 36% (dane nieprezentowane). Optymalizacja warunków hodowlanych w kierunku nadprodukcji KGA z glicerolu przez *Y. lipolytica* WSH-Z06, przeprowadzona przez Zhou i in. [2010], pozwoliła na uzyskanie w optymalnych warunkach $39,2 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ KGA, podczas gdy stężenie PA wynosiło $16,84 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$. Warto zauważyć, że są to wyniki pochodzące z hodowli wstrząsarkowych, natomiast podczas biosyntezy prowadzonej w okresowej hodowli bioreaktorowej stężenie KGA wynosiło $35 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$, autorzy nie podali ilości PA. Znaczącą poprawę proporcji KGA do PA wymienieni wyżej autorzy otrzymali w wyniku nadekspresji genu kodującego karboksylazę pirogronianową ScPYC1 z *Saccharomyces cerevisiae* i RoPYC2 z *Rhizopus oryzae* w komórkach szczepu WSH-Z06 [Yin i in. 2012]. Podobny efekt został uzyskany wskutek regulacji metabolizmu acetylo-CoA poprzez ekspresję genu ACS1, kodującego syntetazę acetylo-CoA z *S. cerevisiae* oraz genu ACL, kodującego ATP-zależną liazę cytrynianową z *Mus musculus* w komórkach ww. szczepu *Y. lipolytica* [Zhou i in. 2012].

Biomasa drożdży z gatunku *Y. lipolytica* jest dopuszczona do obrotu w UE przez Europejską Federację Producentów Pasz, a o jej przydatności decyduje ilość białka komórkowego. Według normy PN-81/A-79006 procentowa zawartość białka w biomacie powinna wynosić od 40 do 52%. W pozostałej, po odwirowaniu podłoża, biomacie oznaczono stężenie białka metodą biuretową. Procentowe stężenie białka rzędu 37,7 i 38,1% zanotowano dla biomasy z hodowli C i D. Najniższą zawartość procentową białka miała biomasa z hodowli A i wynosiła ona 23,3% (rys. 3). Te stosunkowo wysokie stężenia białka wynikają z zastosowania dużej ilości azotu w pożywce – źródłem tego pierwiastka było $10 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Nieco niższą zawartość białka w biomacie drożdży *Y. lipolytica* wyprodukowanej z odpadowych tłuszczów uzyskali Musiał, Rymowicz i Kita [2004]. Ilość protein w biomacie *Y. lipolytica* A-101 wahała się w granicach 26–31%.



Rys. 3. Procentowa zawartość białka w biomacie drożdży *Y. lipolytica* A-10 po hodowli okresowej z wykorzystaniem podłoża inokulacyjnego YNB (A, B) lub mineralnego (C, D). Źródło tiaminy stanowił namok kukurydziany w formie płynnej (A, C) lub sypkiej (B, D)

Fig. 3. The percentage of protein in the *Y. lipolytica* A-10 biomass after a batch fermentation using YNB (A, B) or mineral (C, D) seed culture medium. The source of thiamine was liquid corn steep liquor (A, C) or powder of corn steep (B, D)

WNIOSKI

Uzyskane wyniki jednoznacznie wskazują, że rodzaj zastosowanego podłoża inokulacyjnego odgrywa istotną rolę w procesie biosyntezy KP i KGA. Podłoże YNB pozwala na skrócenie czasu hodowli nawet o 50,5 godz. w porównaniu z podłożem mineralnym, natomiast wprowadza zbyt duże ilości tiaminy do wydajnej produkcji ketokwasów. Podłoże mineralne z kolei, kosztem wydłużenia procesu, umożliwia uzyskanie zadowalających stężeń badanych kwasów oraz dodatkowo bogatej w białko biomasy. Na przebieg procesu wpływ miało także zastosowanie namoku kukurydzianego w dwóch formach. Użycie płynnego namoku kukurydzianego skutkowało wyższą szybkością objętościową produkcji KP i KGA. Pomimo że wartości wydajności produkcji KP i KGA nie są wysokie, uzyskane wyniki świadczą o przydatności szczepu *Y. lipolytica* A-10 jako potencjalnego producenta KP i KGA. Niezbędne są jednak dalsze badania zmierzające do poprawy parametrów ich produkcji, tym bardziej że wykorzystanie taniego i odnawialnego źródła węgla w procesie, czyli gliceryny odpadowej, może znacznie obniżyć koszty produkcji tych kwasów.

PIŚMIENNICTWO

- Barrett D.G., Yousaf M.N., 2008. Poly(triol α -ketoglutarate) as biodegradable, chemoselective, and mechanically tunable elastomers. *Macromolecules*, 41, 6347–6352.
- Chernyavskaya O.G., Shishkanova N.V., Il'chenko A.P., Finogenova T.V., 2000. Synthesis of α -ketoglutaric acid by *Yarrowia lipolytica* yeast grown on ethanol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 53, 152–158.

- Coelho M.A.Z., Amaral P.F.F., Belo I., 2010. *Yarrowia lipolytica*: an industrial workhorse. Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology, vol. 2, 930–944.
- Corn Refineries Asociacion Inc., 1975. Properties and uses of feed products from corn wet-milling operations, Washington DC
- Finogenova T.V., Morgunov I.G., Kamzolova S.V., Chernyavskaya O.G., 2005. Organic acid production by the yeast *Yarrowia lipolytica*: a review of prospects. Appl. Biochem. Microbiol., vol. 41, 418–425.
- Gong R., Li N., Cai W., Liu Y., Jiang J., 2010. α -Ketoglutaric acid-modified chitosan resin as sorbent for enhancing methylene blue removal from aqueous solutions. Int. J. Environ. Heal. R., 4(1), 27–32.
- Gunawan C., Satianegara G., Chen A. K., Breuer M., Hauer B., Rogers P. L., Rosche B., 2007. Yeast pyruvate decarboxylases: variation in biocatalytic characteristics for (R)-phenylacetylcarbinol production. FEMS Yeast Res., 7, 33–39.
- Koh-Banerjee P.K., Ferreira M.P., Greenwood M., Bowden R.G., Cowan P.N., Almada A.L., Kreider R.B., 2005. Effects of calcium pyruvate supplementation during training on body composition, exercise capacity, and metabolic responses to exercise. Nutrition, 21, 312–319.
- Lee Y.C., Chien H.C., Hsu W.H., 2007. Production of N-acetyl-D-neuraminic acid by recombinant whole cells expressing *Anabaena* sp. CH1 N-acetyl-D-glucosamine 2-epimerase and *Escherichia coli* N-acetyl-D-neuraminic acid lyase. J. Biotechnol., 129, 453–460.
- Li Y., Chen J., Lun S.-Y., 2001. Biotechnological production of pyruvic acid. Appl. Microbiol. Biotechnol., 57, 451–459.
- Lütke-Eversloh T., Santos C.N., Stephanopoulos G., 2007. Perspectives of biotechnological production of L-tyrosine and its applications. Appl. Microbiol. Biotechnol., 77, 751–762
- McCarty M. F., 2000. Toward a wholly nutritional therapy for type 2 diabetes. Med. Hypotheses, 54, 483–487.
- Morgunov I., Kamzolova V., Perevoznikova O., Shishkanova N., Finogenova T., 2003. Pyruvic acid production by a thiamine auxotroph of *Yarrowia lipolytica*. Process Biochem., 39, 1469–1474.
- Moser P.M., Greilberger J., Maier A., Juan H., Bücherl-Harrer C., Kager E., 2007. Verwendung von α -Ketoglutarinsäure und 5-Hydroxy-methylfurfural zur Reduktion von oxidativem Stress. C. Y. L. P. GmbH. Patent EP1842536 A1.
- Musiał I., Rymowicz W., Kita A., 2004. Produkcja biomasy drożdży *Yarrowia lipolytica* z tłuszczów odpadowych po smażeniu produktów przekąskowych. ACTA Scient. Polon. Biotechnol., 3(1–2), 75–83.
- Otto C., Yovkova V., Barth G., 2011. Overproduction and secretion of α -ketoglutaric acid by microorganisms. Appl. Microbiol. Biotechnol., 92, 689–695.
- PN-81/A-79006, Drożdże paszowe suszone.
- Roufs J.B., 1996. Pyruvate: does it amp endurance and burn more fat? Muscle Fitness, 57, 195–197.
- Sauer M., Porro D., Mattanovich D., Branduardi P., 2008. Microbial production of organic acids: expanding the markets. Trends Biotechnol., 26, 100–108.
- Sigma-Aldrich Product Information [online]. Sigma-Aldrich 2012, dostępny w Internecie:http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/y0626pis.Par.0001.File.tmp/y0626pis.pdf
- Stanko R.T., Tietze D.L., Arch J.E., 1992. Body composition, energy utilization, and nitrogen metabolism with a 4.25-MJ/d lowenergy diet supplemented with pyruvate. Am. J. Clin. Nutr., 56, 630–635.
- Stewart K., 1975. Methods in cell biology, Ed. Prescott D.M., New York, 12(8), 112–118.

- Tsugawa R., Nakase T., Kobayash T., Yamashita K., Okumura S., 1969. Fermentation of n-paraffins by yeast. III. α -ketoglutarate productivity of various yeast. *Agr. Biol. Chem.*, 33, 929–941.
- Wang X., Perez E., Liu R., Yan L.J., Mallet R.T., Yang S. H., 2007. Pyruvate protects mitochondria from oxidative stress in human neuroblastoma SK-N-SH cells. *Brain Res.*, 1132, 1–9.
- Xu, P., Qiu, J., Gao, C., Ma, C., 2008. Biotechnological routes to pyruvate production. *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 1(3), 169–175.
- Yamada H., Kumagai H., Kashima N., Torii H., Enei H., Okumura S., 1972. Synthesis of L-tyrosine from pyruvate, ammonia and phenol by crystalline tyrosine phenol lyase. *Biochem. Biophys. Res. Co.*, 46, 370–374.
- Yin X., Madzak C., Du G., Zhou J., Chen J., 2012. Enhanced alpha-ketoglutaric acid production in *Yarrowia lipolytica* WSH-Z06 by regulation of the pyruvate carboxylation pathway. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, DOI: 10.1007/s00253-012-4192-z.
- Zabriskie D.W., Armiger W.B., Phillips D.H., Albano P.A., 1982. Traders guide to fermentation media formulation. Traders Protein.
- Zhou Y-T., Niea H-L., Branford-White C., Hea Z-Y., Zhua L-M., 2009. Removal of Cu^{2+} from aqueous solution by chitosan-coated magnetic nanoparticles modified with α -ketoglutaric acid. *J. Colloid Interf. Sci.*, 330, 29–37.
- Zhou J., Zhou H., Du G., Liu L., Chen J., 2010. Screening of a thiamine-auxotrophic yeast for α -ketoglutaric acid production. *Lett. Appl. Microbiol.*, 51, 264–271.
- Zhou J., Yin X., Madzak C., Du G., Chen J., 2012. Enhanced α -ketoglutarate production in *Yarrowia lipolytica* WSH-Z06 by alteration of the acetyl-CoA metabolism. *J. Biotechnol.*, 16, 257–264.

EVALUATION OF SEED CULTURE MEDIUM TO KETOACIDS PRODUCTION BY *YARROWIA LIPOLYTICA* YEAST

Abstract. The aim of the present study was to compare the influence of the seed culture medium (YNB or mineral) and the sort of corn steep (liquor or powder) on the biosynthesis of pyruvic and α -ketoglutaric acids from crude glycerol by *Yarrowia lipolytica* A-10 strain. Batch cultures were carried out until the substrate exhaustion ($100 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ of glycerol) and lasted 68–118 h. Yeast produced from 30.4 to $35.8 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ of pyruvic acid and from 14.4 to $17.9 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ of α -ketoglutaric acid. Higher values of volumetric production rate of both acids were achieved when YNB was used as a seed culture medium. The yield of ketoglutaric acid production was similar in all culture variants. However, for pyruvic acid the highest value of this parameter ($0,35 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$) was obtained when mineral medium and corn steep liquor were used. The highest percentage of protein, about 38%, was determined in yeast biomass derived after the culture with mineral seed culture medium.

Key words: *Yarrowia lipolytica*, pyruvic acid, α -ketoglutaric acid, crude glycerol

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 30.06.2013

Do cytowania – For citation: Cybulski K., Tomaszewska L., Rywińska A., 2013. Dobór podłoża inokulacyjnego do produkcji ketokwasów przez drożdże *Yarrowia lipolytica*. *Acta Sci. Pol. Biotechnol.*, 12 (2), 5–14.

OCENA MOŻLIWOŚCI POMIARU ŚREDNICY KOMÓREK DROŻDŻY PIWOWARSKICH PRZY UŻYCIU LASEROWEGO ANALIZATORA WIELKOŚCI CZĄSTEK

Barbara Foszczyńska, Ewelina Dziuba, Joanna Chmielewska

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Streszczenie. Badano możliwości wykorzystania laserowego analizatora wielkości cząstek Mastersizer 2000 do monitorowania kondycji drożdży piwowarskich poprzez pomiar średnicy komórek. Stwierdzono, że średnicę komórek drożdży należy wyznaczać bezpośrednio po pobraniu biomasy ze środowiska hodowlanego lub fermentacyjnego, stosując wodę destylowaną jako ciecz dyspersyjną. Wykazano przydatność urządzenia do obserwacji zmian wielkości komórek drożdży w warunkach stresu osmotycznego i etanolowego.

Słowa kluczowe: drożdże piwowarskie, rozmiar komórek, analizator wielkości cząstek

WSTĘP

Drożdże piwowarskie są jednym z podstawowych surowców browarniczych, w dużym stopniu decydującym o jakości piwa. W procesie fermentacji brzezki słodowej wytwarzają nie tylko etanol, ale również produkty uboczne, które nadają piwu właściwy profil aromatyczny. Ulegają one przy tym różnym stresom takim jak stres osmotyczny czy etanolowy, które są przyczyną pogorszenia żywotności komórek, osłabienia ich zdolności wzrostu oraz odfermentowania brzezki.

Rozwój nowoczesnych technologii w piwowarstwie wymusza konieczność poszukiwania metod umożliwiających szybką i dokładną ocenę kondycji drożdży nastawnych, jak również monitorowanie ich stanu fizjologicznego podczas procesu technologicznego. Rutynowe metody oceny żywotności drożdży oparte są na barwieniu komórek błękitem metylenowym. Jednakże fakt odbarwienia błękitu świadczy jedynie o potencjale redoks we wnętrzu komórki. Przykładem nowoczesnych technik pomiarowych jest mikroskopia fluorescencyjna [Kordialik-Bogacka 2007], pozwalająca, przy zastosowaniu odpowied-

© Copyright by Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Adres do korespondencji – Corresponding author: Foszczyńska B., Dziuba E., Chmielewska J., Katedra Technologii Rolnej i Przechowalnictwa Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, ul. Chelmońskiego 37/41, 51-630 Wrocław, e-mail: barbara.foszczyńska@up.wroc.pl

nich fluorochromów, na identyfikowanie komórek i niewidocznych pod mikroskopem struktur komórkowych. Cyfrowa analiza obrazu umożliwia liczenie i określenie wielkości komórek oraz badanie żywotności i zmian cech morfologicznych wynikających ze starzenia się lub wrażliwości na szok osmotyczny [Misiewicz i Czuba 2005]. Z kolei cytometria przepływowa pozwala na wykonanie kompleksowych badań określających żywotność i witalność drożdży poprzez oznaczenie liczby i wielkości komórek, zawartości DNA, 3 β -hydroksysteroli, obojętnych lipidów, glikogenu, trehalozy, aktywności proteolitycznej oraz pH wewnątrzkomórkowego [Boyd i in. 2003, Hutter i in. 2005, Weigert i in. 2009]. Jednym z elementów oceny stanu fizjologicznego drożdży jest pomiar wielkości i kształtu komórek. Drożdże bowiem w różnych fazach wzrostu oraz pod wpływem rozmaitych czynników zmieniają swoje rozmiary. Do pomiaru populacji i wielkości komórek drożdży można wykorzystać urządzenia oparte na metodzie Coultera. Szansę łatwego i szybkiego sposobu pomiaru wielkości komórek drożdży stwarza także zastosowanie laserowego analizatora wielkości cząstek Mastersizer 2000 Malvern Instruments. Jest to urządzenie zaprojektowane do pomiaru wielkości cząstek w dyspersjach cieczowych i powietrznych, służy do analiz granulometrycznych cząsteczek ciał stałych i emulsji w zakresie wielkości 0,02–2000 μm [Materiały firmy Malvern Instruments]. Oznaczenie polega na pomiarze rozproszenia światła laserowego przez cząstki, które po uprzedniej dyspersji zostają podane do jednostki optycznej urządzenia. Ze światła rozproszonego obliczana jest wielkość cząstek, przy czym kształt cząstek sprowadzany jest do kuli. Urządzenie umożliwia m.in. pomiar średniej średnicy D[4,3], tj. średnicy kuli o objętości badanej cząstki.

Celem niniejszych badań był dobór cieczy dyspersyjnej oraz czasu ekspozycji komórek drożdży piwowskich z rodzaju *Saccharomyces* przed pomiarem średnicy D[4,3] przy użyciu analizatora wielkości cząstek Mastersizer 2000 Malvern Instruments. Ponadto badano wpływ procesu odwirowania biomasy oraz różnych stężeń wodnych roztworów glukozy i etanolu na średnicę komórek drożdży.

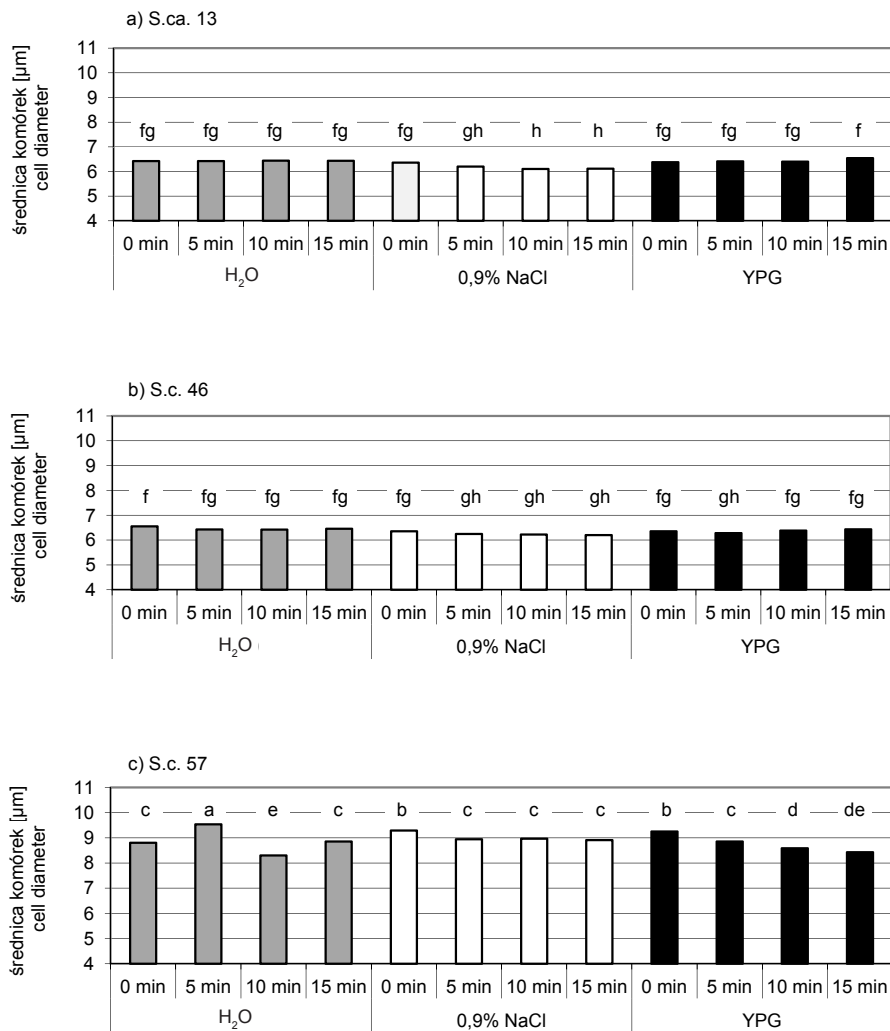
MATERIAŁ I METODY

Materiał badawczy stanowiły trzy szczepy drożdży piwowskich z Kolekcji Kultur Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego w Warszawie:

- *Saccharomyces carlsbergensis* I-S.ca.13 – dolnej fermentacji, pylisty (I-S.ca.13)
- *Saccharomyces cerevisiae* I-S.c. 46 – górnej fermentacji, pylisty (I-S.c.46)
- *Saccharomyces cerevisiae* I-S.c. 57 – górnej fermentacji, kłaczkujący (I-S.c.57) [Rzędowska 1969].

Biomasę drożdży aktywowano w podłożu YPG w temp. 30°C (48 godz. hodowla stacjonarna (10 cm³), a następnie 48 godz. hodowla wstrząsana (100 cm³)).

Przy użyciu analizatora wielkości cząstek Mastersizer 2000 Malvern Instruments mierzono średnicę komórek D[4,3], stosując: a) wodę destylowaną, b) roztwór soli fizjologicznej (0,9% NaCl) oraz c) podłoże YPG jako cieczy dyspersyjne. Do zlewki zawierającej około 800 cm³ cieczy dyspersyjnej wprowadzano zawiesinę drożdży w podłożu YPG w ilości zapewniającej optymalny zakres populacji komórek w czasie pomiaru. Pomiary wykonywano natychmiast po zawieszeniu biomasy w roztworze, ale także po upływie 5, 10 i 15 minut. Dodatkowo dla pomiarów w wodzie destylowanej biomasę odwirowywano (3000 obr./min; 10 min) i tuż przed dyspersją zawieszano w 10 cm³ wody destylowanej.



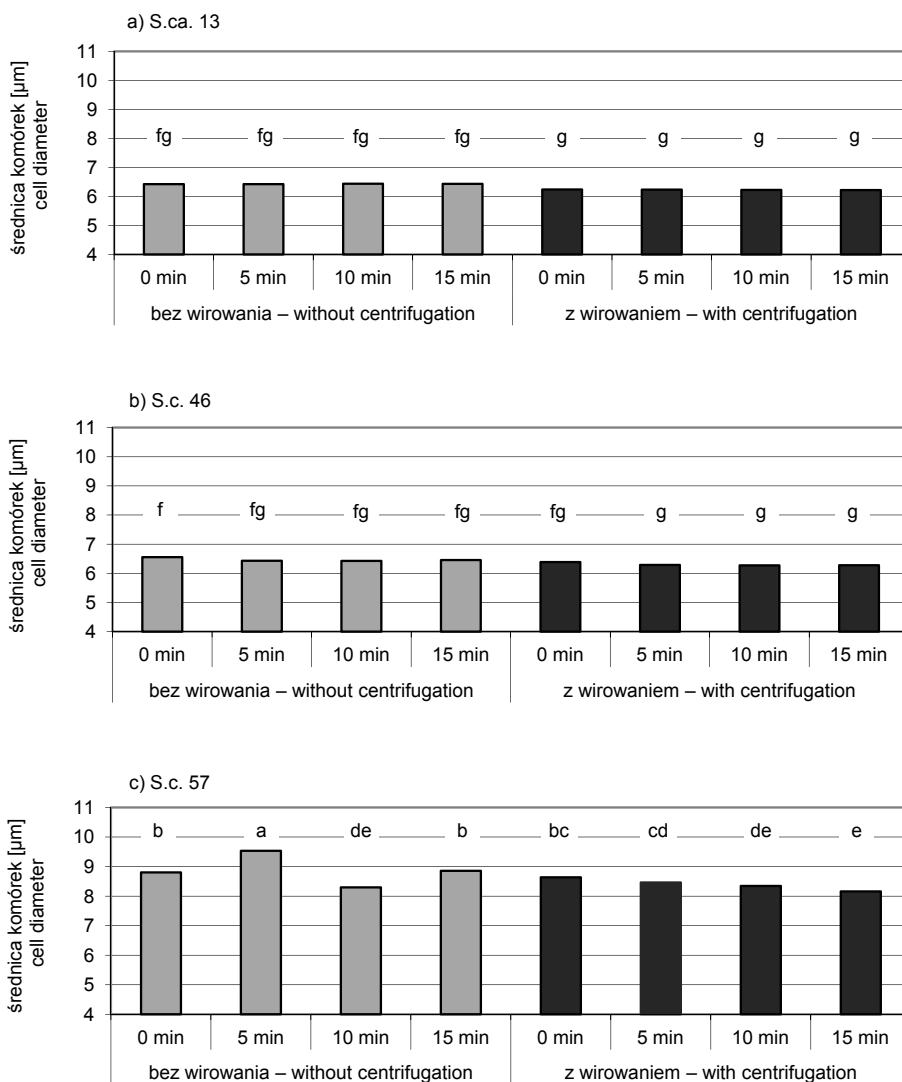
Rys. 1. Wpływ rodzaju medium dyspersyjnego (H₂O, 0,9% NaCl, podłoże YPG) oraz czasu ekspozycji biomasy (0, 5, 10, 15 min) na średnicę D[4,3] komórek drożdży: a) S.ca.13, b) S.c. 46, c) S.c. 57 (NIR = 0,2097)

Fig. 1. The influence of dispersion medium ((H₂O, 0.9% NaCl, YPG medium) and time of biomass exposition (0, 5, 10, 15 min) on volume mean diameter D[4,3] of yeast cells: a) S.ca.13, b) S.c. 46, c) S.c. 57 (NIR = 0.2097)

W kolejnym etapie badań określano zmiany wielkości komórek drożdży w wodnych roztworach glukozy (5,10 i 20% wag.) oraz etanolu (2,5, 5 i 10% obj.) jako mediach dyspersyjnych. Mierzono średnicę komórek po wprowadzeniu biomasy do roztworu oraz po upływie 5, 10 i 15 minut.

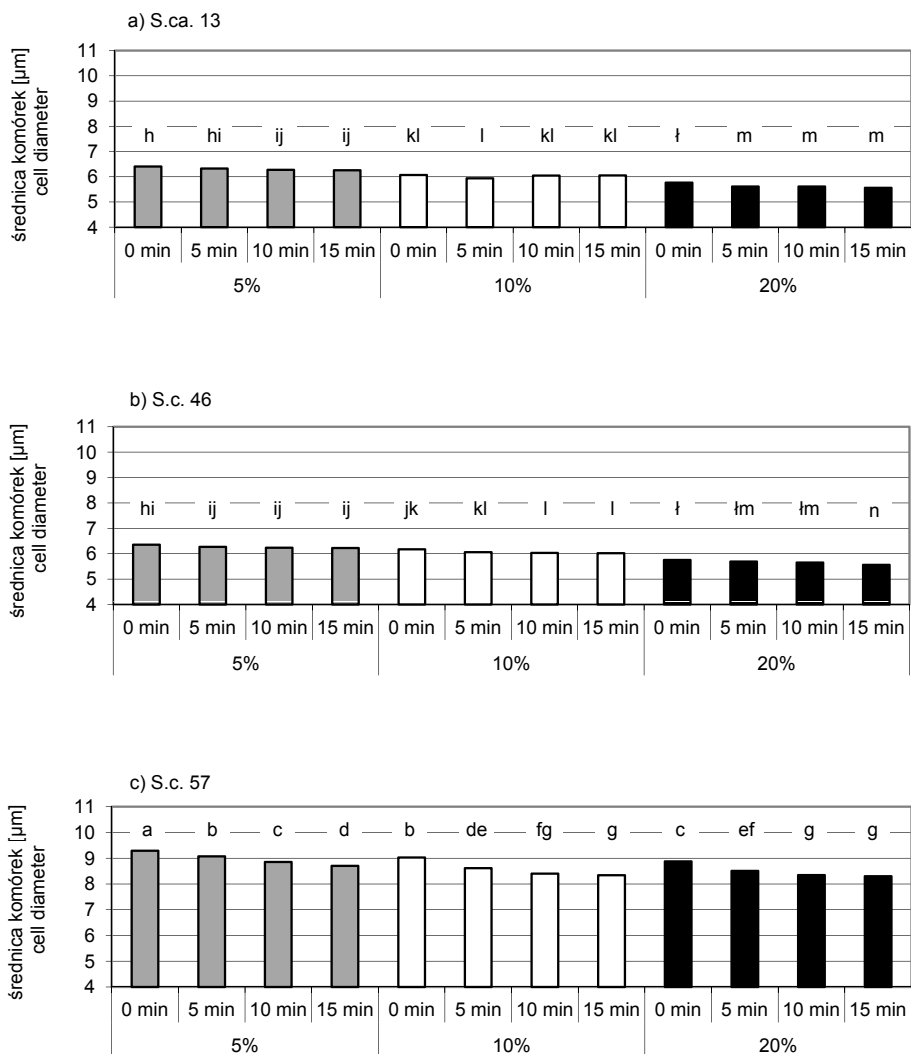
Badania wykonywano w trzech powtórzeniach. Uzyskane wyniki pomiaru średnicy D[4,3] poddano analizie wariancji Anova dla układów czynnikowych (test Duncana przy

$\alpha=0,05$) w programie STATISTICA 9.1. Grupy statystycznie jednorodne zaznaczono na rysunkach małymi literami alfabetu. Wyniki pomiaru średnicy komórek w badanych cieczach przedstawiono na rysunkach 1–4. Dokonano ponadto analizy procentowego rozkładu objętości komórek w próbkach biomasy w sześciu zakresach wielkości średnicy: 0–2 μm ; 2–5 μm ; 5–10 μm ; 10–20 μm ; 20–40 μm ; > 40 μm . Ze względu na dużą liczbę danych przedstawiono w pracy jedynie wyniki rozkładu objętości dla pomiarów bezpośrednio po zawieszeniu komórek w cieczach (tab. 3 i 4).



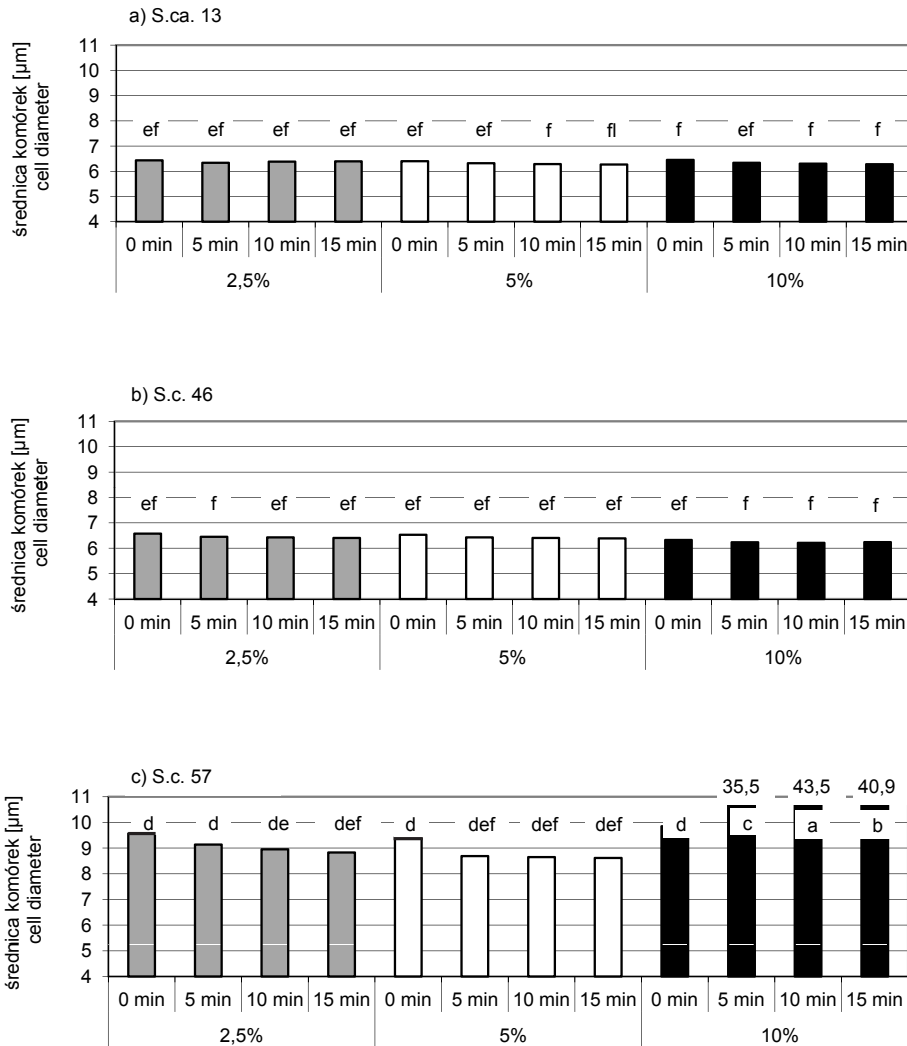
Rys. 2. Wpływ wirowania oraz czasu ekspozycji biomasy (0, 5, 10, 15 min) na średnicę $D[4,3]$ komórek drożdży: a) S.ca.13, b) S.c. 46, c) S.c. 57 (NIR = 0,1919)

Fig. 2. The influence of centrifugation and time of biomass exposition (0, 5, 10, 15 min.) on volume mean diameter $D[4,3]$ of yeast cells: a) S.ca.13, b) S.c. 46, c) S.c. 57 (NIR = 0.1919)



Rys. 3. Wpływ stężenia roztworu glukozy (5, 10, 20%) oraz czasu ekspozycji biomasy (0, 5, 10, 15 min.) na średnicę $D[4,3]$ komórek drożdży: a) S.ca.13, b) S.c. 46, c) S.c. 57 (NIR = 0,1232)

Fig. 3. The influence of glucose concentration (5, 10, 20%) and time of biomass exposition (0, 5, 10, 15 min.) on volume mean diameter $D[4,3]$ of yeast cells: a) S.ca.13, b) S.c. 46, c) S.c. 57 (NIR = 0.1232)



Rys. 4. Wpływ stężenia roztworu etanolu (2.5, 5, 10%) oraz czasu ekspozycji biomasy (0, 5, 10, 15 min.) na średnicę D[4,3] komórek drożdży: a) S.ca.13, b) S.c. 46, c) S.c. 57 (NIR = 2,1329)

Fig. 4. The influence of glucose concentration (2.5, 5, 10%) and time of biomass exposition (0, 5, 10, 15 min.) on volume mean diameter D[4,3] of yeast cells: a) S.ca.13, b) S.c. 46, c) S.c. 57 (NIR = 2.1329)

Dodatkowym elementem badań było porównanie wielkości komórek drożdży wyznaczonych przy użyciu analizatora Mastersizer 2000 Malvern Instruments oraz metodą mikroskopową z wykorzystaniem śruby mikrometrycznej. Z biomasy drożdży w stacjonarnej fazie wzrostu (18–20 godz. hodowla wstrząsana w podłożu YPG) sporządzono przyżyciowy preparat mikroskopowy i dokonano pomiaru 50 losowo wybranych komórek drożdży. Równolegle dokonywano pomiaru średnicy D[4,3]. Na podstawie uzyskanych wyników

obliczono średnią objętość komórek. W przypadku metody mikrometrycznej zastosowano równanie: $V=4/3 \Pi (a/2)^2 (b/2)$, gdzie: a – długość krótszej osi komórki; b – długość dłuższej osi komórki [Sakai i in. 1986]. Dla pomiaru z wykorzystaniem analizatora Mastersizer 2000 zastosowano równanie: $V=4/3 \Pi (d/2)^3$, gdzie d – średnica D[4,3].

WYNIKI

Badane szczepy drożdży różniły się pod względem cech morfologicznych komórek. Najmniejszą ich objętością zarówno w badaniu mikroskopowym, jak i przy użyciu analizatora Mastersizer 2000 charakteryzowały się drożdże I-S.ca.13 (tab.1). Komórki drożdży I-S.c.57 były większe od drożdży I-S.ca.13 oraz I-S.c.46, ponadto w obrazie mikroskopowym tego szczepu obserwowano liczne skupiska komórek. Objętość komórek drożdży wyliczona na podstawie średnicy D[4,3] była znacznie mniejsza od objętości wyznaczonej poprzez pomiar mikroskopowy. Warto podkreślić, że pomiarem laserowym objęte były wszystkie obiekty znajdujące się w celi pomiarowej, natomiast w badaniu mikroskopowym mierzono wybrane, na ogół dojrzałe, komórki drożdży.

Podstawowym celem prowadzonych badań była próba doboru cieczy do dyspersji biomasy drożdży przed podaniem jej do celi pomiarowej analizatora Mastersizer 2000. Poszukiwano medium, które w najmniejszym stopniu wpływa na wielkość komórek podczas pomiaru. Stwierdzono, że komórki drożdży I-S.ca.13 oraz I-S.c.46 zachowywały się podobnie w zastosowanych mediach dyspersyjnych (rys. 1a i 1b). Średnica D[4,3] komórek tych szczepów była porównywalna i nie zmieniała się istotnie w ciągu całego okresu ekspozycji w wodzie destylowanej oraz w podłożu YPG. Drożdże obydwu szczepów wykazywały także podobną średnicę tuż po przeniesieniu ich do roztworu soli fizjologicznej. Jednak w miarę upływu czasu średnica zmniejszała się, zwłaszcza u drożdży I-S.ca.13. Komórki szczepu I-S.c.57 wykazywały zróżnicowaną średnicę w wodzie destylowanej (rys. 1c). Po 5 min ekspozycji w wodzie średnica zwiększyła się, po 10 min malała i ponownie zwiększyła się w końcowym etapie oznaczenia. W roztworze soli fizjologicznej komórki tego szczepu zmniejszyły swoją średnicę w ciągu pierwszych 5 min, a następnie utrzymały ją na stałym poziomie do końca pomiaru. Natomiast w podłożu YPG średnica komórek drożdży I-S.c.57 zmniejszała się istotnie w miarę wydłużania czasu ekspozycji.

Tabela 1. Rozmiary komórek drożdży piwowskich wyznaczone metodą mikrometryczną oraz przy użyciu laserowego analizatora wielkości cząstek Mastersizer 2000

Table 1. Cell size of brewing yeast calculated with micrometric method and with the use of Mastersizer 2000 particle size analyzer

Drożdże Yeast	Pomiar mikrometryczny Measurement with micrometer			Pomiar laserowy Measurement with laser size analyzer	
	Krótsza oś [μm] Shorter axis	Dłuższa oś [μm] Longer axis	Objętość komórki [μm ³] Cell volume	Średnica D[4,3] [μm] Diameter D[4,3]	Objętość komórki [μm ³] Cell volume
	I-S.ca.13	7,2	9,6	260	6,54
I-S.c.46	7,4	11,1	325	6,64	153
I-S.c.57	8,3	12,5	397	7,15	191

Tabela 2. Porównanie objętościowego rozkładu wielkości komórek drożdży [%] po zawieszeniu w różnych mediach dyspersyjnych

Table 2. Comparison of volume distribution of yeast cell size [%] after dispersion in different media

Drożdże Yeast	Medium	Zakresy wielkości komórek Range of cell size					
		0–2 μm	2–5 μm	5–10 μm	10–20 μm	20–40 μm	> 40 μm
I-S.ca.13	H ₂ O	0	27,0	66,9	6,1	0	0
	0,9% NaCl	0	27,2	67,5	5,3	0	0
	YPG	0	26,9	67,8	5,3	0	0
I-S.c.46	H ₂ O	0	24,8	68,3	6,9	0	0
	0,9% NaCl	0	27,3	67,5	5,2	0	0
	YPG	0	27,4	67,6	5,2	0	0
I-S.c.57	H ₂ O	0	24,3	46,5	24,4	4,7	0,1
	0,9% NaCl	0	23,7	44,4	25,1	6,7	0,1
	YPG	0	23,5	44,5	25,4	6,5	0,1

Tabela 3. Porównanie objętościowego rozkładu wielkości komórek drożdży [%] po zawieszeniu w roztworach glukozy lub etanolu

Table 3. Comparison of volume distribution of yeast cell size [%] after dispersion in glucose or ethanol solutions

Drożdże Yeast	Medium	Zakresy wielkości komórek Range of cell size						
		0–2 μm	2–5 μm	5–10 μm	10–20 μm	20–40 μm	> 40 μm	
I-S.ca.13	Glukoza Glucose	5%	0	28,5	64,8	6,7	0	0
		10%	0	32,8	63,4	3,8	0	0
		20%	0	40,7	55,8	3,5	0	0
	Etanol Ethanol	2,5%	0	26,9	67,0	6,2	0	0
		5%	0	27,0	67,3	5,7	0	0
		10%	0	26,3	67,7	6,1	0	0
I-S.c.46	Glukoza Glucose	5%	0	27,2	67,6	5,2	0	0
		10%	0	30,6	65,1	4,3	0	0
		20%	0	39,8	56,3	3,9	0	0
	Etanol Ethanol	2,5%	0	24,6	68,4	7,0	0	0
		5%	0	24,5	69,1	6,4	0	0
		10%	0	26,6	68,9	4,6	0	0
I-S.c.57	Glukoza Glucose	5%	0	21,4	45,6	27,2	5,6	0,2
		10%	0	24,1	46,4	23,8	5,3	0,4
		20%	0	30,1	42,1	22,1	5,4	0,3
	Etanol Ethanol	2,5%	0	21,8	44,7	26,3	7,2	0,1
		5%	0	22,0	44,7	26,5	6,9	0
		10%	0	21,4	43,6	26,9	7,9	0,3

W tabeli 2 przedstawiono wyniki objętościowego rozkładu wielkości komórek (w sześciu zakresach wielkości) tuż po ich rozproszeniu w poszczególnych cieczach. Niezależnie od rodzaju medium rozkład wielkości komórek drożdży I-S.ca.13 oraz I-S.c.46 był podobny. Załedwie 5–6% całkowitej objętości komórek tych dwóch szczepów dotyczyło obiektów o średnicy 10–20 μm . W żadnym z badanych środowisk nie stwierdzono obiektów większych niż 20 μm . Z kolei szczep I-S.c. 57 miał znacznie mniejszy udział objętości komórek w zakresach średnicy 2–5 i 5–10 μm oraz blisko 5-krotnie większy udział objętości w zakresie 10–20 μm . W przypadku tego szczepu, we wszystkich mediach dyspersyjnych, występowały obiekty o wielkości 20–40 μm (ok. 4,7–6,5% objętości) oraz cząstki o średnicy powyżej 40 μm (0,1%).

Kolejnym etapem badań było określenie wpływu procesu wirowania biomasy przed wprowadzeniem ich do medium dyspersyjnego na średnicę komórek. Komórki wszystkich badanych szczepów drożdży poddane wirowaniu wykazywały w wodzie destylowanej istotnie mniejszą średnicę $D[4,3]$ w porównaniu z komórkami biomasy nie wirowanej (rys. 2). Ponadto, odwirowane komórki szczepu I-S.c.57 zmniejszały się podczas całego okresu pomiarowego.

Podsumowując, największą wrażliwość na zastosowane media dyspersyjne oraz proces wirowania wykazał szczep I-S.c.57. Szczep ten odróżniał się od dwóch pozostałych większym rozmiarem komórek, odmiennym rozkładem objętości, wskazującym na obecność zespołów komórek w formie kłaczków. Spośród przebadanych płynów najmniejszy wpływ na średnicę komórek drożdży miała woda destylowana. Czas ekspozycji w wodzie nie zmieniał średnicy komórek drożdży I-S.ca.13 oraz I-S.c.46. Przyjęto więc, że do badania wielkości komórek drożdży przy użyciu analizatora wielkości cząstek Mastersizer 2000 nie należy wirować biomasy, można ją wprowadzić do wody destylowanej, pobierając materiał z podłoża hodowlanego lub fermentacyjnego, a pomiaru dokonywać bezpośrednio po dyspersji.

Ważnym elementem doświadczenia była ocena reakcji komórek drożdży w warunkach stresu osmotycznego i etanolowego, czyli po zawieszeniu w roztworach wodnych glukozy (5, 10 i 20% wag) lub etanolu (2,5, 5 i 10% obj.). Stwierdzono, że zastosowane medium oraz jego stężenie miało istotny wpływ na średnicę komórek. Wszystkie badane szczepy drożdży zmniejszały swoje rozmiary w miarę wzrostu stężenia glukozy, przy czym reakcja komórek była zauważalna tuż po dyspersji (rys. 3). Drożdże I-S.ca.13 oraz I-S.c.46 reagowały szczególnie na 20% roztwór glukozy. Z kolei szczep I-S.c.57 wykazał znaczącą wrażliwość w 10% roztworze. Średnica komórek drożdży zmniejszała się istotnie w ciągu 10 minut ekspozycji, po tym czasie wielkość komórek na ogół stabilizowała się. Może to wskazywać na przystosowanie się drożdży do środowiska zasobnego w podstawowe źródło węgla.

W tabeli 3 przedstawiono wyniki analizy objętościowego rozkładu wielkości komórek drożdży tuż po ich dyspersji w roztworach glukozy lub etanolu. Udział objętości komórek I-S.ca.13 oraz I-S.c.46 o średnicy 2–5 μm zwiększył się z ok. 28% w 5% roztworze glukozy do ok. 40% w roztworze 20%. Nastąpiło to kosztem komórek większych zarówno z przedziału 5–10, jak i 10–20 μm . Drożdże I-S.c.57 zachowywały się podobnie, z tym że objętościowy rozkład wielkości komórek był bardziej rozproszony. Był on porównywalny z tym, jaki obserwowano po dyspersji biomasy w wodzie destylowanej, soli fizjologicznej oraz podłożu YPG.

Komórki drożdży I-S.ca.13 oraz I-S.c.46 zachowywały swoje rozmiary w 2,5 i 5% obj. roztworach etanolu (rys. 4). W 10% roztworze wystąpiło zmniejszenie średnicy komórek po 5 i 10 min ekspozycji. Komórki szczepu I-S.c.57 zmniejszały swoje rozmiary w miarę upływu czasu już przy stężeniu etanolu na poziomie 2,5% obj. Kurczenie się komórek postępowało w 5% roztworze. Zastosowanie 10% roztworu etanolu wywołało prawdopodobnie zjawisko flokulacji komórek szczepu I-S.c.57, ponieważ średnia wartość średnicy zwiększyła się do 9,8 μm tuż po zawieszeniu komórek oraz do ok. 35–44 μm po 5–15 min ekspozycji. Analiza rozkładu wykazała wzrost udziału obiektów o średnicy powyżej 40 μm z 0,3 do 18–25%.

DYSKUSJA

Ocena właściwości drożdży wykorzystywanych w procesach biotechnologicznych uwzględnia wiele aspektów, w tym także cechy morfologiczne komórek. Kształt i rozmiar komórki może nieść informację o stadium wzrostu i jej zdolności do pączkowania. Celem wielu badań jest m.in. wyjaśnienie mechanizmów regulacji wielkości komórek w różnych fazach cyklu życiowego [Bryan i in. 2010, Turner i in. 2012]. Okazuje się np., że rozmiar komórki jest czynnikiem limitującym ilość cykli replikacyjnych, a tym samym długość jej życia [Yang i in. 2011, Zadrag-Tecza i in. 2009].

Na rozmiar komórek mają wpływ czynniki zewnętrzne. Drożdże w różnych środowiskach odznaczają się określoną wielkością komórek, a pod wpływem różnorodnych czynników, w tym czynników stresowych, zdolne są do zmiany swoich rozmiarów. Warunki stresowe są typowe dla fermentacji stężonych brzeczek piwowskich (High Gravity Brewing). Dlatego też pomiar średnicy komórek może być pomocny przy opisywaniu stanu fizjologicznego drożdży oraz przebiegu i efektów fermentacji brzeczki piwowskiej.

Przeprowadzone badania własne dotyczyły oceny możliwości wykorzystania laserowego analizatora wielkości cząstek Mastersizer 2000 (Malvern Instruments) do badania średnicy komórek drożdży piwowskich. Rywińska i in. [2005] potwierdzili przydatność tego urządzenia do charakterystyki populacji drożdży *Yarrowia lipolytica* w czasie długoterminowej biosyntezy kwasu cytrynowego.

W prezentowanej pracy uwagę skupiono na doborze parametrów pomiaru, zakładając, że średnica komórek drożdży może się zmieniać po ich przeniesieniu z naturalnego środowiska wzrostowego lub fermentacyjnego do środowiska, w którym dokonywany jest pomiar. Dlatego też w celu ustalenia najlepszych warunków oznaczenia wykorzystano różne cieczy dyspersyjne oraz różny czas ekspozycji.

Spośród zastosowanych płynów najmniejszy wpływ na średnicę komórek badanych szczepów drożdży wywierała woda destylowana oraz podłoże YPG – takie, jakie stosowano do przygotowania biomasy. Uznano zatem, iż do pomiaru średnicy komórek drożdży przy użyciu laserowego analizatora wielkości cząstek możliwe i wystarczające jest stosowanie wody destylowanej jako cieczy dyspersyjnej. Jest to rozwiązanie, które nie podnosi znacząco kosztów oznaczenia, co jest ważne przy wykonywaniu serii pomiarów (na jedną próbę trzeba przygotować ok. 800 ml cieczy). Zawieszenie biomasy drożdży bezpośrednio pobranej ze środowiska hodowlanego oraz wykonywanie pomiaru tuż po dyspersji komórek upraszcza i skraca procedurę oznaczenia i daje możliwość uzyskania powtarzalnych wyników.

W dalszej części pracy badano, w jaki sposób zmienia się wielkość komórek drożdży po przeniesieniu ich do środowiska wywołującego zjawisko stresu komórkowego. Wraz ze wzrastającym stężeniem glukozy średnica komórek wszystkich badanych szczepów drożdży ulegała zmniejszeniu. Wyniki te były zgodne z wynikami Morrisa i in. [1986], którzy wykazali, że wzrost ciśnienia osmotycznego środowiska powoduje kurczenie się komórek drożdży oraz z wynikami Cahilla i in. [2000], którzy obserwowali zmniejszanie się rozmiarów komórek wystawionych na działanie różnych stężeń czynników wywołujących stres osmotyczny. Tego typu reakcja była odpowiedzią drożdży na zmiany ciśnienia osmotycznego. W warunkach stresu hipertonicznego komórki zmniejszają, a w warunkach hypotonicznych zwiększają swoją wielkość, co jest wynikiem próby zrównoważenia wewnątrzkomórkowego stężenia substancji ze stężeniem tej substancji w środowisku zewnętrznym [Morris i in. 1986]. Odbywa się to poprzez utratę wody z komórki lub pobieranie jej ze środowiska zewnętrznego. Według Pratt i in. [2003] podwyższone ciśnienie osmotyczne powoduje nie tylko skurczenie się komórek drożdży, zmienia także normalny, gładki, sferyczny bądź owalny kształt komórki na skrócony albo pofałdowany. Ponadto stres osmotyczny zakłóca metabolizm drożdży oraz pogarsza ich żywotność.

Stres etanolowy, podobnie jak stres osmotyczny, wpływa niekorzystnie na komórkę drożdży. Etanol ujawnia swe destrukcyjne działanie zarówno na poziomie metabolizmu wewnętrznego komórki, wywołując zakłócenia w organizacji struktury chemicznej i funkcji biologicznej błon komórkowych, jak również na poziomie vitalności, przyczyniając się do obniżenia żywotności i objętości komórek drożdżowych [Antkiewicz i Poreda 2003].

W badaniach własnych nie wykazano istotnego wpływu 2,5, 5 i 10% obj. roztworów etanolu na średnicę komórek drożdży I-S.ca.13 oraz I-S.c.46. Natomiast w przypadku drożdży I-S.c.57 efekt oddziaływania etanolu był widoczny. Wydłużenie czasu ekspozycji komórek tego szczepu w roztworze etanolu o stężeniu 2,5 i 5% obj. powodowało zmniejszanie się ich średnicy, co mogło być związane z próbą przystosowywania się drożdży do nowego środowiska. Pratt i in. [2003] wykazali, że wystawienie drożdży na działanie stresu etanolowego (10% obj. r-r etanolu) przez 15 min wywołuje kurczenie się komórek, powoduje ponadto istotne zmiany w kształcie i właściwościach komórek.

Podczas ekspozycji drożdży I-S.c.57 w 10% obj. roztworze etanolu prawdopodobnie doszło do flokulacji komórek, na co wskazywały wysokie wartości średnicy $D[4,3]$ oraz fakt, że 18–25% objętości badanej biomasy tworzyły obiekty o średnicy powyżej 40 μm . Etanol wymieniany jest w literaturze jako czynnik indukujący flokulację drożdży [Kamada i Murata 1984]. Mechanizm odpowiedzialny za wpływ etanolu na flokulację nie jest dokładnie poznany, ale uważa się, że może on działać jak surfaktant [Suzzi 1996]. Adsorpcja etanolu może również modyfikować układ i właściwości powierzchniowych polimerów. Dengis i in. [1995] wykazali, że drożdże fermentacji górnej i dolnej nie ulegały flokulacji pod wpływem etanolu w fazie wzrostu wykładniczego. Etanol nie miał także wpływu na flokulację szczepów dolnej fermentacji w fazie stacjonarnej. Natomiast w przypadku szczepów fermentacji górnej flokulacja była indukowana już przy stężeniu 5%obj. etanolu. Drożdże I-S.c.57 są szczepem górnej fermentacji o silnych skłonnościach do flokulacji.

Podsumowując, na podstawie przeprowadzonych badań uznano, że analizator Mastersizer 2000 może być przydatny do obserwacji zmian rozmiarów komórek, zwłaszcza tych, które występują jako komórki osobne, tj. nie wykazują zdolności tworzenia zespo-

łów komórek, w tym kłaczków. Proponowana metoda jest szybka, zaś przygotowanie próbek do pomiaru proste – wymaga jedynie zawieszenia badanej biomasy w wodzie. To najkorzystniejsze i najtańsze środowisko do pomiaru średnicy objętościowej komórek.

W dalszych badaniach planowane jest wykorzystanie laserowego analizatora wielkości cząstek do oceny stanu fizjologicznego drożdży piwowarskich podczas wzrostu i fermentacji w podłożach modelowych.

WNIOSKI

1. Analizator wielkości cząstek Mastersizer 2000 może być przydatny do obserwacji zmian rozmiarów komórek drożdży piwowarskich występujących w postaci komórek osobnych.

2. Najkorzystniejszym środowiskiem do pomiaru średnicy komórek drożdży jest woda destylowana.

3. Średnicę komórek należy wyznaczać bezpośrednio po zawieszeniu biomasy w cieczy dyspersyjnej.

4. Komórki drożdży zmniejszyły swoje rozmiary w miarę wzrostu stężenia roztworu glukozy lub etanolu.

5. Badane szczepy drożdży różniły się pod względem zachowania w zastosowanych mediach. Największą wrażliwość na warunki środowiska wykazał szczep górnej fermentacji *S. cerevisiae* I-S.c. 57.

PIŚMIENNICTWO

- Antkiewicz P., Poreda A., 2003. Zdolność adaptacji drożdży piwowarskich w warunkach zmiennego natężenia czynników stresowych. *Agro Przemysł*, 4, 26–27.
- Boyd A.R., Gunasekera T.S., Attfield P.V., Simic K., Vincent S.F., Veal D.A., 2003. A flow-cytometric method for determination of yeast viability and cell number in a brewery. *FEMS Yeast Research*, 3, 11–16.
- Bryan A.K., Goranov A., Amon A., Manalis S.R., 2010. Measurement of mass, density, and volume during the cell cycle of yeast. *PNAS*, 107(3), 999–1004.
- Cahill G., Murray D. M., Walsh P. K., Donnelly D., 2000. Effect of the concentration of propagation wort on yeast cell volume and fermentation performance. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 58, 219–280.
- Dengis P.B., Nélissen L.R., Rouxhet P.G., 1995. Mechanisms of yeast flocculation: comparison of top- and bottom-fermenting strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61(2), 718–728.
- Hutter K.J., Miedl M., Kuhmann B., Nitzsche F., Bryce J.H., Stewart G.G., 2005. Detection of proteinases in *Saccharomyces cerevisiae* by flow cytometry. *J. Inst. Brew.*, 111(1), 26–32.
- Kamada K., Murata M., 1984. On the mechanism of brewers yeast flocculation. *Agric. Biol. Chem.*, 48, 2423–2433.
- Kordialik-Bogacka E., 2007. Metody fluorescencyjne w ocenie jakości drożdży. *Materiały XII Szkoły Technologii Fermentacji – Piwowarstwo w Unii Europejskiej*, Wrocław-Kliczków 2007, 44–45.
- Misiewicz A., Czuba J., 2005. Charakterystyka i różnicowanie drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. *Cz. I. Metody tradycyjne. Prace Instytutów i Laboratoriów Badawczych Przemysłu Spożywczego*, t. 60, 7–19.

- Morris G.J., Winters L., Coulson G.E., Clarke K.J., 1986. Effect of osmotic stress on the ultrastructure and viability of the yeast. *J. Gen. Microbiol.*, 132(7), 2023–2034.
- Pratt L.P., Bryce H.J., Steward G.G., 2003. The effects of osmotic pressure and ethanol on yeast viability and morphology. *J.Inst.Brew.*, 109 (3), 218–228.
- Rzędowska H. (red.), 1969. Katalog kultur drobnoustrojów przemysłowych. WNT, Warszawa.
- Sakai T., Koo K., Saitoh K., 1986. Use the protoplast fusion for the development rapid starch-fermenting strains of *Saccharomyces diastaticus*. *Agric.Biol.Chem.*, 50(2), 297–306.
- Suzzi G., 1996. Flokulacja drożdży, Materiały I Szkoły Technologii Fermentacji – Drożdże w technologii fermentacji. Wrocław, 261–277.
- Materiały firmy Malvern Instruments (niepublikowane).
- Weigert C., Steffler F., Kurz T., Shellhammer T.H., Methner F.J., 2009. Application of a short intracellular pH method to flow cytometry for determining *Saccharomyces cerevisiae* vitality. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75(17), 5615–5620.
- Yang J., Dugrawala H., Hua H., Manukyan A., Abraham L., Lane W., Mead H., Wright J., Schneider B.L., 2011. Cell size and growth rate are major determinants of replicative lifespan. *Cell Cycle*, 10(1), 144–155.
- Turner J.J., Ewald J.C., Skotheim J.M., 2012. Cell size control in yeast. *Curr. Biol.*, 22(9), 350–359.
- Rywińska A., Rymowicz W., Żarowska B., Zięba T., Gryszkin A., 2005. Wykorzystanie laserowego analizatora cząstek do oceny stanu fizjologicznego drożdży *Yarrowia lipolytica* podczas ciągłej biosyntezy kwasu cytrynowego. *Inżynieria i Aparatura Chemiczna*, 4, 92–94.
- Zadrag-Tecza R., Kwolek-Mirek M., Bartosz G., Bilinski T., 2009. Cell volume as a factor limiting the replicative lifespan of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biogerontology*, 10(4), 481–488.

EVALUATION OF MEASUREMENT OF BREWING YEAST DIAMETER CAPABILITIES WITH THE USE OF LASER PARTICLE SIZE ANALYZER

Abstract. The use of Mastersizer 2000 particle size analyzer for determination of brewing yeast volume mean diameter was examined. It seems that the best way of cell size measurement is to transfer a biomass sample directly from the growth or fermenting media to the distilled water as a dispersant. The analyzer can be useful to observe cell size changes in the conditions of osmotic or ethanol stress.

Key words: brewing yeast, cell size, particle size analyzer

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 30.06.2013

Do cytowania – For citation: Foszczyńska B., Dziuba E., Chmielewska J., 2013. Ocena możliwości pomiaru średnicy komórek drożdży piwowarskich przy użyciu laserowego analizatora wielkości cząstek *Acta Sci. Pol. Biotechnol.*, 12 (2), 15–28.

THE RELEASE OF SULFUR COMPOUNDS DURING DEGRADATION OF FEATHER KERATIN BY TWO *BACILLUS* STRAINS

Wojciech Łaba, Anna Choińska, Anna Rodziewicz

Wrocław University of Environmental and Life Sciences

Abstract. Keratinolytic bacteria *Bacillus polymyxa* B20 and *B. cereus* B5esz during cultures in medium with chicken feathers as a sole nutrient source, accumulated various amounts of sulfur compounds at different oxidation level, including thiols, thiosulfate, sulfite and sulfate. The main difference observed between the two tested strains was higher release of sulfate by the former and elevated concentration of thiols by the latter. Additionally, the activity of glutathione reductase, that could potentially play a role in keratinolysis was confirmed, mainly in the cell homogenate fraction, rather than extracellular. Keratinases in crude culture fluids exhibited activity towards soluble keratin preparation, as well as native feather keratin. Application of 2-mercaptoethanol and sulfite, agents that potentially could take part in keratin sulfitolysis, led to a conclusion that they could play a role in keratin degradation, other than activation of extracellular enzymes.

Key words: *Bacillus*, sulfur compounds, keratinases, reducing agents, disulfide reductase

INTRODUCTION

Keratin, a main constituent of vertebrate skin appendages, is a fibrous protein of unique multi-level structure. Its high resilience to mechanical and chemical factors as well as enzymatic hydrolysis is a result of rigid structure, and high cysteine content yielding numerous disulfide bonds. Microbial keratinolytic enzymes are recognized as proteases capable of degrading insoluble structure of keratin proteins. Keratinases are capable of effective bioconversion of keratinous wastes from meat and poultry processing industries into recoverable products such as feedstuff, fertilizers, polymers and in the production of rare amino acids like cysteine and serine [Ichida et al. 2001, Gupta and Ramnani 2006].

© Copyright by Wrocław University of Environmental and Life Sciences

Corresponding author – Adres do korespondencji: Wojciech Łaba, Department of Biotechnology and Food Microbiology, Wrocław University of Environmental and Life Sciences, 51-630 Wrocław, Chelmońskiego 37/41, Poland, e-mail: wojciech.laba@up.wroc.pl

Great deal of research was made to describe keratin biodegradation by a variety of microorganisms, while the mechanism of keratinolysis has not been finally explained so far. A conclusion was put forward that keratin biodegradation is not limited to just a proteolytic event. The first step of the process is considered to be denaturation through cleavage of a major part of disulfide bonds, followed by proteolytic hydrolysis of the substrate [Kunert 1989]. Keratinases of different microorganisms vary in their properties [Ignatova et al. 1999, Kaul and Sumbali 1999, Ghosh et al. 2008, Daroit et al. 2009]. Vast majority of keratinases belongs to serine- and metalloproteases, however, their proteolytic action is known to be supported by reducing agents through cleavage of disulfide bridges in the keratinous substrate. Besides the chemical factors like sulfite or thiols, the disulfide-reducing enzymes are often mentioned. The presence and the quantity of these factors is diverse for each group of keratinolytic microorganisms. Investigating these differences seems to be crucial for the elucidation of practical aspects of keratinolysis.

The capability of effective keratin biodegradation is a unique feature found in a number of bacteria, actinomycetes and fungi. From among bacteria, the genus *Bacillus* appears to play a primary role in feather recycling since it is recognized as the major source of soil proteases [Watanabe and Hayano 1995, Bach et al. 2011]. Keratinolytic activity has been also widely documented for *Streptomyces* spp. [Letourneau et al. 1998, Ignatova et al. 1999, Kaul and Sumbali 1999] and several recently reported strains of Gram-negative bacteria like *Chryseobacterium* sp. [Riffel et al. 2003, Wang et al. 2008], *Vibrio* sp. [Sangali and Brandelli 2000] and *Stenotrophomonas* sp. [Yamamura et al. 2002; Jeonga et al. 2010]. Keratin solubilization by prokaryotes is believed to proceed exclusively via enzymatic attack [Kunert 1989] while in the case of keratinolytic fungi like *Trichophyton* spp. and *Microsporum* spp. it is supported by sulfitolysis involving secreted sulfite, coupled with mechanical action of hyphae [Kunert and Novotný 2001].

The bacterial strains involved in the presented study, represent the aerobic, spore-forming rods, ubiquitous in nature, mainly in soil and plant [Rodziewicz and Łaba 2008, Vijaya et al. 2011]. Those saprophytic bacteria, especially *Bacillus polymyxa*, exhibit an ability of biofilm formation, which is a feature allowing to enhance keratin biodegradation [Rodziewicz et al. 2006]. Some strains of *B. cereus* are capable of causing opportunistic food-borne infections, it is however a highly strain-specific attribute. The spectrum of possible effects of the species on human population ranges from probiotic properties to food spoilage-associated toxicity [Cadot et al. 2010].

The aim of the presented study was to evaluate the release of sulfur compounds by two keratinolytic strains, *B. polymyxa* B20 and *B. cereus* B5esz, growing in the presence of chicken feathers and to assess the role of sulfitolytic factors in feather biodegradation.

MATERIALS AND METHODS

Keratinolytic strains of *Bacillus polymyxa* B20 and *Bacillus cereus* B5esz isolated previously from soil and keratinous waste, respectively, were used for the present study [Łaba and Rodziewicz 2010].

Microbial cultures were carried out aerobically in 250 ml Erlenmayer flasks, in 50 ml of medium, at the temperature 30°C, agitated at 170 rpm, for 15 days. Nutrient broth culture of $1.2 \cdot 10^8$ cfu/ml served as inoculum, used in 1 ml volume per flask. The medium

used in the study consisted of: MgSO_4 (0.1%), KH_2PO_4 (0.01%), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.001%), CaCl_2 (0.01%), yeast extract (0.05%). The basic carbon and nitrogen source were whole, white chicken feathers (1%). Preceding application feathers were washed, degreased with methanol:chloroform (1:1) and dried. The medium was set to pH 7.2 prior to sterilisation. All microbial cultures were performed in duplicate.

All assays were performed in collected culture fluids, after removing feather debris by filtration through medium density filter paper and centrifugation at $10\,000 \times g$ for 10 min at 4°C . The cell sediment was collected for the determination of the disulfide reductase activity. Sulfur compounds were assayed according to following methods: the level of reduced thiols and sulfides by the method of Ellman [Riener et al. 2002] with 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic) acid (DTNB); sulfates by the method of Kolmert et al. [2000] involving barium chloride; sulfites with the method described by Kletzin [1989], using fuchsin and formaldehyde; thiosulfates by the method of Sörbo [1957] using potassium cyanide; sulfides by measurement with a silver/sulfide ionometric electrode and a silver/chloride reference electrode (Detektor s.c.) using pH/ion-meter CP-501 (Elmetron s.j.), after immediate mixing of samples (1:1) with sulfide antioxidant buffer (NaOH 20 g, EDTA- Na_2 dihydrate 17.90 g, L-ascorbic acid 8.75 g/250 cm^3). The red-ox potential was determined directly using the ERPt-11 electrode (Hydromet).

Keratinolytic activity [KA] was assessed using two methods:

1. in a reaction against soluble keratin preparation, according to Wawrzekiewicz et al. [1987], at temperature 40°C and optimum pH 10.2 and pH 7.5, for *B. polymyxa* and *B. cereus* respectively. The unit of keratinolytic activity [KU] was expressed as 0.01 increase of absorbance of TCA-soluble products at 280 nm, calculated per 1 mg of protein in 1 minute;

2. in a reaction against keratin azure (Sigma), at same conditions. One unit of keratinolytic activity was expressed as 0.01 increase of products absorbance at 595 nm, released by keratinases from 5 mg of the substrate, calculated per 1 mg of protein in 1 minute [Letourneau et al. 1998]. All the determinations of keratinolytic activity were performed in triplicate.

The influence of 2-mercaptoethanol and sulfite at concentration 1 mM, 5 mM and 10 mM on keratinolytic activity was also tested. Culture fluids of maximum keratinolytic activity for each strain were used.

Glutathione reductase activity was measured according to the method described by Carlberg and Mennervik [1985] in a reaction with oxidized glutathione in the presence of NADPH. The activity was determined in the culture medium (extracellular) and in sonication-disintegrated cell suspension [Baillie and Norris 1963] prior to and after centrifugation at $10\,000 \times g$ for 10 min at 4°C (membrane-bound and intracellular activity, respectively). One unit of disulfide reductase activity was 1 μmol of NADPH oxidized in 1 minute. Specific activity was given.

RESULTS

Both tested bacterial strains, *Bacillus polymyxa* B20 and *B. cereus* B5esz, exhibit significant keratinolytic potential, that allows them to grow in the presence of native feather keratin as a main nutrient source, as described previously [Łaba and Rodziewicz 2010]. During cultures on feather-supplemented mineral medium hydrolytic action of extracel-

lular keratinolytic proteases is the basic means of keratinic substrate decomposition. Utilization of cysteine-rich keratinous substrate by keratinolytic microorganisms leads to accumulation of sulfur compounds at different oxidation level in culture media. However, significant divergence between the two strains was observed. *B. cereus* demonstrated an ability to release extensive amounts of reduced thiols and hydrogen sulfide, attaining a level of 1.36 mM on the 4th day of culture, in contrast to 0.06 mM in the case of *B. polymyxa* (Fig. 1). The increase of sulfates above the concentration already introduced into the culture medium was 7.04 mM in the culture of *B. polymyxa* which was more than two times higher than in the case of *B. cereus*. The concentration and dynamics of sulfites production were comparable for both strains and increased to 0.71–0.83 mM at the 15th day of culture. Thiosulfates were released to culture environment at the lowest concentration of all investigated sulfur compounds, up to 0.04–0.06 mM for *B. cereus* and *B. polymyxa*, respectively. Sulfides remained undetected at the level above 10 μ M (the ionometric electrode sensitivity threshold), in both cultures.

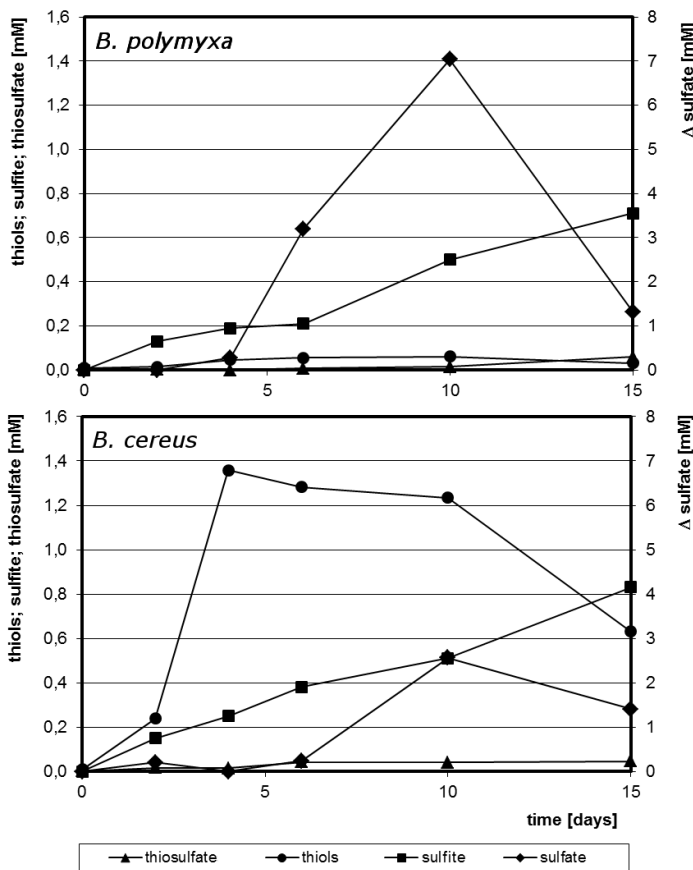


Fig. 1. The release of sulfur compounds in cultures of *B. polymyxa* and *B. cereus* during growth in chicken feather medium.

Rys. 1. Uwalnianie związków siarki w trakcie hodowli bakterii *B. polymyxa* i *B. cereus* w podłożu z piórami

Disulfide reductase activity is often suggested as a factor supporting primary breakdown of disulfide bridges in keratinous substrate. In the presented experiment low extracellular disulfide reductase activity was detected, as well as in the cell membrane-bound fraction in cell homogenate (Fig. 2). Considerably higher activity of $0.037 \mu\text{mol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ was present in the intracellular fraction, however only in *B. polymyxa*, in contrast to $0.013 \mu\text{mol} \times \text{mg}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ in *B. cereus*. It is notable, that the first activity peak for *B. polymyxa* coincided with maximum value of keratinolytic activity [Łaba and Rodziejewicz 2010], followed by depression and secondary elevation.

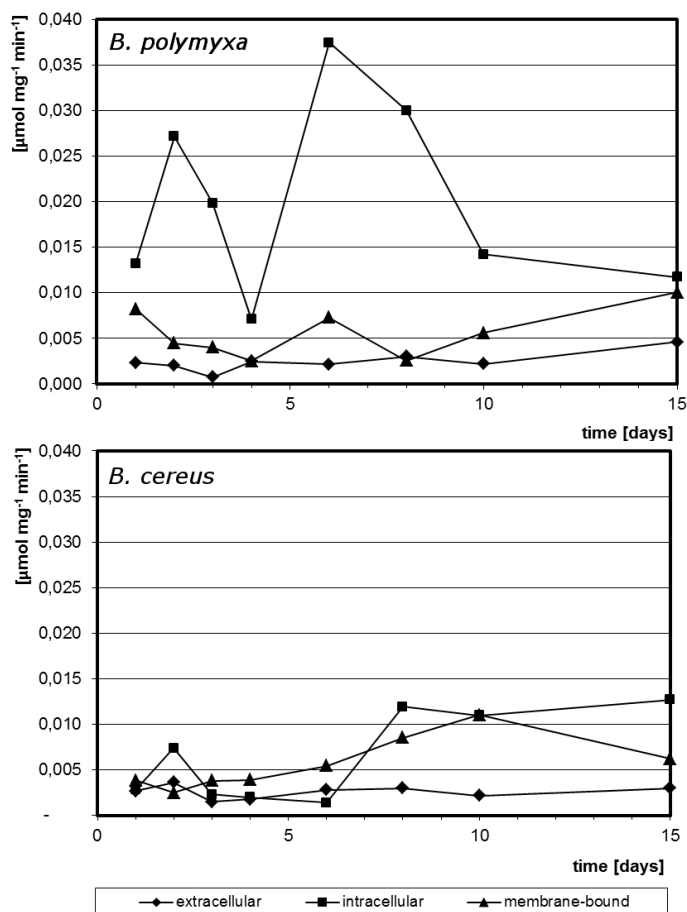


Fig. 2. The activity of disulfide reductase in culture fluids and fractions of cell homogenate
Rys. 2. Aktywność reduktazy disulfidowej w płynach pochodzących oraz frakcjach homogenatu komórkowego

Keratinases in crude culture fluids of *B. polymyxa* and *B. cereus* from the production peak on the 2nd day of culture, exhibited activity towards both, native keratin (keratin azure) of 0.17 KU and 1.42 KU, respectively (Tab. 1). Application of two selected reducing agents, sulfite and 2-mercaptoethanol, proved to be advantageous for the action of

cell-free crude keratinases from *B. polymyxa* against keratin azure. The first enhanced activity up to 145.5% of original value, and the latter up to 222.7%. Sulfite highly stimulated keratinolytic activity on soluble keratin, but only at 5 mM concentration, unlike 2-mercaptoethanol, which did not pose any positive effect. Nonetheless, sulfite inhibited activity of keratinases from *B. cereus* on both, native and soluble keratin. On the contrary, 2-mercaptoethanol at 10 mM increased keratinolytic activity on the native substrate, up to 28% above the initial value. Summarizing, application of a thiol compound at the example of 2-mercaptoethanol, resulted in improvement of keratinase activity, but only on the native keratinous substrate, presumably supporting primary cleavage of disulfide bonds or sustaining proper reductive environment, advantageous for keratinolytic cleavage. Sulfite could also play a similar role, however *B. polymyxa* keratinase activation in the presence of specific concentration (5 mM) of sulfate against soluble keratin remains unclear. In the case of *B. cereus* keratinases sulfite displayed no activation in reaction against both tested substrates.

DISCUSSION

Utilization of keratinic materials by specialized microorganisms requires not only high proteolytic capabilities but also additional factors supporting primary cleavage of disulfide bridges in keratin. The principles of microbial keratin biodegradation involves an auxiliary role of reducing molecules secreted into culture medium, sustaining lowered red-ox potential. Specifically, reducing sulfur compounds accumulating in culture medium in the presence of keratin are usually highlighted. This process was described for keratinolytic filamentous fungi and actinomyces [Kunert 1989, Rajak et al. 1991]. Fungi are capable of intense secretion of cysteine catabolism products in a form of sulfite and sulfate. Among the released compounds sulfate and thiosulfate are known to be inert products, whereas sulfite, in neutral to alkaline environment, could play a role in disulfide bonds reduction through sulfitolysis, producing S-sulfocysteine. As an effect, initial denaturation of keratin and its increased susceptibility towards enzymatic hydrolysis occurs. It was shown for *Microsporum gypseum* cultured on wool-containing medium by detection of sulfitolysis products: sulfocysteine (0.14 mM) and corresponding concentration of reduced thiols [Kunert and Stránský 1988, Kunert 1989]. Léchenne et al. [2007] evidenced concentration of sulfocysteine up to 2 mM together with sulfite up to 0.8 mM for *Aspergillus fumigatus* and few species of dermatophytic fungi. In contrast, in cultures of actinomyces only thiosulfate is accumulated, in the absence of sulfite and negligible sulfate concentration, not supporting direct sulfitolysis. Nonetheless, keratin decomposition was observed in that case, as well, accompanied by the release of cysteine-rich peptides, which could be explained by direct action of cells reducing apparatus or, as proved in early research of Kunert, sulfite was entirely bound with excess cysteine to form sulfocysteine [Kunert 1989].

Sulfate was the dominating form of sulfur removal for both tested *B. polymyxa* and *B. cereus*, as well as several keratinolytic fungi from genera *Chrysosporium*, *Geotrichum*, *Gymnoascoideus*, *Scopulariopsis* and *Talaromyces*, tested by Rajak et al. [1991]. The substantial difference between eukaryotic and prokaryotic microorganisms appears to be in the elevated concentration of thiosulfates and reduced thiols released by the latter.

Table 1. Changes of keratinolytic activity on keratin azure and soluble keratin in the presence of sulfite and 2-mercaptoethanol (specific activity given)
 Tabela 1. Zmiany aktywności keratynolitycznej względem azokeratyny i keratyny rozpuszczalnej, w obecności siarczynu i 2-merkaptoetanolu (podano aktywność właściwą)

	Control Kontrola		Sulfite Siarczyn		2-mercaptoethanol 2-merkaptoetanol		
	0	1	5	10	1	5	10
conc. [mM] stężenie							
keratin azure azokeratyna	0.17±0.02	0.21±0.06	0.22±0.06	0.25±0.05	0.22±0.02	0.37±0.04	0.38±0.01
<i>B. polymyxa</i> B20							
soluble keratin keratyna rozpuszcz.	10.34±2.79	10.71±1.95	20.78±2.74	12.74±5.99	5.36±0.85	3.69±2.10	6.09±2.62
<i>B. cereus</i> B5esz							
keratin azure azokeratyna	1.42±0.40	0.73±0.17	0.71±0.11	0.67±0.19	1.20±0.03	1.62±0.06	1.82±0.47
soluble keratin keratyna rozpuszcz.	97.21±10.62	80.57±4.97	105.09±5.57	47.95±0.93	84.51±2.01	76.15±4.74	59.55±7.23

Thiosulfates were reported to be secreted by various fungal species up to the level of 0.2 mM on feather keratin [Rajak et al. 1991] and can be ten-fold higher in *S. fradiae* cultures on wool [Kunert and Stránský 1988]. In contrast, concentration of thiosulfates in cultures of both tested *Bacillus* strains was negligible.

According to reference data, increasing concentration of free sulfhydryl groups in culture medium should be interpreted as a direct consequence of keratin biodegradation. Exceptionally high concentration of reduced thiols in cultures of *B. cereus* could be explained as a result of elevated proteolytic (caseinolytic) activity (225 PU), emerging on the third day of culture [Łaba and Rodziewicz 2010], leading to rapid accumulation of cysteine-rich peptides or cysteine, yet not transformed into more oxidized state. As an effect, significantly lower redox potential of culture medium was observed, reaching 72 mV, in comparison to 143 mV in cultures of *B. polymyxa* (initial value in culture medium 308 mV; data not shown). In cultures of *B. polymyxa* merely 0.1 mM of thiols was accumulated, despite its considerable keratinolytic activity. It is notable that the release of thiol compounds was correlated with biosynthesis of keratinolytic and proteolytic enzymes, while concentration of other oxidized compounds was increasing gradually in the medium along with keratin degradation.

Liberation of reduced thiols during keratin utilization varies significantly for different bacterial species. According to Ramnani et al. [2005], *B. licheniformis* grown on feathers produced 0.18 mM of thiols, *Vibrio* sp. [Sangali and Brandelli 2000] released 0.4 mM of thiols, *S. pactum* accumulated 1.4 mM [Böckle and Müller 1997] and thermophilic *Thermoactinomyces candidus* released 0.2 mM of –SH groups from wool [Ignatova et al. 1999]. During cultures of keratinophilic filamentous fungi usually comparable level of thiols up to 0.4 mM can be achieved [Rajak et al. 1991, Kaul and Sumbali 1999, Cao et al. 2008]. In contrast, as much as 190 μ M of thiols was reported by Ramnani et al. [2005] for *B. licheniformis* RG1 within the first day of culture on feathers, along with simultaneous mounting of caseinolytic activity. Sulfides, undetected in tested bacterial cultures, are intracellular intermediates of cysteine and methionine catabolism. In culture conditions in alkaline environment sulfides could theoretically reduce disulfide bridges with formation of thiocysteine. However, according to Kunert [1989], neither extracellular sulfide nor thiocysteine was present in culture of *S. fradiae*, probably due to strictly aerobic conditions.

Since reducing sulfur compounds are produced in minor concentrations by prokaryotic microorganisms, different disulfide bond cleavage mechanisms were proposed. Increasing concentration of reduced thiols in bacterial cultures on keratinous substrates could indicate direct reduction of cystine bonds by cells enzymatic system [Ignatova et al. 1999, Kumar et al. 2008]. This reducing activity is a feature of specific disulfide reductases [Ramnani et al. 2005, Yamamura et al. 2002], however Prakash et al. [2010] also suggested direct action of a keratinolytic protease. Ramnani et al. [2005] proved that disulfide reductase is bound to cell membranes in *B. licheniformis* ($56 \mu\text{mol} \times \text{cm}^{-3} \text{min}^{-1}$), thus it could not be detected at significant level in culture medium, which confirms the results obtained in the presented study. Nevertheless, the primary function of membrane-bound oxidoreductases might not be associated with extracellular protein breakage [Kouwen and van Dij 2009]. On the contrary, Yamamura et al. [2002] described extracellular reductase-like enzyme produced by *Stenotrophomonas* sp., which, in purified form, was capable of enhancing lytic action of strains protease and commercial Proteinase K,

even in the absence of NADH, a donor typically required by disulfide reductases. Similarly, recent results published by Ghosh et al. [2008] show disulfide reductase activity in extracellular fraction of *B. cereus* DCUW culture ($0.07 \mu\text{mol} \times \text{cm}^{-3} \text{min}^{-1}$). Prakash et al. [2010] isolated two enzymes from culture medium of *B. halodurans* PPKS-2, of which both exhibited activity towards keratin, but one possessed disulfide reductase activity and N-terminal homology with reductases. This particular reductase was active towards glutathione in the presence and absence of NADH, $1.82 \text{ U} \times \text{mg}^{-1}$ and $0.48 \text{ U} \times \text{mg}^{-1}$, respectively. Joint action of both enzymes resulted in significant enhancement of keratin cleavage, which appears to confirm their cooperative purpose. Different results were presented by Böckle and Müller [1997], where neither cell homogenate nor culture fluid of *S. pactum* exhibited reductase activity, except for whole metabolically active cells.

Enzymatic degradation of keratin is usually associated with supporting action of disulfide bonds-reducing factors. Application of non-enzymatic reducing factors into enzymatic reaction with cell-free keratinase extracts appears to be a rational solution in proteolytic degradation of keratinic wastes. This should lead to enhancement of keratin breakdown due to sulfitolytic cleavage of disulfide bonds. In order to determine the influence of reducing agents on the availability of the keratinous substrate towards proteolysis and to exclude their enzyme-stabilizing properties, keratinolytic reactions were carried out on native feather keratin (keratin azure), as well as soluble keratin preparation, deficient in majority of disulfide bonds. It is significant that keratinases of both tested microorganisms were previously proved not to be thiol-dependent [Laba and Rodziejewicz 2010]. The lack of influence of sulfite and 2-mercaptoethanol on the proteolytic activity against casein was observed, which suggested occurrence of sulfitolysis, rather than protease activation, except for an activatory effect of sulfite towards enzymes of *B. polymyxa*. Likewise, Suh and Lee [2001] confirmed the positive influence of glutathione, cysteine, 2-mercaptoethanol and dithioerythritol, at concentration 1.0–5.0 mM and little effect of sulfite on the keratinase activity from *B. subtilis* against native keratin. The detailed inquiry of reducing agents influence on keratinolytic activity on hair keratin was published by Kunert [1992] for keratinase of *Microsporium gypseum*, where sulfite increased keratinolytic activity at broad concentration range 1–30 mM, while cysteine, dithioerythritol and glutathione were effective at concentration 0.3–1.0 mM.

Both keratinolytic strains of *B. polymyxa* and *B. cereus* are effective keratin-degrading bacteria, however their mode of action, due to metabolic properties, appears to vary. The presence of reducing sulfur compounds in the growth environment undoubtedly influences the process of keratin hydrolysis occurring in nature, nevertheless, this knowledge might also be of biotechnological importance. The presented results suggest that further introduction of disulfide-reducing factors is beneficial for keratin biodegradation carried out with crude keratinases of both tested bacterial strains.

REFERENCES

- Bach E., Cannavan F.S., Duarte F.R.S., Taffarel J.A.S., Tsai S.M., Brandelli A., 2011. Characterization of feather-degrading bacteria from Brazilian soils. *Int. Bioteter. Biodegr.* 65, 102–107.
- Baillie A., Norris J.R., 1963. Studies of enzyme changes during sporulation in *Bacillus cereus*, using starch gel electrophoresis. *J. Appl. Bacteriol.*, 26, 102–106.

- Böckle B., Möller R., 1997. Reduction of disulfide bonds by *Streptomyces pactum* during growth on chicken feathers. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63 (2), 790–792.
- Cadot C., Tran S.L., Vignaud M.L., De Buyser M.L., Kolstø A.B., Brisabois A., Nguyen-Thé C., Lereclus D., Guinebretière M.H., Ramarao N., 2010. InhA1, NprA, and HlyII as candidates for markers to differentiate pathogenic from nonpathogenic *Bacillus cereus* strains. *J. Clin. Microbiol.*, 48 (4), 1358–1365.
- Cao N., Tan H., Liu Y., Xue X., Zhou S., 2008. Characterization of a new keratinolytic *Trichoderma artroviride* strain F6 that completely degrades native chicken feather. *Lett. Appl. Microbiol.*, 104, 411–419.
- Carlberg I., Mannervik B., 1985. Glutathione reductase. *Meth. Enzymol.*, 113, 484–490.
- Daroit D.J., Correa A.P.F., Brandelli A., 2009. Keratinolytic potential of a novel *Bacillus* sp. P45 isolated from the Amazon basin fish *Piaractus mesopotamicus*. *Int. Biodeter. Biodegr.*, 63, 358–363.
- Ghosh A., Chakrabarti K., Chattopadhyay D., 2008. Degradation of raw feather by a novel high molecular weight extracellular protease from newly isolated *Bacillus cereus* DCUW. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 35, 825–834.
- Gupta R., Ramnani P., 2006. Microbial keratinases and their prospective applications: an overview. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 70, 21–33.
- Ichida J.M., Krizova L., LeFevre C.A., Keener H.M., Elwell D.L. Burt Jr. E.H., 2001. Bacterial inoculum enhances keratin degradation and biofilm formation in poultry compost. *J. Microbiol., Meth.* 47, 199–208.
- Ignatova Z., Gousterova A., Spassov G., Nedkov P., 1999. Isolation and partial characterisation of extracellular keratinase from a wool degrading thermophilic strain *Thermoactinomyces candidus*. *Can. J. Microbiol.*, 45, 217–222.
- Jeonga J.H., Leeb O.M., Jeona Y.D., Kima J.D., Leea N.R., Leea C.Y., Sona H.J., 2010. Production of keratinolytic enzyme by a newly isolated feather-degrading *Stenotrophomonas maltophilia* that produces plant growth-promoting activity. *Process Biochem.*, 45, 1738–1745.
- Kaul S., Sumbali G., 1999. Production of extracellular keratinase by keratinophilic fungal species inhabiting feathers of living poultry birds (*Gallus domesticus*): A comparison. *Mycopathologia*, 146, 19–24.
- Kletzin A., 1989. Coupled enzymatic production of sulfite, thiosulfate and hydrogen sulfide from sulfur: purification and properties of a sulfur oxygenase reductase from the facultatively anaerobic archaeobacterium *Desulfurolobus ambivalens*. *J. Bacteriol.*, 171 (3), 1638–1643.
- Kolmert A., Wikström P., Hallberg K.B., 2000. A fast and simple turbidimetric method for the determination of sulfate in sulfate-reducing bacterial cultures. *J. Microbiol. Meth.*, 41, 179–184.
- Kouwen T.R.H.M., van Dij J.M., 2009. Applications of thiol-disulfide oxidoreductases for optimized in vivo production of functionally active proteins in *Bacillus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 85, 45–52.
- Kumar A.G., Swarnalatha S., Gayathri S., Nagesh N., Sekaran G., 2008. Characterization of an alkaline active – thiol forming extracellular serine keratinase by the newly isolated *Bacillus pumilus*. *J. Appl. Microbiol.*, 104, 411–419.
- Kunert J., 1989. Biochemical mechanism of keratin degradation by the actinomycete *Streptomyces fradiae* and the fungus *Microsporium gypseum*: A comparison. *J. Basic Microbiol.*, 29, 597–604.
- Kunert J., 1992. Effect of reducing agents on proteolytic and keratinolytic activity of enzymes of *Microsporium gypseum*. *Mycoses.* 35, 343–348.
- Kunert J. Novotný R., 2001. Degradation of human hair by three soil fungi. An electron microscopic study. *Czech Mycol.*, 53 (3), 189–201.
- Kunert J., Stránský Z., 1988. Thiosulfate production from cystine by the keratinolytic prokaryote *Streptomyces fradiae*. *Arch. Microbiol.*, 150, 600–601.

- Léchenne B., Reichard U., Zaugg C., Fratti M., Kunert J., Boulat O., Monod M., 2007. Sulphite efflux pumps in *Aspergillus fumigatus* and dermatophytes. *Microbiol.*, 153, 905–913.
- Letourneau F., Sousotte V., Bressollier P., Branland P., Verneuil B., 1998. Keratinolytic activity of *Streptomyces* sp. S.K_{1,02}: a new isolated strain. *Lett. Appl. Microbiol.*, 26, 77–80.
- Łaba W., Rodziewicz A., 2010. Keratinolytic potential of feather-degrading *Bacillus polymyxa* and *Bacillus cereus*. *Pol. J. Environ. Stud.*, 19 (2), 371–378.
- Prakash P., Jayalakshmi S.K., Sreeramulu K., 2010. Purification and characterization of extreme alkaline, thermostable keratinase, and keratin disulfide reductase produced by *Bacillus halodurans* PPKS-2. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 87, 625–633.
- Rajak R.C., Parwekar S., Malviya H., Hasija S.K., 1991. Keratin degradation by fungi isolated from the grounds of a gelatin factory in Jabalpur, India. *Mycopathologia*, 114, 83–87.
- Ramnani P., Singh R., Gupta R., 2005. Keratinolytic potential of *Bacillus licheniformis* RG1: structural and biochemical mechanism of feather degradation. *Can. J. Microbiol.*, 51, 191–196.
- Riener C.R., Kada G., Gruber H.J., 2002. Quick measurement of protein sulfhydryls with Ellman's reagent and with 4,4'-dithiodipyridine. *Anal. Bioanal. Chem.*, 373, 266–276.
- Riffel A., Lucas F., Heeb P., Brandelli A., 2003. Characterization of a new keratinolytic bacterium that completely degrades native feather keratin. *Arch. Microbiol.*, 179, 258–265.
- Rodziewicz A., Łaba W., 2008. Biodegradation of feather keratin by *Bacillus cereus* in pure culture and compost, *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities*, 11 (2), #3.
- Sangali S., Brandelli A., 2000. Feather keratin hydrolysis by a *Vibrio* sp. strain kr2. *J. Appl. Microbiol.*, 89, 735–743.
- Sörbo B., 1957. A colorimetric method for the determination of thiosulfate. *Biochim. Biophys. Acta*, 23, 412–416.
- Suh H.J., Lee H.K., 2001. Characterization of a keratinolytic serine protease from *Bacillus subtilis* KS-1. *J. Prot. Chem.*, 20 (2), 165–169.
- Vijaya B., Manjunath K., Jayalakshmi N.R., Nagananda G.S., 2011. Characterization of *Bacillus polymyxa* from jamnagar mine water and biobeneficiation of bauxite ore for calcite through surface modification. *Int. J. Microbiol.*, 2 (2), 156–161.
- Wang S.L., Hsu W.T., Liang T.W., Lyen Y.H., Wang C.L., 2008. Purification and characterization of three novel keratinolytic metalloproteases produced by *Chryseobacterium indologenes* TKU014 in a shrimp shell powder medium. *Biores. Technol.*, 99, 5679–5686.
- Watanabe K., Hayano K., 1995. Seasonal variation of soil protease activities and their relation to proteolytic bacteria and *Bacillus* spp. in paddy field. *Soil Biol. Biochem.* 27, 197–203.
- Wawrzekiewicz K., Łobazewski J., Wolski T., 1987. Intracellular keratinase of *Trichophyton gallinae*. *J. Med. Vet. Mycol.*, 25, 261–268.
- Yamamura S., Morita Y., Hasan Q., Yokoyama K., Tamiya E., 2002. Keratin degradation: a cooperative action of two enzymes from *Stenotrophomonas* sp. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 294, 1138–114.

UWALNIANIE ZWIĄZKÓW SIARKI PODCZAS DEGRADACJI PIÓR PRZEZ DWA SZCZEPY *BACILLUS*

Streszczenie. Keratynolityczne bakterie *Bacillus polymyxa* B20 i *B. cereus* B5esz podczas wzrostu w podłożu z piórami, jako głównym źródłem składników odżywczych, akumulowały w środowisku znaczną ilość związków siarki na różnym stopniu utlenienia, w tym związki tiolowe, tiosiarczany, siarczyny i siarczany. Podstawową różnicą zaobserwowaną pomiędzy dwoma testowanymi mikroorganizmami było wyższe stężenie siarczanów uwalnianych do podłoża przez bakterie *B. polymyxa* oraz zdolność bakterii *B. cereus* do akumulacji w podłożu zredukowanych związków tiolowych. Dodatkowo, aktywność reduktazy

glutationowej, mogącej potencjalnie brać udział w procesie keratynolizy, została potwierdzona głównie w homogenacie komórek, w przeciwieństwie do frakcji pozakomórkowej. Keratynazy obecne w płynie pochodzonym wykazywały aktywność zarówno wobec keratyny rozpuszczalnej, jak i keratyny natywnej. Zastosowanie w mieszaninie reakcyjnej 2-merkaptoetanolu oraz siarczynu pozwoliło zwiększyć aktywność badanych keratynaz poprzez intensyfikację sulfitolizy, natomiast nie na drodze aktywacji tych enzymów.

Słowa kluczowe: *Bacillus*, związki siarki, keratynazy, czynniki redukujące, reduktaza disulfidowa

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 30.06.2013

Do cytowania – For citation: Łaba W., Chońska A., Rodziewicz A., 2013. The release of sulfur compounds during degradation of feather keratin by two *Bacillus* strains Acta Sci. Pol. Biotechnol., 12 (2), 29–40.

SPIS TREŚCI CONTENTS

Krzysztof Cybulski, Ludwika Tomaszewska, Anita Rywińska

- Dobór podłoża inokulacyjnego do produkcji ketokwasów przez drożdże
Yarrowia lipolytica 5
Evaluation of seed culture medium to ketoacids production
by *Yarrowia lipolytica* yeast

Barbara Foszczyńska, Ewelina Dziuba, Joanna Chmielewska

- Ocena możliwości pomiaru średnicy komórek drożdży piwowarskich
przy użyciu laserowego analizatora wielkości cząstek 15
Evaluation of measurement of brewing yeast diameter capabilities
with the use of laser particle size analyzer

Wojciech Łaba, Anna Choińska, Anna Rodziewicz

- The release of sulfur compounds during degradation
of feather keratin by two *Bacillus* strains 29
Uwalnianie związków siarki podczas degradacji piór
przez dwa szczepy *Bacillus*