

# ACTA SCIENTIARUM POLONORUM

Czasopismo naukowe założone w 2001 roku przez polskie uczelnie rolnicze

**Biotechnologia**

Biotechnologia

6(3) 2007



Bydgoszcz Kraków Lublin Olsztyn  
Poznań Siedlce Szczecin Warszawa Wrocław

### **Rada Programowa *Acta Scientiarum Polonorum***

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

### **Rada Naukowa serii *Biotechnologia***

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

Korekta:  
Janina Szydłowska,  
mgr Elżbieta Winiarska-Grabosz

Łamanie  
Halina Sebzda

Projekt okładki  
Daniel Morzyński

ISSN 1644-065X

*Wydanie publikacji dofinansowane ze środków Uniwersytetu Przyrodniczego  
we Wrocławiu*

© Copyright by Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu,  
Wrocław 2007

Redaktor naczelny – prof. dr hab. Andrzej Kotecki  
ul. Sopotka 23, 50-344 Wrocław, tel./fax (71) 328-12-77  
e-mail: [wyd@ozi.ar.wroc.pl](mailto:wyd@ozi.ar.wroc.pl) <http://www.up.wroc.pl>

Nakład 300 + 16 egz. Ark. druk. 2,75  
Drukarnia: F.P.H. „ELMA”

## SKRINING PODŁOŻY DO PRODUKCJI LIOFILIZOWANYCH SZCZEPIONEK DROŹDŻOWYCH DLA SEROWARSTWA\*

Xymena Połomska, Maria Wojtatowicz, Barbara Żarowska,  
Marek Szotłysik, Józefa Chrzanowska

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

**Streszczenie.** Badano przydatność podłoży słodowych (6 wariantów) i serwatkowych (8 wariantów), różniących się zawartością cukrów, związków mineralnych oraz czynników wzrostowych, do produkcji biomasy 5 szczepów drożdży, potencjalnych kultur starterowych dla serowarstwa, przed procesem ich utrwalania na drodze liofilizacji. Wzrost drożdży *Candida kefyr* PIIIb i *C. sphaerica* FII7a zarówno w podłożach słodowych, jak i serwatkowych był bardziej dynamiczny niż szczepów *Yarrowia lipolytica* JIIIc, *Y. lipolytica* PII6a i *C. famata* MI1a. W przypadku podłoży słodowych największą efektywność produkcji biomasy odnotowano w pożywkach wzbogaconych solami mineralnymi zawierającymi azot, fosfor i siarkę oraz ekstraktem drożdżowym. W podłożach serwatkowych oprócz wyżej wymienionych składników niezbędny był jeszcze dodatek glukozy. Biomasa drożdży otrzymana w tych pożywkach wykazywała wysoki poziom przeżywalności po procesie liofilizacji (29,3–84,1%). Jakkolwiek w przypadku czterech z pięciu badanych szczepów drożdży odnotowano wyższą przeżywalność komórek namnożonych w pożywece słodowej niż serwatkowej. Szczep *Y. lipolytica* JIIIc charakteryzował się najwyższym poziomem przeżywalności, powyżej 80%, we wszystkich preparatach niezależnie od pożywki wzrostowej i zastosowanego czynnika ochronnego.

**Słowa kluczowe:** drożdże, podłoża słodowe i serwatkowe, produkcja biomasy, liofilizacja

---

\* Praca została wykonana w ramach grantu MNiI nr 2 P06T 050 28.

## WSTĘP

W ostatnich latach prowadzone są szerokie badania nad zastosowaniem niektórych gatunków drożdży, powszechnie izolowanych z różnych rodzajów sera, jako kultur starterowych w ich produkcji. Najbardziej obiecujące wyniki uzyskano w przypadku takich gatunków, jak: *Yarrowia lipolytica*, *Debaryomyces hansenii* (anamorf – *Candida famata*), *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* (anamorf – *C. sphaerica*), *K. marxianus* (anamorf – *C. kefir*) oraz *Geotrichum candidum* [Wyder i Puhan 1999, Hansen i in. 2001, Szołtyśik i in. 2002, Masoud i Jakobsen 2005]. Szczepienie mleka serowarskiego tymi drożdżami powodowało zarówno skrócenie czasu dojrzewania serów, ujednoczenie ich jakości, jak i wzbogacenie profilu smakowo-zapachowego tych produktów [Bockelmann 2002, Ferreira i Viljoen 2003, Arfi i in. 2004, De Wit i in. 2005, Lanciotti i in. 2005]. Uzasadnia to stosowanie wyselekcjonowanych kultur drożdży, jednakże w formie utrwalonej szczepionki, łatwej do użycia w warunkach mleczarni.

Obecnie powszechnie stosowaną metodą utrwalania przemysłowych szczepionek drobnoustrojów, obok mrożenia, jest liofilizacja [Hunter-Cevera i Belt 1996, Kornacki i Rejs 1997]. Kultury drobnoustrojów utrwalane tą metodą, przy zachowaniu odpowiednich parametrów procesu wymrażania i suszenia oraz użyciu właściwych substancji ochronnych, odznaczają się wysoką przeżywalnością komórek oraz stabilnością cech biotechnologicznych [Cerrutti i in. 2000, Abadias i in. 2001, Blanquet i in. 2005]. Charakterystyka ta ulega wówczas stosunkowo niewielkim zmianom w trakcie przechowywania [Melin i in. 2007].

Na jakość liofilizowanych preparatów mogą mieć również wpływ warunki produkcji biomasy, w szczególności rodzaj i skład pożywki wzrostowej [Simione i Brown 1991]. Szczepy przeznaczone do przechowywania w kolekcjach kultur namnażane są w podłożach ubogich w składniki odżywcze, gdyż biomasa otrzymana w warunkach deficytu źródła węgla i energii charakteryzuje się lepszą przeżywalnością podczas utrwalania [Kirsop 1987]. Jednakże, produkcja biomasy drożdży na cele przemysłowe byłaby w takich warunkach nieekonomiczna ze względu na czas trwania i objętość hodowli, niezbędne do uzyskania odpowiedniej ilości komórek. W tematycznym piśmiennictwie nie podejmowano dotychczas problematyki dotyczącej opracowywania utrwalonych form szczepionek drożdżowych do produkcji serów.

Celem niniejszej pracy był skrining pożywek hodowlanych, słodowych i serwatkowych, pod kątem ich przydatności do produkcji biomasy 5 szczepów drożdży – potencjalnych kultur starterowych dla serowarstwa, przed procesem ich utrwalania metodą liofilizacji.

## MATERIAŁY I METODY

*Szczepy drożdży.* Materiał badawczy stanowiło 5 izolatów drożdży z serów Rokpol: *Yarrowia lipolytica* JIII1c, *Y. lipolytica* PII6a, *Candida famata* MII1a, *C. kefir* PIII1b i *C. sphaerica* FII7a pochodzących z kolekcji kultur Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Drożdże przechowywano na skosach podłoża YM (w gxl<sup>-1</sup>: glukoza, 10; baktopepton, 5; ekstrakt słodowy, 3; ekstrakt drożdżowy, 3; agar, 15) w temp. 4°C i okresowo przeszczepiano.

*Skryning podłoży hodowlanych.* Do namnażania drożdży stosowano podłoża oparte na ekstrakcie słodowym (6 wariantów) i serwatce podpuszczkowej (8 wariantów). Skład podłoży zamieszczono w tabeli 1. W badaniach stosowano serwatkę podpuszczkową wydzielaną w czasie produkcji sera typu holenderskiego. Po odbiałczeniu serwatkę wirowano, a następnie przechowywano w  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Tabela 1. Podłoża hodowlane stosowane w pracy  
Table 1. Culture media used in the study

	Podłoże Medium	Skład Composition
Podłoża słodowe malt media	ME3	Ekstrakt słodowy (Difco; 30,0 gxl <sup>-1</sup> )
	ME3-NPS	ME3 + (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (1,0 gxl <sup>-1</sup> ) + KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0,5 gxl <sup>-1</sup> ) + MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O (0,25 gxl <sup>-1</sup> )
	ME3-NPS-YE	ME3-NPS + Ekstrakt drożdżowy (Difco; 3,0 gxl <sup>-1</sup> )
	ME7	Ekstrakt słodowy (Difco; 70,0 gxl <sup>-1</sup> )
	ME7-NPS	ME7 + (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (1,0 gxl <sup>-1</sup> ) + KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0,5 gxl <sup>-1</sup> ) + MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O (0,25 gxl <sup>-1</sup> )
	ME7-NPS-YE	ME7-NPS + Ekstrakt drożdżowy (Difco; 3,0 gxl <sup>-1</sup> )
Podłoża serwatkowe whey media	RW	Serwatka podpuszczkowa
	RW-YE	RW + Ekstrakt drożdżowy (Difco; 3,0 gxl <sup>-1</sup> )
	RW-G	RW + Glukoza (10 gxl <sup>-1</sup> )
	RW-NS	RW + (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (2,5 gxl <sup>-1</sup> )
	RW-P	RW + KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (1,0 gxl <sup>-1</sup> )
	RW-NPS	RW + (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (2,5 gxl <sup>-1</sup> ) + KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (1,0 gxl <sup>-1</sup> ) + MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O (0,5 gxl <sup>-1</sup> )
	RW-GNPS	RW-NPS + Glukoza (10,0 gxl <sup>-1</sup> )
	RW-GNPS-YE	RW-GNPS + Ekstrakt drożdżowy (Disco; 3,0 gxl <sup>-1</sup> )

Hodowle prowadzono w inkubatorze Bioscreen C (Labsystem Oy, Finlandia). Aparat ten umożliwia wykonanie 200 mikrohodowli jednocześnie i rejestruje przebieg krzywych wzrostu w oparciu o pomiary gęstości optycznej (BioLink, Labsystems Oy, Finlandia). Do studzienek płytki inkubacyjnej wprowadzano po 300 μl pożywki oraz 50 μl zawiesiny drożdży. Inokulum stanowiły zmywy ze skosów YM, które następnie standaryzowano do gęstości 5x10<sup>6</sup> kom.xml<sup>-1</sup>. Każdy wariant mikrohodowli wykonywano w 5 powtórzeniach. Inkubację prowadzono w 25 °C przez 48 h przy ciągłym wstrząsaniu.

Jako kryterium podczas doboru pożywki przyjęto wysoką wartość wskaźnika AREA (pole pod krzywą wzrostu); parametr automatycznie wyliczany przez program BioLink (Labsystem Oy, Finlandia). Ponadto brano pod uwagę przebieg krzywych wzrostu.

**Przygotowanie biomasy do liofilizacji.** Drożdże namnażano w hodowli wstrząsarkowej w dwóch wybranych pożywkach: słodowej i serwatkowej, w objętości roboczej 25 ml/250 ml w temp. 28 °C przy 160 rpm, do momentu osiągnięcia fazy stacjonarnej wzrostu. Biomasę wirowano (5 min, 6000 rpm), przemywano wodą destylowaną, a następnie standaryzowano do gęstości  $3 \times 10^9$  kom.xml<sup>-1</sup>. Zawiesinę mieszano z odpowiednio zateżonym, regenerowanym mlekiem odtłuszczonym z dodatkiem trehalozy (MT), glutaminianu sodu (MG) lub trehalozy i glutaminianu sodu (MTG), otrzymując zawiesinę komórek o końcowej gęstości  $1 \times 10^9$  kom. x ml<sup>-1</sup>, w środku osłonowym o 10% stężeniu każdego ze składników.

**Parametry liofilizacji.** Zawiesiny drożdży w środku osłonowym (1mL) suszono w szklanych fiolkach (poj. 10 ml) przykniętych gumowymi korkami w liofilizatorze półkowym Alfa 2-4 (Christ, Niemcy). Próby wymrażano do temp. -38 °C, a następnie suszono (-38 °C, 1,5 h; -20 °C, 15 h; -10 °C, 4,5 h). Po skończonym procesie fiolki zamykano z zachowaniem próżni i przechowywano w temp. +4 °C.

**Oznaczanie przeżywalności komórek.** Liofilizaty (po 3 fiolki każdego badanego wariantu) rehydratowano 1 mL sterylnej wody destylowanej. Następnie sporządzano serię dziesiętnych rozcieńczeń i posiewano na płytki z agarem YM w pięciu powtórzeniach. Płytki inkubowano w temp. 28 °C przez 72 h. Wyniki wyrażano jako procent wyjściowej gęstości komórek.

**Analiza statystyczna.** Wyniki przeżywalności analizowano statystycznie w programie Statistica 5,0 (StatSoft, Inc., Tulsa, USA). Zastosowano dwukierunkową analizę wariancji do analizy zmiennych oraz test Neumana-Keula do porównania średnich oraz wyznaczenia istotności różnic między nimi ( $p \leq 0,05$ ).

## WYNIKI I Dyskusja

Przedmiotem badań w niniejszej pracy było pięć kultur drożdży należących do gatunków najczęściej izolowanych ze środowiska sera. Wcześniejsze badania prowadzone na Wydziale Nauk o Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu wykazały przydatność powyższych kultur jako ko-starterów w produkcji sera [Szołtysik i in. 2002, Juszczyk i in. 2005, Czajgucka i in. 2006] i skłoniły do opracowania liofilizowanych form tych szczepionek. W pierwszej kolejności wymagało to określenia rodzaju pożywki hodowlanej, która zapewniałaby obfity i dynamiczny wzrost danego drobnoustroju.

Posługując się automatycznym inkubatorem Bioscreen C przetestowano dwie grupy pożywek opartych na naturalnych substratach. Pierwszą z nich stanowiły podłoża słodowe [ME] ze względu na tradycyjne stosowanie brzezki słodowej do hodowli drożdży. Jako bazę dla drugiej grupy pożywek wybrano serwatkę podpuszczkową [RW], mając na względzie późniejsze zastosowanie liofilizowanych drożdży w środowisku sera. Poszczególne warianty podłoży różniły się zawartością źródła węgla i innych pierwiastków biotycznych (azotu, fosforu, siarki) oraz czynników wzrostowych (tab. 1).

W pożywkach słodowych (ME) profile wzrostu obu szczepów *Y. lipolytica* oraz *C. famata* zdecydowanie różniły się od tych obserwowanych dla *C. kefir* i *C. sphaerica* (rys. 1).

Krzywe wzrostu drugiej omawianej grupy drożdży miały klasyczny przebieg, w którym kolejno występowały: lag-faza, faza wzrostu eksponencjalnego i faza stacjonarna. Szczepy *C. kefir* i *C. sphaerica* we wszystkich pożywkach ME rosły bardzo dynamicznie osiągając w krótkim czasie, już ok. 20 godziny hodowli, fazę stacjonarną. Niestety,

maksymalny plon biomasy w hodowlach tych drożdży był stosunkowo niski i nawet w najbogatszych podłożach, ME7-NPS i ME7-NPS-YE, nie osiągnął wartości 1,5 jednostki OD. Przyczyną mogły być uzdolnienia fermentacyjne tych szczepów [Juszczak 2002]. W prowadzonych mikrohodowlach, pomimo ciągłego wstrząsania płytki inkubacyjnej, mogło mieć miejsce niedostateczne natlenienie środowiska sprzyjające ujawnianiu się metabolizmu fermentacyjnego drożdży. W takich warunkach większe jest zużycie cukrów na produkcję energii metabolicznej i mniejsza wydajność biomasy.

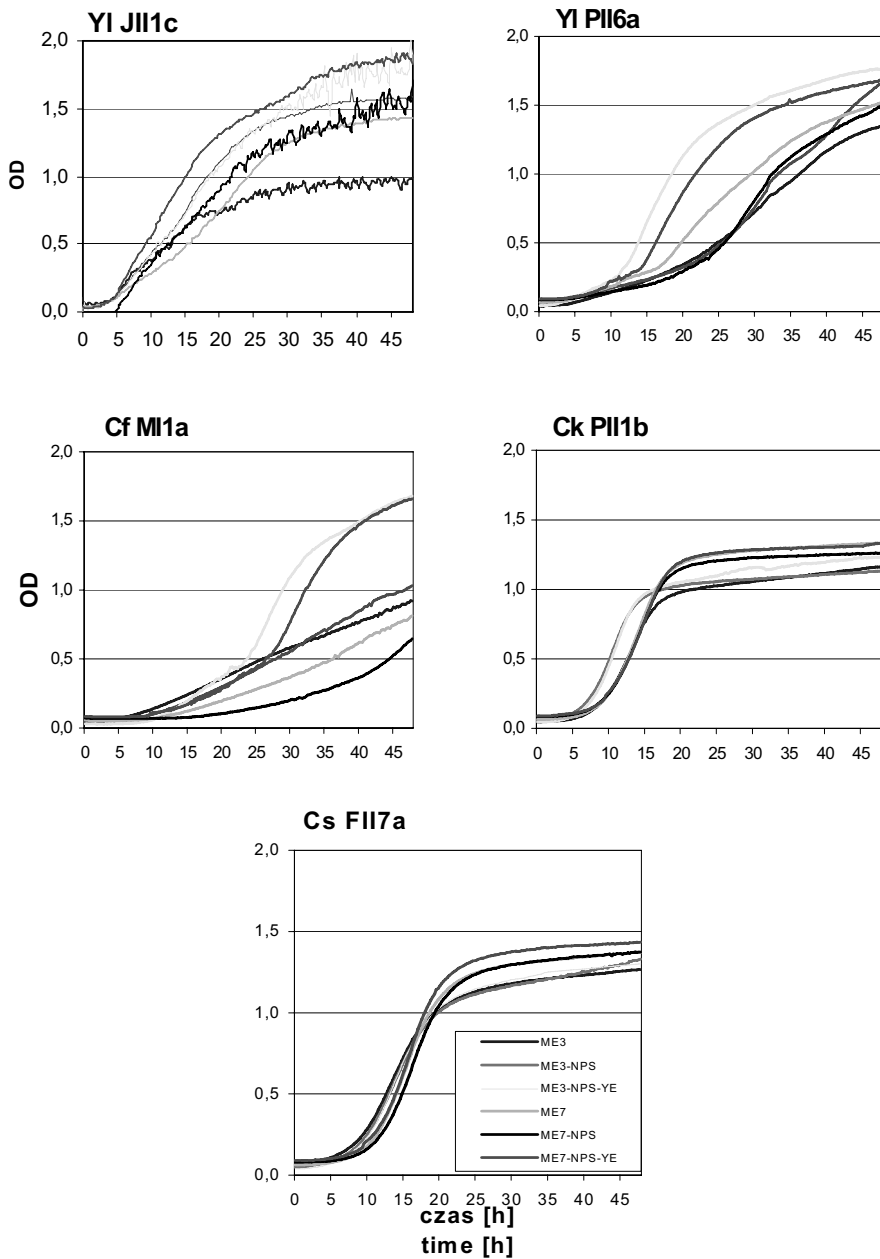
Z kolei efektywność wzrostu drożdży *Y. lipolytica* i *C. famata* w pożywkach słodowych w dużym stopniu zależała od ich składu (rys. 1). Drożdże te rosły najlepiej w brzeczках słodowych, zarówno 3% ME, jak i 7% ME, uzupełnionych mineralnymi źródłami azotu, fosforu i siarki (NPS) oraz czynnikami wzrostowymi (YE), w których osiągały plony biomasy nawet wyższe niż szczepy *C. kefir* i *C. sphaerica*. Jednakże, w żadnej z badanych pożywek słodowych nie zaobserwowano zakończenia fazy wzrostu tych drożdży (rozpoczęcia fazy stacjonarnej) podczas 48 h inkubacji. Wyjątek stanowiła hodowla *Y. lipolytica* JIIIc w najuboższym podłożu ME3, lecz pułap wzrostu był tu jednak bardzo niski,  $OD_{max} = 0,99$ . Zwracają uwagę różnice zachowań dwóch badanych szczepów *Y. lipolytica* w pożywkach słodowych (szczep JIIIc szybciej adaptował się i dynamiczniej wzrastał w tych środowiskach niż szczep PII6a) oraz bardzo słaby wzrost szczepu *C. famata* w podłożach bez dodatku ekstraktu drożdżowego (YE). Świadczy to o jego większych wymaganiach pokarmowych, zwłaszcza w zakresie zapotrzebowania na czynniki wzrostowe, w porównaniu do szczepów *C. kefir*, *C. sphaerica* i *Y. lipolytica*.

W podłożach na bazie serwatki podpuszczkowej (RW) badane szczepy drożdży wykazywały profile wzrostu podobne do tych w pożywkach słodowych (rys. 2). Można tu jednak dostrzec większy wpływ składu podłoża na takie parametry wzrostu drożdży *C. kefir* i *C. sphaerica*, jak długość lag-fazy, dynamika wzrostu podczas fazy logarytmicznej i maksymalny plon biomasy, niż to miało miejsce w przypadku pożywek słodowych. Oba te szczepy rosły bardzo dynamicznie w omawianych mediach hodowlanych, osiągając fazę stacjonarną pomiędzy 20 a 35 h hodowli.

Natomiast wyraźnie mniejszą dynamikę wzrostu wykazywały w pożywkach serwatkowych szczepy *Y. lipolytica* i *C. famata*. Drożdże te, podobnie jak wcześniej w pożywkach słodowych, nie osiągały fazy stacjonarnej podczas 48 h hodowli, jednak uzyskiwane plony biomasy, zwłaszcza przez szczepy *C. famata* i *Y. lipolytica* PII6a, były tu znacznie wyższe. Wzbogacenie bazowej serwatki łatwo przyswajalnymi źródłami pierwiastków biotycznych i czynników wzrostowych w większym stopniu wpłynęło na poprawę parametrów dynamiki i efektywności wzrostu drożdży *C. famata* niż *Y. lipolytica*.

Tym niemniej, dla większości badanych drożdży najwyższe przyrosty biomasy (1,70–1,95 jedn. OD) oraz największą dynamikę wzrostu w głównej fazie hodowli obserwowano w podłożu najbogatszym RW-GNPS-YE. Warto też odnotować, że drożdże *Y. lipolytica* (oba badane szczepy) i *C. famata* potrzebowały znacznie mniej czasu na przystosowanie swojego aparatu enzymatycznego do wzrostu w pożywkach serwatkowych niż drożdże *C. kefir* i *C. sphaerica*.

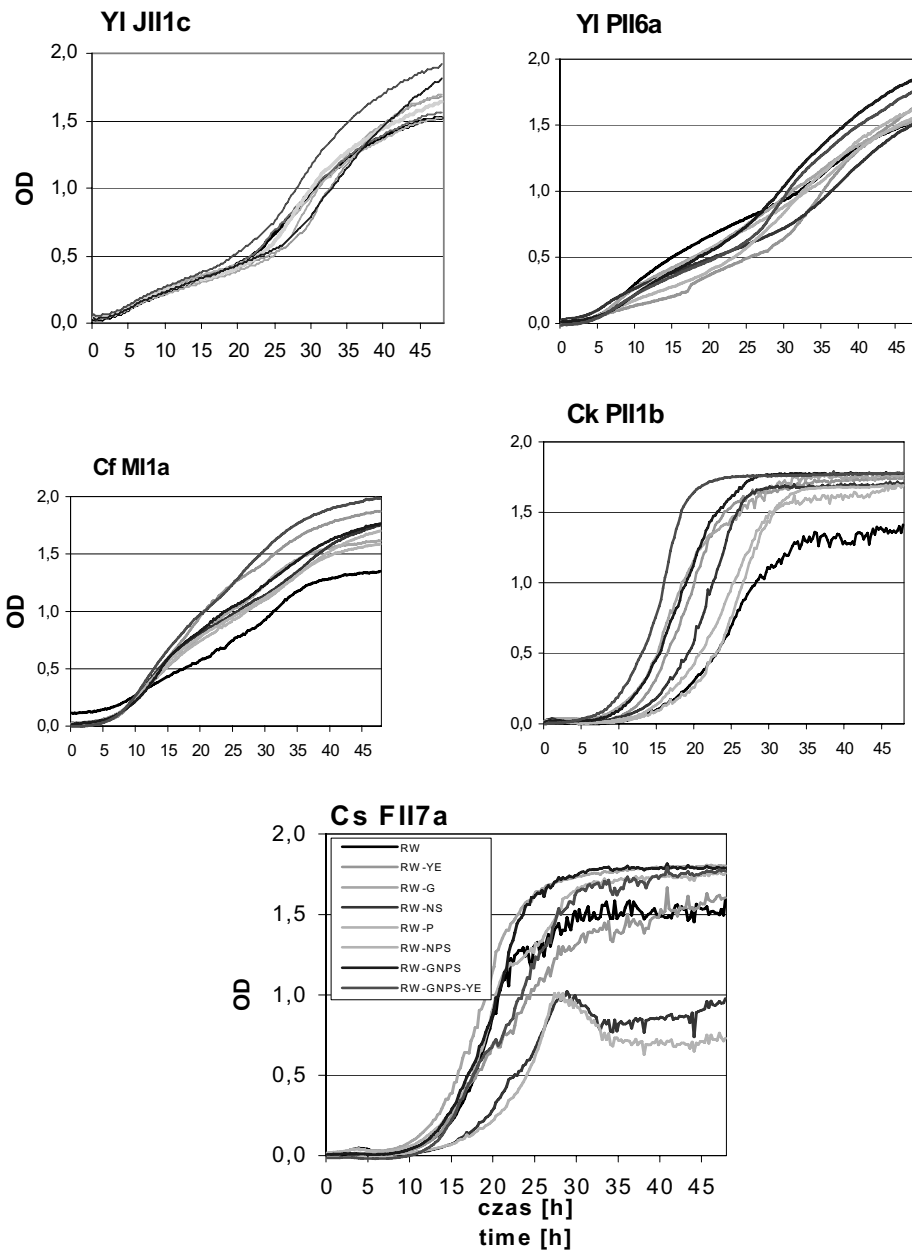
O doborze jednej pożywki słodowej i serwatkowej zdecydowało ostatecznie porównanie wartości indeksu AREA, umownego wskaźnika efektywności wzrostu [Myllyniemi i in. 2004]. Dla poszczególnych szczepów i wariantów podłoża wartości liczbowe tego wskaźnika wahały się w szerokich granicach, od 513 jedn. OD x min, w hodowli szczepu *C. famata* w pożywce ME7-NPS, do 3494 jedn. OD x min, w hodowli *C. kefir* w pożywce RW-GNPS-YE (tab. 2).



Rys. 1. Krzywe wzrostu badanych szczepów drożdży w podłożach słodowych: *Y. lipolytica* JII1c (YI JII1c), *Y. lipolytica* PII6a (YI PII6a), *C. famata* MI1a (Cf MI1a), *C. kefyr* PII1b (CK PII1b), *C. sphaerica* FII7a (Cs FII7a)

Fig. 1. Growth curves of studied yeast strains in malt media: *Y. lipolytica* JII1c (YI JII1c), *Y. lipolytica* PII6a (YI PII6a), *C. famata* MI1a (Cf MI1a), *C. kefyr* PII1b (CK PII1b), *C. sphaerica* FII7a (Cs FII7a)





Rys. 2. Krzywe wzrostu badanych szczepów drożdży w podłożach serwatkowych: *Y. lipolytica* JII1c (YI JII1c), *Y. lipolytica* PII6a (YI PII6a), *C. famata* MI1a (Cf MI1a), *C. kefir* PII1b (CK PII1b), *C. sphaerica* FII7a (Cs FII7a)

Fig. 2. Growth curves of studied yeast strains in whey media: *Y. lipolytica* JII1c (YI JII1c), *Y. lipolytica* PII6a (YI PII6a), *C. famata* MI1a (Cf MI1a), *C. kefir* PII1b (CK PII1b), *C. sphaerica* FII7a (Cs FII7a)

Dane w tabeli 2 potwierdzają wcześniejsze wyniki analizy profili wzrostu drożdży i upoważniają do stwierdzenia, że spośród pożywek słodowych do hodowli drożdży *Y. lipolytica* i *C. famata* najbardziej wskazana byłaby pożywka ME3-NPS-YE lub ME7-NPS-YE, natomiast dla drożdży *C. kefir* i *C. sphaerica* korzystniejsza byłaby druga z wymienionych pożywek. Ponieważ podłoże ME7-NPS-YE było bardziej uniwersalne – zapewniało dobry wzrost wszystkich badanych szczepów, wybrano je do otrzymywania biomasy przeznaczonej do liofilizacji.

Tabela 2. Wartości indeksu AREA (pole pod krzywą wzrostu) dla badanych szczepów drożdży w podłożach słodowych i serwatkowych

Table 2. Values of AREA index (area under growth curve) for studied yeast strains on malt and whey media

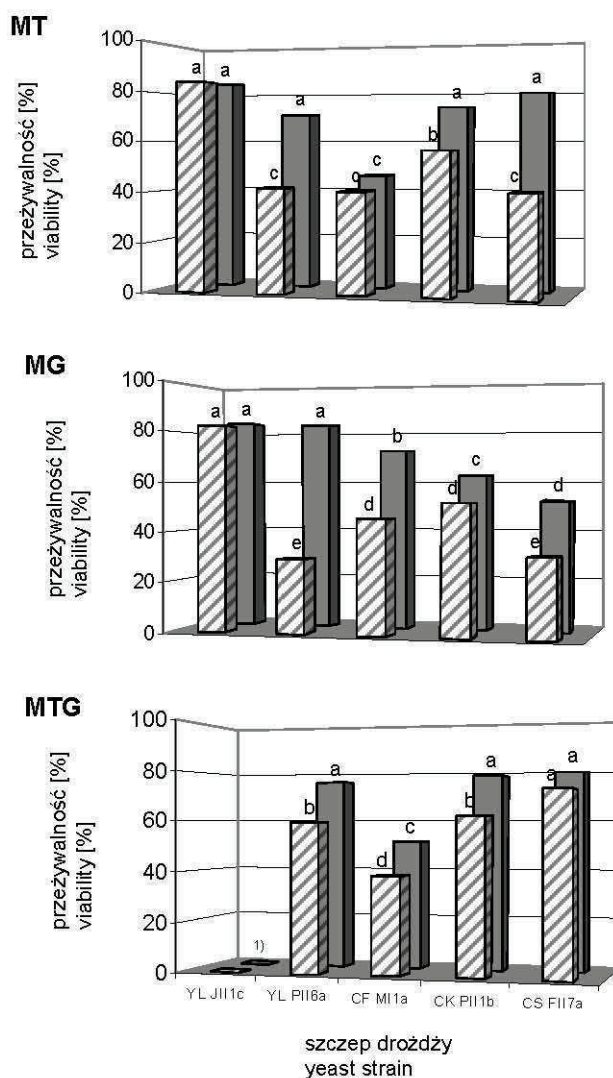
		Podłoże medium	AREA [OD x min]				
			YI JIIIc	YI PII6a	Cf MIIa	Ck PIIIb	Cs FII7a
Podłoże słodowe malt media	ME3	1427 ± 176	1587 ± 114	1266 ± 203	1799 ± 117	2501 ± 217	
	ME3-NPS	2514 ± 252	1875 ± 137	1251 ± 114	2466 ± 263	2482 ± 234	
	ME3-NPS-YE	2647 ± 147	3077 ± 209	2151 ± 167	2506 ± 168	2653 ± 267	
	ME7	1763 ± 139	2559 ± 321	927 ± 79	2697 ± 311	2630 ± 171	
	ME7-NPS	2326 ± 185	1836 ± 218	513 ± 82	2612 ± 257	2586 ± 134	
	ME7-NPS-YE	2768 ± 92	2732 ± 127	1916 ± 241	2702 ± 197	2746 ± 226	
Podłoże serwatkowe whey media	RW	1628 ± 117	2183 ± 120	2113 ± 336	1887 ± 512	2584 ± 122	
	RW-YE	1736 ± 76	1751 ± 243	2972 ± 98	2969 ± 305	2376 ± 579	
	RW-G	1937 ± 197	2132 ± 342	2569 ± 118	3099 ± 394	3164 ± 454	
	RW-NS	1743 ± 214	1870 ± 398	2578 ± 207	2742 ± 168	1410 ± 355	
	RW-P	1837 ± 79	2049 ± 136	2426 ± 139	2150 ± 115	2870 ± 214	
	RW-NPS	1903 ± 156	1951 ± 218	2503 ± 77	2407 ± 324	1228 ± 124	
	RW-GNPS	2268 ± 42	2344 ± 322	2666 ± 578	3176 ± 228	3035 ± 49	
	RW-GNPS-YE	2306 ± 113	2168 ± 311	3145 ± 91	3494 ± 186	2702 ± 214	

Podane wartości stanowią średnią z pięciu hodowli ± odchylenie standardowe

Given results are mean values recalculated from five repetitions ± standard deviation

Kierując się podobną zasadą wytypowano pożywkę serwatkową RW-GNPS-YE jako pożywkę do produkcji biomasy drożdży serwarskich. Trzy szczepy: *C. kefir* PIIIb, *C. famata* MIIa i *Y. lipolytica* JIIIc rosły w tej pożywce najlepiej (wartości AREA odpowiednio 3494, 3145 i 2306 jedn. OD x min), zapewniała ona również dobrą produktywność hodowli drożdży *C. sphaerica* FII7a i *Y. lipolytica* JIIIc.

Na rysunku 3 przedstawiono przeżywalność badanych starterowych kultur drożdży w procesie liofilizacji w zależności od podłoża hodowlanego użytego do namnożenia biomasy. W celu dodatkowego zminimalizowania uszkodzeń komórek w trakcie mrożenia i suszenia sublimacyjnego – zastosowano trzy różne media ochronne. Dobrano je w oparciu o własne doświadczenia [wyniki niepublikowane] oraz dane zamieszczone w pracy Berny i Hennebert [1991], wskazujące na większą skuteczność kombinowanych środków ochronnych nad jednoskładnikowymi.



Rys. 3. Przeżywalność drożdży po liofilizacji w zależności od podłoża wzrostowego (■ ME7-NPS-YE; ▨ RW-GNPS-YE) i użytego środka osłonowego: MT (10% mleko + 10% trehaloza); MG (10% mleko + 10% glutaminian sodu); MTG (10% mleko + 10% trehaloza + 10% glutaminian sodu). Różnymi literami oznaczono istotnie różniące się średnie ( $p < 0.05$ )

Fig. 3. Yeast viability after freeze-drying in accordance to growth medium (■ ME7-NPS-YE; ▨ RW-GNPS-YE) and used protecting agent: MT (10% milk + 10% trehalose); MG (10% milk + 10% sodium glutamate); MTG (10% milk + 10% trehalose + 10% sodium glutamate). Different letters indicate significant differences between means ( $p < 0.05$ )

Stwierdzono zadowalającą przeżywalność komórek we wszystkich preparatach drożdży bezpośrednio po procesie liofilizacji. Kształtowała się ona na poziomie od 29,3% do 84,1%. W przypadku czterech badanych szczepów drożdży wykazano istotny statystycznie wpływ pożywki namnażającej na żywotność liofilizowanych preparatów; komórki pochodzące z pożywki słodowej lepiej przeżywały proces suszenia liofilizacyjnego i rehydratacji niż te, otrzymane w pożywce serwatkowej. Wyjątek stanowił szczep drożdży *Y. lipolytica* JII1c, który zachował bardzo wysoką przeżywalność po procesie liofilizacji (82,2% – 84,1%), niezależnie od pożywki, w której był namnożony oraz zastosowanego czynnika ochronnego. Wyniki te trudno porównywać z danymi literaturowymi ze względu na brak dostępnych informacji na temat wpływu rodzaju podłoża produkcyjnego na przeżywalność przemysłowych szczepów drożdży podczas liofilizacji, a zwłaszcza kultur stosowanych w serowarstwie.

## PODSUMOWANIE

W badanych pożywkach słodowych i serwatkowych drożdże *Candida kefyr* PII1b i *C. sphaerica* FII7a rosły bardziej dynamicznie niż *Yarrowia lipolytica* JII1c, *Y. lipolytica* PII6a i *C. famata* MII1a. Efektywność produkcji biomasy była największa w pożywkach wzbogaconych mineralnym źródłem azotu, fosforu i siarki oraz ekstraktem drożdżowym, a w przypadku podłoży bazujących na serwatce podpuszczkowej – również glukozą. Jednakże do pełnej optymalizacji warunków produkcji biomasy wymagane będzie zwiększenie skali procesu (hodowle wstrząsarkowe lub bioreaktorowe) i dobór właściwej dla każdego szczepu temperatury, natlenienia i pH w procesie hodowlanym.

Badania pokazały ponadto, że mimo użycia bogatych pożywek do produkcji biomasy drożdży uzyskano zadowalający poziom żywotności komórek w liofilizowanych preparatach tych mikroorganizmów, większy dla komórek namnożonych w pożywce słodowej niż serwatkowej, w przypadku czterech spośród pięciu badanych szczepów. Szczep *Y. lipolytica* JII1c wyróżnił się najwyższym poziomem przeżywalności (powyżej 80%), niezależnie od pożywki wzrostowej i użytego czynnika ochronnego.

## PIŚMIENNICTWO

- Abadias M., Benabarre A., Teixido N., Usall J., Vinas I., 2001. Effect of freeze drying and protectants on viability of the biocontrol yeast *Candida sake*. *Int. J. Food Microbiol.*, 65, 173-182.
- Arfi K., Leclerc-Perlat M. N., Baucher A., Tache R., Delettre J., Bonnarne P., 2004. Contribution of several cheese-ripening microbial associations to aroma compound production. *Lait*, 84, 435-447.
- Berny J. F., Hennebert G. L., 1991. Viability and stability of yeast cells and filamentous fungus spores during freeze-drying: effect of protectants and cooling rates. *Mycologia*, 83, 805-815.
- Blanquet S., Garrait G., Beyssac E., Perrier C., Denis S., 2005. Effects of cryoprotectants on the viability and activity of freeze dried recombinant yeasts as novel oral drug delivery systems assessed by an artificial digestive system. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 61, 32-39.
- Bockelmann W., 2002. Development of defined surface starter cultures for the ripening of smear cheeses. *Intern. Dairy Journal*, 12, 123-131.

- Cerrutti P., Segovia de Huergo M., Galvagno M., Schebor C., del Pilar Buera M., 2000. Commercial baker's yeast stability as affected by intracellular content of trehalose, dehydration procedure and the physical properties of external matrices. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 54, 575-580.
- Czajgucka A., Chrzanowska J., Juszczyk P., Szołtysik M., Połomska X., Wojtatowicz M., 2006. Wzrost drożdży w modelowym serze i ich wpływ na degradację białek i tłuszczu. *Acta Sci. Pol. Biotechnologia* 5, 95-103.
- De Wit M., Osthoff G., Viljoen B. C., Hugo A., 2005. A comparative study of lipolysis and proteolysis in Cheddar cheese and yeast-inoculated Cheddar cheeses during ripening. *Enz. Micob. Technol.*, 37, 606-616.
- Ferreira A. D., Viljoen B. C., 2003. Yeasts as adjunct starters in matured Cheddar cheese. *Intern. J. Food Microbiol.*, 86, 131-140.
- Hansen T. K., van den Tempel T., Cantor M. D., Jakobsen M., 2001. *Saccharomyces cerevisiae* as a starter culture in Mycella. *Intern. J. Food Microbiol.*, 69, 101-111.
- Hunter-Cevera J. C., Belt A., 1996. Maintaining cultures for biotechnology and industry. Academic Press, San Diego.
- Juszczyk P., 2002. Charakterystyka mikroflory drożdżowej serów z przerostem pleśni. Praca doktorska, Akademia Rolnicza we Wrocławiu.
- Juszczyk P., Wojtatowicz M., Żarowska B., Chrzanowska J., Malicki A., 2005. Diversity of physiological and biochemical properties within yeast species occurring in rokpol cheese. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 14, 3, 257-261.
- Kirsop B., 1987. Maintenance of yeast cultures. [W:] „Yeast biotechnology” pod red. . D. R. Berry, J. Russel, G. G. Stewart, Allen & Unwin, London, 4-31.
- Kirsop B.E., Snell J.J.S., 1984. Maintenance of microorganisms. Academic Press, London.
- Kornacki K., Reys, A., 1997. Biopreparaty i dodatki w mleczarstwie. [W:] „Mleczarstwo. Zagadnienia wybrane” pod red. S. Ziajki, Wydawnictwo ART, Olsztyn, 163-199.
- Lanciotti R., Vannini L., Chaves Lopez C., Gobbetti M., Guerzoni M.E., 2005. Evaluation of the ability of *Yarrowia lipolytica* to impart strain-dependant characteristics to cheese when used as a ripening adjunct. *Intern. J. Dairy Technol.*, 58/2, 89-99.
- Masoud W., Jakobsen M., 2005. The combined effects of pH, NaCl and temperature on growth of cheese ripening cultures of *Debaryomyces hansenii* and coryneform bacteria. *Intern. Dairy J.*, 15, 69-77.
- Melin P., Håkansson S., Schnürer J., 2007. Optimisation and comparison of liquid and dry formulations of the biocontrol yeast *Pichia anomala* J121. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 73, 1008-1016.
- Myllyniemi A. L., Nuotio L., Lindforst E., Korkeala H., 2004. An automated turbidimetric method for the identification of certain antibiotic groups in incurred kidney samples. *Analyst*, 129, 265-269.
- Simione F. P., Brown E. M., 1991. ATCC preservation methods: freezing and freeze-drying. American Type Culture Collection, 2<sup>nd</sup> edition.
- Szołtysik M., Chrzanowska J., Wojtatowicz M., 2002. Drożdże jako wspomagające kultury startowe w serowarstwie, Mat. VIII Sesji nt. Postęp w technologii, technice i organizacji mleczarstwa, Olsztyn-Kortowo 21-22 lutego 2002, 479-485.
- Wyder M. T., Puhan Z., 1999. Investigation of yeast flora in smear ripened cheeses. *Milchwiss.*, 54, 330-333.

## SCREENING OF GROWTH MEDIA FOR FREEZE-DRIED YEAST STARTER CULTURES FOR CHEESE MAKING

**Abstract:** In the work, the usefulness of malt (6 variants) and rennet whey media (8 variants) for biomass production of 5 yeast strains, potential starter cultures for cheese making, before their preservation by freeze-drying, was studied. Growth media differed in the content of sugars, mineral compounds and growth factors. The growth of *Candida kefyri* PIIIb and *C. sphaerica* FII7a yeast strains in both, malt- and whey-based media, was more dynamic than *Yarrowia lipolytica* JIIIc, *Y. lipolytica* PII6a and *C. famata* MIIa. In case of malt media, the highest efficiency of biomass production was observed in broth enriched with mineral salts, containing nitrogen, phosphorus and sulphur, as well as yeast extract. In whey media, except mentioned above components, the addition of glucose was also indispensable. Yeast biomass obtained in those culture media revealed the highest level of viability after freeze-drying process (29,3–84,1%). In case of four from five tested yeast strains higher survival level was noticed for cells propagated in malt media than in whey media. Regardless of growth medium and applied protective agent, the highest viability (80%) in all preparations revealed *Y. lipolytica* JIIIc strain.

**Key words:** yeast, malt and whey media, biomass production, freeze-drying

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 28.09.2007

## ODDZIAŁYWANIE MYKOTOKSYN NA METABOLIZM FAN I TWORZENIE LOTNYCH ZWIĄZKÓW W BRZECZKACH SŁODOWYCH\*

Ewelina Dziuba, Barbara Foszczyńska, Paweł Zarychta

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

**Streszczenie.** Badano wpływ mykotoksyn OTA, ZEA i DAS na metabolizm wolnego azotu aminokwasowego w trakcie fermentacji brzezki słodowej oraz tworzenie wybranych związków lotnych. Mykotoksyny znajdujące się w fermentującej brzezce piwowskiej oddziaływały w zróżnicowany sposób na drożdże dolnej i górnej fermentacji. Zakłócenie przez te toksyny metabolizmu wolnego azotu aminokwasowego powodowało pewne zmiany profilu organoleptycznego w odfermentowanej brzezce. Wraz ze wzrostem stężenia DAS malała na ogół zdolność drożdży do utylizacji FAN oraz produktywność izobutanolu i alkoholi amylowych. Najbardziej wrażliwe, spośród badanych drożdży, okazały się szczepy *S. carlsbergensis* 13 i *S. cerevisiae* 46, które w obecności DAS w stężeniu  $15 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  słabo utylizowały wolny azot aminokwasowy.

**Słowa kluczowe:** mykotoksyny, drożdże piwowskie, FAN, lotne produkty fermentacji

### WSTĘP

We wcześniejszych pracach [Foszczyńska i Dziuba 2007 a i b] pokazano wpływ zróżnicowanych dawek DAS, ZEA i OTA na stan fizjologiczny drożdży piwowskich *S. carlsbergensis* 13 i *S. cerevisiae* rasy: 23, 46, 57. Stan fizjologiczny drożdży wpływał na aktywność komórek, w tym również na metabolizm związków azotowych (FAN). Zgodnie z powszechnie znanym mechanizmem Ehrlicha aminokwasy znajdujące się w środowisku fermentującej brzezki słodowej są prekursorami lotnych produktów ubocznych, takich jak: aldehyd octowy, propanol, izobutanol, alkohole amyłowe, octan etylu, octan izoamylu i dwuacetyl [Rainbow 1970].

---

\* Badania realizowane w ramach projektu badawczego Nr 2 P06T 020 28 finansowanego przez KBN w latach 2005-2007.

Związki te, ze względu na dużą lotność, wywierają wpływ na cechy organoleptyczne piwa. Wszystkie szczepy *Saccharomyces cerevisiae* wytwarzają w czasie fermentacji wspomnianą wyżej grupę związków, jednak ilość poszczególnych produktów jest cechą osobniczą konkretnej rasy.

Celem tej pracy było wyjaśnienie roli mykotoksyn w zakłócaniu metabolizmu wolnego azotu aminokwasowego (FAN) i skutków tego procesu w tworzeniu przez zróżnicowane rasy drożdży piwowskich związków lotnych, będących w ścisłym związku z przemianami aminokwasów.

## MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Materiałem doświadczalnym były toksyny: ochratoksyna A (OTA), zearalenon (ZEA) i diacetoksyscirpenol (DAS) zakupione w firmie Sigma Aldrich Sp. z o.o.

Materiał biologiczny stanowiły 4 szczepy drożdży piwowskich: *S. carlsbergensis* I-S.ca./13, *S. cerevisiae* (lager) 23, *S. cerevisiae* I-S.c./46 oraz *S. cerevisiae* I-S.c./57. Drożdże S.ca. 13 oraz S.c. 46 i 57 pochodziły z kolekcji kultur drobnoustrojów Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego w Warszawie. Szczep S.c.23 został wyizolowany w Zakładzie Technologii Fermentacji Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu z 48 godz. hodowli suszonych drożdży piwowskich Saflager S-23 (Fermentis Division of S.I.Lesaffre).

Podłożem fermentacyjnym była 12% brzezka słodowa otrzymana ze słodu jasnego typu pilzneńskiego. Brzezkę skażano roztworem mykotoksyny w etanolu, stosując następujące stężenia: OTA – 15  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ; ZEA – 5 i 50  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  oraz DAS – 5 i 15  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ . Wyboru stężeń dokonano na podstawie wyników skринningowej hodowli badanych szczepów drożdży na podłożu syntetycznym skażonym różnymi dawkami mykotoksyn [Dziuba i in., dane niepublikowane]. Próbę kontrolną stanowiła brzezka bez toksyny, ale z równoważną w stosunku do wprowadzonego wraz z toksyną ilością alkoholu.

Brzezki kontrolne i skażone zaszczipiano w warunkach sterylnych inokulum, osiągając stężenie  $20 \times 10^6$  j.t.k. $\cdot\text{ml}^{-1}$ . Po zaszczipieniu brzezkę każdego rodzaju rozdzielano do serii kolb fermentacyjnych (poj. 100 ml). Proces fermentacji z udziałem szczepów S.ca. 13 i S.c. 23 prowadzono w temperaturze 10–12 °C przez 9 dni, a szczepów S.c. 46 i 57 w temperaturze 23–25 °C przez 5 dni.

W trakcie fermentacji pobierano okresowo próby w celu oznaczenia zawartości azotu alfa-aminowego (FAN) metodą ninhydrynową [Analytica EBC 1998].

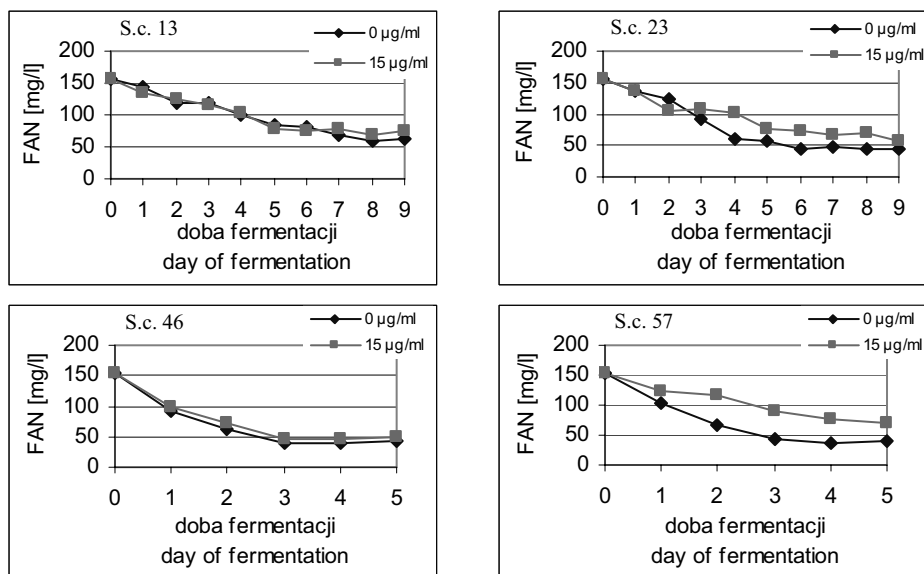
Po zakończeniu fermentacji oznaczono zawartość następujących lotnych produktów ubocznych fermentacji przy zastosowaniu chromatografii gazowej z wykorzystaniem techniki headspace: aldehyd octowy, n-propanol, izobutanol, alkohole amyłowe, octan etylu, octan izoamylu, diacetyl, 2,3-pentanedion. Do oznaczeń stosowano: chromatograf gazowy FISONs seria 8000 wyposażony w kolumny DB-WAX i SP-SIL-8 CB, detektory FID i ECD, Headspace HS 800. Gaz nośny – hel.

## OMÓWIENIE WYNIKÓW

W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że toksyny w odmienny sposób wpływały na wykorzystywanie wolnego azotu aminokwasowego przez poszczególne szczepy drożdży.



Wpływ OTA na metabolizm wolnego azotu aminokwasowego i zmiany zawartości lotnych produktów ubocznych przedstawiono odpowiednio na rysunku 1. Dwa spośród badanych szczepów drożdży, tj. S.c. 13 i S.c. 46 wykorzystywały aminokwasy w brzeczce z dodatkiem OTA w analogiczny sposób jak w brzeczce kontrolnej, ale szczep S.c. 46 (górnjej fermentacji) znacznie szybciej rozpoczął asymilację aminokwasów (rys. 1). Pozostałe dwa szczepy: S.c. 23 i 57 okazały się wrażliwe na OTA. Toksyna ta zakłócała asymilację aminokwasów zwłaszcza w przypadku szczepu S.c. 57. Osłabiała ona intensywność pobierania FAN przez ten szczep i spowodowała, że duża część związków azotowych ( $71 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ) pozostała po fermentacji.



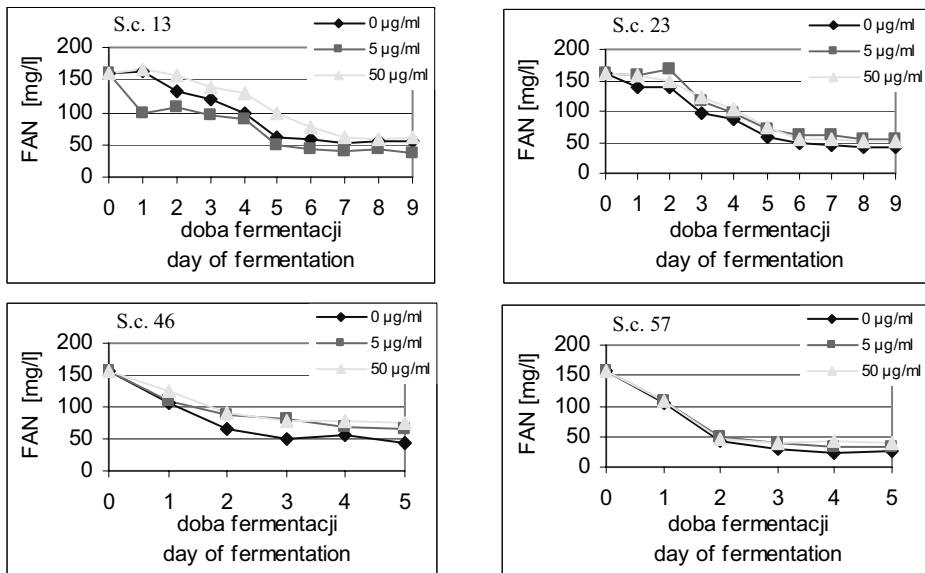
Rys. 1. Zawartość FAN w trakcie fermentacji brzeczki skażonej toksyną OTA

Fig. 1. FAN content during fermentation of wort with OTA toxin

Najmniej wrażliwy na kolejną z badanych mykotoksyn – ZEA – okazał się szczep górnjej fermentacji S.c. 57 (rys. 2). Niezależnie od dawki toksyny wykorzystanie wolnego azotu aminokwasowego w początkowym okresie fermentacji przebiegało analogicznie. Drożdże S.c. 57 począwszy od drugiego dnia fermentacji brzeczki zawierającej ZEA pobierały azot nieco wolniej. W największym stopniu zakłóceniu uległo wykorzystanie FAN przez drugi ze szczepów górnjej fermentacji S.c. 46. Obie dawki mykotoksyn ( $5$  i  $50 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) powodowały znaczne osłabienie wykorzystywania azotu w stosunku do próby kontrolnej. Dla pozostałych dwóch badanych szczepów: S.c. 13 i S.c. 23 wpływ ZEA na wykorzystanie azotu był mniejszy i zaznaczał się jedynie na początku fermentacji.

W brzeczce z dodatkiem DAS, podobnie jak w przypadku ZEA, najbardziej wrażliwym pod względem wykorzystania wolnego azotu okazał się S.c. 46. Osłabienie dynamiki fermentacji zwiększało się wraz ze wzrostem dawki mykotoksyny (rys. 3). Efektem tego było pozostanie w odfermentowanej brzeczce dużej ilości wolnego azotu aminokwasowego ( $101$  i  $105 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Szczep S.c. 57 był również, chociaż w nieco mniej-

szym stopniu, wrażliwy na wpływ DAS. Jednak w miarę przebiegu fermentacji tempo wykorzystania wolnego azotu aminokwasowego w brzeczki skażonych tą mykotosyną zwiększało się i w efekcie tego w odfermentowanej brzeczce znalazły się mniejsze ilości FAN. Z pozostałych dwóch szczepów, drożdże S.ca. 13 wykorzystały wolny azot aminokwasowy z brzeczki skażonej najwyższą dawką DAS ( $15 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) jedynie w minimalnym stopniu. W odfermentowanej brzeczce pozostało go  $148 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ . Największą odporność na toksynę DAS posiadał szczep S.c. 23. Asymilacja aminokwasów przez komórki tego szczepu, nawet w warunkach silnego skażenia DAS, przebiegała w sposób porównywalny do próby kontrolnej.

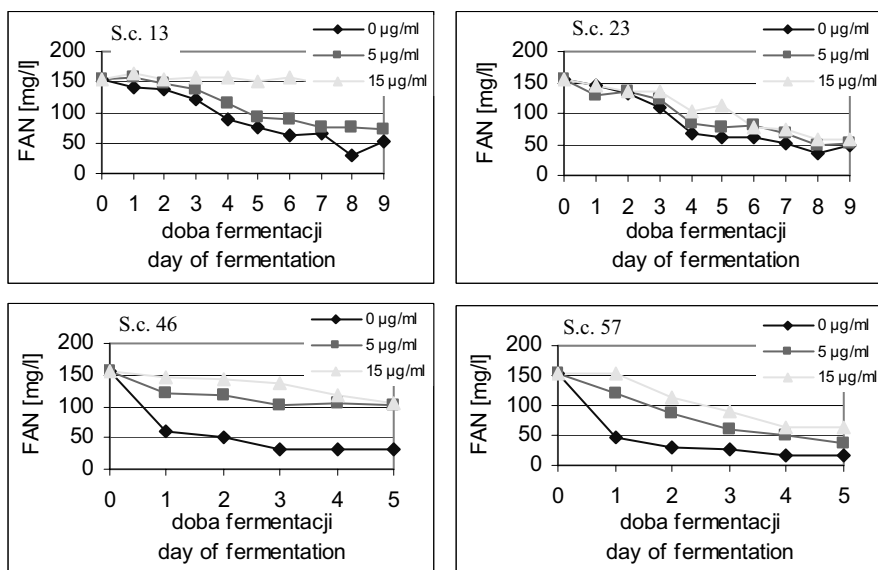


Rys. 2. Zawartość FAN w trakcie fermentacji brzeczki skażonej toksyną ZEA  
Fig. 2. FAN content during fermentation of wort with ZEA toxin

Reasumując, można stwierdzić, że toksyny takie jak OTA, ZEA, DAS nie wywierały znaczącego wpływu na metabolizm związków azotowych przez szczepy dolnej fermentacji S.ca. 13 i S.c. 23 (z wymienionym wyżej wyjątkiem S.ca.13). Szczepy górnej fermentacji różniły się bardzo zależnie od cech osobniczych, jak i rodzaju toksyny. *S. cerevisiae* 46 był szczególnie wrażliwy na DAS i w mniejszym stopniu na ZEA, a S.c. 57 – na DAS i OTA.

W następnej części pracy omówione zostaną konsekwencje zakłóceń metabolizmu wolnych związków azotowych w odniesieniu do lotnych produktów ubocznych fermentacji etanolowej.

Ochratoksyna A dodana do brzeczki, niezależnie od stosowanego szczepu drożdży, zwiększała w niewielkim stopniu ilość tworzonych alkoholi amylovych i w przypadku szczepów S.c. 23 i 57 również izobutanolu (rys. 4). Ilość tworzonych: aldehydu octowego, propanolu, octanu etylu i octanu izoamylu nie zależała ani od badanego szczepu, ani od obecności OTA w brzeczce.

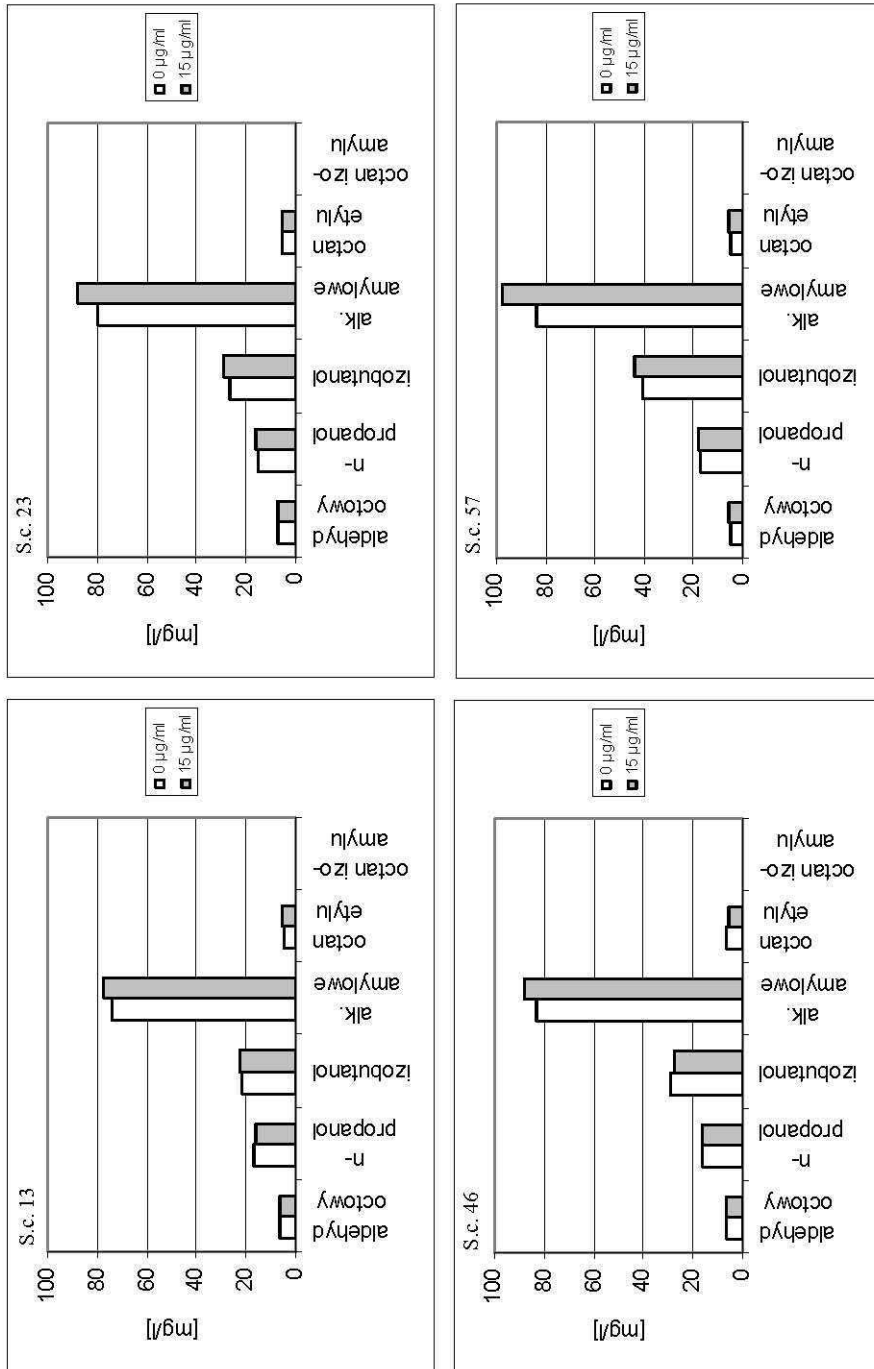


Rys. 3. Zawartość FAN w trakcie fermentacji brzeczki skażonej toksyną DAS  
 Fig. 3. FAN content during fermentation of wort with DAS toxin

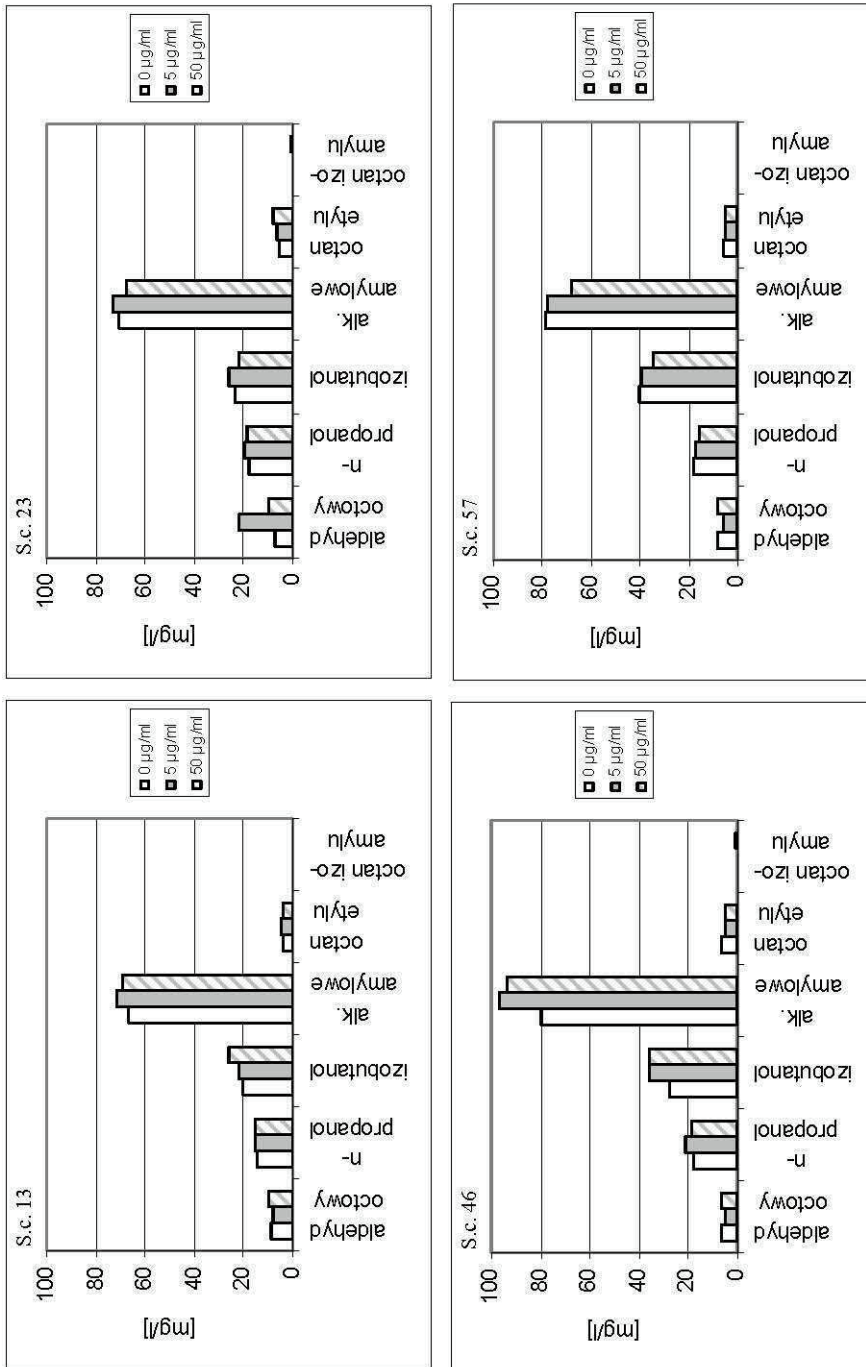
Dodatek ZEA do brzeczek słodowych w ilości  $5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  powodował u szczepów S.ca. 13, S.c. 23 i 46 niewielki wzrost poziomu tworzonych alkoholi amyłowych (rys. 5). Większa dawka tej toksyny ( $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) nieco zmniejszała zawartość tych związków w stosunku do mniejszej dawki ( $5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ), jednak była to ilość nieco większa niż w próbie kontrolnej. W przypadku szczepu S.c. 57 niewielkie obniżenie poziomu alkoholi amyłowych obserwowano jedynie przy wyższym stężeniu ZEA w brzeczce. Wraz ze zwiększaniem dawki ZEA w brzeczce szczepu S.ca. 13 i S.c. 46 tworzyły nieco więcej izobutanolu. Pozostałe dwa szczepy S.c. 23 i 46 przy obecności wyższej dawki toksyny tworzyły nieco mniejsze ilości izobutanolu. Podobnie jak w przypadku OTA nie stwierdzono oddziaływania ZEA na ilość tworzonych aldehydu octowego, propanolu, octanu etylu i octanu izoamylu.

Obecność DAS w brzeczce wpływała w znacznym stopniu na zawartość wyższych alkoholi (rys. 6). Szczególnie wyraźnie zaobserwowano to dla szczepów S.ca. 13 i S.c. 46. Wraz ze wzrostem stężenia toksyny obniżał się poziom tworzonych przez te rasy alkoholi amyłowych i izobutanolu, a w przypadku S.ca. 13 również propanolu. Podobne zmiany wystąpiły w brzeczce fermentowanych przy użyciu szczepów S.c. 23 i 57, ale różnice w zawartości alkoholi amyłowych były znacznie mniejsze. Poziom pozostałych związków: aldehydu octowego, propanolu, octanu etylu i octanu izoamylu nie ulegał zasadniczym zmianom.

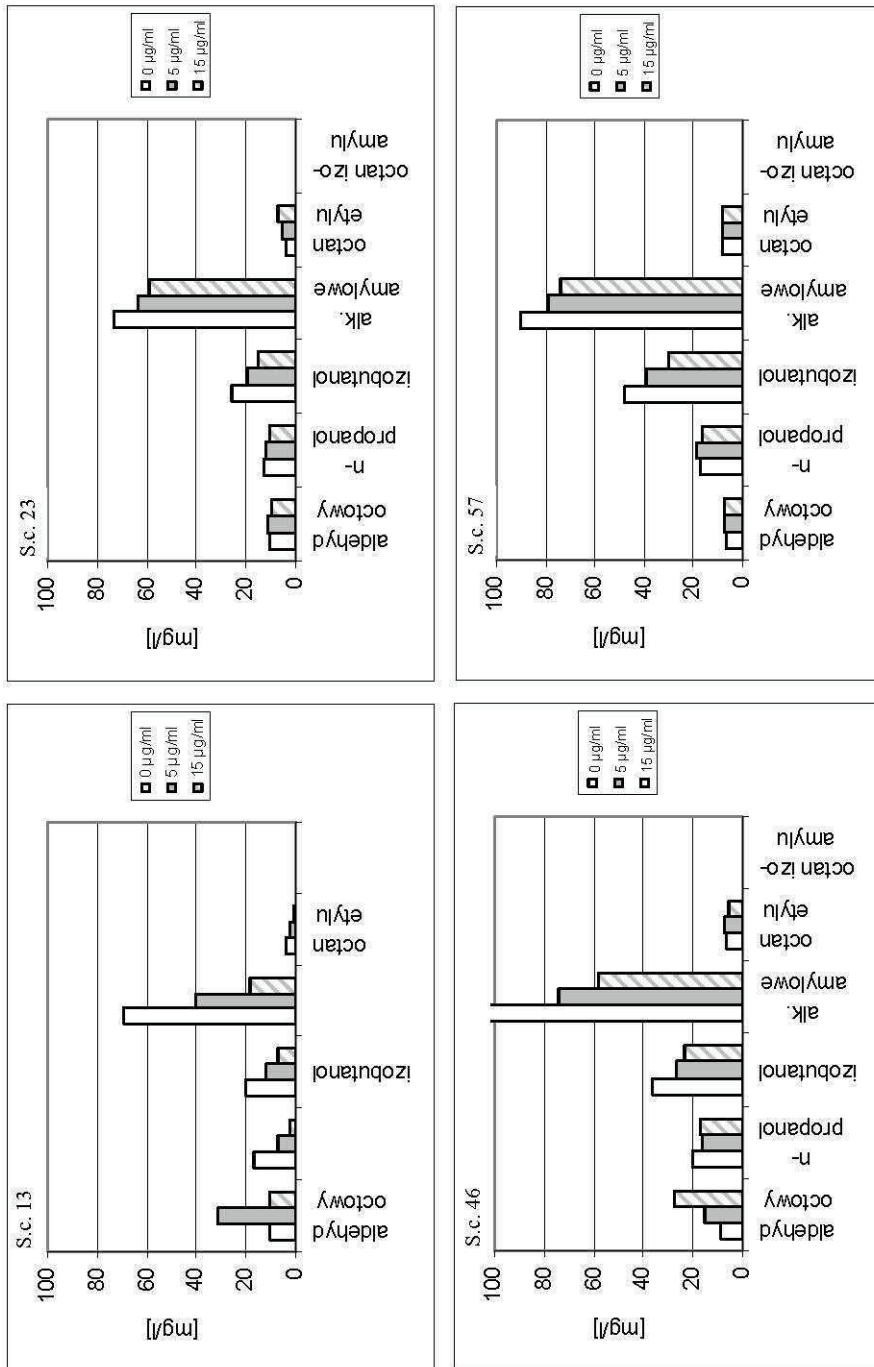
Reasumując można przypuścić, że w przypadku OTA i ZEA zmiany zawartości produktów lotnych fermentacji z omawianej grupy związków po przebyciu leżakowania mogły w niewielkim stopniu zakłócić profil organoleptyczny piwa. Natomiast DAS powodował u badanych szczepów drożdży obniżanie ilości tworzonych alkoholi wyższych znacznie poniżej poziomu prób kontrolnych. W obecności ZEA drożdże wytwarzały w zasadzie większe ilości alkoholi wyższych w porównaniu z próbami kontrolnymi.



Rys. 4. Zawartość wybranych produktów ubocznych po odfermentowaniu brzezek skazonych toksyną OTA  
 Fig. 4. The content of selected by-products after fermentation of worts with OTA toxin



Rys. 5. Zawartość wybranych produktów ubocznych po odfermentowaniu brzozezek skażonych toksyną ZEA  
 Fig. 5. The content of selected by-products after fermentation of worts with ZEA toxin

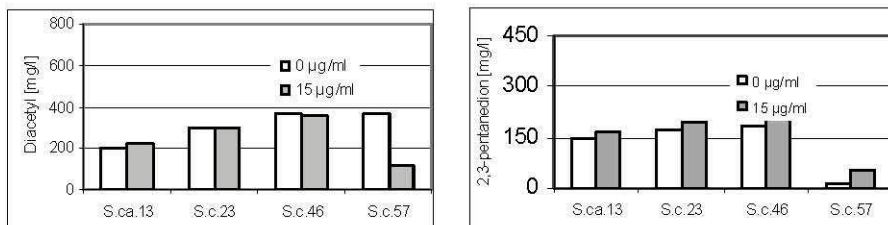


Rys. 6. Zawartość wybranych produktów ubocznych po odfermentowaniu brzozeek skażonych toksyną DAS  
 Fig. 6. The content of selected by-products after fermentation of worts with DAS toxin

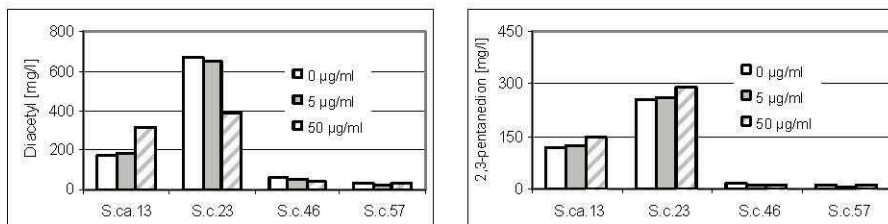
Na rysunku 7 przedstawiono wpływ toksyn na poziom diacetylu i 2,3-pentanedionu w przefermentowanych brzezcach. Zawartość tych związków zarówno w próbach kontrolnych, jak i skażonych mykotoksynami DAS i ZEA była wysoka, zwłaszcza w przypadku szczepów dolnej fermentacji. Inaczej kształtował się wpływ OTA. Badane szczepy drożdży, z wyjątkiem S.c. 57, tworzyły w próbach kontrolnych i skażonych mykotoksynami analogiczne poziomy diacetylu i 2,3-pentanedionu, jednak znacznie niższe niż w przypadku wcześniej omówionych toksyn. Zaobserwowano przy tym, że szczep S.c. 57, przy obecności OTA w brzeccie wytworzył mniej diacetylu, a więcej 2,3-pentanedionu.

Reasumując, można stwierdzić, że ogólnie dodatek mykotoksyn OTA, ZEA i DAS, z nielicznymi wyjątkami, nie wpływał istotnie na zawartość diketonów w brzeccie po zakończonej fermentacji.

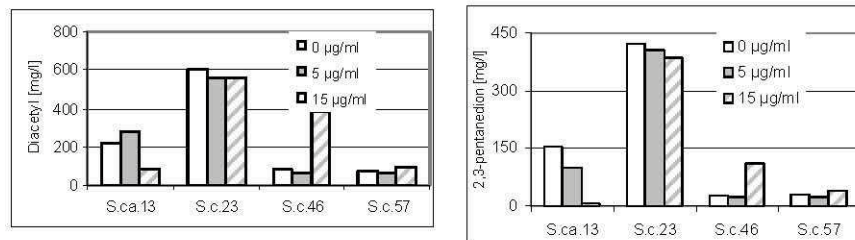
## a) OTA



## b) ZEA



## c) DAS



Rys. 7. Zawartość diacetylu i 2,3-pentanedionu po odfermentowaniu brzezczek skażonych toksyną OTA (a), ZEA (b) i DAS (c)

Fig. 7. The content of diacetyl and 2,3-pentanedione after fermentation of worts with OTA (a), ZEA (b) and DAS (c) toxin

## DYSKUSJA

Rola związków azotowych w procesie fermentacji etanolowej, a zwłaszcza wolnych aminokwasów, jest ciągle zagadnieniem nie do końca poznanym, o czym świadczą pojawiające się również w chwili obecnej liczne publikacje [Guldfeldt i Arneborg 1998, Lekkas i in. 2005, Lekkas i in. 2007, Narziss 1997, Younis i Stewart 1998]. Aminokwasy nie są jedynym czynnikiem powodującym powstawanie lotnych związków odpowiedzialnych za smak i zapach piwa. Druga grupa czynników to: wyjściowa gęstość brzożki i cukry w niej się znajdujące oraz wzajemne relacje ich zawartości. Ponieważ w niniejszej pracy stosowano standardową brzożkę, zawierającą jednakową wyjściową zawartość ekstraktu, czynnikiem decydującym o powstawaniu związków zapachowych była zdolność drożdży do pobierania wolnego azotu z brzożki oraz możliwość wykorzystania dostępnych cukrów (praca w przygotowaniu).

Tworzenie lotnych produktów ubocznych fermentacji etanolowej wiąże się ściśle z metabolizmem aminokwasów. Powiązanie to jest określane mianem „mechanizmu Ehrlicha”. Ze związków lotnych, tworzonych przez drożdże w czasie fermentacji, szczególne znaczenie dla smaku i zapachu piwa mają: alkohole amyłowe, izobutanol, octan etylu i izoamylu oraz diacetyl, mniejsze znaczenie przypisuje się aldehydowi octowemu i propanolowi. Zrównoważona zawartość tych związków decyduje o profilu organoleptycznym i walorach smakowych piwa. Wszystkie drożdże z rodzaju *Saccharomyces* tworzą te same związki, jednak ilość każdego z nich jest cechą osobniczą szczepu. Szczepy fermentacji górnej, działające w brzożce w temperaturze od 15 do 22 °C, mają szybszy metabolizm i w efekcie tworzą większe ilości tych związków w porównaniu z drożdżami dolnej fermentacji.

Tego typu tendencja wystąpiła w próbach fermentowanych z udziałem badanych szczepów drożdży. Stwierdzono przy tym, że ilość wytworzonych produktów ubocznych zależała także od występowania czynnika toksycznego, którego działanie polegało m.in. na blokowaniu asymilacji przez komórki drożdży wolnego azotu aminowego. Było to szczególnie widoczne na przykładzie toksyny DAS i szczepów S.ca. 13 oraz S.c. 46. W próbach skażonych DAS i poddanych fermentacji przez wymienione szczepy drożdży metabolizm aminokwasów był wyraźnie zakłócony (duża ilość pozostałego FAN w brzożce). Odbiło się to niekorzystnie na produktywności alkoholi amyłowych. W przypadku dwóch pozostałych szczepów (S.c. 23 i 57) efekty były podobne, ale ostatecznie różnice w zawartości tych związków, w porównaniu z próbą kontrolną, były mniejsze.

Alkohole wyższe, a zwłaszcza alkohole amyłowe i izobutanol, chociażby z powodu, że ich zawartości w piwach są znaczne, decydują w dużym stopniu o profilu organoleptycznym piwa. Prekursorami tych związków są walina, leucyna i izoleucyna. Jeżeli w brzożce występuje podwyższony poziom wymienionych aminokwasów, to stymuluje to u drożdży tworzenie alkoholi wyższych, a w ślad za tym większych ilości estrów [Perpete i in. 2005]. Estry, a zwłaszcza octan etylu i octan izoamylu, mimo niewielkiej ich zawartości w piwie, ze względu na ich niskie progi wrażliwości sensorycznej, odgrywają dużą rolę w utrzymaniu pożądanego profilu organoleptycznego piwa [Verstrepen i in. 2003]. W badaniach własnych nie stwierdzono wpływu toksyn na poziom wybranych estrów. Należy jednak pamiętać, że związki te mogą powstawać także podczas etapu dojrzwiania piwa.



W wyniku przeprowadzonych badań zaobserwowano, że drożdże górnej fermentacji pozostawiały w odfermentowanej brzezce znacznie niższe ilości diacetylu i 2,3-pentanedionu niż drożdże fermentacji dolnej. Mogło to wynikać z różnic w zawartości poszczególnych aminokwasów, gdyż przeciwstawne efekty na aktywność metaboliczną mają podwyższone poziomy metioniny i lizyny. I tak, pierwsza z nich osłabia metabolizm drożdży, a druga wzmacnia. Skutkuje to zmianami w poziomie diketonów, ponieważ im aktywność drożdży jest niższa, tym mniejsza ilość tych związków jest przez nie tworzona [Lekkas i in. 2005]. W realizowanym projekcie nie przewidziano oznaczeń diacetylu i 2,3-pentanedionu po okresie leżakowania, można więc jedynie przewidywać, jakie zmiany profilu organoleptycznego mogą ujawnić się w piwie wytworzonym z brzezki zanieczyszczonej mykotoksynami.

## WNIOSKI

1. Badane drożdże dolnej fermentacji *S. carlsbergensis 13* i *S. cerevisiae 23* były stosunkowo odporne na działanie toksyn OTA i ZEA. Ich aktywność metaboliczna, mierzona ilością wykorzystywanego wolnego azotu aminokwasowego, nie ulegała zasadniczym zmianom. Szczep *S. carlsbergensis 13* wykazał natomiast dużą wrażliwość na toksynę DAS. Przy stężeniu DAS  $15 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  drożdże te nie były zdolne do asymilacji FAN z brzezki.

2. W przypadku drożdży górnej fermentacji odporność na toksyny była cechą osobniczą szczepu i tak *S. cerevisiae 46* był wrażliwy na DAS i ZEA, a *S. cerevisiae 57* na DAS i OTA.

3. Poziom badanych lotnych wyższych alkoholi (izobutanolu i alkoholi amyłowych) ulegał wpływowi DAS i u wszystkich badanych ras drożdży był niższy niż w próbach kontrolnych. Natomiast toksyna ZEA działała przeciwnie.

4. Zawartość diketonów, z niewielkimi wyjątkami, nie zmieniała się w obecności toksyn OTA, ZEA i DAS w stosunku do prób kontrolnych.

## PIŚMIENNICTWO

- Analytica EBC, 1998. Verlag Hans Carl Getränke-Fachverlag, Norymberga.
- Dziuba E., Foszczyńska B., Stempniewicz R., The effect of mycotoxins DAS, ZEA and OTA on the growth of brewing yeast (dane niepublikowane).
- Foszczyńska B., Dziuba E., 2007a. Stan fizjologiczny drożdży piwowarskich w czasie fermentacji brzezek skażonych mykotoksynami. Cz.1: T-2 i ZEA. Acta Sci. Pol. Biotechnol., 6 (1), 3-12.
- Foszczyńska B., Dziuba E., 2007. Stan fizjologiczny drożdży piwowarskich w czasie fermentacji brzezek skażonych mykotoksynami. Cz.2: DAS i OTA. Acta Sci. Pol. Biotechnol., 6 (2), 25-34.
- Guldfeldt L.U., Arneborg N., 1998. The effect of yeast trehalose content at pitching on fermentation performance during brewing fermentations. J. Inst. Brew., 104, 37-39.
- Lekkas C., Stewart G.G., Hill A., Taidi B., Hodgson J., 2005. The importance of free amino nitrogen in wort and beer. MBAA TQ, 42, 113-116.
- Lekkas C., Stewart G.G., Hill A.E., Taidi B., Hodgson, J., 2007. Elucidation of the role of nitrogenous wort components in yeast fermentation. J. Inst. Brew., 113, 3-11.

- Narziss L., 1997. Global brewing technology – a look over the future. *Brauwelt Intern.*, 15, 16-21.
- Perpete J., Santos G., Bodart E., Collin S., 2005. Uptake of amino acids during beer production: the concept of a critical time value. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 62, 23-27.
- Rainbow C., 1970. Brewer's yeasts. in: *The Yasts*. Vol. 3. Yeast technology, Academic Press, London, New York, 179-186.
- Verstrepen K.J., Derdelinckx G., Dufour J-P., Winderickx J., Thevelein J.M., Pretorius J.S., Delvaux F.R., 2003. Review. Flavor-active esters: adding fruitiness to beer. *J. Biosc. Bioeng.*, 96, 110-118.
- Younis O.S., Stewart G.G., 1998. Sugar uptake and subsequent ester and higher alcohol production by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Inst. Brew.*, 104, 255-264.

## THE EFFECT OF MYCOTOXINS ON FAN METABOLISM AND FORMATION OF VOLATILE COMPOUNDS IN MALT WORTS

**Abstract.** The aim of the research was to examine the effect of mycotoxins OTA, ZEA and DAS on metabolism of free amino acids (FAN) and formation of selected volatile compounds during malt wort fermentation. Mycotoxins influenced on the bottom and top yeast strais in a differnt way. They disturbed FAN metabolism and caused some changes in sensory profile of fermented worts. As DAS concentration increased the yeast ability to FAN consumption as well as productivity of iso-butanol and amyl alcohols decreased. Among yeast strains used the *S. carlsbergensis* 13 and *S. cerevisiae* 46 were the most sensitive to mycotoxins. FAN utilization by these yeasts was very poor in the presence of DAS (15 µg·ml<sup>-1</sup>).

Key words: mycotoxins, brewing yeast, FAN, volatile by-products

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 28.09.2007

## MAKUCH RZEPAKOWY JAKO SUBSTRAT DO BIOSYNTETY KWASU SZCZAWIOWEGO METODĄ SOLID STATE

Elżbieta Gąsiorek, Joanna Fronia, Paweł Firuta,  
Waldemar Podgórski

Akademia Ekonomiczna we Wrocławiu

**Streszczenie.** Zastosowanie metody solid-state do hodowli grzybów strzępkowych z gatunku *Aspergillus niger* pozwoliło na wykorzystanie makuchu rzepakowego, produktu ubocznego powstającego w produkcji biodiesla, do biosyntezy kwasu szczawiowego (OA). Ilość kwasu szczawiowego otrzymanego tą metodą wyniosła ponad 150 g kg<sup>-1</sup> s.s. podłoża. Proces charakteryzował się wysoką czystością chemiczną, gdyż oprócz głównego produktu nie tworzyły się inne kwasy organiczne. Wilgotność substratu stosowana w zakresie od 45 do 70% nie miała wpływu na wydajność produktu.

**Słowa kluczowe:** makuch rzepakowy, kwas szczawiowy, *Aspergillus niger*, hodowla w podłożu stałym

### WSTĘP

Biopaliwa to wszystkie paliwa otrzymane z biomasy, tj. szczątków organicznych lub produktów przemiany materii roślin lub zwierząt oraz roślin energetycznych o szybkim przyroście masy, lub roślin uprawnych specjalnego przeznaczenia [Warowny i Kwiecień 2006]. Są one odnawialnymi źródłami energii, w odróżnieniu od paliw kopalnych, takich jak: ropa naftowa, gaz ziemny lub węgiel. Celem polityki UE jest promowanie rozwoju źródeł paliw odnawialnych oraz stały wzrost ich udziału w rynku wszystkich stosowanych paliw napędowych [Regulaska i Gumeniuk 2006, Warowny i Kwiecień 2006]. Zgodnie z Dyrektywą Unii Europejskiej 2003/30/WE udział biopaliw w rynku wszystkich zużywanych paliw silnikowych (benzyn i olejów napędowych) ma stanowić odpowiednio: 5,75% w roku 2010 oraz 20% w roku 2020 [Dyrektywa Parlamentu Europejskiego 2003/30/WE].

Wśród biopaliw duże znaczenie mają paliwa ciekłe otrzymywane w drodze fermentacji alkoholowej (najczęściej etanol) lub z olejów pozyskanych z roślin oleistych (biodiesel).

W celu produkcji biodiesla w Europie uprawia się przede wszystkim len i rzepak, w USA – kukurydzę i soję, w pozostałych rejonach świata – głównie konopie. Jeśli surowcem jest rzepak, to nasiona tej rośliny poddaje się tłoczeniu, w wyniku którego otrzymuje się olej wykorzystywany do produkcji biodiesla oraz makuch (wytłoki) rzepakowy stanowiący produkt uboczny.

Wysoka zawartość białka i tłuszczu oraz dobrze zbilansowany skład aminokwasowy zdecydowały o przydatności makuchu jako cennego suplementu paszowego w hodowli zwierząt gospodarskich. Makuch rzepakowy jest też potencjalnym źródłem energii, gdyż ze względu na wartość opałową równą 5 kWh/kg może być spalany w instalacjach centralnego ogrzewania.

Mimo szerokiego zastosowania makuchu rzepakowego należy poszukiwać alternatywnych metod jego wykorzystania ze względu na znaczne zwiększenie ilości makuchu w następstwie produkcji biodiesla z oleju rzepakowego. Odpowiednio wczesne opracowanie metod utylizacji tego produktu zapobiegnie ewentualnym problemom z jego nadprodukcją oraz umożliwi obniżenie kosztów otrzymywania biopaliwa. Ponieważ makuch rzepakowy ma konsystencję stałą, dlatego odpowiednią metodą jego utylizacji może być wykorzystanie go jako surowca do otrzymywania cennych produktów biotechnologicznych metodą hodowli drobnoustrojów w podłożu stałym.

Hodowla w podłożu stałym (solid-state fermentation) jest specyficzną techniką biotechnologiczną wykorzystującą zdolność niektórych drobnoustrojów, szczególnie grzybów strzępkowych do wzrostu w pożywkach stałych; w środowisku, w którym nie występuje lub prawie nie występuje wolna woda, tzn. woda nie związana z podłożem [Raghavarao i in. 2003].

Zachętą do stosowania tej metody są duże wydajności bioprocessów, co jest tłumaczone lepszym wzrostem grzybów i większą zdolnością tworzenia pewnych metabolitów w warunkach zbliżonych do naturalnych warunków bytowania tych drobnoustrojów. Zaletą metody jest też możliwość zastosowania jako podłoża hodowlanego tanich produktów ubocznych, a nawet odpadowych przetwórstwa rolno-spożywczego, takich jak: wysłodka buraczana, wycierka ziemniaczana, otręby pszenne lub żytnie, wytłoki owocowe itd.

Metoda hodowli w podłożu stałym jest wykorzystywana w szerokim zakresie: do otrzymywania żywności fermentowanej, enzymów, białka komórkowego, etanolu, kultur starterowych, mykotoksyn, antybiotyków oraz kwasów organicznych, w tym kwasu cytrynowego. Ostatnio wiele prac poświęconych jest też takim zastosowaniom hodowli w podłożu stałym, jak: bioremediacja i biodegradacja niebezpiecznych substancji, biologiczna detoksykacja pozostałości odpadów rolno-przemysłowych, biotransformacja odpadów roślinnych w kierunku poprawy ich wartości odżywczej itd. [Pandey i in. 2000].

Celem prezentowanej pracy jest ocena możliwości biosyntezy kwasu szczawiowego metodą hodowli *Aspergillus niger* w podłożu stałym z zastosowaniem makuchu rzepakowego jako podłoża hodowlanego.

## MATERIAŁY I METODY BADAŃ

**Drobnoustrój.** W badaniach stosowano szczep *Aspergillus niger* S z kolekcji czystych kultur Instytutu Chemii i Technologii Żywności Akademii Ekonomicznej we Wrocławiu, stosowany do przemysłowej produkcji kwasu cytrynowego na podłożach syntetycznych i naturalnych.

**Podłoże i warunki hodowli.** W badaniach stosowano makuch rzepakowy mielony (Petroestry Sp. z o.o., Malczewo). Skład makuchu wyrażony w % był następujący: białko 34-36; tłuszcz 9,5-10,5; włókno surowe 11,5-12,1.

W zlewkach o pojemności 1000 cm<sup>3</sup> umieszczano po 200 g makuchu rzepakowego zwilżonego do odpowiedniej wilgotności. Próby przykrywano wykonanymi z gazy kołderkami, sterylizowano w autoklawie w temp. 121 °C przez 30 min i po schłodzeniu szczepiono zawiesiną zarodników pleśni *A. niger* w ilości 6,1 · 10<sup>7</sup> na 100 g wilgotnego podłoża. Nie korygowano odczynu podłoża; pH makuchu rzepakowego po sterylizacji wynosiło 5,39. Proces biosyntezy prowadzono w cieplarni, w temp. 30 °C. Raz na dzień zlewki wyjmowano celem dokładnego przemieszania podłoża.

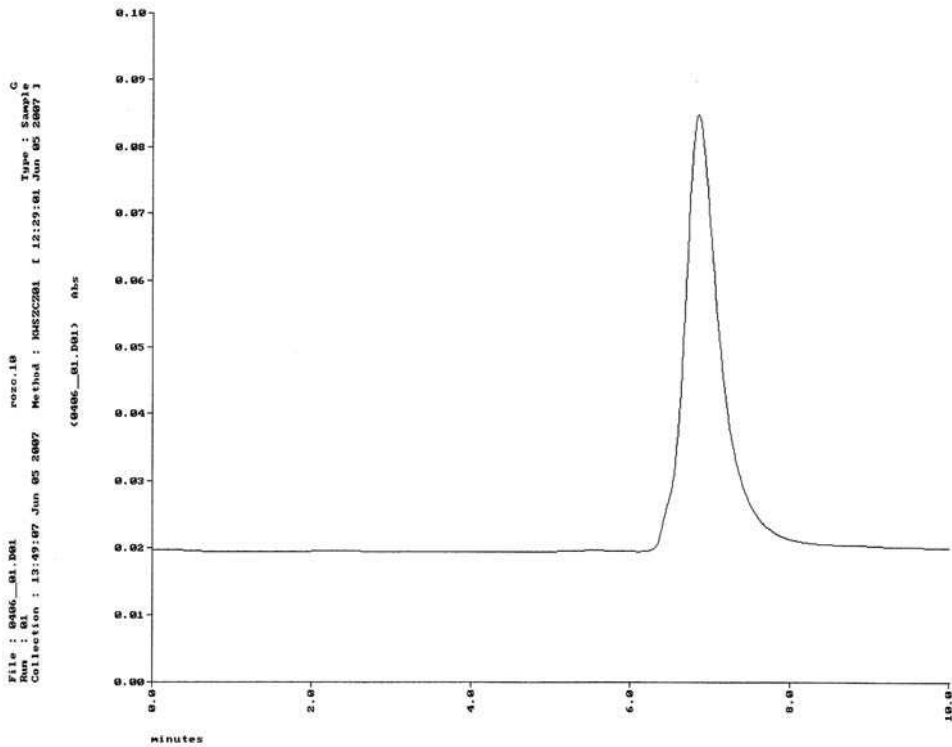
**Metody analizy.** Próby przefermentowanego podłoża o masie 8 g zalewano wodą destylowaną w ilości 100 cm<sup>3</sup> celem ekstrakcji kwasów organicznych i w przesączu oznaczano zawartość tych kwasów metodą HPLC (Perkin Elmer) przy użyciu kolumny Aminex HPX-87H (Bio-Rad Lab., Richmond, Calif., USA) oraz detektora UV/VIS o długości fali 210 nm (Perkin Elmer). Fazą mobilną był 5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Szybkość przepływu wynosiła 0,6 cm<sup>3</sup>min<sup>-1</sup>, a temperatura pomiaru 20 °C. Obecność kwasu szczawiowego oznaczano ponadto metodą jakościową z CaCl<sub>2</sub>. Proces biosyntezy prowadzono w dwóch powtórzeniach i jako wynik końcowy podawano średnią arytmetyczną z dwóch oznaczeń. W celu wyeliminowania wpływu wilgotności podłoża, wyniki oznaczeń przeliczano na suchą substancję.

## WYNIKI I DISKUSJA

W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że szczep *Aspergillus niger* S, który w procesach biosyntezy prowadzonych metodą wglębną na podłożach skrobiowych oraz na podłożach zawierających cukier wytwarzał głównie kwas cytrynowy, w warunkach zamiany źródła węgla i energii na makuch rzepakowy wytwarzał znaczne ilości kwasu szczawiowego. Maksymalne stężenie kwasu wyniosło ponad 152 g kg<sup>-1</sup>s.s. podłoża. Odnotowano ponadto bardzo wysoką czystość chemiczną procesu biosyntezy, gdyż kwas szczawiowy był praktycznie jedynym kwasem organicznym, którego obecność stwierdzano metodą HPLC (rys. 1).

Badania wykazały, że wilgotność podłoża, stosowana w zakresie od 45 do 70% (tab.1), nie miała wpływu na końcowe stężenie kwasu szczawiowego, wynoszące około 150 g kg<sup>-1</sup>s.s. podłoża.

Ze względu na otrzymane wyniki celowe wydaje się jednak stosowanie wilgotności podłoża na poziomie 55%, przy którym maksymalne stężenie kwasu szczawiowego stwierdzano już w ósmej dobie procesu biosyntezy.



Rys. 1. Chromatogram próby fermentacyjnej nr 3 po 12. dniu hodowli

Fig. 1. Chromatogram of the fermented sample No 3 after 12<sup>th</sup> day of culturingTabela. 1. Wpływ początkowej wilgotności podłoża na produkcję kwasu szczawiowego przez *Aspergillus niger*Table 1. Effect of the initial substrate moisture on the production of oxalic acid by *Aspergillus niger*

Nr próby Sample number	Wilgotność podłoża Substrate moisture [%]	Stężenie kwasu szczawiowego [g kg <sup>-1</sup> s.s.] po czasie fermentacji [dni] Oxalic acid concentration [g kg <sup>-1</sup> s.s.] after time of fermentation [days]							
		5	6	7	8	9	10	11	12
1	45	40,5	52,4	67,7	88,9	91,7	68,0	<b>152,7</b>	141,2
2	50	30,9	67,5	86,8	142,9	145,2	142,6	149,6	<b>152,6</b>
3	55	32,8	41,0	76,8	<b>152,1</b>	147,4	119,8	141,6	141,0
4	60	87,3	42,3	98,2	105,7	53,6	107,9	<b>120,2</b>	114,1
5	65	48,9	30,3	5,1	86,5	81,6	86,5	<b>148,0</b>	108,0
6	70	67,6	53,4	57,4	78,5	110,7	60,5	<b>149,3</b>	143,7

Kwas szczawiowy otrzymuje się tradycyjnie metodami chemicznymi poprzez utlenianie węglowodanów, glikolu etylenowego, propylenu lub tlenku węgla oraz z mrówczanu sodowego przez kondensację odwodorniającą [Ullman's Encyclopedia ... 1991].

Znane są też procesy biosyntezy kwasu szczawiowego metodą wglębną przy zastosowaniu pleśni *Aspergillus niger* w podłożach syntetycznych z glukozą, ksylozą, d-arabinozą, glukonianem potasu itd. oraz naturalnych z surowym olejem rzepakowym, porafinacyjnymi kwasami tłuszczowymi, cukrem białym, serwatką oraz melasą [Bormstein i Johnson 1952, Foryś i Podgórski 2004, Podgórski i Leśniak 2003, Ruijter i in. 1999]. Najwyższe stężenie kwasu szczawiowego na poziomie 68,1 g dm<sup>-3</sup> uzyskano w podłożu zawierającym kwasy tłuszczowe [Rymowicz i Lenart 2003].

Były też próby otrzymywania kwasu szczawiowego metodą solid-state w podłożu ze słodkich ziemniaków (*Ipomoea batatas*) przy użyciu pleśni *Aspergillus niger*. Po 6. dobie hodowli w próbie pofermentacyjnej stwierdzano obecność kwasów: szczawiowego i cytrynowego w stężeniach odpowiednio: 88 oraz 77,7 g kg<sup>-1</sup> s.s. podłoża [Leangon i in. 1999].

W warunkach hodowli w podłożu stałym z wykorzystaniem wysłodków buraczanych stosowany w niniejszej pracy drobnoustrój tworzył głównie kwas cytrynowy w ilości około 104 g kg<sup>-1</sup> s.s. Ilość kwasu szczawiowego tworzona w tym procesie nie przekraczała 3,2 g kg<sup>-1</sup> s.s. [Gąsiorek 1999]. Zmiana substratu, w którym głównym źródłem węgla były polisacharydy na makuch, zawierający ponad 10% tłuszczu była prawdopodobną przyczyną zmiany metabolizmu *A. niger* skutkującej nadprodukcją kwasu szczawiowego kosztem kwasu cytrynowego. Drugim powodem zmiany dominującego metabolitu tworzącego się w tym procesie mogły być różnice dotyczące początkowego pH podłoża; niższe, w zakresie 3-4, charakterystyczne dla wysłodków buraczanych sprzyjało raczej produkcji kwasu cytrynowego, wyższe natomiast, w zakresie 5-6, charakterystyczne dla makuchu rzepakowego sprzyjało biosyntezie kwasu szczawiowego. Wartość pH jako głównego czynnika kontrolującego produkcję kwasu szczawiowego oraz kwasu cytrynowego przez *Aspergillus niger* stwierdzono już we wcześniejszych doniesieniach [Ruijter i in. 1999].

## WNIOSKI

Wstępne badania laboratoryjne wykazały przydatność makuchu rzepakowego jako surowca do otrzymywania kwasu szczawiowego metodą hodowli *Aspergillus niger* w podłożu stałym ze względu na wysokie stężenie produktu, przekraczające 150 g kg<sup>-1</sup> s.s. oraz wysoką selektywność procesu fermentacji. Opracowana metoda pozwala na efektywne zagospodarowanie produktu ubocznego powstającego w produkcji biodiesla z jednoczesnym otrzymywaniem wartościowego produktu mikrobiologicznego. Kwas szczawiowy jest silnym kwasem organicznym o mocy porównywalnej z kwasami mineralnymi, stąd znajduje bardzo szerokie zastosowanie: w obróbce metali i materiałów włókienniczych, w farbiarstwie, w garbarstwie, w przemyśle papierniczym, w bioremediacji gleb o podwyższonej zawartości metali ciężkich itd. Celowe jest więc kontynuowanie badań nad optymalizacją warunków hodowli pleśni *Aspergillus niger* S w kierunku maksymalizacji tworzenia tego cennego bioproduktu.

## PIŚMIENNICTWO

- Bormstein R.A., Johnson M.J., 1952. The mechanism of formation of citrate and oxalate by *Aspergillus niger*. J.Biol. Chem.. 1 (198), 143-153.
- Dyrektywa 2003/30/WE Parlamentu Europejskiego i Rady z dn. 8 maja 2003 r. w sprawie wspierania użycia w transporcie biopaliw lub innych paliw odnawialnych.
- Foryś E., Podgórski W., 2004. Application of replicated 2<sup>3</sup> full factorial central composite circumscribed design of experiment (CCC DOE) for the optimization of oxalate biosynthesis by *Aspergillus niger* W78C. Acta Scient. Pol. Biotechnologia. 3(1-2), 43-53.
- Gąsiorek E., 1999. Badania nad biosyntezą kwasu cytrynowego metodą hodowli w podłożu stałym (solid-state). Praca doktorska. Uniwersytet Przyrodniczy. Wrocław.
- Kozakowski G., 2006. Biopaliwa na rynku paliw silnikowych Unii Europejskiej. Przemysł Chemiczny. 85(12), 1620-1623.
- Leangon S., Maddox I.S., Brooks J.D., 1999. Influence of the glycolytic rate on production of citric acid and oxalic acid by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. World J. Microb. Biotech. 15, 493-495.
- Pandey A., Soccol C.R., Mitchell D., 2000. New developments in solid state fermentation: I-bioprocesses and products. Process Biochem. 35, 1153-1169.
- Podgórski W., Leśniak W., 2003. Biochemical Method of Oxalic Acid Production from Beet Molasses. Chem. Pap. 6 (57), 408-412.
- Raghavarao K.S.M.S., Ranganathan T.V., Karanth N.G., 2003. Some engineering aspects of solid-state fermentation. Biochem. Eng. J. 13, 127-135.
- Rogulska M., Gumeniuk A., 2006. Biopaliwa – dylematy surowcowe. Przemysł Chemiczny. 85(12), 612-1615.
- Ruijter G.J.G., Vondervoort P.J.I., Visser J., 1999. Oxalic acid production by *Aspergillus niger*: an oxalate-non-producing mutant produces citric acid at pH 5 and in the presence of manganese. Microbiology. 145, 2569-2576.
- Rymowicz W., Lenart D., 2003. Oxalic acid production from lipids by a mutant of *Aspergillus niger* at different pH. Biotechnol. Lett. 25, 955-958.
- Ullmann's Encyclopedia of industrial chemistry. Red. Elvers B., Hawkins S., Schulz G. . Tom A 18. Weinheim; Basel (Switzerland); Cambridge; New York, NY: VCH 1991.
- Warowny W., Kwiecień K., 2006. Paliwa z biomasy i ich wykorzystanie. Przemysł Chemiczny. 85(12). s. 1598-1610.

## RAPESEED MEAL AS A SUBSTRAT FOR BIOSYNTHESIS OF OXALIC ACID BY SOLID STATE FERMENTATION

**Abstract.** *Aspergillus niger* S culturing by the solid state method of fermentation was used for bioutilization of oilseed meal, the byproduct of biodiesel production, to oxalic acid synthesis. The amount of product calculated on substrate dry matter amounted to 150 g kg<sup>-1</sup>.

The bioprocess was characterized by high chemical selectivity as only oxalic acid was found in the post fermentation media. Moisture of the substrate in the range of 45 do 70% did not influence on the product concentration.

**Keywords:** rapeseed meal, oxalic acid, *Aspergillus niger*, solid state fermentation

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 28.09.2007



## **PORÓWNANIE PROFILI LOTNYCH ZWIĄZKÓW ZAPACHOWYCH SERÓW HANDLOWYCH I WYTWARZANYCH Z UDZIAŁEM DROŻDŻY *YARROWIA LIPOLYTICA*\***

Marek Szołtysik, Monika Żelazko,  
Anna Dąbrowska, Xymena Połomska,  
Maria Wojtatowicz, Józefa Chrzanowska

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

**Streszczenie.** Przedmiotem badań było porównanie profilu lotnych związków zapachowych sera wyprodukowanego z dodatkiem szczepionki drożdży *Yarrowia lipolytica* z profilami serów handlowych takich gatunków, jak: szwajcarski (Ementaler), holenderski (Gouda), angielski (Cheddar), z porostem i przerostem pleśniowym (Camembert i Rokpol). We wszystkich serach oznaczono liczebność drożdży oraz podstawowy skład chemiczny i kwasowość. Lotne związki zapachowe ekstrahowano z serów do fazy stałej (metodą SPME) i analizowano metodą GC/MS. Najwyższe stężenie lotnych związków wykazano w doświadczalnych serach otrzymanych z dodatkiem kultury drożdżowej. W serach tych w puli wszystkich zidentyfikowanych substancji dominowały produkty pochodzące z rozkładu tłuszczu oraz powstające z tryptofanu kwas indolo-3-octowy. Profil lotnych związków zapachowych tych serów okazał się najbardziej podobny do profili handlowych serów pleśniowych.

**Słowa kluczowe:** drożdże, *Yarrowia lipolytica*, sery, dojrzewanie, lotne związki zapachowe

### **WSTĘP**

Cechy organoleptyczne serów kształtowane są przez związki powstające w wyniku wieloetapowych przemian degradacyjnych, jakim podlegają główne składniki tych produktów: białka, tłuszcz i laktoza. Za przemiany te odpowiedzialne są enzymy występujące w serze, a ich źródłem, oprócz naturalnych biokatalizatorów mleka i podpuszczki,

---

\* Praca została wykonana w ramach grantu wewnętrznego Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu 503/GW/07.

są mikroorganizmy wprowadzane w procesie technologicznym, jako kultury starterowe [Fox 1995]. W serach podczas dojrzewania rozwija się również mikroflora dzika nie-starterowa, która może być dodatkowym źródłem enzymów.

Wśród tej mikroflory znaczny udział wykazują drożdże. Ich występowanie potwierdzono w różnych typach serów [Fleet i Main 1987, Fleet 1992, Besancon i in. 1992, Viljoen i in. 1995, Roostita i Fleet 1996, van den Tempel i Jacobsen 1998, Wojtatowicz i in. 2001]. Drobnoustroje te do niedawna postrzegane były głównie jako czynnik pogarszania się jakości serów. Jednak w obrębie ich bardzo zróżnicowanej na ogół populacji, stwierdza się również występowanie szczepów, które pozytywnie wpływają na kształtowanie cech smakowo-zapachowych serów [Fleet 1992, van den Tempel i Jacobsen, 1998 i 2000, Guerzoni i in. 1998, Wyder i in. 1999, Gdula 2001].

Najlepszymi cechami z technologicznego punktu widzenia odznaczają się drożdże *Yarrowia lipolytica*, które mogą być wykorzystane w serowarstwie w formie wspomagającej kultury starterowej. Aktywne uczestnictwo tych drożdży w dojrzewaniu serów związane jest głównie z ich zdolnością asymilowania kwasu mlekowego i cytrynowego, a także wytwarzania enzymów proteolitycznych i lipolitycznych [Suzzi i in. 2001]. Uwalniane pod wpływem ich enzymów produkty rozkładu białek i tłuszczu przyczyniają się do powstawania licznych związków odpowiedzialnych za kształtowanie cech organoleptycznych serów [Basancon i in. 1992, Addis i in. 1999, Larsen i in. 1999]. Badania innych autorów potwierdzają, że wykorzystanie drożdży *Y. lipolytica* do produkcji serów ograniczyło w nich zmienność mikroflory drożdżowej, a także wpłynęło na poprawę cech jakościowych gotowych produktów, przy jednoczesnym skróceniu czasu ich dojrzewania [Ferreira i Viljoen 2003, van den Tempel i Jacobsen 2000].

Wprowadzenie nowego, wyselekcjonowanego szczepu drożdży *Y. lipolytica* do sera i ocena profilu związków zapachowych dojrzałego produktu w porównaniu do profili tych związków w wybranych gatunkach serów handlowych jest ważnym elementem weryfikacji jego przydatności, jako kultury starterowej.

## MATERIAŁ I METODY

Materiał badawczy stanowiły sery doświadczalne wyprodukowane z udziałem szczepu drożdży *Y. lipolytica* JIIIc i sery handlowe, należące do takich gatunków jak: szwajcarski Ementaler, holenderski Gouda, angielski Cheddar oraz sery z porostem i przerostem pleśniowym: Camembert i Rokpol.

Sery doświadczalne produkowano w warunkach półtechnicznych z mleka pasteryzowanego i znormalizowanego, do którego dodano szczepionkę mezofilnych bakterii kwasząco-aromatyzujących typu LD (Chr. Hansen) i kulturę drożdży *Y. lipolytica* JIIIc. Drożdże namnożono w hodowli prowadzonej metodą wstrząsarkową, na podłożu YCG zawierającym ( $\text{g l}^{-1}$ ): ekstrakt drożdżowy – 1,7; kazeinę – 2,0; glukozę – 10, w temperaturze 28 °C przez 48 h. Po zakończeniu hodowli biomasę odwirowano i wprowadzono do mleka serowarskiego w ilości  $10^5$  j.t.k. $\text{ml}^{-1}$ . Sery po nasoleniu dojrzewały przez okres 8 tygodni w temperaturze 15 °C, przy wilgotności względnej powietrza 85%.

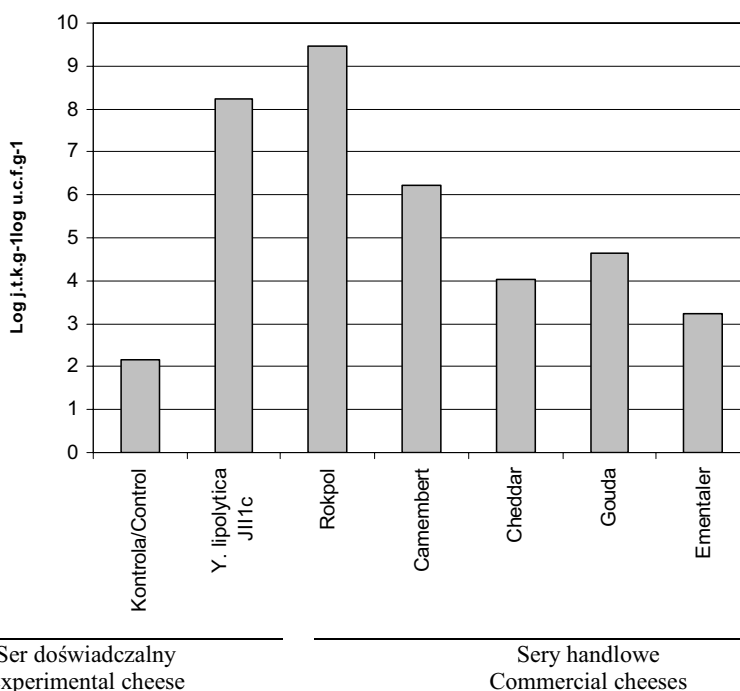
W serach określono liczebność drożdży metodą płytkową na podłożu OGY o składzie ( $\text{g l}^{-1}$ ): agar – 15,0; ekstrakt drożdżowy – 5,0; glukoza – 20,0; chlorowodorek oksytetracykliny – 0,1. Płytki inkubowano w temperaturze 30 °C przez 72 godziny.

Skład chemiczny i kwasowość serów oznaczono standardowymi metodami według Zmarlickiego [1981].

Lotne związki zapachowe ekstrahowano z wodnego homogenatu sera (1:1 w/v) inkubowanego w temp. 50 °C metodą mikroekstrakcji do fazy stałej (SPME), wykorzystując dwie fazy stacjonarne Carboxen/polidimetylosiloksan (CAR/PDMS) i Carbowax/diwinylobenzen (CW/DVB). Termiczną desorbpcję analizowanych substancji prowadzono w dozowniku chromatografu gazowego ekspozując włókno mikrostrzykawki przez 3 min w temperaturze 240 °C. Rozdział wykonano metodą chromatografii gazowej w aparacie firmy Agilent Technologies wyposażonym w detektor masowy (GC/MS) w następujących warunkach: kolumna 60 m x 250 μm x 0,25 μm, 40 °C (5min) do 240 °C (4 °C/min), gaz nośny – hel (20cm<sup>3</sup>/s), split 100:1. Identyfikację substancji wykonywano w oparciu o analizę porównawczą widm masowych z komercyjną biblioteką widm NIST.

## OMÓWIENIE WYNIKÓW I Dyskusja

Na rysunku 1 przedstawiono wyniki oznaczeń liczebności drożdży w serach doświadczalnych, do których wprowadzono szczep *Y. lipolytica* J111c, oraz w wybranych serach handlowych: szwajcarskim Ementalerze, holenderskim Gouda, angielskim Cheddar i serach z porostem i przerostem pleśniowym: Camembert i Rokpol.



Rys. 1. Liczebność drożdży w serach doświadczalnych i handlowych

Fig. 1. Total yeast count in commercial cheeses and experimental cheese, produced with *Y. lipolytica* yeast

Po 8 tygodniach dojrzewania serów doświadczalnych wielkość populacji drożdży wynosiła 8,25 log j.t.k./g sera. Zbliżone wartości wykazywali również inni badacze, którzy zastosowali, jako ko-startery, w procesie produkcji sera drożdże tego samego gatunku [Guerzoni i in. 1998, Wyder i in 1999, van den Tempel i Jakobsen 2000, Gdula 2001]. W analizowanych serach kontrolnych, do których nie wprowadzono wspomagającej kultury drożdży, ich liczebność wynosiła 2,17 log j.t.k./g sera.

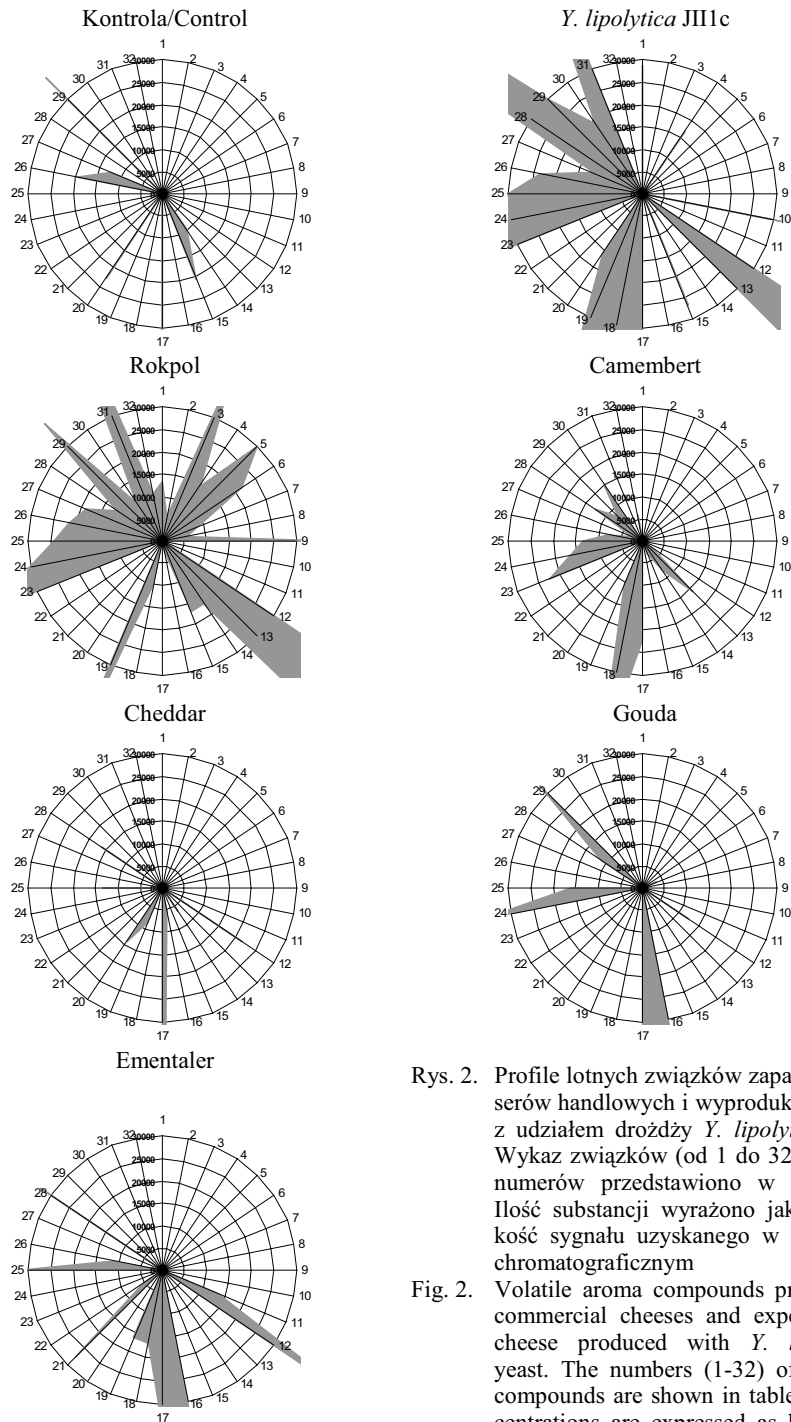
W serach handlowych wielkość populacji dzikiej mikroflory drożdżowej była zróżnicowana. Najwyższy jej poziom, wynoszący 9,45 log j.t.k./g, wykazano w serze Rokpol, podczas gdy w serach typu szwajcarskiego, angielskiego i holenderskiego były to wartości niższe i zawierały się w przedziale 3,23–4,63 log j.t.k./g (rys. 1). Otrzymane wyniki są zbliżone z doniesieniami innych autorów, którzy wykazywali najwyższą liczebność drożdży, na poziomie 4,0–9,0 log j.t.k./g, w serach miękkich i półmiękkich. W serach półtwardych i twardych jest ona niższa i na ogół zawiera się w przedziale od 4,0 do 6,0 log j.t.k./g [Fleet 1992, Fleet i Main 1987, Roostita i Fleet 1996, van den Tempel i Jacobsen 1998, Besancon i in. 1992, Wojtatowicz i in. 2001].

W badanych serach określono podstawowy skład chemiczny i kwasowość czynną (tab. 1). Zawartość suchej masy serów doświadczalnych wyprodukowanych w skali półtechnicznej była wyrównana i zawierała się w przedziale 55,93–56,19%, co pozwoliło na ich zakwalifikowanie do grupy serów twardych. W serach kontrolnych dojrzewających jedynie przy udziale mezofilnych paciorkowców mlekowych odnotowano pH na poziomie 5,47, podczas gdy w serach wyprodukowanych z dodatkiem drożdży była to wartość wyższa o około jedną jednostkę. Wykazano również, że podstawowy skład chemiczny i kwasowość serów handlowych były typowe dla przedstawicieli wybranych gatunków i nie różniły się one od wartości cytowanych w literaturze [Fox 2000].

Tabela 1. Parametry fizykochemiczne serów handlowych i doświadczalnych, wyprodukowanych z dodatkiem drożdży *Y. lipolytica* JIIIc

Table 1. Physico-chemical properties of commercial cheeses and experimental cheese, produced with *Y. lipolytica* yeast

Sery Cheeses		Sucha masa Dry matter [%]	Tłuszcz Fat [%]	Tłuszcz w s.m. Fat in dry matter [%]	Białko Protein [%]	NaCl [%]	pH
Doświadczalne Experimental	Kontrola Control	56,19	22,72	40,43	30,12	1,17	5,47
	<i>Y. lipolytica</i>	55,93	22,69	40,56	30,39	1,16	6,19
Handlowe Commercial	Rokpol	57,24	30,62	53,49	22,64	3,47	6,20
	Camembert	45,82	23,34	50,93	19,43	2,12	4,50
	Cheddar	54,56	27,04	49,56	24,11	1,43	5,10
	Gouda	54,96	22,98	41,81	27,94	1,94	5,90
	Ementaler	61,28	29,71	48,48	28,8	2,10	5,20



Rys. 2. Profile lotnych związków zapachowych serów handlowych i wyprodukowanych z udziałem drożdży *Y. lipolytica* JII1. Wykaz związków (od 1 do 32) według numerów przedstawiono w tabeli 2. Ilość substancji wyrażono jako wysokość sygnału uzyskanego w rozdziale chromatograficznym

Fig. 2. Volatile aroma compounds profiles of commercial cheeses and experimental cheese produced with *Y. lipolytica* yeast. The numbers (1-32) of volatile compounds are shown in table 2. Concentrations are expressed as height of peaks of chromatogram

Tabela 2. Procentowy udział lotnych związków zapachowych serów handlowych i wyprodukowanych z udziałem drożdży *Y. lipolytica* JIIIc.Table 2. Relative concentration of volatile aroma compounds in commercial cheeses and experimental cheese produced with *Y. lipolytica* yeast

Związki Compounds	Ser doświadczalny Experimental cheese			Sery handlowe Commercial cheeses				
	Kontrola/ Control	<i>Y.</i> <i>lipolytica</i> JIIIc	Rokpol	Camembert	Cheddar	Gouda	Ementaler	
<b>ALDEHYDY/ALDEHYDES</b>								
1 aldehyd octowy/actaldehyd	–	3,1	1,8	–	–	–	–	
2 2-metylopropanal/2-methylpropanal	–	–	0,8	–	–	–	–	
3 3-metylobutanal/3-methylbutanal	–	–	5,5	–	–	–	–	
4 2-propenal	–	1,8	2,0	–	–	–	–	
<b>KETONY/KETONES</b>								
5 2-butanon	–	–	4,4	–	–	–	–	
6 2-pentanon	–	–	1,8	–	–	–	–	
7 2-heksanon/2-hexanon	–	–	1,2	–	–	–	–	
8 3-hydroksy-2-butanon/3 hydroxy-2-butanon	–	–	0,8	–	–	1,7	–	
9 2-heptanon	–	–	5,2	–	–	–	–	
10 2-tridekanon/2-tridecanon	–	3,6	–	–	–	–	–	
11 2-pentadekanon/2-pentadecanon	–	–	0,2	–	–	–	–	
12 2-nonanon	–	4,2	7,9	1,6	–	–	4,8	
13 2-undekanon/2-undecanon	–	7,4	24,2	7,1	10,3	5,7	19,0	
14 5-metylo-2-heksanon/5-methyl-2-heksanon	–	–	2,3	3,6	–	–	–	
15 2-metylo-4-heptanon/2-methyl-4-heptanon	5,9	2,8	2,3	1,5	3,0	–	–	
<b>ALKOHOLE/ALCOHOLS</b>								
16 3-metylo-1-butanol/3-methyl-1-butanol	12,5	–	0,3	–	–	–	–	
17 3-metylobutanol/3-methylbutanol	–	5,5	–	10,1	2,4	20,8	12,9	
18 2-heptanol	26,1	10,5	1,4	22,7	59,1	27,3	12,5	
19 2-fenyletanol/2-phenylethanol	–	3,9	7,3	4,8	–	–	6,0	
20 2-propanol	–	1,7	–	–	4,1	–	5,8	
21 2-etylo-2-metylotridekanol/2-ethyl-2-methyltridecanol	13,9	–	–	–	6,9	–	–	
<b>KWASY/CARBOXYLIC ACIDS</b>								
22 Kwas propionowy/Propionic acid	–	–	–	–	–	–	9,8	
23 Kwas kapronowy/Caproic acid	–	9,2	7,2	10,1	–	–	1,9	
24 Kwas kaprylowy/Caprylic acid	–	4,6	4,1	6,8	–	–	–	
25 Kwas kaprynowy/Caprynic acid	–	3,2	3,2	5,5	–	17,0	–	
26 Kwas laurynowy/Laurinic acid	–	2,4	2,5	4,5	6,3	7,4	11,3	
27 Kwas mirystynowy/Myristic acid	11,8	1,3	2,4	3,1	–	–	4,1	
28 Kwas indolo-3-octowy/ Indolo-3-acetic acid	7,6	20,3	1,5	5,4	–	–	–	
<b>LAKTONY/LACTONES</b>								
29 δ-dodekalakton/δ-dodecalacton	–	3,2	5,8	3,6	7,9	5,0	11,9	
30 δ-tetradekalakton/δ-tetradecalacton	22,2	2,0	1,4	6,8	–	15,1	–	
31 γ-dekalakton/γ-decalacton	–	9,2	1,0	–	–	–	–	
<b>ESTRY/ESTERS</b>								
32 ester metylowy kwasu oktadekanowego/ octadecanoic acid methyl ester	–	–	1,5	2,6	–	–	–	

W badanych serach analizowano lotne związki zapachowe po ich uprzedniej ekstrakcji do fazy stałej. Uzyskane wyniki badań przedstawiono w tabeli 2 oraz zilustrowano graficznie w postaci charakterystycznych profili (rys. 2). Głównymi grupami związków chemicznych, jakie zidentyfikowano w serach, były: aldehydy, ketony, metyloketony, alkohole, kwasy, laktony i estry.

Wykazano, że w serach doświadczalnych, do których wprowadzono kulturę drożdży *Y. lipolytica* JIIIc, stężenie lotnych związków zapachowych, wyrażone jako pole powierzchni profilu wykreślonego na podstawie wysokości sygnałów uzyskanych w rozdiale chromatograficznym było najwyższe (rys. 2). W puli analizowanych związków dominowały drugorzędowe alkohole i kwasy tłuszczowe, których procentowy udział wynosił odpowiednio 21,6% i 20,7%.

Hydrolyza triacylogliceroli, jaka ujawnia się w serach poprzez nagromadzenie się wolnych kwasów tłuszczowych, w dużej mierze determinuje cechy sensoryczne tych produktów. Związki te bezpośrednio przyczyniają się do kształtowania smaku i zapachu serów, ale mogą być także prekursorami innych związków kształtujących finalną ich jakość, takich jak: ketony, alkohole czy estry [Jollivet i in. 1994, Molimard i in. 1997, Cichosz 1997, Gardini i in. 1999, Pandey i in. 1999, McSweeney i Sousa 2000].

Spośród wszystkich uwalnianych z tłuszczu mlecznego kwasów największe znaczenie w kształtowaniu cech sensorycznych serów mają kwasy krótko- i średniołańcuchowe [Fox i in. 1995]. W serach otrzymanych z dodatkiem drożdży *Y. lipolytica* JIIIc, występowały wolne kwasy tłuszczowe: kapronowy, kaprylowy, kaprynowy, laurynowy i mirystynowy (tab. 2, rys. 2). Ich nagromadzenie się wynikało ze zdolności badanych drożdży do syntezy zarówno zewnątrz- i wewnątrzkomórkowych enzymów lipolitycznych, hydrolizujących lipidy mleka w środowisku sera [Szołtysik 2004, Szołtysik i in. 2006].

Badany szczep drożdży uczestniczył również w katabolizmie wolnych kwasów tłuszczowych przyczyniając się do powstania znacznych ilości ketonów (2-tidekanonu, 2-nonanonu, 2-undekanonu), drugorzędowych alkoholi (2-propanolu i 2-heptanolu), a także  $\delta$ -dodekalaktonu i  $\gamma$ -dekalaktonu (tab. 2).

Substancje, jakie zaobserwowano w serach wyprodukowanych z dodatkiem drożdży *Y. lipolytica* JIIIc wykazano także w handlowych serach z przerostem i porostem pleśni (ser Rokpol i Camembert), o czym świadczy duże podobieństwo ich profili przedstawionych na rysunku 2. Obecność tych samych substancji w serach pleśniowych potwierdzili również inni autorzy [McSweeney i Sousa 2000, Collins i in. 2003], którzy zajmowali się analizą składników odpowiedzialnych za tworzenie cech smakowo-zapachowych tych produktów. Wykazali oni, że o charakterystycznym smaku i zapachu analizowanych serów decydują głównie nasycone n-metyloketony o nieparzystej liczbie atomów węgla w cząsteczce (3-15 atomów), których stężenie najczęściej wynosi od 30 do 50 mg/100 g sera [Collins i in., 2003]. Drugą w kolejności po ketonach, ważną grupą związków wpływającą na jakość serów pleśniowych są wolne kwasy tłuszczowe o długości łańcucha węglowego od 4 do 18 atomów węgla z przewagą kwasów krótko- i średniołańcuchowych [McSweeney i Sousa 2000]. W formowaniu aromatu serów biorą również udział drugorzędowe alkohole, wśród których dominuje 2-heptanol, a także powstające z hydroksykwasów laktony, głównie  $\delta$ - i  $\gamma$ -laktony o 10 i 12 atomach węgla w cząsteczce [Cichosz 1997]. W serach handlowych z porostem i przerostem pleśni zaobserwowano również występowanie estru metylowego kwasu stearynowego, którego nie identyfikowano w próbach serów doświadczalnych.

W pozostałych typach serów handlowych, dojrzewających głównie przy udziale bakterii, udział lotnych związków pochodzących z degradacji tłuszczu były znacznie niższe (rys. 2). W serze Cheddar, Gouda i Ementaler stwierdzono jedynie obecność 2-undekanonu, 2-heptanolu, kwasu laurynowego i  $\delta$ -dodekalaktonu, a w serze Gouda dodatkowo kwasu kapronowego i  $\delta$ -tertadekalaktonu. Wyniki te potwierdzają doniesienia

innych autorów, którzy wykazali, że w składzie związków tworzących aromat tych serów dominują głównie substancje powstające w wyniku katabolizmu aminokwasów [Fox i in. 2000, Singht i in. 2003, Smit i in. 2005, Dirinck i de Winne 1999, Thierry i in. 2004].

Aktywne uczestnictwo drożdży *Y. lipolytica* w procesie dojrzewania serów i formowaniu ich aromatu związane jest głównie z tym, że gatunek ten wykazuje wysoką aktywność proteolityczną. Aktywność endopeptydazowa tych drożdży ujawnia się zarówno w środowisku kwaśnym, jak i zasadowym [Lenoir 1984, Ogrydziak 1993, Sinigaglia i in. 1994, Roostita i Fleet 1996, Glover i in. 1997]. Gatunek ten zdolny jest do biosyntezy pozakomórkowej zasadowej proteiny serynowej, a także kwaśnej aspartylowej [Ogrydziak 1993, Young i in. 1996, Glover i in. 1997]. Niektóre szczepy syntetyzują proteinazę aktywną w środowisku obojętnym [Ogrydziak 1993]. Wiele doniesień wskazuje również na aktywny udział *Y. lipolytica* w katabolizmie wolnych aminokwasów, o czym może świadczyć obecność produktów ich degradacji, identyfikowanych w podłożach organicznych, w których prowadzono hodowle tego gatunku [Gardini i in. 2006].

W serach wyprodukowanych z dodatkiem badanego szczepu drożdży zidentyfikowano wprawdzie produkty powstające z rozkładu białka, choć ich wpływ na walory sensoryczne nie był tak znaczący jak w przypadku związków powstających z tłuszczu.

W serach, do których wprowadzono drożdże *Y. lipolytica* JII1c, wykazano obecność związków zapachowych powstających z aminokwasów aromatycznych, a także posiadających rozgałęziony łańcuch węglowy. Największy udział 20,3% w puli wszystkich zidentyfikowanych lotnych substancji posiadał kwas indolo-3-octowy powstający w wyniku rozkładu tryptofanu. Jego obecność w znacznie niższym stężeniu wykazano również w serze kontrolnym wyprodukowanym bez udziału drożdży, a także w serze Camembert.

Wśród produktów katabolizmu izoleucyny wykazano 2-metylobutanol, którego występowanie stwierdzono również w badanych serach z porostem pleśni, a także w serach typu angielskiego, holenderskiego i szwajcarskiego.

Produktem rozkładu fenyloalaniny był 2-fenyletanol, którego występowanie zaobserwowano również w grupie analizowanych handlowych serów pleśniowych. Jego powstawanie jest wynikiem reakcji transaminacji i redukcji prowadzonej przez drożdże rozwijające się na powierzchni serów, głównie pleśniowych i maziowych [McSweeney i Sousa 2000]. Analiza wyników uzyskanych w toku przeprowadzonych badań wskazuje na związek pomiędzy występowaniem w serach 2-fenyletanolu a wysoką liczebnością drożdży zarówno starterowych, jak i niestarterowych.

W badanych serach handlowych wykazano obecność lotnych związków charakterystycznych dla danego typu tych produktów. W serze Ementaler zaobserwowano występowanie kwasu propionowego, tworzonego z L-mleczanu przez bakterie z rodzaju *Propionibacterium* [Thierry i in. 2004]. W serze Gouda natomiast występował 3-hydroksy-2-butanon (acetoina), powstający w wyniku enzymatycznej kondensacji dwóch cząsteczek aldehydu octowego lub redukcji diacetylu [Dirinck i Winne 1999]. W serach dojrzewających z udziałem szczepu *Y. lipolytica* JII1c nie wykazano ani kwasu propionowego, ani 3-hydroksy-2-butanonu.



## WNIOSKI

1. Najwyższe stężenie lotnych związków wykazano w serach dojrzewających z dodatkiem drożdży *Y. lipolytica* J11c, w puli których dominowały pochodzące z rozkładu lipidów drugorzędowe alkohole i kwasy tłuszczowe oraz kwas indolo-3-octowy powstający z rozkładu tryptofanu.

2. Sery doświadczalne wykazywały największe podobieństwo w składzie lotnych związków zapachowych do sera Rokpol i Camembert.

3. We wszystkich serach handlowych wykazano typowe dla ich gatunków lotne związki zapachowe.

## PIŚMIENNICTWO

- Addis E., Fleet G.H., Cox J.M., Kolak D., Leung T., 2001. The growth, properties and interactions of yeasts and bacteria associated with the maturation of Camembert and blueveined cheese, *Int. J. Food Microbiol.*, 69, 25-36.
- Besançon X., Smet C., Chabaliere C., Rivemale M., Revelbel J.P., Ratomahenina R., Galzy P., 1992. Study of surface yeast flora of Roquefort cheese, *Int. F. Food Microbiol.*, 17, 9-18.
- Cichosz G., 1997. Czynniki determinujące cechy sensoryczne serów dojrzewających. *Lipoliza. Przegląd Mleczarski*, 10, 325-329.
- Collins Y.F., McSweeney P.L.H., Wilkinson M.G., 2003. Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. *Int. Dairy J.*, 13, 841-866.
- Dirinck P., de Winne A. 1999. Flavour characterisation and classification of cheese by gas chromatographic-mass spectrometric profiling, *J. Chromatogr.A.*, 847, 203-208.
- Ferreira A.D., Viljoen B.C., 2003. Yeasts as adjunct starters in matured Cheddar cheese, *Int. J. Food Microbiol.* 86, 131-140
- Fleet G. H., Mian M A., 1987. the occurrences ons growth of yeasts in dairy products, *Int. J. Food Microbiol.*, 4, 145-155.
- Fleet G.H., 1992. Spoilage Yeast's, *Critical Reviews in Biotechnology*, 12, 1-44.
- Fox P.F., 1995. *Development in dairy chemistry*. Applied Science Publishers, London and New York.
- Fox P.F, Guine P.T., Cogan T.M., McSweeney P.L.H., 2000. *Fundamentals of Cheese Science*. An Aspen Publication.
- Gardini F., Tofalo R., Belletti N., Iucci L., G Suzzi, Torriani S., Guerzoni M.E. Lanciotti R., 2006. Characterization of yeasts involved in the ripening of Pecorino Crotonese cheese, *Food Microbiol.*, 23, 641-648.
- Gardini F., Lanciotti R., Guerzoni M.E., Torriani S., 1999. Evolution of aroma production and survival of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgarius* and *Lactobacillus acidophilus* in fermented milks. *Int. Dairy J.*, 9, 125-134.
- Gdula A., 2001 *Aktywność hydrolityczna drożdży Yarrowia lipolytica* ich rola w procesie dojrzewania sera. Praca doktorska. UP Wrocław.
- Glover D.J., McEwen R.K., Thomas C.R. Young T.W., 1997. pH regulated expression of the acid and alkaline extracellular proteases of *Yarrowia lipolytica*. *microbiology*, 143, 3045-3054.
- Guerzoni M.E., Gobbetti M., Lanciotti R., Vannini L., Lopez C.C., *Yarrowia lipolytica* as potential ripening agent in milk products. 1998, [in:] *Yeast in the Dairy Industry: Ppositive and Negative Aspects* (eds. M. Jakobsen, J. Narvhus, B.C. Viljoen). FIL-IDF, Copenagen, Denmark, pp. 23-33.

- Jollivet N., Chataud J., Vayssier Y., Bensoussan M., Belin J.M., 1994. Production of volatile compounds in model milk and cheese media by eight strains of *Geotrichum candidum* Link, J. Dairy Res., 61, 241-248.
- Larsen M.D., van den Tempel T., Hansen T.K., Jakobsen M., 1999. *Sacharomyces cerevisie* as starter culture in Mycella, 2<sup>ed</sup> Symposium: Yeast in the dairy industry, Bologna, Italy, 09-10.09.1999
- Lenoir J., 1984. The surface flora and its role in the ripening of cheese. Int. Dairy Federation Bulletin, Brussels, Belgium, 171, 3-20.
- McSweeney P.L.H., Sousa M.J., 2000. Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheese during ripening: A review, Le Lait, 80, 293-324.
- Molimard P., Spinnler H.E., 1996. Review: Compounds involved in the flavor of surface mold-ripened cheese: origins and properties, J. Dairy Sci., 79, 169-184.
- Ogrydziak, D.M., 1993. Yeast extracellular protease, Crit. Rev. Biotechnol., 13, 1-55
- Pandey A., Benjamin S., Soccol C.R., Nigam P., Krieger N., Soccol V.T., 1999. The realm of microbial lipases in biotechnology, Biotechnol. App. Biochem., 29, 119-131.
- Roostita R., Fleet G.H., 1996. Growth of yeasts in milk and associated changes to milk composition. Int. J. Food Microbiol., 31, 205-219.
- Singaglia M., Lanciotti R., Guerzoni M.E., 1994. Biochemical and physiological characteristics of *Yarrowia lipolytica* strains in relation to isolation source. Can. J. Microbiol., 40, 54-59.
- Singh T.K., Drake M.A., Cadwallader K.R., 2003. Flavor of cheddar cheese: a chemical and sensory perspective. CRFSFS, Institute of Food Technologist, 2, 139-162.
- Smit G., Smit B.A., Engels W.J.M. 2005. Flavour formation by lactic acid bacteria and biochemical flavour profiling of cheese products. FENS Microbiology Reviews, 29, 591-610.
- Suzzi G., Lanorte, M.T., Galgano, F., Andrighetto C., Lombardi A., Lanciotti R. and Guerzoni M.E., 2001. Proteolytic, lipolytic and molecular characterization of *Yarrowia lipolytica* isolated from cheese, Int. J. Food Microbiol., 69, 69-71.
- Szoltysik M., Chrzanowska J., Wojtatowicz M., 2004. Drożdże jako wspomagające kultury startowe w serowarstwie. VII Sesja Naukowa „Postęp w technologii, technice i organizacji mleczarstwa”, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski, Olsztyn 21-22.02.2002.
- Szoltysik M., Żelazko M., Rak L., Połomska X., Dąbrowska A., Wojtatowicz M., Chrzanowska J., 2006. Zdolność drożdży *Yarrowia lipolytica* pochodzących z sera do wytwarzania amin biogennych w mleku, Acta Sci. Pol., Biotechnologia 5, 87-94.
- van den Tempel T. Jakobsen M., 1998. Yeast associated with Danablu cheese. Int. Dairy J., 8, 25-31.
- van den Tempel T. and Jakobsen M., 2000. The technological characteristics of *Debaryomyces hansenii* and *Yarrowia lipolytica* and their potential as starter cultures for production of Danablu, Int. Dairy J., 10, 263-270.
- Thierry A., Maillard M.B., Herve B., Richoux R., Lortal S., 2004. Variad volatile compounds are produced by *Propionobacterium freundenreichii* in Emmental cheese. Food chemistry, 87, 453-463.
- Viljoen B., Greyling T., 1995. Yeasts associated with cheddar and Gouda making, Int. J. Food Microbiol., 28, 79-88.
- Wojtatowicz M., Chrzanowska J., Juszczak P., Skiba A., Gdula. A., 2001. Identification and biochemical characteristic of yeast microflora of Rokpol cheese, Int. J. Food Microbiol., 69, 135-140.

- Wyder M.T., Bachmann H.P., Puhon Z., 1999. Role of selected yeast in cheese ripening: an evolution in foil wrapped Raclette cheese. *Lebensm.-Wiss. Technol.* 32, 333-343.
- Young T.W., Wadswon A., Glover D.J., Quincey R.V., Butin M.J., Kamei E.A., 1996. The extracellular acid protease gene of *Yarrowia lipolytica*: sequences and pH-regulated transcription. *Microbiology*, 142, 2913-2921.
- Zmarlicki, St., 1981. *Ćwiczenia z analizy mleka i produktów mlecznych*, Warszawa, 1981.

### COMPARISON OF AROMA COMPOUNDS PROFILES OF COMMERCIAL CHEESES AND CHEESE PRODUCED WITH YEAST *YARROWIA LIPOLYTICA*

**Abstract.** The aim of the study was to compare of aroma compounds profiles of experimental cheeses produced with *Yarrowia lipolytica* JIIIc with those of commercial cheeses: Emmental, Gouda, Cheddar, Rokpol and Camembert. The level of yeast number as well as chemical composition and acidity were determined in all cheeses. Volatile aroma compounds were isolated from cheeses using solid phase microextraction (SPME) method and analysed by GC/MS method. The highest relative concentration of secondary alcohols, fatty acids and 3-indolo acetic acid were found in experimental cheese. The profile of aroma compounds of this cheese appeared to be similar to profiles of mould cheeses.

**Key words:** yeast, *Yarrowia lipolytica*, cheese ripening, volatile aroma compounds

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 28.09.2007



## SPIS TREŚCI CONTENTS

<b>Xymena Połomska, Maria Wojtatowicz, Barbara Żarowska, Marek Szoltysik, Józefa Chrzanowska</b>	
Skrining podłoży do produkcji liofilizowanych szczepionek drożdżowych dla serowarstwa .....	3
Screening of growth media for freeze-dried yeast starter cultures for cheese making	
<b>Ewelina Dziuba, Barbara Foszczyńska, Paweł Zarychta</b>	
Oddziaływanie mykotoksyn na metabolizm FAN i tworzenie lotnych związków w brzeczках słodowych .....	15
The effect of mycotoxins on FAN metabolism and formation of volatile compounds in malt worts	
<b>Elżbieta Gąsiorek, Joanna Fronia, Paweł Firuta, Waldemar Podgórski</b>	
Makuch rzepakowy jako substrat do biosyntezy kwasu szczawowego metodą solid state .....	27
Rapeseed meal as a substrat for biosynthesis of oxalic acid by solid state fermentation	
<b>Marek Szoltysik, Monika Żelazko, Anna Dąbrowska, Xymena Połomska, Maria Wojtatowicz, Józefa Chrzanowska</b>	
Porównanie profili lotnych związków zapachowych serów handlowych i wytwarzanych z udziałem drożdży <i>Yarrowia lipolytica</i> .....	33
Comparison of aroma compounds profiles of commercial cheeses and cheese produced with yeast <i>Yarrowia lipolytica</i>	