

Marta Paślawska
Instytut Inżynierii Rolniczej
Akademia Rolnicza we Wrocławiu

AKTYWNOŚĆ DROŻDŻY *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* LIOFILIZOWANYCH Z DODATKIEM WYBRANYCH SUBSTANCJI OCHRONNYCH

Streszczenie

Badano wpływ temperatury płyty grzejnej z zakresu 20°C-50°C oraz dodatku trehalozy, laktozy i fruktozy, na komórki drożdży *Saccharomyces cerevisiae* podczas liofilizacji. Stwierdzono, że zastosowanie temperatury płyty grzejnej na poziomie 45°C i 50°C pozwoliło uzyskać susz o porównywalnie wysokiej aktywności biochemicznej i biologicznej oraz o niższej wilgotności i aktywności wody niż susze uzyskane przy temperaturze 20°C, 25°C, 30°C, 35°C i 40°C. Dodatek trehalozy i laktozy spowodował poprawę aktywności drożdży natomiast dodatek fruktozy pozostał bez wpływu na stan i cechy liofilizatów.

Słowa kluczowe: suszenie sublimacyjne, drożdże, osmoprotektory

Wstęp

Drobnoustroje stosowane w biotechnologii powinny zapewniać wysoką wydajność produktu i powtarzalność prowadzonych procesów. W praktyce przemysłowej i laboratoryjnej stosowane są okresowe przesiewy mikroorganizmów na pożywki stałe lub płynne i przechowywanie tych hodowli w temperaturze 4°C, jednak w takich warunkach drobnoustroje mogą zmieniać cechy morfologiczne i biochemiczne, a częste przesiewy wprowadzają ryzyko zakażenia oraz pojawiania się mutantów [Libudzisz, Kowal 2000]. Aby ograniczyć pasażowanie kultur, stosować można przechowywanie drobnoustrojów w stanie anabiozy wywołanym odwodnieniem komórek [Bednarski 1990].

Woda w żywych komórkach jest rozpuszczalnikiem enzymów, substancji pokarmowych, krystaloidów i koloidów, a usunięcie jej powoduje przemianę białek protoplazmy z hydrozolu w hydrożel [Fennema 1996], co z kolei prowadzi do zahamowania funkcji życiowych układów, w stopniu uzależnionym od ilości pozostawionej wody [Tutowa, Kuc 1991].

Powszechnie stosowana w przechowywaniu szczepów liofilizacja (zamrożenie zawiesiny komórek, a następnie sublimacja lodu w próżni) jest zabiegiem wywołującym efekt letalny wśród utrwalanych komórek [Miyamoto-Shinohara i in. 2000], a przyczyną niszczenia komórek może być wzrost stężenia elektrolitu spowodowany usunięciem wody w postaci lodu lub samo formowanie kryształów lodu [Tutowa, Kuc 1991]. Zmniejszenie efektu letalnego uzyskać można stosując dodatkowe czynniki ochronne, takie jak węglowodany, białka lub inne substancje [Cerrutti i in. 2000; Mikkat i in.1997], a rola tych substancji polega na ochronie komórek podczas zamrażania oraz reaktywacji komórek ze stanu anabiozy [Diniz-Mendes, Bernardes 1999]. Niewielka ilość wody w liofilizacie chroni substancje białkowe przed degradacją, a jednocześnie stanowi warunek dobrej żywotności utrwalonej kultury [Turker, Hamamci 1998].

Cel pracy

Celem pracy było określenie optymalnej temperatury liofilizacji drożdży *Saccharomyces cerevisiae* oraz zasadności stosowania trehalozy, laktozy i fruktozy jako dodatkowych substancji ochronnych.

Materiały i metody

Do badań stosowano drożdże *Saccharomyces cerevisiae* (drożdże piekarskie, prasowane; Wołczyn) w formie zawiesiny: 100g drożdży/5mlH₂O_{dest.}

Doświadczenia prowadzono w dwóch etapach:

- określono optymalną temperaturę płyty grzejnej przy kontaktowym dostarczaniu ciepła podczas liofilizacji; próbkę zamrażano (-40°C) z szybkością 4°C/min, liofilizowano w suszarce OE-950 (92Pa,6h) stosując temperaturę odpowiednio 20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C lub 50°C;
- określono wpływ trehalozy, laktozy i fruktozy w dawkach 2% i 4% na aktywność komórek drożdży; liofilizacja przebiegała w temperaturze 50°C (92Pa,6h).

Ocenę aktywności suszu przeprowadzono na podstawie analizy stanu fizjologicznego komórek (metodą mikroskopową po rehydracji w wodzie destylowanej (20 min., temp. 40°C) i wybarwieniu błękitem metylenowym), wilgotności suszu (metodą termogravimetryczną PN-73/A-79005), aktywności wody (miernikiem aktywności wody KMAW 7 Corabid) oraz aktywności enzymatycznej, oceniając dynamikę pobierania glukozy z podłoża (50ml roztworu zawierającego 10% glukozy oraz 5g suszonych drożdży, 30°C) wyznaczoną za pomocą pomiaru pH w odstępach co 1 minutę w czasie 60 minut.

Wyniki

Dobór optymalnej temperatury płyty grzejnej podczas liofilizacji

W zakresie stosowanych wartości temperatury 20-40°C nie zaobserwowano wpływu temperatury płyty grzejnej na wilgotność (W) oraz aktywność wody (A_w) suszu (tab. 1). Wilgotność liofilizatów wahała się w granicach 10,00%-12,75%, przy oznaczonej aktywności wody na poziomie 0,55-0,43. Zastosowanie temperatury płyty grzejnej 45°C i 50°C pozwoliło uzyskać susze o niższej zawartości wody: 7,47%-6,87% oraz niższej aktywności wody: 0,38-0,39.

*Tabela 1. Wilgotność (W) oraz aktywność wody (A_w) liofilizatów drożdży *Saccharomyces cerevisiae* uzyskanych przy zastosowaniu podczas sublimacji temperatury płyty grzejnej z zakresie 20°C -50°C.*

*Table 1. Humidity (W) and water activity (A_w) of lyophilizates of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* obtained by using the heating plate temperature within the range of 20 and 50°C during the sublimation*

	Temperatura płyty grzejnej [°C]						
	20	25	30	35	40	45	50
W [%]	10,71	11,17	10,00	10,00	12,75	7,47	6,87
A_w	0,55	0,53	0,52	0,46	0,52	0,39	0,38

W doświadczeniach nie wykazano jednoznacznej zależności pomiędzy stosowaną temperaturą płyty grzejnej a stanem fizjologicznym liofilizowanych komórek, określonym na podstawie liczby komórek pączkujących, aktywnych i nieaktywnych (tab. 2). Liczba komórek pączkujących wahała się pomiędzy 18,10% przy temperaturze płyty grzejnej 25°C, a 30,00% przy temperaturze płyty grzejnej 40°C, natomiast liczba komórek nieaktywnych pomiędzy 21,00% przy temperaturze 40°C, a 31,70% przy temperaturze 45°C. Stan fizjologiczny komórek w uzyskanych liofilizatach oceniono jako dobry.

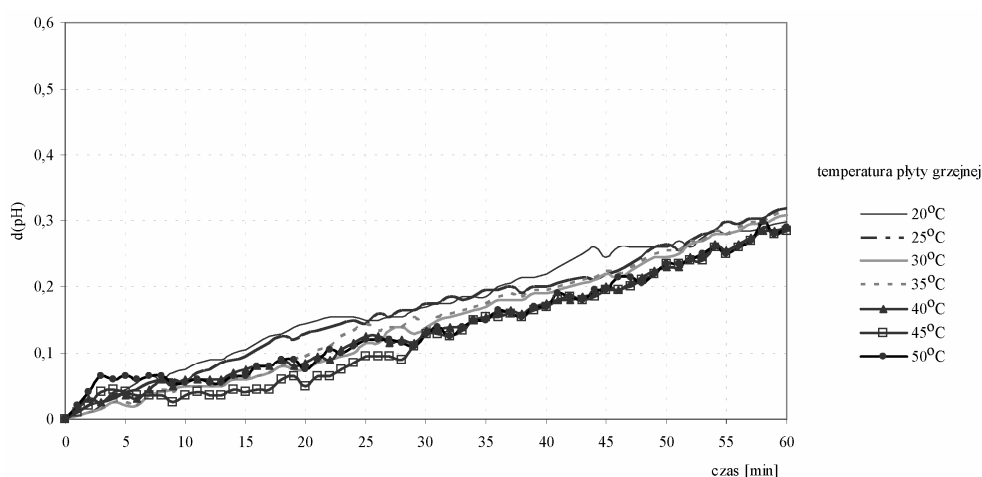
Stopień zachowania enzymów komórkowych określono na podstawie analizy szybkości pobierania cukru z podłoża, mierzonej jako spadek wartości pH w czasie (rys. 1).

Niezależnie od zastosowanej temperatury płyty grzejnej z zakresu 20°C-50°C, zaobserwowano zbliżoną dynamikę pobierania cukru z podłoża we wszystkich próbach, co pozwala stwierdzić, że w warunkach doświadczenia stopień zachowania enzymów komórkowych nie zależał od parametrów suszenia.

Tabela 2. Stan fizjologiczny komórek drożdży *Saccharomyces cerevisiae* suszonych sublimacyjnie przy zastosowaniu temperatury płyty grzejnej z zakresu 20°C-50°C

Table 2. Physiological state of the cells of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* dried by sublimation while using the heating plate temperature within the range of 20 and 50°C

Komórki	Temperatura płyty grzejnej [°C]					
	20	25	30	35	40	45
Pączkujące [%]	23,30	22,50	23,00	25,40	22,00	24,90
Aktywne [%]	41,60	56,70	42,00	54,10	43,99	53,90
Nieaktywne [%]	35,10	20,80	35,00	21,50	34,01	21,20



Rys. 1. Aktywność sacharolityczna liofilizatu drożdży *Saccharomyces cerevisiae* uzyskanego przy zastosowaniu temperatury płyty grzejnej z zakresu 20°C-50°C

Fig. 1. Saccharolytic activity of the lyophilizate of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* obtained by using the heating plate temperature within the range of 20 and 50°C

Stwierdzono, że ze względu na możliwość uzyskania liofilizatu o najniższej zawartości wody, aktywności wody, dobrym stanie fizjologicznym oraz względnie wysokim stopniu zachowania enzymów, uzasadnione jest stosowanie w czasie liofilizacji drożdży *Saccharomyces cerevisiae* temperatury płyty grzejnej 50°C.

Ocena wpływu zastosowanej substancji ochronnej na aktywność biologiczną i biochemiczną liofilizatów drożdży *Saccharomyces cerevisiae*

Przeprowadzono suszenie sublimacyjne drożdży z dodatkiem trehalozy, laktozy oraz fruktozy w dawkach 2% i 4%, przy temperaturze płyty grzejnej 50°C i ciśnieniu 92Pa (6h).

Najniższą wilgotność oraz najniższą aktywność wody oznaczono w liofilizatach z 4% dodatkiem trehalozy- odpowiednio 2,25% i 0,018, natomiast najwyższe w próbie suszonej z 2% dodatkiem fruktozy-odpowiednio 12,45% i 0,276 (tab. 3).

Tabela 3. Wilgotność (W) oraz aktywność wody (A_w) liofilizatów drożdży *Saccharomyces cerevisiae* z zastosowaniem dodatków ochronnych

Table 3. Humidity (W) and water activity (A_w) of lyophilizates of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* while using protective additives

	Substancja ochronna					
	Trehaloza		Laktoza		Fruktoza	
	2%	4%	2%	4%	2%	4%
W [%]	3,36	2,25	4,35	2,65	12,45	11,47
A_w	0,02	0,02	0,03	0,02	0,28	0,23

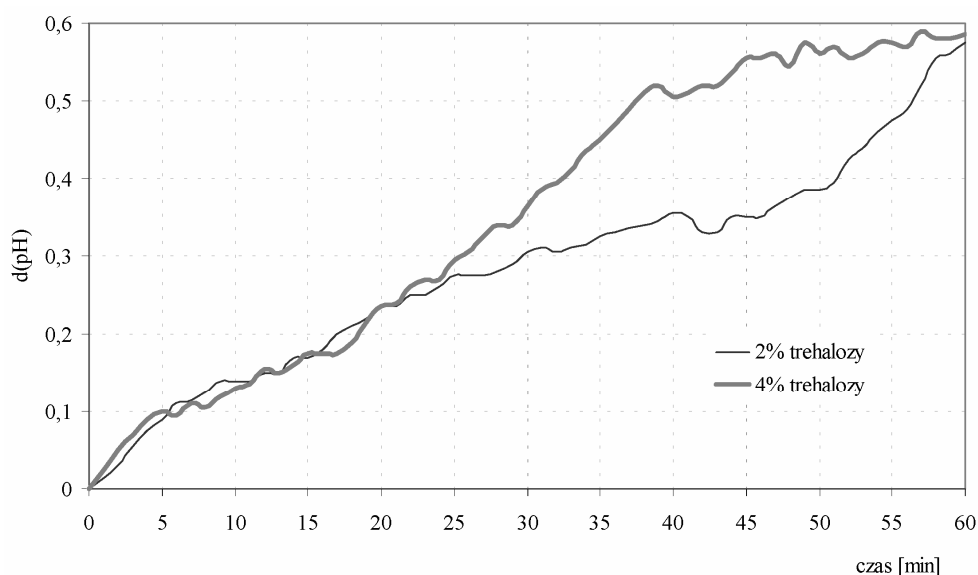
Stan fizjologiczny biomasy wysuszonej z wyższą z zastosowanych dawek osmo-protectorów - 4% był nieco lepszy niż z suszonej z dodatkiem 2% (tab. 4). Liczba komórek pączkujących oznaczona we wszystkich próbach była wysoka 22,00%-25,40% ogólnej liczby komórek, natomiast liczba komórek nieaktywnych wahała się w granicach 35,10%-34,01% w próbach z mniejszą zawartością substancji ochronnej i wynosiła około 20% w próbach zawierających wyższą dawkę osmo-protectora. Ze względu na stan fizjologiczny użyte substancje ochronne spowodowały poprawę stanu fizjologicznego liofilizowanej biomasy tylko w dawce 4%.

Aktywność biochemiczną liofilizatów z dodatkiem trehalozy oceniono w warunkach pomiaru jako najwyższą, niezależnie do stosowanej dawki trehalozy (rys. 2). W ciągu 60 minut testu na podłożu z glukozą nastąpiła zmiana wartości pH o około 0,6, podczas gdy w próbach suszonych z fruktozą zmiana wyniosła $\Delta pH=0,3$ (rys. 3). Dynamika pobierania glukozy przez drożdże suszone z dodatkiem laktozy była zróżnicowana ze względu na dawkę cukru i w przypadku zastosowania dodatku 2% aktywność sacharolityczna była wyższa niż przy 4% dodatku laktozy (rys. 4).

Tabela 4. Stan fizjologiczny liofilizatów drożdży *Saccharomyces cerevisiae* uzyskanych z zastosowaniem dodatków ochronnych

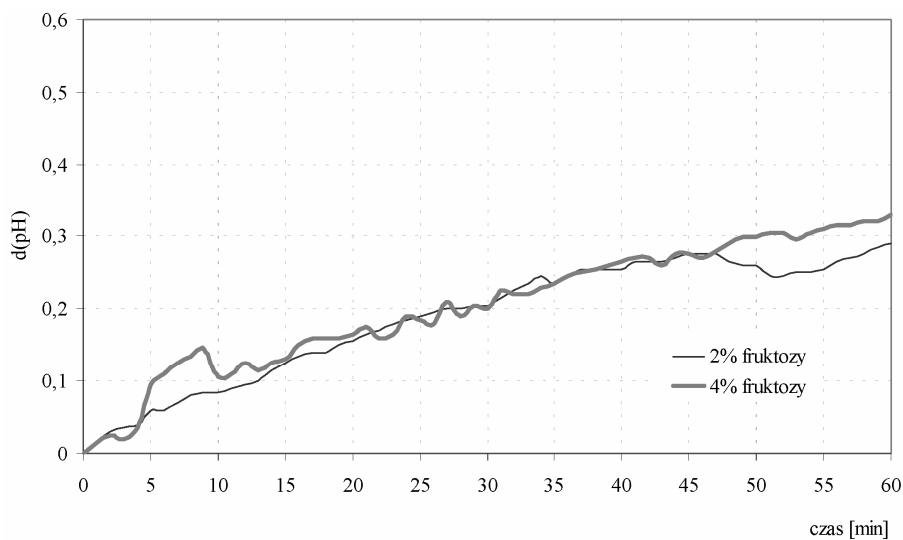
Table 4. Physiological state of lyophilizates of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* obtained by using protective additives

Komórki	Substancja ochronna					
	Trehaloza		Laktoza		Fruktoza	
	2%	4%	2%	4%	2%	4%
Pączkujące [%]	23,30	22,50	23,00	25,40	22,00	24,90
Aktywne [%]	41,60	56,70	42,00	54,10	43,99	53,90
Nieaktywne [%]	35,10	20,80	35,00	21,50	34,01	21,20



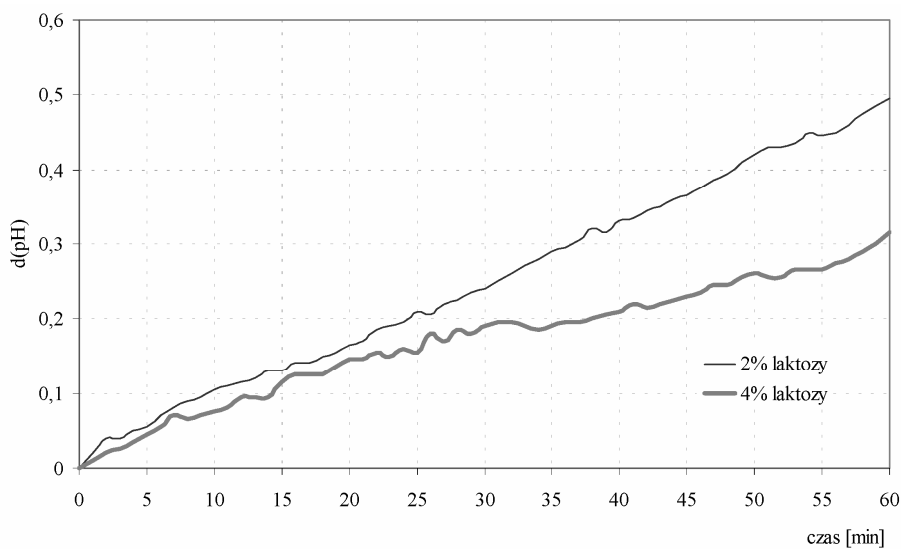
Rys. 2. Aktywność sacharolityczna drożdży *Saccharomyces cerevisiae* suszonych z trehalozą

Fig. 2. Saccharolytic activity of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* dried with trehalose



Rys. 3. Aktywność sacharolityczna drożdży *Saccharomyces cerevisiae* suszonych z fruktozą

Fig. 3. Saccharolytic activity of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* dried with fructose



Rys. 4. Aktywność sacharolityczna drożdży *Saccharomyces cerevisiae* suszonych z laktozą

Fig. 4. Saccharolytic activity of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* dried with lactose

Na podstawie porównania dynamiki pobierania glukozy z podłoża przez drożdże piekarskie można stwierdzić, że najlepszy stopień zachowania enzymów sacharolitycznych gwarantuje dodatek trehalozy (niezależnie do zastosowanej dawki), nieco gorszy efekt ochronny obserwuje się w próbach suszonych z laktozą, natomiast zastosowanie fruktozy nie zapewnia wystarczającej ochrony komórki przed niekorzystnym wpływem zamrażania.

Wnioski

1. W zakresie stosowanych wartości temperatury płyty grzejnej 20°C-50°C, nie stwierdzono negatywnego wpływu podwyższonej temperatury na aktywność liofilizowanych komórek drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Ze względu na osiągniętą znacznie niższą wilgotność końcową oraz aktywność wody, ekonomicznie uzasadnione jest stosowanie temperatury płyty grzejnej na poziomie 45°C-50°C.
2. Stosowanie trehalozy i laktozy jako dodatków chroniących komórki przed negatywnym wpływem zamrażania jest uzasadnione ze względu na możliwość obniżenia końcowej wilgotności i aktywności wody suszu, oraz poprawę aktywności enzymatycznej liofilizatów.

Bibliografia

- Bednarski W. 1990. Wybrane aspekty utrwalania oraz przechowywania szczepów drobnoustrojów przemysłowych, *Przemysł fermentacyjny i owocowo-warzywny*. 3/90, s. 13-15.
- Cerrutti P., Segovia de Huerdo M., Galvagno M., Schebor C., del Pilar Buera M. 2000. Commercial baker's yeast stability as affected by intercellular content of trehalose, dehydration procedure and the physical properties of external matrices. *Appl Microbiol Biotechnol*.54:575-580.
- Fennema O.R. 1996. *Food Chemistry*, Marcel Dekker Inc., New York.
- Libudzisz Z., Kowal K. 2000. *Mikrobiologia techniczna*. Wydawnictwo Politechniki Łódzkiej.
- Miyamoto-Shinohara Y., Imaizumi T., Sukenobe J., Murakami Y., Kawamura S., Komatsu Y. 2000. Survival Rate of Microbes after Freeze-Drying and Long-Term Storage. *Cryobiology* 41, s. 251-255.

Turker N, Hamamci H. 1998. Storage behavior of immobilized dried microorganisms. *Food Microbiology*.15,s. 3-11.

Tutowa i Kuc.1991. Suszenie produktów biosyntezy. WNT Warszawa 1991.

Badania wykonano w ramach grantu KBN nr 3 PO6 T 063 25, w latach 2003-2005.

ACTIVITY OF YEAST *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* LIOPHILIZED WITH CHOSEN PROTECTANTS

Summary

The influence of freeze-drying temperature (20°C-50°C) and different sugars (trehalose, lactose and fructose) as osmoprotective compounds on the cell viability and biotechnological activity of commercial baker's yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, were analyzed. It was found, that relatively high temperature of dehydration of frozen cells (45°C -50°C), let to obtain the product of lower humidity, water activity and comparatively high biotechnological activity, as these obtained at lower temperature (20°C-40°C). The addition of external trehalose and lactose (4% and 2% as well) improved the biological and biotechnological activity of *S. cerevisiae* cells.

Key words: sublimation drying, yeast, osmoprotectans

This research work was supported by the Polish State Committee for Scientific Research (grant No 3 PO6 T 063 25, years 2003-2005)