

BARBARA ŻAROWSKA  
MARIA WOJTATOWICZ  
XYMENA POŁOMSKA

Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Wrocław

# Kinetyka procesu biosyntezy toksyn killerowych przez drożdże *Debaryomyces hansenii*

## Wstęp

Zdolność drożdży do produkcji białek killerowych oraz odporność i wrażliwość na nie może istotnie wpływać na kształtowanie się wzajemnych stosunków między mikroorganizmami w danej niszy ekologicznej.

Drożdże *Debaryomyces hansenii* i ich anamorficzna forma *Candida famata* zasiedlają różnorodne środowiska; występują w wodach morskich, na roślinach, owocach i skórze ssaków. Są izolowane praktycznie ze wszystkich typów mrożonej i chłodzonej żywności. Powszechnie występują w takich produktach spożywczych, jak: mleko, jogurty, lody, kiełbasy, szynki, sosy i dipy. Jednak głównym źródłem izolacji tych drożdży są sery dojrzewające. W odróżnieniu od innych gatunków drożdży, *D. hansenii* jest gatunkiem dominującym w większości serów [1]. Tworzenie toksyn killerowych może być jednym z czynników zapewniających szczepom tego gatunku przewagę nad innymi drożdżami w fermentowanej żywności. W piśmiennictwie naukowym jest na ten temat niewiele informacji. Wcześniejsze badania autorów pokazały, że izolaty *D. hansenii* z serów *Rokpol* wykazywały aktywność bójczą przede wszystkim wobec szczepów gatunku *Y. lipolytica* [2, 3]. Podobnie do innych halofilnych drożdży, stwierdzono, że dodatek NaCl do podłoża wzmagal toksyczość białek killerowych *D. hansenii*. Natomiast w przeciwieństwie do stosunkowo dobrze poznanych białek killerowych drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lacti* czy *Schwaniomyces occidentalis*, przejawiających najwyższą aktywność w temperaturze około 25°C, większość badanych szczepów *D. hansenii* największą ilość toksyny killerowej produkowało w temperaturze 14°C, typowej dla procesu dojrzewania sera. Powyższe dane świadczą o tym, że toksyna killerowa drożdży *D. hansenii* jest nową, dotychczas w zasadzie nie opisaną substancją białkową.

Celem badań było porównanie kinetyki i efektywności syntezy toksyn killerowych przez 3 szczepy drożdży *Debaryomyces hansenii*.

## Materiały i metody

Przedmiotem badań były szczepy *Debaryomyces hansenii*: AII4b, MI1a i KI2a produkujące toksyny killerowe oraz wzorcowy szczep wrażliwy *Yarrowia lipolytica* PII6a do badania poziomu tworzonych toksyn. Drożdże pochodziły z kolekcji własnej Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Szczepy te zostały wyizolowane z sera *Rokpol*. Przechowywano je na skosach YPG w temperaturze 4°C i cyklicznie przeszczepiano.

**Podłoża.** Biosyntezę toksyn killerowych przez badane drożdże prowadzono w podłożu YPG o składzie: ekstrakt drożdżowy 10 g, pepton 20 g i glukoza 20 g, bufor cytrynianowo-fosforanowy (pH 4,6) 1000 mL. Agarowe podłoże YPG-MB z dodatkiem błękitu metylenowego (MB) w ilości 0,03 g/L stosowano do oznaczania aktywności bójczej w hodowlach drożdży *Debaryomyces*.

**Techniki hodowli.** Hodowle prowadzono w bioreaktorze BIOSTAT B-PLUS (*Sartorius*, Germany), w objętości roboczej 3 L. W czasie procesu utrzymywano temperaturę 14°C, przepływ powietrza na poziomie 0,36 vvm, szybkość obrotową mieszadła 500 rpm. *Inokum* stanowiła 72-godz. hodowla wstrząsana w podłożu YPG w ilości 1%. Z hodowli w bioreaktorze, w odstępach 3-godzinnych pobierano 10 mL próbki do oznaczeń biomasy, resztkowej glukozy, białka i aktywności killerowej supernatantu.

**Metody analityczne.** Biomagę oznaczano metodą wagową. Stężenie resztkowej glukozy w supernatancie oceniano metodą *Nelsona* [4], białko metodą *Lowry'ego* [5]. Poziom aktywności bójczej supernatantu oznaczano metodą dyfuzyjną wg *Woods i Bevan* [6] na podłożu YPG-MB wobec *Y. lipolytica* PII6a, jako szczepu wzorcowego. Za jednostkę aktywności bójczej (aU) umownie przyjęto ilość toksyny killerowej wnoszonej z płynem pohodowlanym do studzienki w agarze YPG-MB, która daje strefę zahamowania wzrostu szczepu wrażliwego równą 1 mm [7].

**Obliczenia.** Szybkość właściwą wzrostu drożdży obliczano ze wzoru

$$\mu = \frac{\ln X_2 - \ln X_1}{dt} \quad [\text{h}^{-1}] \quad (1)$$

natomiast szybkość właściwą tworzenia toksyny killerowej ( $q_{KT}$ ) w czasie trwania wzrostu drożdży (w tropofazie) wyznaczano posługując się równaniem:

$$q_{KT} = \frac{dP}{dX} \mu \quad [\text{aU/mg suchej biomasy /h}] \quad (2),$$

a po zakończeniu wzrostu drożdży (w idiofazie) wg wzoru:

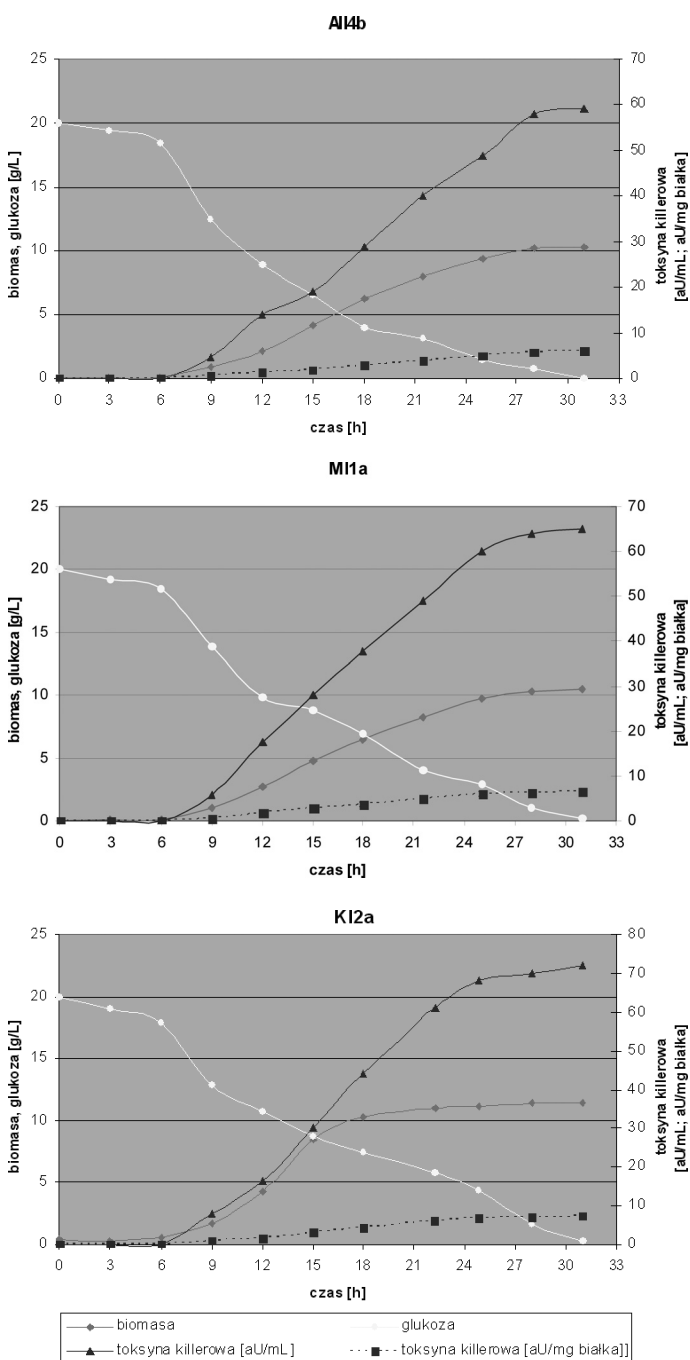
$$q_{KT} = \frac{dP}{dt} \frac{1}{X} \quad [\text{aU/mg suchej biomasy /h}] \quad (3)$$

gdzie:

$X_2 - X_1$  – przyrost biomasy w czasie  $dt$  ( $t_2 - t_1$ )  
 $dP$  – przyrost tworzonych produktu  
 $[X]$  – stężenie biomasy już istniejącej

### Omówienie i dyskusja wyników

Aktywność killerowa drożdży jest zjawiskiem znanym od ponad 40 lat. Pomimo licznych badań nad toksynami killerowymi różnych szczepów drożdży w tematycznym piśmiennictwie brak jest informacji na temat dynamiki ich tworzenia. Celowe wydawało się więc podjęcie badań w tym zakresie. Przeprowadzono hodowle okresowe 3 szczepów *D. hansenii* w podłożu YPG i w temperaturze 14°C. Badane drożdże długo adaptowały się do takich warunków, trwająca około 4–6 h lagfaza mogła być spowodowana stosunkowo niską temperaturą hodowli. Podczas 30-godzinnych procesów drożdże osiągały poziom biomasy równy około 10–11 g/L przy całkowitym zużyciu zawartej w podłożu glukozy (Rys. 1). Biosynteza toksyn killerowych z udziałem szczepów AII4b i MI1a prze-



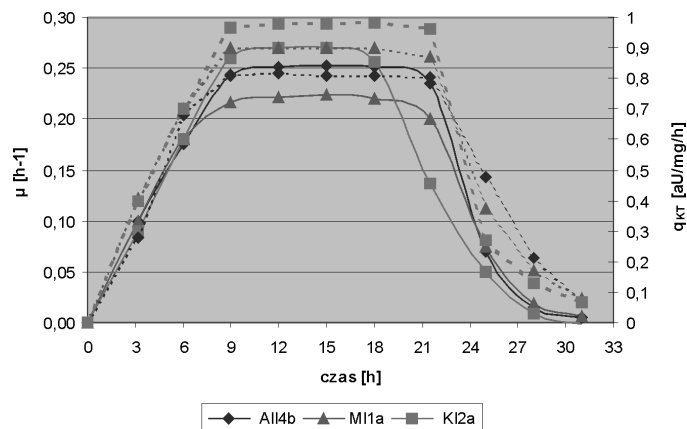
Rys. 1. Biosynteza toksyn killerowych, wzrost i zużycie glukozy w hodowlach trzech szczepów *Debaryomaces hansenii* w podłożu YPG

biegała wraz ze wzrostem drożdży, czyli od około 9 do 28 h procesu. Produkcja białek killerowych przez szczep KI2a miała natomiast nieco inny charakter; w hodowli tej biosyntezę toksyn obserwowano również po zahamowaniu wzrostu drożdży. Zjawisko to jest trudne do zinterpretowania, biorąc jednak pod uwagę fakt, że użyte w pracy szczepy są reprezentantami tego samego gatunku można przypuszczać, że kinetyka tworzenia białek killerowych jest cechą szczepową.

Poziom toksyn killerowych w przeliczeniu na 1 mL płynu pohodowlanego wzrastał w czasie trwania hodowli osiągając zbliżone dla wszystkich kultur wartości, w zakresie 60–70 aU/mL. Uzyskanych wyników nie można porównywać z wynikami innych autorów, gdyż w literaturze brak jakichkolwiek informacji na temat efektywności produkcji toksyn killerowych drożdży *D. hansenii*.

W badanych hodowlach drożdży stwierdzano stały poziom białka (8–9 mg/mL) utrzymujący się przez cały okres trwania procesów (dane niepublikowane). Fakt ten można wytłumaczyć wykorzystywaniem przez drożdże zawartych w podłożu peptydów i jednoczesną biosyntezą białek killerowych. Obserwowany wzrastający poziom toksyn killerowych wyrażony w aU/mg białka (Rys. 1) może świadczyć o rosnącej aktywności bójczej produkowanych toksyn.

Na rys. 2 przedstawiono kinetykę wzrostu i syntezy toksyn killerowych przez badane szczepy *D. hansenii*. Wszystkie drożdże osiągały fazę wykładniczą około 9 h hodowli i rosły ze zbliżoną maksymalną szybkością właściwą wzrostu  $\mu_{max}$  w zakresie 0,22–0,27 h<sup>-1</sup>. W hodowlach szczepów AII4b i MI1a białka killerowe najintensywniej tworzone były przez komórki w fazie wykładniczej.



Rys. 2. Profile zmian szybkości właściwej wzrostu,  $\mu$  (—) i szybkości właściwej syntezy toksyn killerowych,  $q_{KT}$  (---) w hodowlach 3 szczepów drożdży *D. hansenii* (AII4b; MI1a; KI2a)

Biosynteza toksyn przebiegała w tym czasie ze stałą maksymalną szybkością właściwą  $q_{KT}$ , na poziomie 0,82–0,9 aU/mg biomasy/h. Najwyższą szybkością właściwą tworzenia toksyn killerowych, 0,98 aU/mg biomasy/h, cechował się szczep KI2a produkujący białka także po zakończeniu wzrostu biomasy. Brak literaturowych danych na temat szybkości tworzenia toksyn killerowych uniemożliwia porównanie uzyskanych wyników. Jedynie *Gotowczyc* i wsp. [8] w przeglądowej publikacji zamieszczają informację, że maksymalna produkcja białek killerowych następuje w fazie wzrostu wykładniczego przy dużym zasobie składników pokarmowych i odpowiednim pH środowiska.

Reasumując, badane drożdże *D. hansenii* produkowały toksyny killerowe podczas wzrostu ze zbliżoną szybkością i efektywnością. Dalsze badania będą zmierzały do wydzielania i oczyszczania białek killerowych z płynów pochodowlanych.

#### Wnioski

1. Biosynteza toksyn killerowych z udziałem szczepów *Debaryomyces hansenii* AII4b i MI1a przebiegała wraz ze wzrostem drożdży, natomiast w hodowli szczepu KI2a biosyntezę toksyn obserwowano również po zahamowaniu wzrostu drożdży.
2. Poziom toksyn killerowych w przeliczeniu na 1 mL płynu pochodowlanego wzrastał w czasie trwania procesów.
3. W hodowlach wszystkich szczepów białka killerowe najintensywniej tworzone były przez komórki w fazie wykładniczej.
4. Najwyższą szybkością właściwą tworzenia toksyn killerowych cechował się szczep *D. hansenii* KI2a.

#### LITERATURA

1. G. H. Fleet: *J. Appl. Bacteriol.* **68**, 199-211 (1990).
2. M. Gotowczyc, H. Oberman, Drewicz E.: *Biotechnol.* **2** (17), 36 (1992).
3. O.H. Lowry, N.J. Rosenbrough, A.L. Farr, R.J. Randall: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951).
4. N. Nelson: *J. Biol. Chem.*, **153**, 375 (1944).
5. C. Wen-Bao, H. Yuh-Fehng, J. Shung-Chang, C. Shenq-Chyi: *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 12, 5348 (2000).
6. M. Wojtatowicz, B. Żarowska, X. Kieźel, J. Chrzanowska: *Acta Sci. Polon. Biotechnol.* **1/2**, 75 (2002).
7. D. Woods D, E. Bevan: *J. Gen. Microbiol.* **51**, 115 (1968).
8. B. Żarowska, M. Wojtatowicz, X. Połomska, P. Juszczyk, J. Chrzanowska: *Folia Microbiol.* **49** nr 6, 713 (2004).

**Badania realizowane w ramach projektu badawczego Nr N N312 256834 finansowanego przez MNiSW w latach 2008-2010.**

Wydział Inżynierii Chemicznej i Procesowej Politechniki Warszawskiej



Sieć Naukowa SURUZ

organizują

VII KONFERENCJĘ NAUKOWĄ



**INŻYNIERIA PROCESOWA W OCHRONIE ŚRODOWISKA**

17–19 września 2009 r.

w Sarbinowie k/Koszalin

w połączeniu z

MIKROSYMPOZJUM

**Surfaktanty w ochronie środowiska i medycynie**

w ramach działalności sieci naukowej

Surfaktanty i układy zdyspergowane w teorii i praktyce – SURUZ

Celem konferencji jest:

- przegląd osiągnięć w opracowaniu metod, procesów i urządzeń, zwiększających czystość powietrza, wody i gleby,
- wymiana doświadczeń w dziedzinie wdrażania i stosowania technicznych środków ochrony wód i powietrza oraz unieszkodliwiania odpadów stałych,
- dyskusja nowych kierunków rozwoju inżynierii procesowej w zakresie ochrony środowiska pracy oraz oceny jego wpływu na zdrowie.

Organizatorzy zapraszają do udziału w konferencji pracowników szkół wyższych, instytutów badawczych i zakładów przemysłowych zajmujących się:

- oczyszczaniem gazów odlotowych i spalinowych,
- oczyszczaniem ścieków,
- unieszkodliwianiem i utylizacją odpadów stałych,
- innymi zastosowaniami metod inżynierskich w problemach ochrony środowiska i zdrowia człowieka.

Informacje: <http://www.ichip.pw.edu.pl/sosnowski/sarb09/>