

GRAŻYNA KRASNOWSKA

## PRÓBA WYKORZYSTANIA ENZYMÓW POCHODZENIA MIKROBIOLOGICZNEGO DO DEGRADACJI SUROWCÓW ZWIERZĘCYCH BOGATYCH W TKANKĘ ŁĄCZNĄ

### Streszczenie

Celem pracy było porównanie aktywności proteolitycznej preparatów enzymatycznych uzyskanych z płynów pochodzących z drożdży *Yarrowia lipolytica* szczepu A101 i grzybów *Beauveria bassiana* 278 oraz ocena ich przydatności do degradacji skór wieprzowych. Preparaty enzymatyczne scharakteryzowano pod względem ich aktywności proteolitycznej wobec kazeiny, żelatyny oraz hemoglobiny. Ponadto przeprowadzono ocenę właściwości kolagenolitycznych preparatów w stosunku do kolagenu rozpuszczalnego oraz wołowych ścięgien Achillesa. Aktywność kolagenolityczną oceniono na podstawie dynamiki uwalniania wolnych grup aminowych i hydroksyproliny z substratów.

W drugim etapie badań przeprowadzono hydrolizę skór wieprzowych doświadczalnymi preparatami enzymatycznymi w środowiskach o pH = 3,5 i pH = 6,0 w temp. 20°C. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że preparat z *Beauveria bassiana* 278 wykazywał najwyższą aktywność proteolityczną w środowisku o pH = 6,0, natomiast preparat z *Yarrowia lipolytica* przy pH = 3,5. W stosunku do kolagenu skór wieprzowych aktywność obu preparatów enzymatycznych była wyższa przy pH = 6,0, jednak z przewagą aktywności kolagenolitycznej preparatu uzyskanego z *Yarrowia lipolytica*. Enzymy z *Yarrowia lipolytica* efektywniej degradowały również białka skór wieprzowych, zwłaszcza w środowisku o optymalnym pH = 3,5.

**Słowa kluczowe:** enzymy proteolityczne, aktywność kolagenolityczna, hydroliza enzymatyczna, skóry wieprzowe.

### Wprowadzenie

Dynamiczny rozwój biotechnologii w znacznym stopniu przyczynia się do postępu technologicznego oraz stwarza możliwości zastąpienia tradycyjnych procesów chemicznych. Ponadto, w przetwórstwie żywności, poprzez m.in. poprawę właściwości funkcjonalnych białek pozwala na poszerzenie oferty asortymentowej kierowanej do

wielu grup konsumentów [5, 7, 17]. Największe znaczenie praktyczne mają technologie, w których zastosowano enzymy. Procesy te mogą być kontrolowane i przerywane na określonym, pożądanym etapie. Zastosowanie preparatów enzymatycznych w technologii żywności umożliwia produkcję nowych i bardziej atrakcyjnych pod względem żywieniowym i sensorycznym produktów, pełniejsze wykorzystanie surowców i produktów ubocznych, a tym samym zmniejszenie kosztów produkcji [7]. Enzymy stosowane w przemyśle spożywczym otrzymywane są z tkanek roślinnych i zwierzęcych, ale obecnie największe znaczenie ma produkcja enzymów przy użyciu wyselekcjonowanych drobnoustrojów [15]. Synteza enzymów z hodowli drobnoustrojów zależy od warunków jej prowadzenia, co z kolei umożliwia ich produkcję o ściśle określonej specyficzności. Wzrastające zapotrzebowanie na standaryzowane preparaty enzymatyczne, których produkcja i zastosowanie będzie ekonomicznie uzasadnione, stwarza konieczność poszukiwania nowych i tanich ich źródeł [4, 17].

Wśród mikroorganizmów zdolnych do biosyntezy znacznych ilości enzymów hydrolitycznych znajdują się grzyby pasożytujące na owadach, określane wspólną nazwą entomopatogenów. Enzymy proteolityczne tych grzybów i ich specyficzność substratowa stanowiły przedmiot zainteresowań badaczy w wielu opracowaniach [2, 4, 13]. Do grzybów tych należą m.in. grzyby *Beauveria bassiana* z klasy *Deuteromyces*. Drugi z analizowanych mikroorganizmów to drożdże z gatunku *Yarrowia lipolytica*, które należą do tzw. drożdży niekonwencjonalnych, występujących w glebie, w naturalnych zasobach wodnych oraz stanowią dominującą florę w produktach spożywczych bogatych w tłuszcz i białka. Charakteryzują się rzadko spotykaną u drożdży zdolnością biosyntezy enzymów pozakomórkowych hydrolizujących białka i tłuszcze. Drożdże te wykorzystują, jako źródło węgla i energii, tylko niektóre cukry, takie jak: glukoza, fruktoza i ryboza. Są jednym z gatunków drożdży wchodzących m.in. w skład dzikiej mikroflory występującej w serach, szczególnie pleśniowych i maziowych [6, 20].

Celem pracy było porównanie aktywności proteolitycznej preparatów enzymatycznych uzyskanych z pływów pochodzących drożdży *Yarrowia lipolytica* i grzybów *Beauveria bassiana* oraz ocena ich przydatności do degradacji skór wieprzowych.

### **Materiał i metody badań**

Do badań użyto dwóch preparatów enzymatycznych uzyskanych z hodowli wgłębnej drożdży *Yarrowia lipolytica* szczepu A 101 oraz grzybów entomopatogennych *Beauveria bassiana* 278. Szczep drożdży pochodził z kolekcji Katedry Biotechnologii Akademii Rolniczej we Wrocławiu, natomiast szczep grzybów z Katedry Botaniki i Biologii Akademii Medycznej we Wrocławiu. Hodowle

drobnoustrojów prowadzono w temp. 26–28°C metodą wstrząsową przez 72 h wg Chrzanowskiej i wsp. [3, 6]. W otrzymanych preparatach enzymatycznych określano ich aktywność proteolityczną wobec: 1% kazeiny (Serva), 2% żelatyny (Serva) oraz 2% hemoglobiny preparowanej w warunkach laboratoryjnych z krwi wołowej [12]. Przyrost produktów degradacji substratów oznaczano poprzez pomiar absorbancji przy długości fali 280 nm w próbach inkubowanych w temp. 35°C przez 1 h z dodatkiem ocenianego preparatu enzymatycznego i substratu rozpuszczonego w buforze cytrynianowo-fosforanowym przy pH = 3,5; 6,0 i 8,0 [2, 11, 13]. Za jednostkę aktywności przyjęto taką ilość enzymu, która w warunkach testu powodowała przyrost ekstynkcji  $\Delta E = 0,01$ . Ponadto przeprowadzono ocenę właściwości kolagenolitycznych preparatów wobec 1% roztworu kolagenu rozpuszczalnego (Serva) oraz wobec natywnych białek wołowych ścięgien Achillesa. Podatność kolagenu rozpuszczalnego (do 20 cm<sup>3</sup> roztworu wprowadzono 2 cm<sup>3</sup> preparatu enzymatycznego) na degradację oceniano na podstawie dynamiki przyrostu wolnych grup aminowych [10, 19] i hydroksyproliny [1] po 2, 5 i 24 h prowadzenia procesu hydrolizy tego substratu w buforze Brittona Robinsona o pH = 6,0 w temp. 35°C. Natomiast wołowe ścięgna Achillesa (50 mg w 4 cm<sup>3</sup> buforu) poddano działaniu 1 cm<sup>3</sup> preparatu enzymatycznego w analogicznych warunkach, a intensywność procesu degradacji surowca określano po 24, 48 i 72 h jego trwania.

W drugim etapie badań przeprowadzono hydrolizę skór wieprzowych wyżej wymienionymi preparatami enzymatycznymi, w środowiskach o pH = 3,5 i pH = 6,0 w temp. 20°C. Materiał ten uzyskano z partii bocznych skór świń rasy Pietrain i po oczyszczeniu z tkanki tłuszczowej poddano dwukrotnemu rozdrobnieniu w wilku laboratoryjnym. Hydrolizę prowadzono metodą zalewową przy stosunku surowca do preparatu enzymatycznego jak 1:1 w buforze cytrynianowo-fosforanowym w temp. 20±1°C. Reakcję przerywano po 8, 24 i 48 h prowadzenia procesu wprowadzając 5% roztwór TCA, a następnie próby wirowano przy 7000 obr./min przez 10 min. Stopień hydrolizy białek surowca doświadczalnego określano na podstawie oznaczeń przyrostów zawartości wolnej hydroksyproliny, azotu rozpuszczalnego [11] oraz wolnych grup aminowych w roztworach po określonym czasie trwania degradacji surowca. Doświadczenie przeprowadzono w pięciu seriach.

Analizę statystyczną wyników przeprowadzono używając programu Statgraphics (wersja 5.0).

## Wyniki i dyskusja

Wyniki oznaczeń aktywności proteolitycznej preparatu enzymatycznego wobec wybranych substratów przedstawiono w tab. 1. Dowodzą one, że preparat enzymatyczny uzyskany z drożdży *Yarrowia lipolytica* wykazywał najwyższe

zdolności proteolityczne w środowisku o pH = 3,5, natomiast w przypadku preparatu z grzybów *Beauveria bassiana* optymalnym pH działania było 6,0.

Tabela 1

Aktywność preparatów enzymatycznych wobec kazeiny, żelatyny i hemoglobiny.

The activity of enzymatic preparations towards casein, gelatin, and hemoglobin

| pH  | Preparat enzymatyczny<br>Enzymatic preparation | Kazeina<br>Casein                                  |                        | Żelatyna<br>Gelatin                                |                        | Hemoglobina<br>Hemoglobin                          |                        |
|-----|--|--|------------------------|--|------------------------|--|------------------------|
|     |  | [j.a./cm <sup>3</sup> ]<br>[u.a./cm <sup>3</sup> ] | [j.a./mg]<br>[u.a./mg] | [j.a./cm <sup>3</sup> ]<br>[u.a./cm <sup>3</sup> ] | [j.a./mg]<br>[u.a./mg] | [j.a./cm <sup>3</sup> ]<br>[u.a./cm <sup>3</sup> ] | [j.a./mg]<br>[u.a./mg] |
| 3,5 | <i>Yarrowia lipolytica</i>                     | 74,4   | 97,9                   | brak<br>no   | –                      | 293,2  | 385,9                  |
|     | <i>Beauveria bassiana</i>                      | 25,6   | 168,5                  | 2,0  | 13,2                   | 52,4   | 344,9                  |
| 6,0 | <i>Yarrowia lipolytica</i>                     | 30,0   | 39,5                   | 1,2  | 1,6                    | 282,0  | 371,0                  |
|     | <i>Beauveria bassiana</i>                      | 160,0  | 1053,3                 | brak<br>no   | –                      | 226,4  | 1490,4                 |
| 8,0 | <i>Yarrowia lipolytica</i>                     | 8,0  | 10,67                  | 1,0  | 1,3                    | 79,0   | 105,3                  |
|     | <i>Beauveria bassiana</i>                      | 32,0   | 213,3                  | brak<br>no   | –                      | 29,0   | 193,3                  |

Kazeina pod wpływem działania obu preparatów ulegała hydrolizie we wszystkich zakresach pH. Preparat z *Yarrowia lipolytica* wykazywał najwyższą zdolność hydrolityczną w stosunku do tego białka przy pH=3,5 (74,4 j.a./cm<sup>3</sup> preparatu) i wraz z obniżeniem kwasowości środowiska reakcji jego aktywność malała, osiągając wartość 8,0 j.a./cm<sup>3</sup> przy pH = 8,0. Optymalnymi warunkami prowadzenia procesu przy zastosowaniu preparatu enzymatycznego z *Beauveria bassiana* było środowisko buforu o pH = 6,0, w którym aktywność osiągnęła wartość 160 j.a./cm<sup>3</sup>, natomiast zarówno w kwaśnym (pH = 3,5), jak i zasadowym (pH = 8,0) roztworze aktywność spadała odpowiednio do wartości 25,6 i 32,0 j.a./cm<sup>3</sup>. Aktywność specyficzna wobec tego substratu wyrażona w aktywności 1 mg białka enzymatycznego jest dużo wyższa w przypadku preparatu pochodzenia grzybowego i w optymalnych warunkach działania osiągnęła wartość powyżej 1050 jednostek. Świadczy to jednak o tym, że uzyskany preparat enzymatyczny charakteryzował się niewielkim stężeniem białka enzymatycznego i należałoby go zatężyć, aby poprawić jego funkcjonalność.

Żelatyna zastosowana w doświadczeniu okazała się substratem bardzo mało dostępnym i tylko nieznaczną aktywność ( $2 \text{ j.a./cm}^3$ ) wobec niej stwierdzono przy użyciu preparatu z *Beauveria bassiana* w roztworze o pH 3,5 oraz preparatu z *Yarrowia lipolytica* w środowisku o pH 6,0 ( $1.2 \text{ j.a./cm}^3$ ). Aktywność specyficzną preparatu *Beauveria bassiana* była ponad 8-krotnie wyższa ( $13,2 \text{ j.a./mg}$  białka) niż z *Yarrowia lipolytica* ( $1,6 \text{ j.a./mg}$  białka).

Spośród analizowanych substratów najbardziej podatna na działanie ocenianych preparatów była hemoglobina. Wobec hemoglobiny preparat z *Beauveria bassiana* wykazywał aktywność na poziomie  $52,4 \text{ j.a./cm}^3$  przy pH = 3,5, około 4,5-krotnie wyższą ( $226,4 \text{ j.a./cm}^3$ ) przy pH = 6,0, a przy pH = 8,0 najniższą, rzędu  $29,0 \text{ j.a./cm}^3$ . Preparat z *Yarrowia lipolytica* charakteryzował się wobec tego substratu najwyższą aktywnością i była ona zbliżona w roztworach o wartościach pH = 3,5 i 6,0, a wynosiła odpowiednio:  $293,2$  i  $282,0 \text{ j.a./cm}^3$ , ale znacznie spadła w teście przeprowadzonym w środowisku alkalicznym (przy pH = 8,0 oznaczono  $79 \text{ j.a./cm}^3$  preparatu). Uwzględniając zawartość białka w preparatach ( $0,15 \text{ mg}$  białka w  $1 \text{ cm}^3$  preparatu z *Beauveria bassiana* i  $0,76 \text{ mg}$  białka w  $1 \text{ cm}^3$  preparatu z *Yarrowia lipolytica*) obliczono ich aktywność specyficzną. Najwyższe wartości odnotowano w przypadku proteaz z *Beauveria bassiana* –  $344,9 \text{ j.a./mg}$  białka (pH = 3,5) i  $1490,4 \text{ j.a./mg}$  białka (pH=6,0), natomiast enzymy z *Yarrowia lipolytica* cechowały się aktywnością rzędu  $371 \text{ j.a./mg}$  białka (pH = 6,0) i  $386 \text{ j.a./mg}$  białka (pH = 3,5). Wartości te wskazują również, że preparat enzymatyczny z *Yarrowia lipolytica* był bardziej stabilny w różnych zakresach pH, gdyż nie zmieniał istotnie swej aktywności wobec tego substratu.

W dalszej części badań przeprowadzono ocenę aktywności kolagenolitycznej analizowanych preparatów enzymatycznych. Zastosowanymi substratami były: kolagen rozpuszczalny oraz wołowe ścięgna Achillesa. Podatność tych substratów oceniono na podstawie dynamiki zmian zawartości wolnych grup aminowych i hydroksyproliny w roztworach po przeprowadzonej degradacji surowców. Wiadomo, że niespecyficzne dla białek kolagenowych enzymy oddziałują tylko na niehelikalne końce cząsteczek kolagenu oraz na białka towarzyszące, niemniej są one stosowane do izolacji kolagenu z różnych źródeł [14, 18]. Analizując uzyskane dane (tab. 2) należy stwierdzić, że będące przedmiotem badań preparaty enzymatyczne wykazały odmienne właściwości hydrolityczne w stosunku do tych surowców. Białka natywnych ścięgien Achillesa okazały się bardziej opornym substratem na działanie preparatu z grzybów *Beauveria bassiana* niż zastosowany roztwór kolagenu rozpuszczalnego. Poziom hydrolizy białek ze ścięgien Achillesa, wyrażony przyrostem wolnych grup aminowych po 3 dobach prowadzenia procesu, był na niewiele wyższym poziomie niż hydroliza kolagenu rozpuszczalnego prowadzona przez 2 h ( $85,3 \text{ } \mu\text{g}$  Gly z wołowych ścięgien Achillesa i  $62,1 \text{ } \mu\text{g}$  Gly z kolagenu rozpuszczalnego). Wyraźniejsze efekty obserwowano w degradacji białek kolagenowych ścięgien, gdzie po 48 h hydrolizy poziom oznaczanej

hydroksyproliny (18,2 µg) przewyższał jej ilość mierzoną po 24 h hydrolizy kolagenu rozpuszczalnego (17,8 µg). W przypadku prowadzenia hydrolizy z zastosowaniem preparatu drożdżowego przyrosty wolnych grup aminowych i hydroksyproliny kształtowały się na znacznie wyższym poziomie. Proteoliza obu substratów po 24 h osiągnęła zbliżony poziom degradacji tych białek. W przypadku kolagenu rozpuszczalnego oznaczono bowiem 72,6 µg hydroksyproliny i 316,2 µg glicyny, natomiast w drugim porównywanym surowcu wartości te kształtowały się odpowiednio na poziomie 87,7 µg hydroksyproliny i 303,8 µg glicyny. Wyniki tych oznaczeń potwierdziły poprzednio zaobserwowane spostrzeżenia, że aktywność kolagenolityczna preparatu drożdżowego jest wyższa niż preparatu uzyskanego po hodowli grzybów *Beauveria bassiana*.

Tabela 2

Aktywność kolagenolityczna preparatów enzymatycznych.

The collagenolytic activity of enzymatic preparations.

| Substrat<br>Substrate                                       | Czas degradacji<br>Duration of degradation<br>[h] | Przyrosty wolnej hydroksyproliny<br>Increase of free hydroxyprolin<br>[µg Hyp/g substrate] |                           | Przyrosty wolnych grup aminowych<br>Increases in free amine groups<br>[µg Gly/g substrate] |                           |
|---|---|--|---------------------------|--|---------------------------|
|   |   | <i>Yarrowia lipolytica</i>   | <i>Beauveria bassiana</i> | <i>Yarrowia lipolytica</i>   | <i>Beauveria bassiana</i> |
| Kolagen rozpuszczalny<br>Soluble collagen                   | 2   | 26,8   | 11,2                      | 75,1   | 62,1                      |
|   | 5   | 52,5   | 13,4                      | 133,2  | 183,3                     |
|   | 24  | 72,6   | 17,8                      | 316,2  | 280,4                     |
| Wołowe ścięgna Achillesa<br>Achilles tendons of beef cattle | 24  | 87,7   | 6,0                       | 303,8  | 16,7                      |
|   | 48  | 137,7  | 18,2                      | 510,0  | 50,2                      |
|   | 72  | 254,7  | 27,6                      | 602,5  | 85,3                      |

W drugim etapie badań przeprowadzono hydrolizę enzymatyczną skór wieprzowych w temp. 20°C, w środowisku o pH = 3,5 i pH = 6,0. Po upływie 8, 24 i 48 h prowadzenia procesu określono stopień degradacji enzymatycznej surowca, oznaczając zawartość wolnej hydroksyproliny, azotu rozpuszczalnego i wolnych grup aminowych. Wyniki tych oznaczeń przedstawiono w tab. 3. i 4.

W wyniku degradacji skór wieprzowych, prowadzonej przy pH = 3,5 z wykorzystaniem enzymów z *Yarrowia lipolytica*, po 8 h trwania procesu hydroksyprolina była uwalniana na poziomie 27,5 µg Hyp/g substratu. Przedłużanie hydrolizy do 24 i 48 h powodowało znacznie mniejsze przyrosty oznaczanej Hyp w roztworze do wartości 30,1 i 32,8 µg Hyp/g substratu. Analiza statystyczna wyników dowiodła istotności różnic pomiędzy porównywanymi okresami badawczymi. Niższe

przyrosty wolnej hydroksyproliny odnotowano podczas hydrolizy prowadzonej w obecności preparatu enzymatycznego z grzybów *Beauveria bassiana*. Wielkości te zawierały się w granicach od 0,4 do 8,9  $\mu\text{g}$  Hyp z 1g substratu (tab. 4), niemniej wydłużanie czasu prowadzenia procesu powodowało istotny statystycznie przyrost ilości tego aminokwasu.

Tabela 3

Produkty degradacji enzymatycznej skór wieprzowych.  
Products of enzymatic degradation of pigskins.

| Parametr<br>Parameter                                     | Czas<br>Duration<br>[h] | Preparat enzymatyczny<br>Enzymatic preparation |          |                           |          |
|---|-------------------------|--|----------|---------------------------|----------|
|   |                         | <i>Yarrowia lipolytica</i>                     |          | <i>Beauveria bassiana</i> |          |
|   |                         | pH = 3,5                                       | pH = 6,0 | pH = 3,5                  | pH = 6,0 |
| Wolna hydroksyprolina<br>[ $\mu\text{g}$ Hyp/g substratu] | 0                       | 19,7   | 22,3     | 2,8                       | 5,5      |
| Free hydroxyprolin<br>[ $\mu\text{g}$ Hyp/g substrate]    | 8                       | 27,5   | 26,2     | 3,2                       | 7,9      |
|   | 24                      | 30,1   | 40,6     | 4,2                       | 9,6      |
|   | 48                      | 32,8   | 47,2     | 11,7                      | 23,2     |
| Wolne grupy aminowe<br>[ $\mu\text{g}$ Gly/g substratu]   | 0                       | 657,8  | 603,8    | 386,3                     | 303,8    |
| Free amine groups<br>[ $\mu\text{g}$ Gly/g substrate]     | 8                       | 1127,3   | 1402,5   | 441,8                     | 334,5    |
|   | 24                      | 2488,5   | 2104,5   | 538,5                     | 621,8    |
|   | 48                      | 2847,8   | 2300,3   | 590,3                     | 705,0    |
| Azot rozpuszczalny<br>[mg N/g substratu]                  | 0                       | 0,1  | 0,1      | 0,7                       | 2,2      |
| Soluble nitrogen<br>[mg N/g substrate]                    | 8                       | 2,3  | 0,2      | 3,9                       | 4,5      |
|   | 24                      | 3,9  | 2,7      | 4,5                       | 6,2      |
|   | 48                      | 5,4  | 3,1      | 4,7                       | 7,0      |

Podczas prowadzenia hydrolizy enzymatycznej doświadczalnego surowca przy pH = 6,0 preparatem z *Yarrowia lipolytica*, przyrost wolnej hydroksyproliny po 8 h był nieznaczny i wynosił tylko około 4  $\mu\text{g}$  Hyp z 1g substratu, natomiast dłuższy okres prowadzenia hydrolizy (48 h) przyczynił się do blisko dwukrotnego przyrostu uwalnianej hydroksyproliny w porównaniu ze środowiskiem o niższej kwasowości. W przypadku prowadzenia degradacji z wykorzystaniem preparatu z *Beauveria bassiana* ilość oznaczonej hydroksyproliny była niższa, a wartości przyrostu tego aminokwasu w środowisku o wyższym pH wskazują, że są to warunki efektywniejszej hydrolizy skór przez te enzymy. Tak więc aktywność kolagenolityczna obu preparatów enzymatycznych była wyższa w stosunku do kolagenu skór wieprzowych przy pH = 6,0, mimo że przy proponowanym niższym pH wydajność hydrolizy tego białka jest dodatkowo wspomagana przez środowisko prowadzenia procesu. Z literatury przedmiotu wiadomo, że stosowanie kwasów i buforów w zakresach pH od 3 do 3,5 pozwala na uzyskanie kolagenu rozpuszczalnego, gdyż następuje rozpuszczenie

młodego tropokolagenu oraz ulegają degradacji niektóre kowalencyjne wiązania sieciujące [8, 9, 16].

Analizując wyniki oznaczeń wolnych grup aminowych po procesie hydrolizy skór stwierdzono, że wydłużenie czasu trwania procesu istotnie wpłynęło na zwiększenie poziomu degradacji białek tego surowca. W przypadku zastosowania preparatu drożdżowego oznaczone ilości glicyny były ponad 10-krotnie wyższe przy pH = 3,5 niż przy degradacji skór preparatem grzybowym. Różnice te były mniej drastyczne (4-5-krotny wzrost zawartości oznaczanej glicyny) po hydrolizie skór w czasie 48 i 72 h, przy pH = 6,0. Porównując ilości oznaczanej glicyny w różnych okresach badawczych należy podkreślić, że najintensywniejsza degradacja białek następowała w pierwszych 24 h prowadzenia procesu w obu zakresach pH. Wydłużanie czasu trwania hydrolizy o następne 24 h przyniosło również istotną zmianę w wartościach oznaczanego parametru, ale charakteryzowała się ona mniejszą intensywnością.

Tabela 4

Przyrosty produktów degradacji enzymatycznej skór wieprzowych.  
Increases in products of enzymatic degradation of pigskins.

| pH  | Czas<br>Duration<br>[h] | Wolna hydroksyprolina<br>[µg Hyp/g substratu]<br>Free hydroxyprolin<br>[µg Hyp/g substrate] |                               | Wolne grupy aminowe<br>[µg Gly/g substratu]<br>Free amine groups<br>[µg Gly/g substrate] |                               | Azot rozpuszczalny<br>[mg N/g substratu]<br>Soluble nitrogen<br>[mg N/g substrate] |                               |
|-----|-------------------------|---|-------------------------------|--|-------------------------------|--|-------------------------------|
|     |                         | <i>Yarrowia<br/>lipolytica</i>  | <i>Beauveria<br/>bassiana</i> | <i>Yarrowia<br/>lipolytica</i>   | <i>Beauveria<br/>bassiana</i> | <i>Yarrowia<br/>lipolytica</i>   | <i>Beauveria<br/>bassiana</i> |
| 3,5 | 0                       | 0,0 <sup>a*)</sup>  | 0,0 <sup>a</sup>              | 0,0 <sup>a</sup>   | 0,0 <sup>a</sup>              | 0,0 <sup>a</sup>   | 0,0 <sup>a</sup>              |
|     | 8                       | 7,8 <sup>bc</sup>   | 0,4 <sup>a</sup>              | 469,5 <sup>b</sup>   | 55,5 <sup>c</sup>             | 2,2 <sup>c</sup>   | 3,2 <sup>c</sup>              |
|     | 24                      | 10,4 <sup>c</sup>   | 1,4 <sup>b</sup>              | 1830,8 <sup>de</sup>   | 152,2 <sup>d</sup>            | 3,8 <sup>e</sup>   | 3,8 <sup>d</sup>              |
|     | 48                      | 13,1 <sup>cd</sup>  | 8,9 <sup>e</sup>              | 2190,0 <sup>e</sup>  | 204,0 <sup>e</sup>            | 5,3 <sup>e</sup>   | 4,0 <sup>de</sup>             |
| 6,0 | 0                       | 0,0 <sup>a</sup>  | 0,0 <sup>a</sup>              | 0,0 <sup>a</sup>   | 0,0 <sup>a</sup>              | 0,0 <sup>a</sup>   | 0,0 <sup>a</sup>              |
|     | 8                       | 3,9 <sup>b</sup>  | 2,4 <sup>c</sup>              | 798,7 <sup>c</sup>   | 30,7 <sup>b</sup>             | 0,1 <sup>b</sup>   | 2,3 <sup>b</sup>              |
|     | 24                      | 18,3 <sup>e</sup>   | 4,1 <sup>d</sup>              | 1500,8 <sup>d</sup>  | 318,0 <sup>f</sup>            | 2,6 <sup>d</sup>   | 4,0 <sup>de</sup>             |
|     | 48                      | 24,9 <sup>e</sup>   | 17,7 <sup>f</sup>             | 1696,5 <sup>d</sup>  | 401,2 <sup>e</sup>            | 3,0 <sup>f</sup>   | 4,8 <sup>f</sup>              |

Wartości średnie w tej samej kolumnie oznaczone jednakowymi literami oznaczają brak różnic statystycznych przy poziomie ufności  $\alpha \leq 0,05$ .

The mean values in the same and designated by the same letters indicate no statistically significant differences at a trust level of  $\alpha \leq 0,05$

Oceniając stopień hydrolizy białek surowca na podstawie przyrostów azotu rozpuszczalnego w roztworach należy podkreślić znacznie wyższą efektywność hydrolityczną preparatu enzymów pochodzenia grzybowego w stosunku do preparatu drożdżowego. Przy zastosowaniu pierwszego z omawianych preparatów przyrosty azotu rozpuszczalnego zawierały się w granicach od 3,37 mg N do 4,04 mg N z 1 g



substratu przy pH = 3,5 i nieznacznie więcej (do 4,8 mg N/g substratu) przy pH = 6,0. W przypadku tego parametru różnice w efektywności preparatu z grzybów *Beauveria bassiana* były mniej istotne przy zróżnicowaniu warunków środowiskowych. Preparat pochodzenia drożdżowego wykazywał natomiast większą zdolność hydrolityczną białek skór przy pH = 3,5, szczególnie przy wydłużeniu czasu działania do co najmniej 24 h, jakkolwiek na efektywność degradacji białek doświadczalnego surowca może również wpływać zastosowany w doświadczeniu bufor [18]. Mniejsza kwasowość środowiska istotnie obniżyła aktywność tych enzymów. Analiza statystyczna wyników wskazuje na istotność różnic w wartościach tego wyróżnika we wszystkich okresach badawczych przy obu testowanych preparatach w każdym zakresie pH ich działania.

### Wnioski

1. Preparaty enzymatyczne z drożdży *Yarrowia lipolytica* oraz z grzybów *Beauveria bassiana* charakteryzowały się odmiennymi właściwościami hydrolitycznymi. Optymalną kwasowością środowiska działania preparatu enzymatycznego z *Beauveria bassiana* jest wartość pH = 6,0, a w przypadku preparatu z *Yarrowia lipolytica* pH = 3,5.
2. Spośród testowanych substratów, w przypadku obu ocenianych preparatów enzymatycznych, hemoglobina była najbardziej dostępnym białkiem, a żelatyna najbardziej opornym.
3. Aktywność kolagenolityczna preparatu drożdżowego jest wyższa niż preparatu pochodzenia grzybowego.
4. W stosunku do kolagenu skór wieprzowych aktywność obu preparatów enzymatycznych jest wyższa przy pH = 6,0.
5. Enzymy z *Yarrowia lipolytica* efektywniej degradowały białka skór wieprzowych, przy czym optymalnym pH ich działania było pH = 3,5.
6. Preparat enzymatyczny z *Beauveria bassiana* wykazuje wyższe zdolności proteolityczne w stosunku do białek skór w środowisku o pH = 6,0.

*Praca wykonana w ramach grantu KBN 5 P06G 028 19*

### Literatura

- [1] A.O.A.C.: Official Methods of Analysis, 15<sup>th</sup> Edition: 1<sup>st</sup> Supplement, Hydroxyproline in Meat and Meat Products, 1990, 36-37.
- [2] Bichodka M.J., Khachatourians G.G.: Purification and properties of an extracellular proteinase produced by entomopathogenic fungi. Appl. Environ. Microbiol., 1987, 7, 1679-1684.
- [3] Chrzanowska J., Kołaczowska M.: Production of extracellular proteolytic enzymes by *Beauveria bassiana*. Acta Mycol., 1998, 33 (2), 277-285.

- [4] Chrzanowska J., Polanowski A.: Enzymy proteolityczne grzybów rodzaju *Penicillium*. Postępy Mikrobiologii, 1990, **1/2**, 3-15.
- [5] Frokjaer S.: Use of hydrolysates for protein supplementation. Food Technol., 1994, **10**, 86-88.
- [6] Gdula A., Skiba A., Chrzanowska J., Wojtatowicz M.: *Yarrowia lipolytica* – jej aktywność hydrolityczna i potencjalny udział w procesie dojrzewania serów. Mat. XXIX Sesji Nauk. KTiChŻ PAN, Olsztyn 1998, s. 207.
- [7] Kalinowska H., Bielecki S., Turkiewicz M.: Enzymy nowej generacji w produkcji żywności. Cz. I. Przem Spoż. 2000, **10**, 3-5.
- [8] Kijowski J.: Muscle proteins. In: Chemical and functional properties of food proteins. Ed. Z.E. Sikorski, Technomic Publishing Co. Inc. Lancaster, 2001, pp. 233-269.
- [9] Krasnowska G.: Kolagen – właściwości i znaczenie technologiczne. Zesz. Nauk. AR we Wrocławiu, 1998, **328**, 137-147.
- [10] Kuchroo C.V., Ramilly I.P., Fox P.F.: Assessment of proteolysis in cheese by reaction with trinitrobenzoesulphonic acid. J. Food Technol., 1983, **7**, 129-133.
- [11] Leger R.J., Cooper R.M., Charnley A.K.: Cuticle-degradation enzymes of entomo-pathogenic fungi. Cuticle degradation in vitro by enzymes from entomopathogen. J. Invertebr. Pathol., 1986, **47**, 167-177.
- [12] Mejbaum-Katzenellenbogen W., Mochnacka I.: Kurs praktyczny biochemii. PWN, Warszawa 1968.
- [13] Morihara K., Tsuzuki H.: Elastolytic properties of various proteinases of microbial origin. Arch. Biochem. Biophys., 1967, **120**, 68-78.
- [14] Powell T.H., Hunt M.C., Dickeman M.E.: Enzymatic assay to determine collagen thermal denaturation and solubilization. Meat Sci., 2000, **54**, 307-311.
- [15] Rodziewicz A., Sobieszcański J.: Pozakomórkowe proteiny drobnoustrojów. Postępy Mikrobiologii, 1998, **1/2**, 55-73.
- [16] Sadowska M., Kotłowski R.: Fizykochemiczne właściwości kolagenu ryb, świń i bydła. W: Żelatyna. Właściwości, technologia, użytkowanie. Polska Izba Dodatków do Żywności, Konin 1999, 13-25.
- [17] Sawicka – Żukowska R.: Zastosowanie preparatów enzymatycznych w przemyśle rolnospożywczym. Przem. Spoż., 1998, **3**, 19-22.
- [18] Sikorski Z.E.: Charakterystyka białek głównych surowców żywnościowych. W: Chemia żywności, pod red. Z.E. Sikorskiego. WNT, Warszawa 2002, s. 304-333.
- [19] Snyder S. L., Sobociński P.Z.: An improved 2,4,6-trinitrobenzoesulphonic acid method for determination of amines. Anal. Biochem., 1975, **64**, 285-288.
- [20] Wojtatowicz M., Chrzanowska J., Juszczyk P., Skiba A., Gdula A.: Identification and biochemical characteristic of yeast microflora of Rocpol cheese, J. Food Microbiol., 2001, **69**, 135-140.

#### AN ATTEMPT TO USE ENZYMES OF MICROBIOLOGICAL ORIGIN FOR THE DEGRADATION OF ANIMAL PRODUCTS RICH IN CONNECTIVE TISSUE

##### S u m m a r y

The objective of the investigation was to compare the proteolytic activity of enzymatic preparations obtained from the post-culture fluids of yeast *Yarrowia lipolytica* strain A101, fungi *Beauveria bassiana* 278, and to assess their usefulness for the degradation of pigskins. The proteolytic activity of some enzymatic preparations towards casein, gelatin, and hemoglobin was investigated. Moreover, the assessment of collagenolytic features of the preparations towards soluble collagen and Achilles tendons of

beef cattle was performed. The collagenolytic activity was assessed on the basis of the dynamics of realizing free amine groups and hydroxyproline from the substrates. Next, the hydrolysis of pigskins using experimental enzymatic preparations was conducted in the media of pH = 3.5 and pH = 6.0, at 20°C. Basing on the investigation results, it was stated that the preparation obtained from *Beauveria bassiana* 278 was characterized by the highest proteolytic activity at pH=6.0, whereas the activity of the preparation obtained from *Yarrowia lipolytica* was the highest at pH=3.5. The activity of both enzymatic preparations towards collagen from beef cattle skins was higher at pH=6.0. However, the collagenolytic activity of the preparation obtained from *Yarrowia lipolytica* was higher than the latter one. The proteins from pigskins degraded the enzymes of *Yarrowia lipolytica* more efficiently and the optimum pH was 3.5.

**Key words:** proteolytic enzymes, collagenolytic activity, enzymatic hydrolysis, pigskins. ☒