

ADRIAN CZERNIAK, TOMASZ JANKOWSKI

## MIKROKAPSULKOWANIE $\alpha$ -TOKOFEROLU WEWNĄTRZ KOMÓREK DROŻDŻY *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

### Streszczenie

W pracy oceniono przydatność drożdży *Saccharomyces cerevisiae* jako naturalnego materiału nośnikowego w procesie mikrokapsulkowania witaminy E oraz ustalono optymalne warunki tego procesu.

Witaminę E, w formie DL- $\alpha$ -tokoferolu, mieszano z porcją drożdży oraz wodnym roztworem alkoholu etylowego i inkubowano przez 48 h w temperaturze od 25 do 55 °C. Przy użyciu metody płaszczyzny odpowiedzi (RSM) oceniono wpływ temperatury ( $X_1$ ), stężenia etanolu ( $X_2$ ) oraz stosunku drożdży do witaminy ( $X_3$ ) na końcową zawartość witaminy E w komórkach drożdżowych (wydajność procesu).

Stwierdzono, że w badanym zakresie, wydajność procesu jest nieliniową funkcją stężenia etanolu. Po przekroczeniu określonej wartości stężenia wydajność malała. Zaobserwowano również liniowy, ujemny wpływ stosunku masowego drożdży do witaminy na ten proces. W badanym zakresie temperatura wywierała niewielki, dodatni wpływ na wydajność procesu. Po zastosowaniu optymalnych warunków mikrokapsulkowania witaminy E w komórkach drożdży (temperatura 25 - 55 °C, stężenie etanolu – 54,3 % i stosunek drożdży do witaminy równy 1) uzyskano wydajność procesu na poziomie 36,1 %.

**Słowa kluczowe:** przeciwutleniacze, witamina E, *Saccharomyces cerevisiae*, mikrokapsulkowanie witamin, metoda płaszczyzny odpowiedzi (RSM)

### Wprowadzenie

Przeciwutleniacze są związkami o zdolności do wiązania wolnych rodników. Dzięki tej właściwości są w stanie chronić wrażliwe składniki komórek (kwasy nukleinowe, białka, fosfolipidy błonowe) przed degradacją na drodze utleniania, a tym samym zapobiegać uszkodzeniom tkanek pod wpływem zwiększonej aktywności wolnych rodników. Prowadzi to do obniżenia ryzyka wystąpienia niektórych schorzeń, takich jak: choroby układu sercowo-naczyniowego, choroby układu nerwowego i nowotwory [9, 12]. Jednym z najczęściej występujących naturalnie przeciwutleniaczy jest witamina E, będąca grupą związków chemicznych o zbliżonej budowie i aktywności.

---

Mgr inż. A. Czerniak, prof. dr hab. T. Jankowski, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Wydz. Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, ul. Wojska Polskiego 48, 60-637 Poznań

Wśród nich największą aktywność przeciwutleniającą wykazuje  $\alpha$ -tokoferol ( $\alpha$ TP), stosowany powszechnie do produkcji żywności, m.in. jako dodatek do margaryn i olejów, smalcu, pieczywa cukierniczego oraz odwodnionego tłuszczu mlecznego. Powszechnie występuje także jako jeden ze składników suplementów diety [18]. Ze względu na ograniczoną trwałość w warunkach dostępności tlenu i światła, a także uleganie szybkiej degradacji pod wpływem wysokiej temperatury, zastosowanie  $\alpha$ TP jest w wielu procesach technologicznych mocno utrudnione [3]. Dodatkowo, lipidowy charakter witaminy E wymusza konieczność stosowania emulgatorów, natomiast ciętkła jej postać ogranicza użycie w produktach suchych i sproszkowanych [25].

Zwiększenie stabilności wrażliwych dodatków do żywności, takich jak aromaty czy witaminy uzyskuje się zwykle poprzez zastosowanie metod mikrokapsułkowania, polegających na wytworzeniu wokół substancji otoczki o specyficznych właściwościach [13]. W literaturze opisano wiele metod mikrokapsułkowania używanych w procesie ochrony i zwiększania dostępności  $\alpha$ TP. Najczęściej stosowanymi technikami są: suszenie rozpyłowe, zestalanie rozpyłowe, ekstruzja w biomateriałach, prosta i złożona koacerwacja oraz suszenie sublimacyjne. W charakterze materiałów otoczujących wykorzystywane są przede wszystkim naturalne polimery, tłuszcze, woski i białka [11, 20]. W nowszych metodach wykorzystuje się kapsułki alginianowe [27], otoczki białkowe uzyskane techniką wymuszonego żelowania [23], żele pektynowe [24], nanocząsteczki uzyskane z polimeru  $\epsilon$ -kapolaktonu [4] oraz kompleksy białko-chitozanowe [15].

Alternatywę dla wymienionych metod może stanowić użycie struktur komórkowych jako naturalnego nośnika w procesie mikrokapsułkowania. Najczęściej wymienia się drożdże z gatunku *Saccharomyces cerevisiae* (drożdże piekarskie), stanowiące tani i ogólnodostępny produkt [1, 16]. Głównymi zaletami biomasy drożdżowej, w porównaniu z materiałami tradycyjnymi, jest pełna biokompatybilność z produktem oraz nietoksyczność, pozwalająca na niemal nieograniczone stosowanie w produkcji żywności. Dodatkowo, drożdże odznaczają się niewielkimi wymiarami oraz dużą odpornością na działanie czynników zewnętrznych (wysoka temperatura, siły ścinające). Istnieje również możliwość wykorzystania w procesie drożdży odpadowych, powstających w dużych ilościach w takich gałęziach przemysłu spożywczego, jak browarnictwo czy gorzelnictwo.

Proces mikrokapsułkowania w komórkach drożdżowych prowadzi się zwykle poprzez zmieszanie wodnej emulsji substancji kapsułkowanej z porcją biomasy i inkubację w określonej temperaturze przez kilka do kilkudziesięciu godzin, po którym biomasa jest oddzielana, płukana i suszona. Ze względu na pasywny, dyfuzyjny charakter, proces ten nie wymaga stosowania skomplikowanej i drogiej aparatury, co znacząco wpływa na obniżenie kosztów. Do tej pory z powodzeniem wykorzystano tę metodę do

mikrokapsułkowania barwników [1], aromatów [16, 26], przeciwutleniaczy [17, 21, 22] oraz składników preparatów farmaceutycznych [19].

Celem badań była ocena przydatności drożdży z gatunku *Saccharomyces cerevisiae* jako naturalnego nośnika w procesie mikrokapsułkowania witaminy E oraz optymalizacja tego procesu. Testowanymi czynnikami była temperatura inkubacji oraz stężenie etanolu i stosunek suchej masy drożdży do witaminy w mieszaninie kapsułkującej.

### **Material i metody badań**

#### *Witamina E*

Substancję o aktywności witaminy E stanowił syntetyczny DL- $\alpha$ -tokoferol o 97-procentowej czystości (Sigma-Aldrich, Polska).

#### *Drożdże*

W badaniach wykorzystano komercyjnie dostępne drożdże piekarskie (Lesaffre Polska). Przed procesem drożdże zostały poddane płukaniu w celu usunięcia pozostałości pożywki oraz fragmentów komórek. W tym celu porcję ok. 500 g drożdży zawieszano w 0,5 M buforze fosforanowym (pH 6,8) i oddzielano przez wirowanie ( $3950 \times g$ , 10 min). Procedurę płukania powtarzano trzykrotnie. Uzyskaną pastę drożdżową poddawano następnie liofilizacji przez 48 h.

#### *Mikrokapsułkowanie witaminy E*

Proces mikrokapsułkowania wykonywano w zamkniętych szklanych wialach z ciemnego szkła o poj. 40 ml przy użyciu termostatowanego bloku aluminiowego, umieszczonego na mieszadle magnetycznym (IKA, Niemcy). Odpowiednią porcję drożdży zawieszano w 15 ml wody destylowanej i dodawano 200 mg  $\alpha$ TP rozpuszczonego w takiej ilości etanolu, by jego końcowe stężenie w mieszaninie było zgodne z przyjętym planem doświadczenia (tab. 2). Zawartość wial inkubowano przez 48 h w temp. 25 - 55 °C, przy mieszaniu na poziomie 150 obr.  $\cdot$  min<sup>-1</sup>. Po zakończeniu inkubacji zawiesinę wirowano ( $3950 \times g$ , 15 min), po czym pozostały osad komórek zawieszano w wodzie destylowanej i ponownie wirowano w celu usunięcia pozostałości niezakapsułkowanej witaminy. Procedurę powtarzano trzykrotnie, po czym biomasę drożdżową poddawano suszeniu sublimacyjnemu przez 24 h.

#### *Oznaczenie wydajności mikrokapsułkowania witaminy E*

Zawartość witaminy E w komórkach określano metodą ekstrakcji i analizy chromatograficznej [6]. W tym celu naważkę suchych mikrokapsulek (10 mg) zawieszano w 0,5 ml wody destylowanej i ekstrahowano porcją bezwodnego alkoholu etylowego. Dla polepszenia ekstrakcji próby poddano sonikacji przez 20 min. W celu określenia

strat podczas ekstrakcji dodawano znaną ilość standardu wewnętrznego w postaci octanu DL- $\alpha$ - tokoferolu. Uzyskany ekstrakt filtrowano przez filtr strzykawkowy (0,45  $\mu\text{m}$ ), po czym mierzono zawartość DL- $\alpha$ - tokoferolu w filtracji metodą szybkiej chromatografii cieczowej (RRLC) w chromatografii Infinite 1200 (Agilent Technologies, USA), wyposażonym w kolumnę XDB-C18, z detekcją sygnału przy długości fali  $\lambda = 280 \text{ nm}$ . Jako eluent stosowano 97-procentowy metanol w przepływie  $2 \text{ ml /min}^{-1}$ . Identyfikacji jakościowej i ilościowej dokonywano metodą kalibracji zewnętrznej, z wykorzystaniem wzorca o znanym stężeniu.

Wydajność procesu (ang. *Encapsulation yield*, EY) wyrażano procentową zawartością witaminy E w komórkach drożdży piekarskich i obliczano z równania:

$$EY [\% \text{ wag.}] = \frac{C_e}{m_k \times D_k} \times 100$$

$C_e$  – zawartość witaminy E w ekstrakcie [mg],

$m_k$  – masa próby [mg],

$D_k$  – sucha masa kapsułek [% (m/m)].

#### *Plan doświadczenia optymalizacyjnego*

Optymalizację procesu mikrokapsułkowania przeprowadzano metodą płaszczyzny odpowiedzi (ang. *Response surface methodology*, RSM), przy uwzględnieniu metody centralnego planu kompozycyjnego. W badaniach oceniano wpływ: temperatury inkubacji w zakresie 25 – 55 °C ( $X_1$ ), stężenia etanolu w zakresie 50 – 85 % (obj.) ( $X_2$ ) oraz stosunku masowego drożdży do witaminy w zakresie 1 – 2,5 ( $X_3$ ) na końcową zawartość witaminy E w komórkach drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Poszczególne poziomy badanych czynników zakodowano dla ułatwienia późniejszej analizy wariancji (tab. 1). Dla analizowanej zmiennej zależnej wyznaczono metodą regresji krokowej wstecznej równanie wielomianu o ogólnej postaci:

$$Y = b_0 + b_1 X_1 + \dots + b_k X_k + b_{12} X_1 X_2 + \dots + b_{1-k,k} X_{k-1} X_k + b_{11} X_1^2 + \dots + b_{kk} X_k^2$$

gdzie: Y to zmienna zależna, natomiast  $b_0$ ,  $b_k$ ,  $b_{k-1,k}$  i  $b_{kk}$  to odpowiednio współczynniki określające wyraz wolny, efekty główne, ich interakcję oraz wyrazy kwadratowe. W trakcie opracowywania modelu regresji, wartości zmiennej zależnej poddano transformacji zgodnie z równaniem:

$$y' = \sqrt{y + k},$$

gdzie:  $y'$  to zmienna transformowana, natomiast  $y$  to zmienna zależna w postaci pierwotnej (EY),  $k$  to stała równa 0,4. Typ transformacji ustalono na podstawie wyników testu Box-Cox, stanowiącego narzędzie wspomagające procedury wyboru formy funkcyjnej modeli regresji w przypadku wykrycia nieprawidłowości związanych z występowaniem korelacji pomiędzy średnią a wariancją [2]. Poprawność dopasowania mo-

delu matematycznego opisującego zależności między zmiennymi oraz ich wpływ na wartość EY oceniano na podstawie testu braku dopasowania (ang. *Lack of fit*) oraz skorygowanego współczynnika determinacji  $R^2$ . We wszystkich analizach przyjęto poziom istotności  $p = 0,05$ . Analizę statystyczną wykonano w programie Statistica 6.0 PL.

#### *Uwalnianie witaminy E z mikrokapsulek w sztucznych płynach trawiennych*

Doświadczenie dotyczące uwalniania witaminy E w sztucznych płynach trawiennych przeprowadzono z mikrokapsułkami wykonanymi w optymalnych warunkach procesu. Do wytworzenia symulującego płynu żołądkowego (ang. *Simulated gastric fluid*, SGF) użyto 0,05 M HCl (pH 1,2) zawierającego (m/m): 0,2 % NaCl, 0,5 % Tweenu 80 oraz 0,1 % pepsyny. Tween 80 dodano w celu zwiększenia dyspersyjności uwolnionej witaminy E. Jako sztuczny płyn jelitowy (ang. *Simulated intestinal fluid*, SIF) zastosowano 0,05 M PBS (pH 7,4) zawierający (m/m): 0,5 % Tweenu 80 i 1 % trypsyny [27]. Próbkę kontrolną stanowiła woda destylowana zawierająca 0,5 % Tweenu 80. Porcję 150 mg mikrokapsulek o znanej zawartości witaminy E zawieszono w 25 ml SGF, SIF lub próby kontrolnej i inkubowano przez minimum 8 h w temp. 37 °C, przy ciągłym mieszaniu 120 obr·min<sup>-1</sup>. Próbkę (20  $\mu$ l) pobierano co 30 min i zastępowano świeżą porcją cieczy, po czym ekstrahowano 1 ml dichlorometanu. Po odparowaniu rozpuszczalnika w strumieniu azotu i rozpuszczeniu pozostałości w metanolu oznaczano zawartość DL- $\alpha$ -tokoferolu metodą chromatograficzną.

Wynik wyrażano procentowo, jako stosunek ilości witaminy E uwolnionej do roztworu do początkowej ilości witaminy, wprowadzonej w formie mikrokapsulek. Doświadczenie wykonano w trzech powtórzeniach ( $n = 3$ ).

Tabela 1

Wartości kodowe zmiennych niezależnych użytych w doświadczeniu optymalizacyjnym.  
Coded levels for independent variables used in optimisation experiment.

Zmienna / Variable	Kod, $X_i$ Code, $X_i$	Wartość kodowa / Coded level				
		-2	-1	0	1	2
Temperatura [°C] Temperature [°C]	$X_1$	15	25	40	55	65
Stężenie etanolu [% obj.] Ethanol concentration [% vol.]	$X_2$	38	50	67,5	85	97
Stosunek drożdży do $\alpha$ TP Yeast to $\alpha$ TP ratio	$X_3$	0,5	1	1,75	2,5	3

## Wyniki i dyskusja

### Optymalizacja procesu mikrokapsułkowania

W pierwszych etapie badań przeprowadzono ocenę wpływu wybranych czynników (zmiennych wejściowych) na końcową wydajność procesu (EY), wyrażoną jako procent masowy  $\alpha$ TP w suchej masie mikrokapsulek. Schemat wykonanego doświadczenia oraz uzyskane wyniki w postaci średniej z trzech powtórzeń przedstawiono w tab. 2.

Tabela 2

Plan doświadczenia optymalizacyjnego z uwzględnieniem wybranych zakresów: temperatury ( $X_1$ ), stężenia etanolu ( $X_2$ ) i stosunku masowego drożdży do  $\alpha$ TP ( $X_3$ ) oraz uzyskane wartości wydajności procesu mikrokapsułkowania witaminy E (EY).

Optimisation experiment plan including selected ranges of: temperature ( $X_1$ ), ethanol concentration ( $X_2$ ), and yeast to  $\alpha$ TP mass ratio, and vitamin E microencapsulation yield (EY) values obtained.

Lp. No.	Temperatura Temperature [°C]	Stężenie etanolu Ethanol concentration [% obj. / vol.]	Stosunek drożdży do $\alpha$ TP Yeast to $\alpha$ TP Ratio	Wydajność <sup>a</sup> Encaps. yield <sup>a</sup> [% (m/m / w/w)]
1	25	50,0	2,5	28,3
2	25	85,0	2,5	0,0
3	40	67,5	0,5	31,2
4	55	50,0	2,5	30,1
5	40	67,5	1,75	24,9
6	40	97,0	1,75	0,0
7	25	50,0	1	35,3
8	40	38,0	1,75	20,6
9	25	85,0	1	1,1
10	40	67,5	1,75	25,1
11	55	85,0	2,5	0,0
12	40	67,5	1,75	25,8
13	55	50,0	1	43,0
14	40	67,5	1,75	28,3
15	65	67,5	1,75	24,4
16	15	67,5	1,75	22,3
17	40	67,5	1,75	25,0
18	40	67,5	3	19,5
19	55	85,0	1	0,1
20	40	67,5	1,75	24,7

<sup>a</sup> – wartość średnia z 3 powtórzeń / mean value from 3 runs

Wybrany model matematyczny (tab. 3) o postaci wielomianu drugiego stopnia, zastosowany do opisu uzyskanych wyników, był istotny na poziomie  $p < 0,0001$ . Charakteryzował się dobrym dopasowaniem, na co wskazuje wartość skorygowanego współczynnika determinacji  $R^2 = 0,98$ . Na podstawie wyniku testu braku dopasowania równego (0,0909) można stwierdzić, że dla badanych przedziałów zmiennych wejściowych wybrany model może być wykorzystany do przewidywania zawartości witaminy E w komórkach. Analiza statystyczna wykazała, że spośród ocenianych zmiennych wejściowych istotny wpływ na końcową zawartość witaminy E w mikrokapsułkach miało stężenie etanolu ( $X_2$ ,  $p < 0,0001$ ) oraz stosunek masowy drożdży do  $\alpha$ TP ( $X_3$ ,  $p < 0,0001$ ), natomiast temperatura inkubacji w badanym zakresie wywierała niewielki (statystycznie nieistotny), dodatni efekt ( $X_1$ ,  $p = 0,4174$ ). Wielkość wpływu poszczególnych czynników na wartość EY oceniono na podstawie wykresu PARETO efektów (rys. 1). Wyznaczone równanie regresji w postaci wielomianu kwadratowego dla wartości EY miało następującą postać:

$$y' = 0,048X_1 - 2,53X_2 - 0,31X_3 - 1,68X_2^2 + 5,04.$$

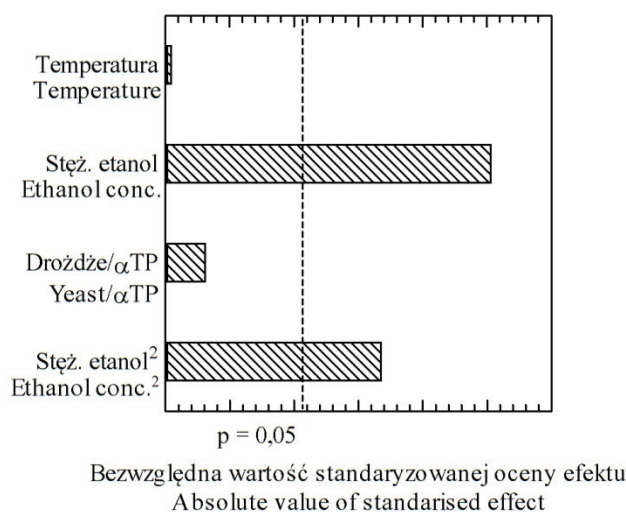
Tabela 3

Wyniki analizy wariancji zredukowanego modelu w postaci wielomianu kwadratowego.  
Results of reduced model analysis of variance in the form of quadratic polynomial.

Źródło Source	Suma kwadratów Sum of squares	Stopnie swobody Degree of freedom	Średni kwadrat Mean square	Wartość F F value	Prawdopodobieństwo Probability
Model	65,33	4	16,33	365,26	< 0,0001
Temp., $X_1$	0,031	1	0,031	0,70	0,4174
Stęż. etanol, $X_2$	59,11	1	59,11	1321,85	< 0,0001
Drożdże/ $\alpha$ TP, $X_3$	1,33	1	1,33	29,83	< 0,0001
Stęż. etanol <sup>2</sup> , $X_2^2$	23,98	1	23,98	536,39	< 0,0001
Reszty Residues	0,63	14	0,045	-	-
Brak dopasowania Lack of fit	0,54	9	0,06	3,49	0,0909
Błąd czysty Pure error	0,086	5	0,017	-	-

W przeprowadzonym doświadczeniu wydajność mikrokapsułkowania witaminy E w komórkach drożdży piekarskich była bardzo zróżnicowana i wahała się od 0 do 42,99 % (m/m). Spośród analizowanych zmiennych wejściowych największy wpływ na wydajność miało końcowe stężenie etanolu w mieszaninie kapsułkującej, natomiast

stosunek masowy drożdży do witaminy wpływał na tę wartość w nieznacznym stopniu (rys. 2). Zaobserwowano, że w mieszaninie kapsułkującej zawierającej powyżej 85 % (obj.) etanolu proces mikrokapsułkowania praktycznie nie zachodził, gdyż końcowa wydajność wynosiła poniżej 0,1 % (m/m). Zmniejszanie zawartości etanolu w mieszaninie powodowało wzrost końcowej zawartości witaminy E w komórkach, przy czym największą wartość stwierdzono w wariantach zawierających ok. 55 % (obj.) etanolu. Po przekroczeniu tej ilości obserwowano zmniejszanie wydajności procesu.



Rys. 1. Wykres PARETO efektów dla analizowanych czynników.

Fig. 1. PARETO chart of effects for factors analysed.

Wcześniejsze badania wykazały, że obecność rozpuszczalnika organicznego, takiego jak np. etanol, jest niezbędne do uzyskania statystycznie istotnych zawartości witaminy E w komórkach. Stwierdzono, że w układach niezawierających rozpuszczalnika ilość związanej witaminy nie przekraczała 1 - 2 % (m/m) [7]. Zjawisko to można tłumaczyć koniecznością zwiększenia rozpuszczalności hydrofobowego DL- $\alpha$ -tokoferolu w ścianie komórki drożdżowej, która jest głównym składnikiem tej komórki decydującym o wnikiwaniu związków do jej wnętrza [28]. Prosty model mikrokapsułkowania związków hydrofobowych wewnątrz komórek *Saccharomyces cerevisiae* został zaproponowany przez Ciamponi i wsp. [5], którzy określili ścianę komórki jako hydrofilową, selektywną membranę. Przedstawiony w wymienionej pracy model dyfuzji Ficka wskazuje, że im substancja lepiej rozpuszcza się w ścianie komórki drożdżowej, tym wydajniejszy jest proces mikrokapsułkowania. Niewielkie związki o małej masie cząsteczkowej, takie jak terpeny i węglowodory niskocząsteczkowe, mogą dość swobodnie przenikać do wnętrza komórki [26]. Ze względu na dość dużą masę cząstecz-



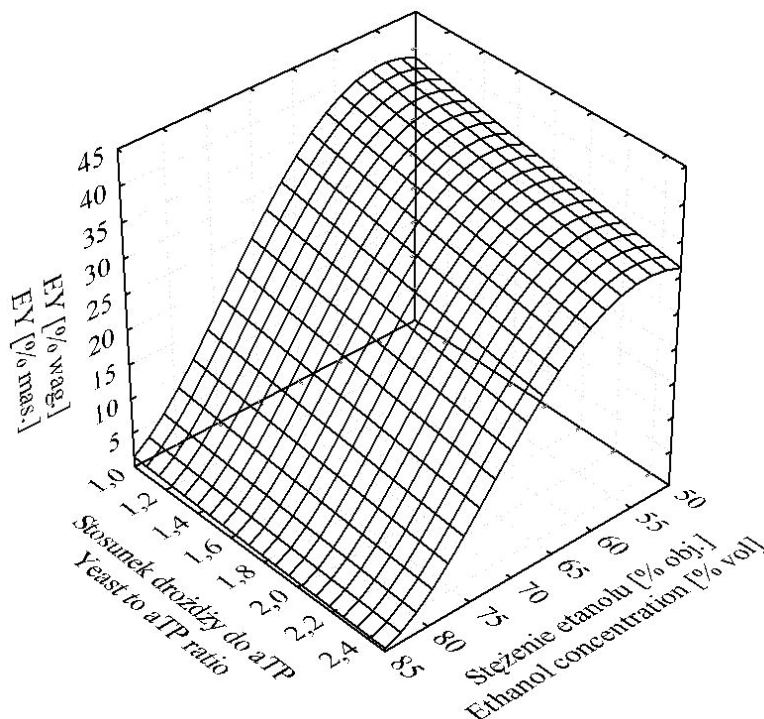
kową ( $430,7 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) oraz obecność w cząsteczce silnie hydrofobowego łańcucha bocznego, DL- $\alpha$ -tokoferol praktycznie nie dyfunduje w sposób bierny przez ścianę komórkową. Podobne wyniki uzyskali Kilcher i wsp. [14] w badaniach nad wnikaniem syntetycznych oligomerów do wnętrza komórki drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Oligomery te różniły się między sobą tylko liczbą jednostek monomeru, a tym samym masą cząsteczkową. Związki o dużej masie nie były w stanie przenikać do wnętrza, w przeciwieństwie do zbudowanych z niewielkiej liczby podjednostek. Wyznaczona dla danego oligomeru granica masy cząsteczkowej może być modyfikowana poprzez zmianę polarności środowiska. Zastosowany w wymienionej pracy sulfotlenek dimetylu (DMSO) znacząco zwiększał rozpuszczalność wysokocząsteczkowych oligomerów w ścianie komórki *Saccharomyces cerevisiae*, a tym samym ich zawartość w komórkach. Użyty w niniejszych badaniach optymalizacyjnych etanol powodował zwiększenie rozpuszczalności DL- $\alpha$ -tokoferolu w ścianie komórkowej, co zwiększyło jego końcową zawartość w mikrokapsułkach. Zaobserwowano, że w badanych układach wydajność była nieliniową funkcją stężenia etanolu. Po przekroczeniu pewnego stężenia etanolu, wielkość EY malała (rys. 2). Za efekt ten odpowiada prawdopodobnie degradujący wpływ etanolu na struktury komórki drożdżowej, takie jak błony cytoplazmatyczne, będące przypuszczalnie głównym miejscem wiązania i stabilizacji kapsułkowanego DL- $\alpha$ -tokoferolu [10].

Analiza zmian wydajności procesu mikrokapsułkowania witaminy E w zależności od stosunku masowego drożdży do witaminy ( $X_3$ ) wykazała, że w badanym zakresie zmiennej wraz z jej wzrostem dochodziło do obniżenia EY, z wartości 28,2, w przypadku stosunku równego 1, do 21,9 w odniesieniu do stosunku równego 2,5 ( $X_1 = 40$ ,  $X_2 = 67,5$ ). Efekt ten przypuszczalnie można tłumaczyć ustaleniem się specyficznego stanu równowagi pomiędzy biomasą drożdżową, a DL- $\alpha$ -tokoferolem. W stanie równowagi dana ilość biomasy w określonych warunkach temperatury i stężenia etanolu może związać określoną ilość witaminy E. Wzrost udziału suchej masy drożdży w mieszaninie kapsułkującej powodował przesunięcie tego stanu w stronę mniejszych zawartości końcowych witaminy w komórkach.

Zbliżony efekt zaobserwowano w badaniach nad stabilizacją kurkuminy wewnątrz komórek drożdży *Saccharomyces cerevisiae* [17]. Kurkumina, podobnie jak DL- $\alpha$ -tokoferol, jest związkiem słabo rozpuszczalnym w wodzie i o dużej masie cząsteczkowej ( $368,4 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ ). Wykazano, że do uzyskania wysokiej wydajności procesu mikrokapsułkowania, stosunek drożdży do kurkuminy nie powinien przekraczać 0,5. Szczegółowy mechanizm tego zjawiska, w odniesieniu do witaminy E, nie został jednak jeszcze poznany.

Wykonane doświadczenie optymalizacyjne pozwoliło na określenie optymalnych warunków mikrokapsułkowania  $\alpha$ TP do uzyskania maksymalnej wydajności procesu w badanym zakresie zmiennych wejściowych. Ich wartości liczbowe wyniosły kolejno:

temperatura ( $X_1$ ) – 25 - 55 °C, stężenie etanolu ( $X_2$ ) – 54,3 % (obj.) oraz stosunek masowy drożdży do witaminy ( $X_3$ ) równy 1. Rzeczywista, uzyskana doświadczalnie w wymienionych warunkach, wartość liczbową EY wyniosła  $36,1 \pm 0,7$  % i była zbliżona do oczekiwanej (39,9 %) oraz mieściła się w wyznaczonym przedziale ufności (37,1 - 42,8 %).



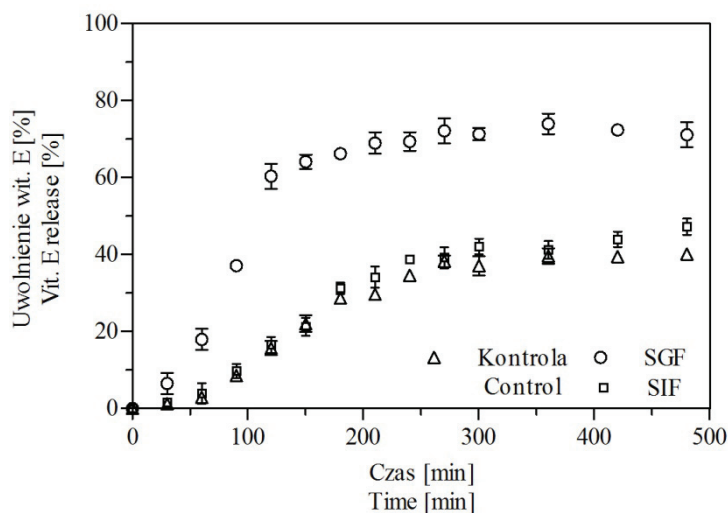
Rys. 2. Płaszczyzna odpowiedzi dla wartości EY w funkcji stężenia etanolu i stosunku drożdży do  $\alpha$ TP. Temperatura inkubacji równa 40 °C.

Fig. 2. Response surface for EY value as a function of ethanol concentration and yeast to  $\alpha$ TP ratio. Incubation temperature equalling 40 °C.

#### *Uwalnianie witaminy E z mikrokapsulek w SGF i SIF*

Drugi etap doświadczenia polegał na ocenie kinetyki uwalniania DL- $\alpha$ -tokoferolu z mikrokapsulek drożdżowych w symulowanych płynach trawiennych. Uzyskane profile uwalniania przedstawiono na rys. 3. Stwierdzono, że w środowisku kwaśnym (symulowany sok żołądkowy) uwolnienie witaminy E z mikrokapsulek zachodziło istotnie szybciej niż w słabo zasadowym pH (symulowany sok jelitowy) oraz w próbie kontrolnej. W SGF w ciągu 4 godzin uwolniło się 69,4 %  $\alpha$ TP, w SIF – 38,7 %, natomiast w próbie kontrolnej – 34,7 %. Stwierdzono również, że po tym czasie dalsze

uwalnianie witaminy E było istotnie wolniejsze i po 8 h wyniosło kolejno: 71,1, 47,3 i 40,1 %. Niska retencja witaminy  $\alpha$ TP w mikrokapsułkach znajdujących się w warunkach symulowanego płynu żołądka jest przypuszczalnie spowodowana specyficzną budową komórki *Saccharomyces cerevisiae*, zawierającej sztywną ścianę złożoną głównie z  $\beta$ -1,3- i  $\beta$ -1,6-glukanów oraz niewielkie ilości chityny [8]. W warunkach kwaśnych struktura ta ulega degradacji poprzez hydrolizę, wpływając na zwiększoną szybkość uwalniania witaminy. Podobną zależność zaobserwowano podczas oceny uwalniania kwasu chlorogenowego mikrokapsulkowanego w komórkach drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, w których stwierdzono ubytek 95 % tego kwasu w ciągu 2 h inkubacji w SGF [21]. Obserwowane uwolnienie znaczących ilości witaminy E z mikrokapsulek w krótkim czasie sugeruje jej względnie nietrwałe związanie ze strukturami komórki, np. z  $\beta$ -glukanami lub mannoproteinami ściany komórkowej. Dodatkowo stwierdzone niepełne uwolnienie  $\alpha$ TP w trakcie doświadczenia wskazuje, że podczas mikrokapsulkowania część witaminy wiąże się z innymi strukturami komórki, takimi jak np. błony lipidowe [10], wykazując tym samym mniejszą podatność na testowane warunki. Jednym z dalszych etapów badań powinna być próba określenia miejsca wiązania się witaminy E z komórką drożdżową oraz poznania czynników mających wpływ na ten proces.



Rys. 3. Profile uwalniania witaminy E z mikrokapsulek ( $X_1 = 55$  °C,  $X_2 = 54,3$  %,  $X_3 = 1$ ) w symulowanych płynach trawiennych oraz w wodzie destylowanej (próba kontrolna).

Fig. 3. Release profiles of vitamin E from microcapsules ( $X_1 = 55$  °C,  $X_2 = 54,3$  %,  $X_3 = 1$ ) in simulated digestive fluids and in distilled water (control sample).

## Wnioski

1. Spośród badanych czynników największy wpływ na końcową zawartość witaminy E w komórkach (wydajność mikrokapsułkowania) ma stężenie etanolu w mieszaninie kapsułkującej.
2. Zwiększenie stosunku masowego drożdży do witaminy ma negatywny wpływ na wydajność mikrokapsułkowania.
3. W analizowanym zakresie temperatura inkubacji wywierała niewielki dodatni wpływ na proces mikrokapsułkowania.
4. Wyznaczone, optymalne wartości zmiennych wejściowych w przypadku maksymalnej wartości EY wynoszą: temperatura ( $X_1$ ) 25 - 55 °C, stężenie etanolu ( $X_2$ ) – 54,3 % (obj.) i stosunek masowy drożdży do witaminy ( $X_3$ ) równy 1.
5. Uwalnianie witaminy E z mikrokapsułek przebiega istotnie szybciej w warunkach kwaśnych niż w słabo zasadowym pH.

*Badania zrealizowano w ramach Projektu Badawczego nr N N312 213638 Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego.*

## Literatura

- [1] Bishop J., Nelson G., Lamb J.: Microencapsulation in yeast cells. *J. Microencaps.*, 1998, **15**, 791-773.
- [2] Box G.E.P., Cox D.R.: An analysis of transformations. *J. R. Stat. Soc. Ser. B.*, 1964, **26**, 211-246.
- [3] Bramley P., Elmadfa I., Kafatos A., Kelly F., Manios Y., Roxborough H., Schuch W., Sheehy P., Wagner K-H.: Vitamin E. *J. Sci. Food Agric.*, 2000, **7 (80)**, 913-938.
- [4] Byung Y., Hwang J., Bang S., Darby D., Cooksey K., Dawson P., Park H., Whiteside S.: Formulation and characterization of  $\alpha$ -tocopherol loaded poly  $\epsilon$ -caprolactone (PCL) nanoparticles. *Food Sci. Technol.*, 2011, **(44)**, 24-28.
- [5] Ciamponi F., Duckham C., Tirelli N.: Yeast cells as microcapsules. Analytical tools and process variables in the encapsulation of hydrophobes in *S. cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2012, **95**, 1445-1456.
- [6] Czerniak A., Dziadas M.: Zastosowanie LLE/HPLC do oceny on-line efektywności mikrokapsułkowania witaminy E w drożdżach piekarskich (*Saccharomyces cerevisiae*). *Mat. IX Konferencji Chromatograficznej, Uniwersytet im. A. Mickiewicza w Poznaniu, Poznań 2011*.
- [7] Czerniak A., Łakowiecki Ł., Jankowski T.: Encapsulation of lipid-soluble functional food ingredients in commercial yeast cells. *Proc. 2nd Int. ISEKI Food Conference, Milan 2011, 9 September*, p. 120.
- [8] De Nobel J.G., Klis F.M., Munnik T., Priem J., van den Ende H.: An assay of the relative cell wall porosity of *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluveromyces lactis* and *Schizasaccharomyces pombe*. *Yeast*, 1990, **6 (6)**, 483-490.
- [9] Dwiecki K., Górnaś P., Nogala-Kałużka M., Witkowski S., Polewski K.: Wpływ izomerów optycznych  $\alpha$ -tokoferolu na przepuszczalność membrany lipidowej. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2005, **2 (43)**, 30-40.

- [10] Dwiecki K., Sieger A., Górna P., Nogala-Kałucka M., Polewski K.: Oddziaływanie membrany lipidowej z D- $\alpha$ -tokoferolem w zależności od jego stężenia. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2004, **3** (40) Supl., 3-11.
- [11] Dziezak J.: Microencapsulation and encapsulated ingredients. *Food Technol.*, 1988, **4** (42), 136-151.
- [12] Grajek W.: Rola przeciwutleniaczy w zmniejszaniu ryzyka wystąpienia nowotworów i chorób układu krążenia. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2004, **3** (35), 3-11.
- [13] Jankowski T.: Mikrokapsułkowanie składników żywności. W: Food product development. Opracowywanie nowych produktów żywnościowych. Red. J. Czapski. Wyd. AR w Poznaniu., 1995, ss. 259-276.
- [14] Kilcher G., Delneri D., Duckham C., Tirelli N.: Probing (macro)molecular transport through cell walls. *Faraday Discuss.*, 2008, **139**, 199-212
- [15] Luo Y., Zhang B., Whent M., Yu L., Wang Q.: Preparation and characterization of zein/chitosan complex for encapsulation of  $\alpha$ -tocopherol, and its in vitro release study. *Colloids Surf. B.*, 2011, **2** (85), 145-152.
- [16] Normand V., Dardelle G., Bouquerand P-E., Nicolas L., Johnston D.: Flavor encapsulation in yeast: limonene used as a model system for characterization of release mechanism. *J. Agric. Food. Chem.*, 2005, **53**, 7532-7543.
- [17] Paramera E., Konteles S., Karathanos V.: Microencapsulation of curcumin in cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Chem.*, 2011, **125**, 892-902.
- [18] Rutkowski A., Gwiazda S., Dąbrowski K.: Substancje dodatkowe i składniki funkcjonalne żywności. Wyd. Agro and Food Technology, Czeladź 1997.
- [19] Sangwai M., Vavia P.: Effect of decisive formulation variables on bioencapsulation efficiency and integrity of yeast biocapsules for oral itraconazole delivery. *J. Microencaps.*, 2011, **4** (28), 311-322.
- [20] Schrooyen P., van der Meer R., De Kruif C.: Microencapsulation: its application in nutrition. *P. Nutr. Soc.*, 2001, **60**, 475-479.
- [21] Shi G., Rao L., Yu R., Xiang H., Pen H., Long S., Yang C.: Yeast-cell-based microencapsulation of chlorogenic acid as a water-soluble antioxidant. *J. Food Eng.*, 2007, **80**, 1060-1067.
- [22] Shi G., Rao L., Yu R., Xiang H., Yang H., Ji R.: Stabilization and encapsulation of photosensitive resveratrol within yeast cell. *Int. J. Pharm.*, 2008, **349**, 83-93.
- [23] Somchue W., Sermsri W., Shiwatana J., Siripinyanond A.: Encapsulation of  $\alpha$ -tocopherol in protein-based delivery particles. *Food Res. Int.*, 2009, **8** (42), 909-914.
- [24] Song Y-B., Lee J-S., Lee H.:  $\alpha$ -Tocopherol-loaded Ca-pectinate microcapsules: Optimization, in vitro release, and bioavailability. *Colloids Surf. B.*, 2009, **73**, 394-398.
- [25] Surh J.: Influence of pH, emulsifier concentration, and homogenization condition on the production of stable oil-in-water emulsion droplets coated with fish gelatin. *Food Sci. Biotechnol.*, 2007, **6** (16), 999-1005.
- [26] Wojtyś A., Jankowski T.: Wpływ temperatury na szybkość przenikania wybranych olejków eterycznych do komórek drożdży piekarskich. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2004, **3** (40), 77-86.
- [27] Yoo S-H., Song Y-B., Chang P-S., Lee H.: Microencapsulation of  $\alpha$ -tocopherol using sodium alginate and its controlled release properties. *Int. J. Biol. Macromol.*, 2006, **38**, 25-30.
- [28] Zlotnik H., Fernandez M.P., Bowers B., Cabib E.: *Saccharomyces cerevisiae* mannoproteins from an external cell wall layer that determines wall porosity. *J. Bacteriol.*, 1984, **3** (159), 1018-1026.

---

**MICROENCAPSULATION OF  $\alpha$ -TOCOPHEROL INSIDE  
*SACCHAROMYCES CEREVISIAE* YEAST CELLS**

S u m m a r y

The objective of the paper was to assess the *Saccharomyces cerevisiae* cells as a natural carrier matrix for the vitamin E microencapsulation process and to set optimal parameters thereof.

Vitamin E, in the form of DL- $\alpha$ -tocopherol, was mixed with a suspension of yeast cells in the ethyl alcohol - water solution and incubated for 48 h at a temperature ranging from 25 to 55 °C. The effect was assessed of the temperature ( $X_1$ ), ethanol concentration ( $X_2$ ), and yeast to vitamin E ( $X_3$ ) mass ratio on the final amount of vitamin E in yeast cells (process yield).

It was found that, within the scope of the research study, the process yield was a non-linear function of ethanol concentration. As soon as the predetermined concentration value was exceeded, the yield decreased. Furthermore, a linear negative effect of yeast to vitamin E mass ratio on the process was observed. When the predetermined optimal conditions were applied to microencapsulate vitamin E in yeast cells (temperature: 25 - 55 °C; ethanol concentration: 54.3 %; yeast cells to vitamin E mass ratio: 1), the process yield obtained was at a level of 36.1 %.

**Key words:** antioxidants, vitamin E, *Saccharomyces cerevisiae*, vitamin microencapsulation, response surface methodology (RSM) 