

AGATA KAPTUROWSKA, IZABELA STOLARZEWICZ,
IZABELA CHMIELEWSKA, EWA BIAŁECKA-FLORJAŃCZYK

ULTRADŹWIĘKI – NARZĘDZIE DO INAKTYWACJI KOMÓREK DROŻDŻY ORAZ IZOLACJI BIAŁEK WEWNĄTRZKOMÓRKOWYCH

Streszczenie

Techniki ultradźwiękowe są od dawna stosowane w przemyśle spożywczym, przede wszystkim w procesach przetwarzania i utrwalania żywności. Celem pracy była ocena sonifikacji jako alternatywnej metody inaktywacji komórek drożdży. Dodatkowo rozważono zastosowanie sonifikacji do pozyskiwania roztworu białek wewnątrzkomórkowych. Komórki szczepu drożdży *Saccharomyces cerevisiae* 2200 oraz komórki świeżych drożdży piekarskich poddawano sonifikacji w głowicowym homogenizatorze ultradźwiękowym o częstotliwości 20 kHz. Zaobserwowano istotny wpływ czasu, cyklu pracy oraz mocy fali akustycznej na inaktywację komórek oraz stopień izolacji białek, które wydzielono z wydajnością 60 % ze szczepu drożdży *S. cerevisiae* 2200 i 43 % ze świeżych drożdży piekarskich. Dezintegracja struktury komórkowej drożdży za pomocą ultradźwięków może być dobrą laboratoryjną metodą permeabilizacji ściany komórkowej oraz izolacji białek. Liczba żywych komórek po procesie sonifikacji zmniejszyła się 100 do 1000-krotnie w porównaniu z początkową liczbą jtk/cm³, przy czym efekt ten może zostać zwielokrotniony przez połączenie działania ultradźwięków z czynnikiem termicznym.

Słowa kluczowe: niszczenie komórek, drożdże piekarskie, sonifikacja, ultradźwięki

Wprowadzenie

Techniki ultradźwiękowe są od dawna stosowane w przemyśle spożywczym zarówno w analizie żywności, jak i w procesach jej przetwarzania i utrwalania. Można się także nimi posłużyć w celu zwiększenia poziomu bezpieczeństwa produktów spożywczych [4, 5, 11].

W technologii żywności wykorzystuje się przede wszystkim zdolność fal ultradźwiękowych o dużej mocy i małej częstotliwości (20 - 100 kHz) do wywoływania

Mgr inż. A. Kapturowska, dr inż. I. Stolarzewicz, dr hab. inż. E. Białecką-Florjańczyk, prof. SGGW, Katedra Chemii, Wydz. Nauk o Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, ul. Nowoursynowska 159 C, 02-776 Warszawa, mgr inż. I. Chmielewska, Międzywydziałowe Studium Biotechnologii, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa

efektu kawitacji, który wpływa na fizykochemiczne oraz biochemiczne właściwości materiału, a w szczególności na dezintegrację struktur komórkowych. Niszczenie ścian i błon komórkowych przyczynia się do inaktywacji mikroorganizmów, ale jest także podstawą do łatwiejszego uwalniania zawartości komórki do środowiska i w ten sposób staje się ważnym etapem w procesie otrzymywania polisacharydów czy wewnątrzkomórkowych białek, w tym enzymów [3, 5, 6, 10].

Zjawisko kawitacji jest wynikiem implozji pęcherzyków gazu spowodowanej gwałtownymi zmianami ciśnienia (do 50 MPa) oraz temperatury (nawet do 5500 °C) [6, 12]. Siły mechaniczne, tworzące się wówczas w miejscu zderzenia pęcherzyków kawitacyjnych, oraz fala generowana po ich implozji są głównymi czynnikami odpowiedzialnymi za uszkodzenie komórek. Ultradźwięki mogą nieodwracalnie uszkadzać błonę komórkową. Taki proces nazywa się letalną sonoporacją (ang. *lethal sonoporation*) lub powodować odwracalne powstawanie porów w strukturze błony – taki proces nazywa się odwracalną sonoporacją (ang. *reparable sonoporation*). Proces ten jest wynikiem tzw. stresu ścinającego (ang. *shear stress*) wywołanego drganiami rezonansowymi powodującymi powstawanie w środowisku lokalnych mikroprzepływów o gwałtownie zmieniających się prędkościach. To z kolei przyczynia się do powstania wokół pęcherzyków dużych naprężeń ścinających, które oddziałują na materiał biologiczny i mogą powodować sonoporację [19, 20]. Efekt ten potęgowany jest dodatkowo przez substancje o charakterze rodników, tworzące się w wyniku termicznego rozkładu rozpuszczalnika i cząsteczek zawartych w zderzających się pęcherzykach [3]. Według Oyane i wsp. [15] niszczenie ściany komórkowej *S. cerevisiae* jest wynikiem działania formujących się w czasie sonolizy wody, rodników nadtlenkowych lub hydroksylowych. W procesie sonifikacji obserwowano obniżenie liczby komórek drożdży, pleśni, alg oraz bakterii m.in. *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolytica*, *Pseudomonas fluorescens* czy *Bacillus subtilis* [6, 9, 16]. Najtrudniej inaktywacji ulegają spory, najłatwiej komórki bakterii, a pośrednią odporność wykazują drożdże [3, 8]. Jednak o inaktywacji tych ostatnich organizmów przez fale ultradźwiękowe wiadomo niewiele [7, 10, 15].

Celem pracy było określenie przydatności sonifikacji, jako alternatywy w stosunku do innych powszechnie stosowanych metod, do dezaktywacji komórek drożdży. Badania przeprowadzono na świeżych komórkach prasowanych drożdży piekarskich oraz na komórkach szczepu laboratoryjnego *Saccharomyces cerevisiae* 2200. Ponadto w pracy zbadano możliwość zastosowania ultradźwięków w procesie dezintegracji komórek tych mikroorganizmów m.in. w celu pozyskiwania białek wewnątrzkomórkowych, a w szczególności enzymów, mogących znaleźć zastosowanie jako katalizatory reakcji chemicznych wykorzystywanych w biotechnologii i technologii żywności.

Material i metody badań

Badania prowadzono z użyciem prasowanych drożdży piekarskich *Saccharomyces cerevisiae* produkowanych przez firmę Lallemand (Józefów, Polska) oraz szczepu laboratoryjnego *Saccharomyces cerevisiae* 2200 należącego do Kolekcji Czystych Kultur Zakładu Mikrobiologii i Biotechnologii Żywności Wydziału Nauk o Żywności SGGW w Warszawie. Materiał mikrobiologiczny przechowywano w warunkach chłodniczych w temp. 4 °C, szczep laboratoryjny przechowywano na skosach YPD (2 % glukozy, 2 % peptonu, 1 % ekstraktu drożdżowego) z dodatkiem 2 % agaru. Szczep laboratoryjny *Saccharomyces cerevisiae* namnażano, prowadząc 24-godziną hodowlę stacjonarną w bioreaktorze BioFlo 3000 przez 24 h w temp. 28 °C na podłożu melasowym (6 °Błg, pH 7) w objętości roboczej 4 dm³; drożdże prasowane zgodnie z deklaracją producenta były również namnażane na podłożu melasowym.

Dezintegrację komórek drożdży prowadzono za pomocą homogenizatora ultradźwiękowego (sonifikatora głowicowego) OmniRuptor4000 (Kennesaw, USA) o częstotliwości 20 kHz i maksymalnej mocy 300 W. Stosowany cykl pracy (ang. *duty cycle*, wyznaczający sposób pulsacji) wynosił 60 i 90 %; fale ultradźwiękowe transmitowane do roztworu w trybie jeden impuls na sekundę, np. 60 % oznacza, że aktywny przedział czasu wynosił 0,6 s.

Jednorazowo poddawano działaniu ultradźwięków 4 g biomasy drożdży prasowanych lub 4 g odwirowanej biomasy szczepu laboratoryjnego drożdży *S. cerevisiae*, zawieszonych w 40 cm³ roztworu soli o pH 6,3 (MgCl₂, KH₂PO₄) w ciągu 5, 15 oraz 30 min. W trakcie sonifikacji próbkę chłodzono. Po przeprowadzonej dezintegracji komórki drożdży wirowano w wirówce szybkoobrotowej (20 °C, 10 min, 10000 rpm). Stężenie białek w supernatancie po procesie sonifikacji oznaczano metodą Lowry'ego, zaś zawartość białka w komórkach drożdży metodą Kjeldahla [18]. Liczbę komórek drożdży szczepu *S. cerevisiae* 2200 oznaczano metodą płytkową wgłębną po 72 h hodowli w temp. 28 °C, stosując stałe podłoże Sabourauda z dodatkiem chloramfenikolu. Suchą masę drożdży oznaczano metodą termogravimetryczną jako średnią z 3 powtórzeń.

Wyniki analizowano metodami statystycznymi za pomocą oprogramowania Statgraphics Plus for Windows 4.1©Statistical Graphics Corp. W celu weryfikacji hipotezy statystycznej o równości średnich obiektowych przeprowadzono jednoczynnikową oraz wieloczynnikową analizę wariancji. Do porównania średnich i wyodrębnienia grup jednorodnych stosowano test Tukey'a. Analizy prowadzono na poziomie istotności $\alpha = 0,05$.

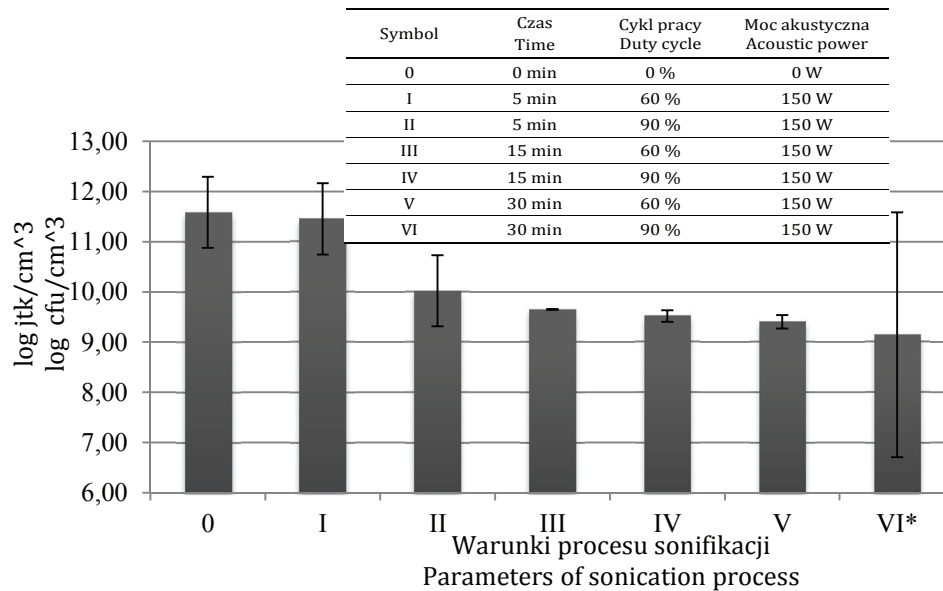
Wyniki i dyskusja

Wpływ ultradźwięków na liczbę komórek drożdży poddawanych sonifikacji

Udowodniono, że ultradźwięki przy cyklu pracy homogenizatora 60 lub 90 % powodowały częściową inaktywację komórek drożdży *Saccharomyces cerevisiae* szczepu 2200. Na przeżywalność komórek miał wpływ zarówno cykl pracy, jak i czas trwania procesu (rys. 1). Najniższe z zastosowanych parametrów sonifikacji (5 min, 60 %) były nieskuteczne w inaktywacji komórek drożdży. Zwiększenie cyklu pracy homogenizatora do 90 % w tym samym czasie powodowało obniżenie liczby komórek szczepu *S. cerevisiae* 2200 tylko o jeden cykl logarytmiczny, to jest średnio o 97,3 % (z $3,86 \times 10^{11}$ jtk/cm³ do $1,05 \times 10^{10}$ jtk/cm³) w stosunku do ich początkowej liczby. Natomiast wydłużenie czasu ekspozycji komórek na działanie fal do 15 i 30 min przy cyklu pracy 90 % poprawiło efektywność sonifikacji i pozwoliło na obniżenie ich liczby średnio z $3,86 \times 10^{11}$ jtk/cm³ do $4,47 \times 10^9 - 2,55 \times 10^9$ jtk/cm³ (tzn. o około 99 %), czyli o dwa cykle logarytmiczne.

W czasie sonifikacji uwalniana jest energia cieplna, powodująca wzrost temperatury zawiesiny komórek drożdży nawet powyżej 50 °C. Może to zaburzać ocenę efektywności sonifikacji, ponieważ temperatura stanowi dodatkowy czynnik inaktywujący drobnoustroje, czego przykładem są wyniki procesu prowadzonego w ciągu 30 min przy cyklu pracy sonifikatora 90 % charakteryzujące się dużym odchyleniem standardowym. Wynika to z trudności w utrzymaniu temperatury procesu, w stosowanym modelu aparatu, poniżej 45 °C, a więc poniżej temperatury uznawanej za letalną dla drożdży. Guerrero i wsp. [4], którzy badali wpływ temperatury na inaktywację drożdży *S. cerevisiae* (zastosowana początkowa liczba komórek 10^8 jtk/cm³) zaobserwowali w tej właśnie temperaturze znaczny spadek liczby żywych komórek drożdży w porównaniu z liczbą komórek pozostałą po procesie sonifikacji przeprowadzonym w temp. 35 °C. Spadek ten jest tym większy im wyższa jest temperatura zawiesiny komórek. Można zatem stwierdzić, że im wyższa temperatura procesu sonifikacji tym efekt działania ultradźwięków jest przez nią bardziej maskowany.

Z doniesień literaturowych wynika, że ważnym czynnikiem wpływającym na przeżywalność komórek *S. cerevisiae*, obok częstotliwości fali akustycznej, jest moc sonifikatora zastosowana w procesie dezintegracji. Ciccolini i wsp. [7] stwierdzili, że optymalną mocą aparatu przy częstotliwości fali 20 kHz jest 100 W. Wartość ta pozwoliła na 6-krotne zmniejszenie liczby komórek po 10 min ekspozycji. W przypadku zmniejszonej mocy (50 W) nie dochodziło do wywołania efektu kawitacji, natomiast wartość większa (180 W) czyniła proces sonifikacji bardzo mało wydajnym. Dlatego w przedstawionych badaniach zastosowano moc 150 W, która zapewniła kawitację oraz pozwoliła uniknąć nadmiernego wzrostu temperatury biomasy drożdży zawieszanej w buforze, obserwowanego przy wyższych wartościach.



Rys. 1. Wpływ warunków procesu sonifikacji na inaktywację komórek drożdży szczepu *Saccharomyces cerevisiae* 2200 (III – odchylenie standardowe na tyle niskie, że słupek błędu jest niewidoczny przy wybranej skali rysunku; *VI – duże odchylenie standardowe z przyczyn opisanych w tekście).

Fig. 1. Effect of sonication process conditions on inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* 2200 yeast cells (III – standard deviation is so low that the column with error is invisible at the selected scale of the Figure; *VI – high standard deviation because of the facts as described in the text).

Na omawiany efekt działania ultradźwięków duży wpływ wywiera także początkowa liczba komórek drożdży użytych do eksperymentu. I tak przy początkowej liczbie komórek *S. cerevisiae* 10^2 jtk/cm³ i częstotliwości fali 27,5 kHz, Tsukamoto i wsp. [10] uzyskali prawie 100-krotnie mniej żywych komórek drożdży, zaś przy liczbie 10^5 jtk/cm³ spadek ten był zaledwie 5-krotny. Oyane i wsp. [15], prowadząc podobne doświadczenia, poddawali działaniu ultradźwięków o częstotliwości 20 kHz zawiesinę komórek drożdży *S. cerevisiae* o początkowej liczbie 10^6 jtk/cm³. W ten sposób zredukowano 10-krotnie liczbę komórek drożdży w ciągu 30 min procesu przy zastosowaniu mocy na poziomie 200 W. Redukcję 1000-krotna liczby komórek tych mikroorganizmów osiągnięto dopiero po 90 min. W związku z tym autorzy uznali, że uszkodzenie ściany komórkowej drożdży oraz hamowanie syntezy RNA zachodzi już w pierwszych 18 min procesu, ale efekt ten jest trudny do zaobserwowania metodą płytkową, gdyż komórki potrafią regenerować się w ciągu 6 - 8 h od momentu ekspozycji na działanie fal ultradźwiękowych, co potwierdzono metodą cytometrii przepływowej wykorzystującej efekt wzrastającej fluorescencji podczas inkubacji komórek drożdży.

Natomiast w przypadku niniejszej pracy wyniki uzyskane podczas inaktywacji komórek drożdży piekarskich w ciągu 5 min pozwalają wnioskować o nieskuteczności procesu. Prawdopodobnie jest to spowodowane możliwością szybkiej regeneracji ściany komórkowej. Jej miejscową permeabilizację potwierdza pojawianie się białka w buforze, w którym zawieszono komórki drobnoustrojów (tab. 1). Ponadto pomimo, że kawitacja pozwala osiągnąć wysoki poziom dyspersji komórek drożdży w cieczy podczas homogenizacji za pomocą ultradźwięków, to jednak komórki drobnoustrojów wykazują tendencję do gromadzenia się w miejscach, gdzie efekt kawitacji nie zachodzi ze względu na powstającą falę stojącą, co może znacznie osłabiać inaktywację mikroorganizmów [10].

Choć uzyskane wyniki redukcji początkowej liczby komórek są obiecujące, to lepsze efekty inaktywacji wegetatywnych form mikroorganizmów w materiałach ciekłych można osiągnąć dopiero przy jednoczesnym poddaniu komórek działaniu innych czynników, takich jak temperatura lub ciśnienie. W związku z tym stale prowadzone są badania, których celem jest opracowanie nowych rozwiązań technologicznych [2, 7, 10, 14, 16] oraz obniżenie kosztów procesu [19].

Tabela 1

Ilość uwolnionego białka w procesie sonifikacji komórek drożdży szczepu *Saccharomyces cerevisiae* 2200, w ciągu 5 min przy cyklu pracy homogenizatora 90 %, determinowana początkową ich liczbą. Protein amounts released within the sonication process of yeast cells of *Saccharomyces cerevisiae* 2200 strain, during 5 min at a homogenizer's duty cycle of 90 %, determined by the initial number of those cells.

Liczba komórek drożdży [jtk/cm ³] Number of yeast cells [cfu/cm ³]	Ilość uwolnionego białka [mg/g s.s.] Protein released [mg/g d.m.]
$7,00 \times 10^{10}$	237 ± 19
$7,00 \times 10^9$	113 ± 34
$7,00 \times 10^8$	< 1
$7,00 \times 10^7$	< 1

Sonifikacja jako metoda izolacji białek wewnątrzkomórkowych

Z danych literaturowych wynika, że sonifikacja jest także dobrą metodą wydzielania enzymów i innych białek z komórek drobnoustrojów [12]. Do istotnych czynników wpływających na stopień dezintegracji komórek za pomocą fal ultradźwiękowych (oprócz takich parametrów, jak częstotliwość i moc fali akustycznej oraz czas jej działania) należą także objętość zawiesiny komórek poddawanych sonifikacji oraz ich liczba, kształt i rozmiar [1, 4]. Według Borthwick i wsp. [2] w tradycyjnych homogenizatorach ultradźwiękowych pracujących przy częstotliwości

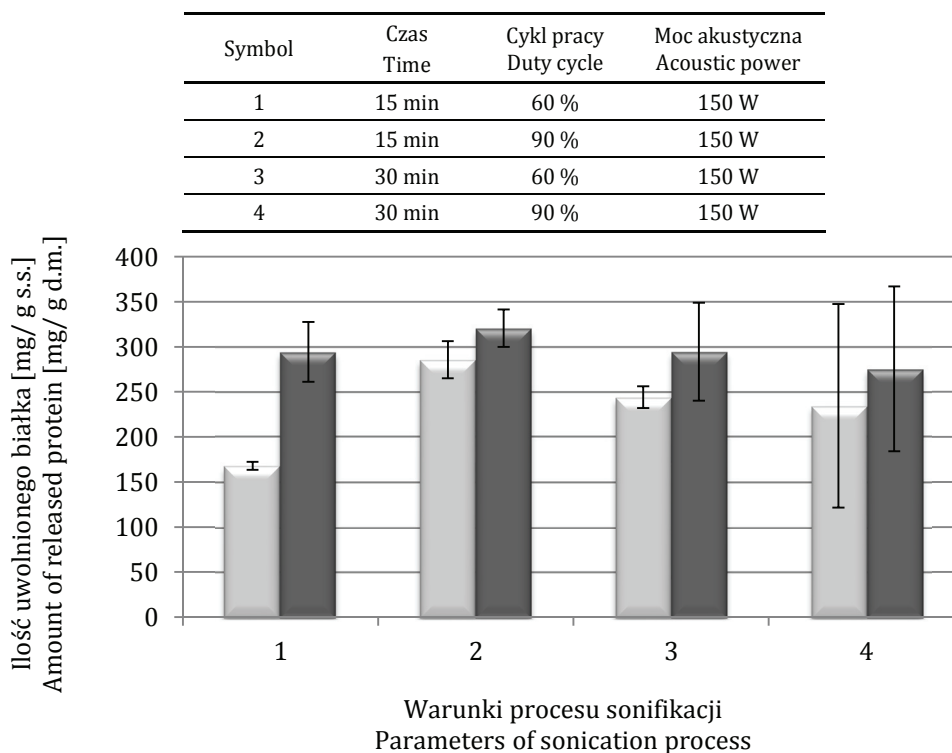
około 20 kHz optymalna objętość mieszaniny poddawanej sonifikacji wynosi 40 cm^3 , gdyż przy mniejszych objętościach formuje się warstwa aerozolu. Powstająca wówczas piana może wpływać na nadmierne natlenienie roztworu, mogące prowadzić do denaturacji białek znajdujących się w medium [17]. Obserwacje poczynione w trakcie badań własnych potwierdzają powyższe stwierdzenia.

W celu optymalizacji procesu pozyskiwania białek wewnątrzkomórkowych za pomocą homogenizatora OmniRuptor4000 określono wpływ początkowej liczby komórek drożdży szczepu *Saccharomyces cerevisiae* 2200 na ilość uwolnionego białka. Z uzyskanych wyników można wnioskować, że liczba komórek zdecydowanie wpływa na ilość uwolnionych białek w roztworze powstałym w wyniku procesu dezintegracji. Największą ilość uwolnionego białka ($237 \text{ mg/g s.s. drożdży}$) uzyskano przy parametrach: 5 min, 90 % cyklu pracy i moc 150 W, przygotowując 10-krotne rozcieńczenie zawiesiny komórek w buforze fosforanowym o początkowej liczbie rzędu 10^{11} jtk/g . Zastosowanie dziesięciokrotnie mniejszej ilości biomasy w jednostce objętości buforu powodowało spadek ilości uwalnianego białka (średnio $113 \text{ mg/g s.s. drożdży}$), ale w przeliczeniu na 1 g suchej substancji drożdży był to jedynie 2-krotny spadek ilości białka w roztworze (tab. 1). Iida i wsp. [8] informują z kolei, że w zakresie stężeń biomasy prasowanych drożdży piekarskich (Oriental Yeast, Japan) od $0,1 \text{ g/30 cm}^3$ do 1 g/30 cm^3 poddawanych działaniu fal ultradźwiękowych o częstotliwości 20 kHz w sonifikatorze głowicowym przez 5 min i mocy 100 W nie zaobserwowano zmian ilości białek uwalnianych do roztworu (średnio 50 mg/g biomasy), ale przy zawartości 10 g biomasy/ 30 cm^3 ilość uzyskiwanego białka zmniejszała się. Podobną ilość biomasy komórek drożdży *S. cerevisiae* stosowali Apar i Özbek [1], którzy stwierdzili, że w przedziale 30 - 150 g biomasy/ dm^3 przy parametrach: 15 min, 50 % cykl pracy i moc 60 W, ilość uwalnianego białka w czasie sonifikacji nie zależy od masy drożdży. Zastosowane w pracy ilości biomasy komórek drożdży wynosiły od 0,1 do 100 g/dm^3 , zatem były mniejsze od użytych przez wyżej cytowanych autorów. Dlatego można przyjąć, że w przypadku tych parametrów procesu (czyli określonej ilości energii) istnieje optymalna ilość biomasy, dla której proces wydzielania białka można przeprowadzić z największą wydajnością.

Na rys. 2. przedstawiono wpływ parametrów procesu sonifikacji na ilość uwalnianego białka z komórek drożdży szczepu *Saccharomyces cerevisiae* 2200 hodowanych na podłożu melasowym oraz z komórek świeżych drożdży prasowanych *S. cerevisiae* (stężenie biomasy w badanych roztworach wynosiło 100 g/dm^3). Analiza statystyczna wyników wykazała istotny wpływ parametru czasu (p-value = 0,0371) i rodzaju materiału biologicznego (p-value = 0) użytego do procesu oraz istnienie korelacji pomiędzy wymienionymi czynnikami a cyklem pracy homogenizatora (p-value odpowiednio 0,0013 i 0,0421). Zarówno w przypadku prasowanych drożdży piekarskich, jak i szczepu laboratoryjnego *S. cerevisiae* 2200 istotnie większą wydajność

procesu uzyskiwano w ciągu 15 min i przy 90 % cyklu roboczym ($NIR^T = 28,9$). Roztwór pochodzący z sonifikacji prasowanych drożdży piekarskich zawierał mniej białek (średnio 285,6 mg/g s.s.) aniżeli drożdży hodowanych na podłożu melasowym (średnio 320,6 mg/g s.s., $NIR^T = 63,1$) (rys. 2). Różnice wynikające z rodzaju zastosowanego materiału biologicznego mogą wynikać z większej podatności komórek szczepu *S. cerevisiae* 2200 na nieodwracalną sonoporację. Podobnie, jak w przypadku wpływu parametrów procesu na inaktywację czyli na liczbę jtk po procesie sonifikacji trwającym 30 min przy cyklu roboczym 90 %, ilość uwolnionego białka w ostatnim z analizowanych wariantów doświadczenia cechuje się wysokimi wartościami odchylenia standardowego (rys. 2).

- Świeże drożdże piekarskie / Raw baker's yeast
- Laboratoryjne drożdże hodowlane / Yeast cultured in laboratory



Rys. 2. Wpływ warunków procesu sonifikacji na ilość uwolnionego białka z komórek drożdży szczepu *Saccharomyces cerevisiae* 2200 hodowanych na podłożu melasowym oraz komórek świeżych drożdży prasowanych *S. cerevisiae*.

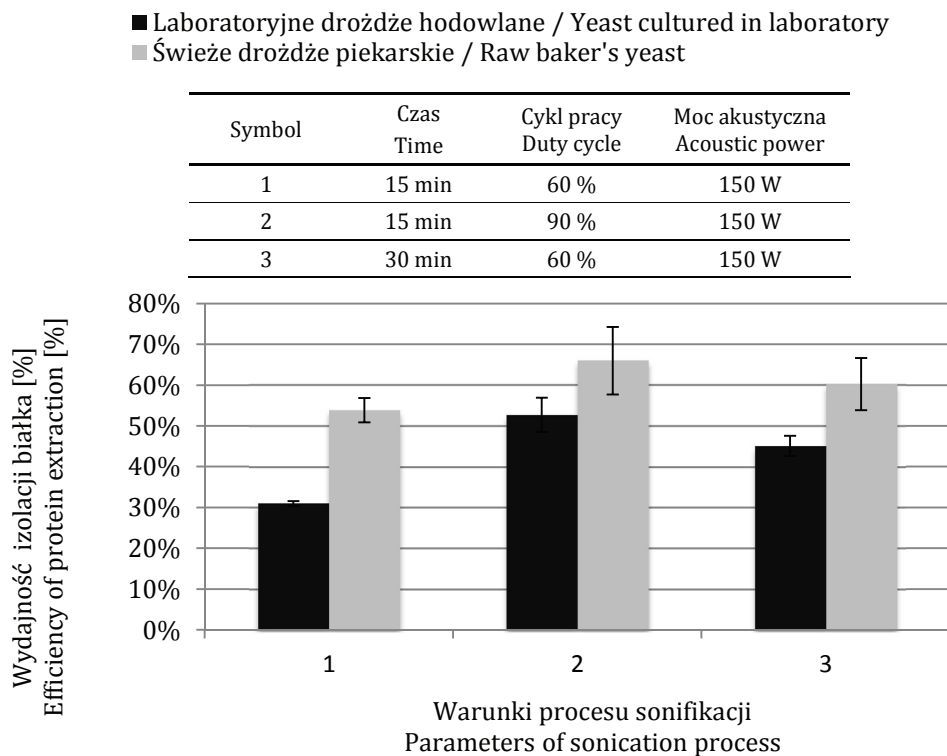
Fig. 2. Effect of sonication process conditions on the amount of protein released from yeast cells of *Saccharomyces cerevisiae* 2200 strain cultured on molasses medium and from pressed raw *S. cerevisiae*.

Oprócz takich czynników, jak: początkowa liczba komórek, temperatura procesu, rodzaj materiału biologicznego, istotny wpływ na wydajność izolacji białek podczas procesu sonifikacji ma typ zastosowanego aparatu emitującego fale ultradźwiękowe oraz jego moc. Ilość uwalnianego białka przez drożdże wzrasta liniowo w zakresie mocy homogenizatora głowicowego od 10 do 60 W przy stężeniu biomasy 0,1 g/30 cm³. Stosowanie mocy powyżej 180 W w badanym typie sonifikatora skutkuje denaturacją białka. Natomiast moc akustyczna 140 W poprawia wydajność procesu izolacji białek, ale czyni go nieekonomicznym z punktu widzenia ilości białka w odniesieniu do kJ zużytej energii. Jeśli chodzi o typ źródła fal ultradźwiękowych lepsze efekty zarówno w inaktywacji, jak i w uwalnianiu białek można uzyskać stosując aparat głowicowy o częstotliwości fali 20 kHz aniżeli myjkę ultradźwiękową emitującą fale o częstotliwości 130 kHz oraz poprzez połączone działania sonifikacji i homogenizacji mechanicznej, która prowadzi do delokalizacji aktywnych pęcherzyków [8].

W konsekwencji różnic ilości uwalnianych białek po sonifikacji można stwierdzić, że rodzaj materiału biologicznego w istotny sposób wpływa na wydajność procesu sonifikacji mierzoną procentowym udziałem ilości uwolnionego białka w stosunku do całkowitej zawartości białka w komórce (rys. 3). Niezależnie od zastosowanych parametrów doświadczenia wyższą wydajność osiągnięto w przypadku szczepu *Saccharomyces cerevisiae* 2200 – średnio 60 %, zaś w przypadku komórek prasowanych drożdży piekarskich jedynie 43 % ($NIR^T = 0,17$).

Izolacja białek za pomocą ultradźwięków (ang. UAE – *ultrasound assisted extraction*) była wykorzystywana jak dotąd jedynie w małej skali pilotażowej do izolacji białek sojowych, umożliwiając oszczędność około 70 % energii w porównaniu z metodami tradycyjnymi [20]. Jednocześnie na podstawie badań własnych można stwierdzić, że dezintegracja komórek drożdży za pomocą homogenizatora ultradźwiękowego stwarza możliwość otrzymywania enzymów oraz innych białek w warunkach laboratoryjnych. W zależności od zastosowanych parametrów czasu, mocy, cyklu pracy oraz początkowej liczby komórek uzyskano zawiesinę białek rzędu kilkuset mg/g s.s. drożdży.

W aspekcie potencjalnego wykorzystania sonifikacji jako metody izolacji enzymów wewnątrzkomórkowych, wykorzystywanych w katalizie chemicznej, niezbędna jest ocena jej wpływu na aktywność wspomnianych białek. Zatem konieczne są dalsze prace nad doбором aparatu i warunków sonifikacji w celu uzyskania jak najlepszej wydajności przy zachowaniu wysokiej aktywności katalitycznej izolowanych enzymów, które mogą katalizować reakcje syntezy związków stosowanych w technologii żywności, takich jak substancje zapachowe [13], biosurfaktanty czy antyutleniające.



Rys. 3. Porównanie wydajności izolacji białek z komórek prasowanych drożdży piekarskich oraz komórek drożdży szczepu *Saccharomyces cerevisiae* 2200 hodowanych na podłożu melasowym metodą dezintegracji komórek przy zastosowaniu fal ultradźwiękowych.

Fig. 3. Comparing extraction efficiency of proteins from pressed baker's yeast cells and from yeast cells of *S. cerevisiae* 2200 cultured on molasses medium using sonification-based cell disruption method.

Wnioski

1. Działanie ultradźwięków w cyklu pracy homogenizatora 60 i 90 %, mocy 150 W w ciągu 30 min i temperaturze 40 °C powoduje zmniejszenie liczby komórek drożdży *Saccharomyces cerevisiae* średnio o 2 cykle logarytmiczne przy początkowej liczbie 10^{10} - 10^{11} jtk/cm³.
2. Ultradźwięki mogą doprowadzić do dezintegracji ściany komórkowej, a tym samym do uwolnienia różnych frakcji białek komórkowych o stężeniu od 285 mg białka/g s.s. w przypadku prasowanych drożdży *Saccharomyces cerevisiae* do 320 mg białka/g s.s. w przypadku drożdży *Saccharomyces cerevisiae* 2200.
3. Sonifikacja jest dobrą metodą laboratoryjną do permeabilizacji ściany komórkowej drożdży i uwalniania białek wewnątrzkomórkowych.

Literatura

- [1] Apar D. K., Özbek B.: Protein Releasing Kinetics of Bakers' Yeast Cells by Ultrasound. *Chem. Biochem. Eng. Q.*, 2008, **22** (1), 113-118.
- [2] Borthwick K.A.J., Coakley W.T., McDonnell M.B., Nowotny H., Benes E., Groschl M.: Development of a novel compact sonicator for cell disruption. *J. Microbiol. Meth.*, 2005, **60**, 207-216.
- [3] Bury D., Jelen P., Kalab M.: Disruption of *Latobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 11842 cells for lactose hydrolysis in dairy products: a comparison of sonication, high-pressure homogenization and bead milling. *Int. Food Sci. Emerg. Technol.*, 2001, **2**, 23-29.
- [4] Ciccolini L., Taillandier P., Wilhem A. M., Delmas H., Strehaiano P.: Low frequency thermo-ultrasonification of *Saccharomyces cerevisiae*: effect of temperature and of ultrasonic power. *Chem. Engin. J.*, 1997, **65**, 145-149.
- [5] Dolatowski Z. J., Stadnik J., Stasiak D.: Applications of ultrasound in food technology. *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.*, 2007, **6** (3), 89-99.
- [6] Drakopoulou S., Terzakis S., Fountoulakis M. S., Mantzavinos D., Manios T.: Ultrasound-induced inactivation of gram-negative and gram-positive bacteria in secondary treated municipal wastewater. *Ultra. Sonochem.*, 2009, **16**, 629-634.
- [7] Guerrero S., Lopez-Malo A., Alzamora S. M.: Effect of ultrasound on the survival of *Saccharomyces cerevisiae*: influence of temperature, pH and amplitude. *Int. Food Sci. Emerg. Technol.*, 2001, **2**, 31-39.
- [8] Iida Y., Tuziuti T., Yasui K., Towata A.: Protein release from yeast cell as an evaluation method of physical effects in ultrasonic field. *Ultra. Sonochem.*, 2008, **15**, 995-1000.
- [9] Jiranek V., Grbin P., Yap A., Barnes M., Bates D.: High power ultrasonics as a novel tool offering new opportunities for managing wine microbiology. *Biotechnol. Lett.*, 2008, **30** (1), 1-6.
- [10] Tsukamoto I., Yim B., Stavarache C.E., Furuta M., Hashiba K., Maeda Y.: Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* by ultrasonic irradiation. *Ultra. Sonochem.*, 2004, **11**, 61-65.
- [11] Kaczmarek L., Lewicki P.: Zastosowanie technik ultradźwiękowych w przetwarzaniu żywności. *Przem. Spoż.*, 2005, **9** (59), 34-36.
- [12] Knorr D., Zenker M., Heinz V., Lee D.: Applications and potential of ultrasonics in food processing. *Trends Food Sci. Tech.*, 2004, **15**, 261-266.
- [13] Krzyżkowska J., Białecka-Florjańczyk E., Stolarzewicz I.: Biotechnologiczne metody otrzymywania substancji zapachowych. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*. 2009, **3** (64), 5-18.
- [14] Mason T. J.: Sonochemistry and sonoprocessing: the link, the trends and (probably) the future. *Ultra. Sonochem.*, 2003, **10**, 175-179.
- [15] Oyane I., Takeda T., Oda Y., Sakata T., Furuta M., Okitsu K., Maeda Y., Nishimura R.: Comparison between the effects of ultrasound and γ -rays on the inactivation of *Saccharomyces cerevisiae*: Analyses of cell membrane permeability and DNA Or RNA synthesis by flow cytometry. *Ultra. Sonochem.*, 2009, **16**, 532-536.
- [16] Piyasena P., Mohareb E., McKellar R.C.: Inactivation of microbes using ultrasound: a review. *Int. J. Food Microbiol.*, 2003, **87**, 207-216.
- [17] Szewczyk K.W.: *Technologia biochemiczna*. Oficyna Wyd. Politechniki Warszawskiej, Warszawa 2003.
- [18] Toczko M., Grzeleńska A.: *Materiały do ćwiczeń z biochemii*. Wyd. SGGW, Warszawa 2001.
- [19] Wu J.: Shear stress in cells generated by ultrasound. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 2007, **93**, 363-373.
- [20] Vilku K., Mawson R., Simons L., Bates D.: Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry – A review. *Int. Food Sci. Emerg. Technol.*, 2008, **9**, 161-169.

**ULTRASOUNDS – A TOOL TO INACTIVATE YEAST AND TO EXTRACT
INTRACELLULAR PROTEIN****S u m m a r y**

Sonication technique has been commonly used in food industry, first of all in food preservation and food processing. The objective of this study was to assess the sonication as an alternative method to inactivate yeast cells. Additionally, it was considered whether or not the sonication could be used to obtain intracellular protein solution. Cells of *Saccharomyces cerevisiae* 2200 strain and a raw yeast biomass were sonicated in a 20 kHz horn-type sonicator. It was found that the time, duty cycle, and power of ultrasounds significantly impacted the cell inactivation and the protein extraction degree. The efficiency of extracting proteins from the cultured *S. cerevisiae* 2200 yeast strain amounted to 60 %, and from the raw baker's yeast to 43 %. The disruption of yeast cells by ultrasounds can be a good laboratory technique used to permeabilize cell wall and to extract intracellular proteins. After sonication, the count of live yeast cells decreased by 100 to 1000 times compared to their initial count expressed as cfu/cm³; this effect can be intensified by combing the activity of ultrasounds with a thermal factor.

Key words: cell disruption, baker's yeast, sonication, ultrasounds ☒