

EWA MAJEWSKA, EWA BIAŁECKA-FLORJAŃCZYK, KINGA SUŁOWSKA

## **DROŻDŻE PIEKARSKIE JAKO BIOKATALIZATOR REAKCJI HYDROLIZY ESTRÓW**

### **Streszczenie**

Jedną z metod modyfikacji tłuszczów jest reakcja enzymatycznego przeestryfikowania, wykorzystująca enzymy lipolityczne. Z uwagi na złożony proces izolacji enzymy te są reagentami kosztownymi i trudnodostępnymi. Alternatywnym rozwiązaniem może być użycie mikroorganizmów produkujących enzymy, bez konieczności wydzielenia ich w czystej postaci. Rolę tę mogą spełniać drożdże piekarskie (*Saccharomyces cerevisiae*), które są źródłem różnych enzymów, wykazujących katalityczny wpływ na przebieg wielu reakcji chemicznych.

Celem pracy było wstępne rozpoznanie możliwości wykorzystania drożdży piekarskich do modyfikacji triacylogliceroli. Jako modelową reakcję wybrano hydrolizę dioctanu heksano-1,2-diolu – estru zawierającego grupy acetylowe o różnej rzędowości. Proces hydrolizy prowadzono w obecności drożdży liofilizowanych, drożdży prasowanych lub biomasy szczepu *Saccharomyces cerevisiae* 102, jako biokatalizatorów, w roztworze wodnym, w temp. 30°C przy stałym mieszaniu. Postęp reakcji kontrolowano metodą chromatografii gazowej. Stwierdzono, że hydrolazy wydzielane przez drożdże wykazywały regioselektywność w stosunku do grup acetylowych o różnej rzędowości, powodując dwukrotnie szybszą hydrolizę grupy pierwszorzędowej, co stwarza praktyczne perspektywy wykorzystania drożdży piekarskich w przemianach acylogliceroli. Rodzaj użytych drożdży piekarskich nie miał znaczącego wpływu na szybkość reakcji.

**Słowa kluczowe:** drożdże piekarskie, triacyloglicerole, lipazy, hydroliza

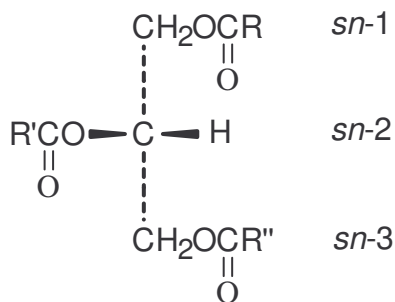
### **Wprowadzenie**

Tłuszcze – estry glicerolu i długołańcuchowych kwasów tłuszczowych – stanowią jeden z podstawowych składników pożywienia człowieka, pełniąc w organizmie funkcje energetyczne i metaboliczne. Są one strukturalną częścią błon komórkowych oraz bogatym źródłem wielu substancji biologicznie czynnych, takich jak witaminy A, D, E, K czy niezbędne nienasycone kwasy tłuszczowe (NNKT).

Właściwości funkcjonalne i żywieniowe, takie jak: plastyczność, konsystencja, temperatura topnienia czy stabilność oksydacyjna, różnych produktów spożywczych kształtowane są głównie przez tłuszcze i zależą nie tylko od rodzaju kwasów tłuszczowych estryfikowanych w triacyloglicerolach, ale również od rozkładu tych kwasów w cząsteczkach triacylogliceroli. Procesem pozwalającym na zmianę tych właściwości, w celu uzyskania produktu o pożądanym parametrach, jest modyfikacja tłuszczów, a jednym z jej sposobów jest reakcja enzymatycznego przeestryfikowania z użyciem enzymów lipolitycznych zwanych lipazami. Lipazy zdefiniowano jako hydrolazy estrów glicerolowych; enzymy hydrolizujące estry innych alkoholi niż glicerol zaliczono do esteraz [3].

W procesie modyfikacji tłuszczów lipazy katalizują wiele reakcji m.in.: hydrolizę, estryfikację, interestryfikację, alkoholizę czy acydolizę. Mechanizm działania katalitycznego większości znanych lipaz zależy od właściwości substratu i warunków procesu. Reakcje hydrolizy i resyntezy, zachodzące podczas enzymatycznego przeestryfikowania, są odwracalne. W roztworze wodnym przebiega hydroliza, natomiast reakcja resyntezy przeważa w środowiskach o ograniczonej zawartości wody [5].

Wiele lipaz wykazuje regioselektywność, polegającą na rozróżnianiu w cząsteczce triacyloglicerolu pozycji zewnętrznych (pierwszorzędowe wiązania estrowe) od pozycji wewnętrznej (drugorzędowe wiązania estrowe). W czasie lipolizy lipaza *sn*-1,3 regiospecyficzna preferuje hydrolizę wiązań estrowych w pozycjach *sn*-1 i *sn*-3 triacyloglicerolu (rys.1).



Rys. 1. Pozycje *sn*-1, *sn*-2, *sn*-3 w cząsteczkach triacylogliceroli.

Fig. 1. Representation of *sn*-nomenclature of triacylglycerols.

Prowadzi to do powstania równomolowej mieszaniny *sn*-1,2 diacylogliceroli i *sn*-2,3 diacylogliceroli, która następnie może hydrolizować dalej do *sn*-2 monoacylogliceroli.

Enzymy lipolityczne otrzymywane są z grzybów, bakterii oraz tkanek zwierzęcych i roślinnych. W skali przemysłowej stosowane są lipazy pochodzenia

zwierzęcego oraz mikrobiologicznego, uzyskiwane głównie z grzybów strzępkowych oraz drożdży, takich jak *Candida rugosa* i *Candida antarctica* [11]. Z uwagi na skomplikowany proces izolacji i oczyszczania enzymów oraz mały rynek zbytu, lipazy są reagentami kosztownymi. Wygodniejszym rozwiązaniem byłoby zastosowanie mikroorganizmów, a zwłaszcza drożdży piekarskich (*Saccharomyces cerevisiae*), które w przeciwieństwie do enzymów są surowcem tanim, dostępnym i łatwym w użyciu (nie wymagają sterylnych warunków hodowli). Komórki drożdży są w stanie syntetyzować kilkaset enzymów [10], (takich jak oksydoreduktazy i hydrolazy), a także koenzymy niezbędne do przebiegu wielu procesów utleniania i redukcji.

Drożdże piekarskie są z powodzeniem wykorzystywane od lat w syntezie chemicznej [2, 9], głównie w reakcjach redukcji związków karbonylowych. Stwierdzono, że mają one również wpływ na przebieg innych reakcji chemicznych np. reakcję hydrolizy. Można je stosować w postaci prasowanej, suchej, liofilizowanej czy immobilizowanej, a reakcje z ich udziałem zachodzą zarówno w wodzie, jak i w rozpuszczalnikach organicznych.

Obecność enzymów lipolitycznych w drożdżach piekarskich udowodniono już dawno [6], a nawet wydzielono i scharakteryzowano lipazę z frakcji mitochondrialnej drożdży piekarskich i potwierdzono jej aktywność w stosunku do triacylogliceroli [8]. Ostatnio wzrosło zainteresowanie tym zagadnieniem w kontekście inżynierii genetycznej [1, 7], np. poprzez ekspresję genu *lipA* kodującego lipazę A z *Bacillus subtilis* m.in. w drożdżach piekarskich zwiększono ilość wytwarzanej przez nie lipazy. Dotychczas jednak nie podjęto próby zastosowania komórek drożdży w przemianach acylogliceroli.

Celem pracy było wstępne rozpoznanie możliwości wykorzystania drożdży piekarskich do modyfikacji triacylogliceroli. Ponieważ cechą decydującą o przydatności lipaz w tej reakcji jest ich regioselektywność, pierwszym etapem badań było porównanie katalitycznego efektu drożdży w reakcji hydrolizy estrów alkoholi pierwszo- i drugorzędowych. Jako modelową reakcję wybrano hydrolizę diocetanu heksano-1,2-diolu – estru zawierającego grupy acetylowe o różnej rzędowości.

### **Materiał i metody badań**

Proces hydrolizy prowadzono w obecności drożdży liofilizowanych (S. I. Lesaffre), drożdży prasowanych (Józefów) lub biomasy szczepu *Saccharomyces cerevisiae* 102 (wyhodowanego w Zakładzie Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności WTŻ SGGW), jako biokatalizatorów, w roztworze wodnym, w temp. 30°C przy stałym mieszanii.

Do hodowli wglębnej szczepu *Saccharomyces cerevisiae* 102 zastosowano płynne podłoże YPD o następującym składzie: 2% glukozy, 2% peptonu i 1% ekstraktu drożdżowego. Do przechowywania drożdży na skosach stosowano podłoże YPD z 2%

agarem. Wszystkie podłoża wyjałowiono w autoklawie w temp. 121°C przez 20 min, a ich pH ustalono na poziomie 5,0. Do przygotowania podłoży używano wody dejonizowanej.

Biomasę szczepu *Saccharomyces cerevisiae* 102 namnażano w podłożu YPD posiewanym materiałem komórkowym z hodowli na skosie (YPD z 2% agarem). Hodowle prowadzono w kolbach o poj. 500 cm<sup>3</sup>, zawierających 80 cm<sup>3</sup> podłoża, na wytrząsarce posuwisto-zwrotnej SM-30 Control (Edmund Bühler, Niemcy) o częstotliwości drgań 250 cykli na min, w temp. 28°C przez 48 godz. Zawartość kolb przenoszono do uprzednio zważonych gилz i wirowano przez 10 min przy 3500 obr./min (Centrifuge type MPW – 365, Polska). Supernatant zlewano z nad osadu, a odwirowane drożdże, po oznaczeniu suchej masy, używano do reakcji.

Diocjan heksano-1,2-diolu otrzymano w reakcji heksano-1,2-diolu (6,0 g, 0,05 moli) z nadmiarem bezwodnika octowego (15,5 g, 0,15 moli). Produkt z mieszaniny poreakcyjnej ekstrahowano chloroformem (3 x 50 cm<sup>3</sup>) i destylowano (temp. wrzenia 85°C, 2 mm Hg).

Reakcja hydrolizy: w kolbie okrągłodennej umieszczano 3,0 g drożdży (w przeliczeniu na suchą masę), 3,0 g sacharozy oraz 60 cm<sup>3</sup> wody. Zawiesinę mieszano mieszadłem magnetycznym przez 30 min w temp. 20 ± 2°C. Następnie dodawano 0,3 g (1,5 mmola) diocjanu heksano-1,2-diolu rozpuszczonego w niewielkiej ilości etanolu (0,5 cm<sup>3</sup>). Reakcje kontynuowano przez 9 godz., pobierając próbki do kontroli przebiegu reakcji w ciągu tego czasu. Z pobranych próbek diocjanu heksano-1,2-diolu i produkty jego hydrolizy ekstrahowano chloroformem (2 x 5 cm<sup>3</sup>). Reakcję prowadzono w dwóch wariantach: bez stabilizacji pH (wówczas pH mieszaniny reakcyjnej wynosiło około 4,5) i w buforze o pH 7. Próby wykonywano w dwukrotnym powtórzeniu, uzyskując porównywalne wyniki.

Próbki mieszaniny reakcyjnej analizowano przy użyciu chromatografu gazowego Shimadzu GG-171, wyposażonego w detektor płomieniowo-jonizacyjny. Zastosowano kolumnę kapilarną BPX 70. Rozdział chromatograficzny rejestrowano z użyciem programu CHROMAX 2005 w następujących warunkach: temp. 60°C przez 1 min, przyrost 10°/min do 200°C, 5 min w 200°C.

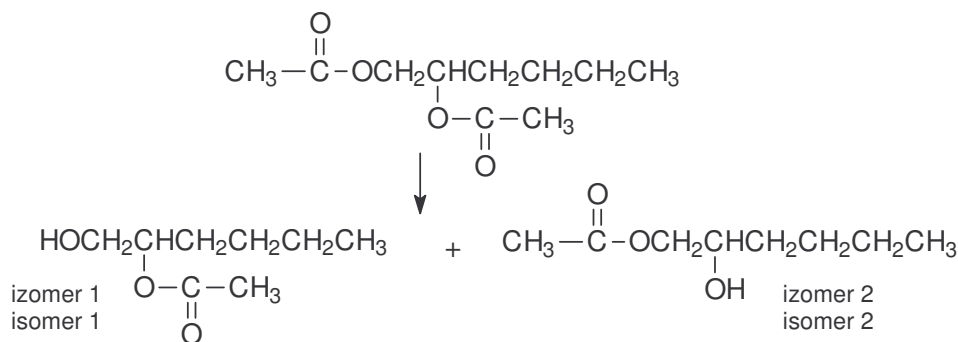
Produkty rozpadu estru analizowano metodą spektrometrii masowej, po uprzednim rozdziale w kolumnie chromatograficznej BPX 70, w warunkach 55°C przez 1 min, przyrost 4°/min do 220°C, 3 min w 220°C, w aparacie Shimadzu GCMS 2010. Na widmie masowym izomeru 1 zaobserwowano pik molekularny M=159 oraz następujące piki jonów fragmentacyjnych: m/z = 129, m/z = 117, m/z = 87, m/z = 74, m/z = 69. W przypadku izomeru 2 zaobserwowano: M = 159, m/z = 103, m/z = 87, m/z = 74, m/z = 69, a na widmie substratu zaobserwowano: M = 202, m/z = 129, m/z = 117, m/z = 100, m/z = 86, m/z = 82.

## Wyniki i dyskusja

Hydroliza dioctanu heksano-1,2-diolu w obecności drożdży piekarskich prowadziła do powstania dwóch monoocetanów, w zależności od tego czy hydrolizie uległa pierwszorzędowa (izomer 1) czy drugorzędowa grupa acetylowa (izomer 2) (rys. 2).

Postęp reakcji hydrolizy śledzono za pomocą chromatografii gazowej. Oznaczano jedynie względną zawartość dioctanu i monoocetanów, które w przeciwieństwie do stosunkowo dobrze rozpuszczalnego w wodzie heksano-1,2-diolu, ulegały całkowitej ekstrakcji chloroformem. Przykładowy chromatogram mieszaniny reakcyjnej przedstawiono na rys. 3. Poszczególne piki zidentyfikowano na podstawie ich widm masowych.

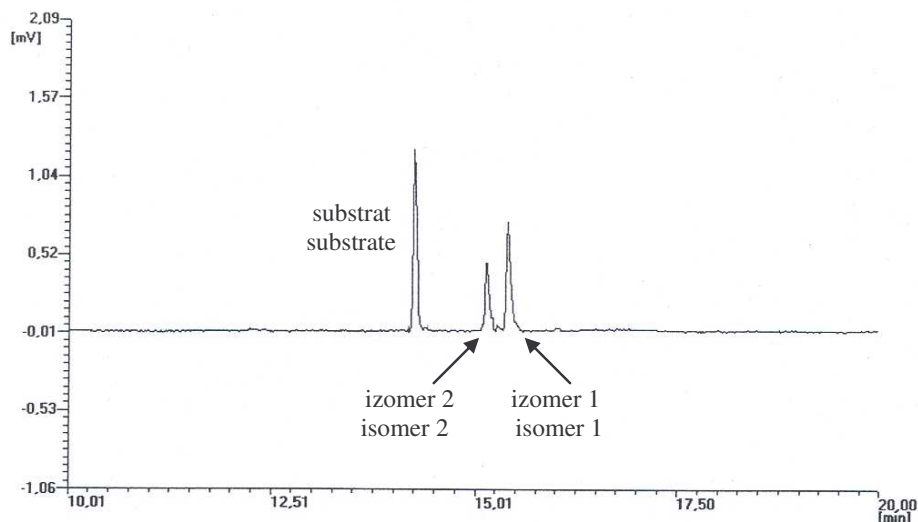
Wyniki kolejnych prób przedstawiono w tab. 1.



Rys. 2. Schemat hydrolizy dioctanu heksano-1,2-diolu.

Fig. 2. The scheme of hexane-1,2-diol diacetate hydrolysis.

We wszystkich przypadkach stwierdzono regioselektywny przebieg reakcji – hydroliza pierwszorzędowej grupy acetylowej zachodziła w przybliżeniu około dwukrotnie szybciej. Prawidłowość tę zaobserwowano także w przypadku reakcji prowadzonej w roztworze buforowym o pH = 7, przy czym stabilizacja pH w niewielkim stopniu zwiększała zarówno wydajność, jak i regioselektywność reakcji hydrolizy. Taki wpływ pH na przebieg reakcji hydrolizy enzymatycznej jest zgodny z ogólnym mechanizmem działania hydrolaz [4]. Nie stwierdzono natomiast istotnego wpływu rodzaju drożdży piekarskich ani na wydajność, ani na regioselektywność reakcji. Zatem w dalszych etapach pracy celowe będzie zastosowanie drożdży liofilizowanych, które w przeciwieństwie do pozostałych cechuje większa trwałość, co pozwala na osiągnięcie powtarzalnych i porównywalnych wyników.



Rys. 3. Chromatogram mieszaniny poreakcyjnej 1a po 4 godz.

Fig. 3. GC profile of the reaction mixture 1a after 4 hours.

Tabela 1

Zawartość izomerycznych monoacetyloheksanodioli w mieszaninie poreakcyjnej [%].  
The percentage of isomeric monoacetylhexanediols content in the reaction mixture.

1a	Drożdże liofilizowane Liofilized baker's yeast			
	Bez buforu Without buffer		Bufor pH 7 Buffer pH 7	
Czas reakcji [godz] Reaction time [h]	Izomer 1 Isomer 1	Izomer 2 Isomer 2	Izomer 1 Isomer 1	Izomer 2 Isomer 2
0,5	0,0	0,0	0,0	0,0
1	10,5	0,0	15,0	4,0
2	11,0	5,0	24,0	12,0
3	25,6	11,4	34,0	12,0
4	34,0	16,0	34,0	14,0
7	36,0	17,0	45,0	15,0
9	38,0	19,0	46,0	18,0

c.d. tab. 1

1b	Drożdże prasowane Fresh baker's yeast			
	Bez buforu Without buffer		Bufor pH 7 Buffer pH 7	
	Izomer 1 Isomer 1	Izomer 2 Isomer 2	Izomer 1 Isomer 1	Izomer 2 Isomer 2
0,5	2,0	3,0	0,0	0,0
1	10,0	8,0	4,0	3,0
2	15,0	12,0	13,0	7,0
3	16,0	17,0	27,0	13,0
4	26,0	18,0	28,0	20,0
7	41,0	19,0	35,0	25,0
9	44,0	21,0	43,0	26,0

1c	Szczep <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 102 The breeding strain <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 102			
	Bez buforu Without buffer		Bufor pH 7 Buffer pH 7	
	Izomer 1 Isomer 1	Izomer 2 Isomer 2	Izomer 1 Isomer 1	Izomer 2 Isomer 2
0,5	3,0	5,0	0,0	0,0
1	7,0	8,0	6,0	8,0
2	13,0	14,0	12,0	12,0
3	22,0	18,0	24,0	17,0
4	24,0	20,0	31,0	17,0
7	42,0	21,0	50,0	30,0
9	45,0	23,0	50,0	30,0

### Wnioski

1. Enzymy produkowane przez drożdże wykazują regioselektywność w stosunku do grup acetylowych o różnej rzędowości: estry alkoholi pierwszorzędowych są hydrolizowane w przybliżeniu dwukrotnie szybciej niż drugorzędowych.
2. Rodzaj użytych drożdży piekarskich nie ma znaczącego wpływu na szybkość hydrolizy estru.
3. Uzyskane wyniki stanowią podstawę do podjęcia badań nad wykorzystaniem enzymów hydrolitycznych wydzielanych przez drożdże w przemianach acylogliceroli.

### Literatura

- [1] Athenstaedt K., Daum G.: Tg14p and Tg15p, two triacylglycerol lipases of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* are localized to lipid particles. *J. Biol. Chem.*, 2005, **280**, 37301-37309.
- [2] Csuk R., Glanzer B.I.: Baker's yeast mediated transformations in organic chemistry. *Chem. Rev.*, 1991, 49-97.
- [3] Enzyme nomenclature. Academic Press, INC, ed. Webb. E. C. London 1984.
- [4] Faber K.: Biotransformations in organic chemistry, Springer Verlag, Berlin 2000.
- [5] Jaeger K.E., Dijkstra B.W., Reetz M.T.: Bacterial biocatalists: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Ann. Rev. Microbiol.*, 1999, **53**, 315-351.
- [6] Nurminen T., Suomalainen H.: The lipolytic activities of the isolated cell envelope fractions of baker's yeast. *Biochem. J.*, 1970, **118**, 759-763.
- [7] Sanchez M., Prim N., Randez-Gil F., Pastor J., Diaz P.: Engineering of baker's yeast, *E. coli* and *Bacillus* host for the production of *Bacillus subtilis* lipase A. *Biotechnol. Bioeng.*, 2002, **78** (3), 339-345.
- [8] Schousboe I.: Properties of triacylglycerol lipase in mitochondrial fraction from baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Biochim. Biophys. Acta.*, 1976, **450** (2), 165-74.
- [9] Servi S.: Enzymatic reactions in organic chemistry. Synthesis, 1990, pp. 1-25.
- [10] Walker G.M.: Yeast-physiology and biotechnology, ed. J. Wiley, Chichester, 1998,
- [11] Vakhlu J., Kour A.,: Yeast lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. *Elect. J. Biotechnol.*, 2006, **19**.

*Praca stanowi fragment badań wykonanych w ramach grantu uczelnianego nr 504 0927 0011 pt. „Biotransformacje z udziałem drożdży piekarskich”.*

## BAKER'S YEAST AS BIOCATALYST OF ESTERS HYDROLYSIS

### S u m m a r y

One of the methods of fats modifications is enzymatic interesterification, which uses lipolytic enzymes. Taking their complex isolation process into account, these enzymes are quite expensive and difficult to obtain. The employment of microorganisms, which release enzymes, may be the alternative solution to this problem, for example baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) could be possibly used. Baker's yeast are a great source of various enzymes, which may catalyze many chemical reactions.

The objective of this study was to carry out initial investigations, aiming at employing baker's yeast in triacylglycerols modifications. As a model reaction a hydrolysis of hexane-1,2-diol diacetate (an ester containing esters groups of different order) was chosen. The experiments were carried out in the presence of lyophilized and fresh baker's yeast as well as the breeding strain. The progress of the reactions was monitored by gas chromatography. It was proved that hydrolases released by baker's yeast showed positional specificity towards acetyl groups of different order – hydrolysis of primary group proceeded twice as fast. It may create practical opportunities for utilizing baker's yeast in triacylglycerols modifications. The variety of used yeast had not influenced on the speed of reaction.

**Key words:** baker's yeast, triacylglycerols, lipases, hydrolysis ☒