

GRAŻYNA KRASNOWSKA

OCENA WŁAŚCIWOŚCI PROTEOLITYCZNYCH PREPARATÓW ENZYMATYCZNYCH UZYSKANYCH Z RÓŻNYCH SZCZEPÓW DROŻDŻY *YARROWIA LIPOLYTICA*

Streszczenie

Przeprowadzone badania miały na celu porównanie aktywności hydrolitycznej preparatów enzymatycznych, otrzymanych z płynów pochodzących z dwóch szczepów drożdży *Yarrowia lipolytica* PII6a i A-101, oraz sprawdzenie możliwości ich zastosowania do prowadzenia hydrolizy skór wieprzowych. Preparaty enzymatyczne uzyskano z hodowli drożdży prowadzonych na dwóch podłożach, w których zastosowano różne źródła węgla (olej słonecznikowy lub glukozę). Stwierdzono niewielką aktywność kolagenolityczną wszystkich ocenianych preparatów enzymatycznych. Na podstawie oznaczeń ich aktywności proteolitycznej i lipolitycznej do prowadzenia hydrolizy skór wieprzowych wybrano preparaty otrzymane ze szczepu PII6a.

Efektywność hydrolizy enzymatycznej skór, wyrażona ilością uwalnianej hydroksyproliny, wolnych grup aminowych oraz białka, była największa przy zastosowaniu mieszaniny preparatów enzymów pochodzących z hodowli na obu podłożach. Ponadto poprzez odpowiedni dobór warunków prowadzenia procesu (temperatura, pH oraz rozdrobnienie surowca) można istotnie wpływać na jego wydajność. Przedstawione wyniki badań wskazują na celowość stosowania tego taniego źródła enzymów do degradacji białek skór wieprzowych.

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

Wprowadzenie

Wśród preparatów enzymatycznych stosowanych w technologii żywności największą grupę stanowią proteiny (ponad 60% wszystkich stosowanych preparatów), następnie amylazy (30%) i lipazy (3%). Wraz z rozwojem biotechnologii i upowszechnieniem się produkcji preparatów enzymatycznych pochodzenia mikrobiologicznego, koszty ich produkcji są coraz mniejsze, co stwarza sprzyjające

warunki do powszechnego ich stosowania w praktyce produkcyjnej [3, 6, 20].

Zastosowanie wyizolowanych enzymów w przetwórstwie mięsa ogranicza się obecnie do preparatów działających hydrolitycznie oraz transglutaminazy sieciującej białka. Preparaty enzymów proteolitycznych wykorzystuje się przede wszystkim do skruszania mięsa. Najpowszechniej do tego celu są stosowane preparaty pochodzenia roślinnego, takie jak: papaina, bromelaina i ficyna, preparaty pochodzenia mikrobiologicznego oraz preparaty enzymów proteolitycznych pochodzenia zwierzęcego. Enzymy roślinne degradują przede wszystkim białka tkanki łącznej – kolagen i elastynę, a tylko w nieznacznym stopniu działają na włókna mięśniowe, podczas gdy proteazy pochodzenia mikrobiologicznego oddziałują zwłaszcza na włókna mięśniowe, a tkankę łączną degradują tylko w pewnych warunkach [5, 8, 10, 19, 23].

Celem badań było porównanie aktywności hydrolitycznej preparatów enzymatycznych, otrzymanych z płynów pochodzących dwóch szczepów drożdży *Yarrowia lipolytica* PII6a i A-101 oraz sprawdzenie możliwości ich wykorzystania do prowadzenia hydrolizy skór wieprzowych.

Materiał i metody badań

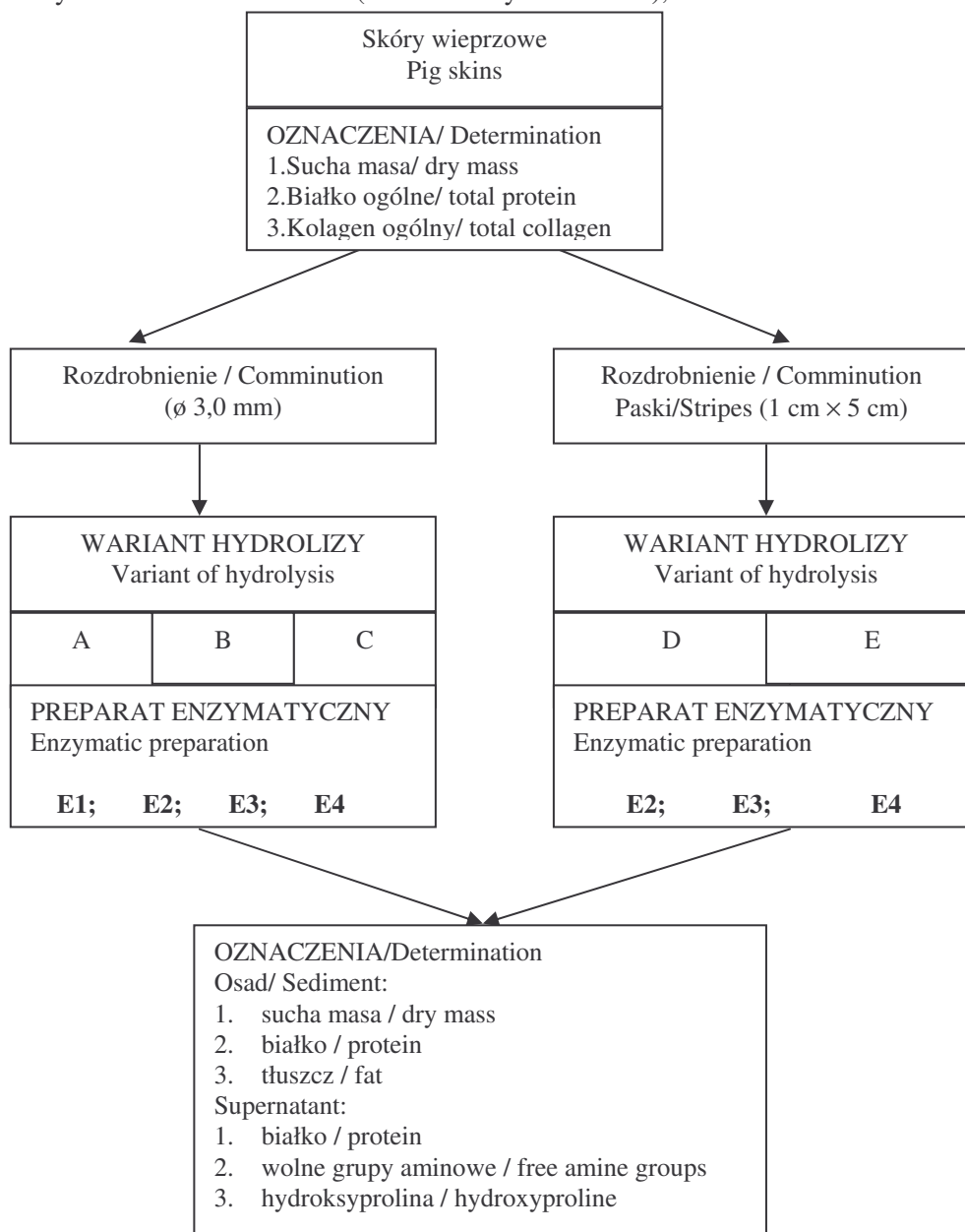
Szczepy drożdży pochodziły z kolekcji Katedry Biotechnologii Akademii Rolniczej we Wrocławiu. Zastosowane preparaty enzymatyczne uzyskano z hodowli wgłębnej drożdży *Yarrowia lipolytica* szczepów A-101 i PII6a. Gatunek ten jest jednym z gatunków drożdży wchodzących między innymi w skład dzikiej mikroflory występującej w serach, szczególnie pleśniowych i maziowych [7, 18, 24].

Hodowle ww. szczepów prowadzono wg metodyki podanej przez Gdulę i wsp. [7], a w podłożach jako źródło węgla zastosowano glukozę (PG) lub olej słonecznikowy (PO). W otrzymanych preparatach enzymatycznych, po ich odwirowaniu lub dodatkowym podczyszczeniu, zbadano aktywność proteolityczną wobec takich substratów białkowych, jak: kazeina (Serva), żelatyna (Serva) i hemoglobina (preparat przygotowany laboratoryjnie z krwi wołowej). Aktywność oznaczano spektrofotometrycznie po inkubacji, w temp. 35°C przez 1 h, substratu z preparatem enzymatycznym w buforze fosforanowo-cytrynianowym [4, 12, 14]. W przypadku obu szczepów przeprowadzono również ocenę aktywności lipolitycznej w teście płytkowym wobec 1% trójbutyryny, w którym określano średnicę stref przejaśnienia [7].

W drugim etapie badań, do doświadczeń wybrano preparat enzymatyczny otrzymany ze szczepu PII6a (uzasadnienie zawarto w rozdz. *Wyniki i dyskusja*).

Zastosowano 4 modelowe preparaty uzyskane w różnych warunkach hodowli drożdży i o różnym stopniu oczyszczenia, wprowadzając następujące ich oznaczenia:

- **E1** – preparat enzymatyczny otrzymany z płynów pochodzących szczepu PII6a drożdży *Yarrowia lipolytica*, hodowanego na podłożu z dodatkiem oleju, poddany oczyszczaniu w AMICONIE (rozcieńczony 30–krotnie),



Rys. 1. Schemat doświadczenia.

Fig. 1. Flowchart of experiment's conduct.

- **E2** – preparat enzymatyczny otrzymany z płynów pohodowlanych szczepu PII6a drożdży *Yarrowia lipolytica*, hodowanego na podłożu z dodatkiem oleju, poddany wirowaniu przy 10000 obr./min (rozcieńczony 20-krotnie),
- **E3** – preparat enzymatyczny otrzymany z płynów pohodowlanych szczepu PII6a drożdży *Yarrowia lipolytica*, hodowanego na podłożu z dodatkiem glukozy, poddany wirowaniu przy 10000 obr./min (rozcieńczony 20-krotnie),
- **E4** – mieszanina preparatów enzymatycznych E2 i E3 (1:1).

Tak przygotowane preparaty poddano oznaczeniom aktywności w zakresie pH 3 - 8, w celu określenia optymalnych warunków działania oraz porównania aktywności preparatów różniących się metodą podczyszczania.

Druga część doświadczenia dotyczyła oceny procesu hydrolizy enzymatyczno-kwasowej skór wieprzowych o różnym stopniu rozdrobnienia. Materiał ten uzyskano z partii bocznych skór świń rasy Pietrain i po oczyszczeniu z przylegającej tkanki tłuszczowej rozdrabniano w wilku laboratoryjnym lub krojono w paski o wymiarach 1 x 5 cm. W próbach skór oznaczano zawartość: suchej masy [16], białka ogółem [17] i kolagenu [1]. Hydrolizę prowadzono z zastosowaniem ww. preparatów enzymatycznych w buforze fosforanowo-cytrynianowym o pH = 3,0 metodą zalewową, zachowując proporcje preparatu enzymatycznego do skór jak 1:1. W tym etapie badań przeprowadzono 5 wariantów hydrolizy skór w 5 seriach, które oznaczono w następujący sposób:

- **A** – hydroliza skór rozdrobnionych w wilku laboratoryjnym (Ø 3 mm) – 8 h w temp. 20°C,
- **B** – hydroliza skór rozdrobnionych w wilku laboratoryjnym (Ø 3 mm) – 8 h w temp. 20°C, a następnie przez 16 h w temp. 4°C,
- **C** – hydroliza skór rozdrobnionych w wilku laboratoryjnym (Ø 3 mm) – 24 h w temp. 4°C,
- **D** – hydroliza skór ciętych w paski o wymiarach ok. 1x5 cm – 8 h w temp. 20°C,
- **E** – hydroliza skór ciętych w paski o wymiarach ok. 1x5 cm – 24 h w temp. 20°C.

Ocenę efektywności degradacji enzymatyczno-kwasowej prowadzono w oparciu o analizę przyrostu zawartości wolnej hydroksyproliny [1], wolnych grup aminowych [11, 22] i zmian zawartości białka [13] w roztworach po hydrolizie oraz zmian zawartości suchej masy, białka ogółem w skórkach po degradacji.

Wyniki badań poddano analizie statystycznej stosując dwuczynnikową analizę wariancji. Obliczeń dokonano za pomocą programu STATISTICA 5.1.

Schemat układu doświadczenia przedstawiono na rys. 1.

Wyniki i dyskusja

*Ocena aktywności preparatów enzymatycznych otrzymanych z hodowli drożdży *Yarrowia lipolytica* szczepów PII6a i A-101*

Aktywność proteolityczną preparatów przedstawiono w tab. 1

W przypadku szczepu A-101, wyższą aktywność wobec hemoglobiny wykazał preparat uzyskany z płynu pohodowlanego, w którym źródłem węgla dla drobnoustrojów był olej słonecznikowy. Osiągnęła ona wartość 54 j.a./cm³ preparatu. Natomiast preparat enzymatyczny pochodzący z hodowli szczepu PII6a charakteryzował się dużo wyższą aktywnością hydrolityczną wobec tego substratu. Przy czym należy zaznaczyć, że zmiana źródła węgla w podłożu hodowlanym miała bardzo istotny wpływ na tę aktywność, która kształtowała się na poziomie 72,0 j.a./cm³ w przypadku podłoża PO i 194,0 j.a./cm³ przy zastosowaniu podłoża PG. Kazeina natomiast okazała się substratem, wobec którego wyższą aktywnością cechowały się preparaty enzymatyczne z hodowli na podłożu z dodatkiem oleju jako źródła węgla. W przypadku tego substratu również aktywność preparatu ze szczepu PII6a była wyższa (26 i 114 j.a./cm³ odpowiednio z hodowli na podłożu PG i PO) w stosunku do aktywności preparatu pochodzącego z hodowli szczepu A-101, gdzie analogiczne wartości oznaczono na poziomie 6,65 i 42,0 j.a./cm³. W płynach pohodowlanych obu szczepów nie stwierdzono aktywności proteolitycznej wobec żelatyny w środowisku o pH=3,0, natomiast przy pH=6,0 preparaty wykazywały niską aktywność wobec tego białka. Wiadomo, że wszystkie enzymy nieswoiste działają wyłącznie na niehelikalne końce łańcuchów cząsteczek kolagenu, a działanie tych enzymów dotyczy głównie innych białek towarzyszących kolagenowi [2, 9, 15].

Tabela 1

Aktywność preparatów enzymatycznych.
Activity of enzymatic preparations.

Substrat Substrate	pH	Rodzaj preparatu enzymatycznego Type of enzymatic preparation							
		A - 101				PII6a			
		PG		PO		PG		PO	
		[j.a./cm ³] [u.a./cm ³]	[j.a./mg białka] [u.a./mg protein]	[j.a./cm ³] [u.a./cm ³]	[j.a./mg białka] [u.a./mg protein]	[j.a./cm ³] [u.a./cm ³]	[j.a./mg białka] [u.a./mg protein]	[j.a./cm ³] [u.a./cm ³]	[j.a./mg białka] [u.a./mg protein]
Hemoglobina Hemoglobin	3,0	16,80	22,40	54,00	40,06	194,00	90,36	72,00	71,50
Kazeina	6,0	6,65	8,87	42,00	31,16	26,00	12,11	114,00	113,21

Casein									
Żelatyna	3,0	0,00	0,00	0,00	0,00	4,00	1,86	0,00	0,00
Gelatin	6,0	1,20	1,60	18,00	13,35	44,00	20,49	16,00	15,89

PG – podłoże hodowlane z glukozą / culture medium with glucose;

PO – podłoże hodowlane z olejem słonecznikowym / culture medium with oil.

W teście, w którym oceniano aktywność lipolityczną preparatów enzymatycznych, wykazano wyższą efektywność preparatów ze szczepu PII6a, gdyż obszary przejaśnienia osiągnęły średnicę w przedziałach 12–15 mm, podczas gdy w przypadku szczepu A101 tylko w granicach 4–6 mm.

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że preparaty ze szczepu PII6a charakteryzowały się wyższą aktywnością specyficzną wobec hemoglobiny i kazeiny oraz wyższą aktywnością lipolityczną niż preparaty enzymów uzyskane ze szczepu A-101. Dlatego do przeprowadzenia hydrolizy skór wieprzowych w planowanym doświadczeniu wybrano preparat enzymatyczny otrzymany z płynu pohodowlanego szczepu PII6a. Sporządzone z niego modelowe preparaty enzymatyczne poddano oznaczeniom aktywności w szerszym zakresie pH, a uzyskane wyniki przedstawiono w tab. 2.

Tabela 2

Aktywność proteolityczna preparatów enzymatycznych otrzymanych ze szczepu PII6a drożdży *Yarrowia lipolytica*.

Proteolytic activity of enzymatic preparations obtained from the PII6a strain of *Yarrowia lipolytica* yeast.

Substrat Substrate	pH	Rodzaj preparatu enzymatycznego Type of enzymatic preparation							
		E1		E2		E3		E4	
		[j.a./cm ³] [u.a./cm ³]	[j.a./mg białka] [u.a./mg protein]	[j.a./cm ³] [u.a./cm ³]	[j.a./mg białka] [u.a./mg protein]	[j.a./cm ³] [u.a./cm ³]	[j.a./mg białka] [u.a./mg protein]	[j.a./cm ³] [u.a./cm ³]	[j.a./mg białka] [u.a./mg protein]
Hemoglobina Hemoglobin	3,0	2117	1570	2107	2092	1973	919	4517	1002
	4,0	1233	915	-	-	-	-	2167	481
	5,0	783	581	-	-	-	-	533	118
Kazeina Casein	6,0	250	186	264	288	211	111	433	96
	8,0	100	74	-	-	-	-	300	63
Kolagen Collagen	5,0	0	0,00	-	-	-	-	0	0,00

Aktywność specyficzną ocenianych preparatów enzymatycznych wobec hemoglobiny wzrastała wraz z obniżeniem pH środowiska i najwyższe wartości zanotowano przy pH = 3,0 w przypadku preparatu E1 i E2, czyli pochodzących z

hodowli drożdży na podłożu z olejem. Kazeina również okazała się substratem najbardziej podatnym na działanie enzymów E1 i E2, podobnie przy obniżaniu pH ich aktywność wzrastała. Ponadto potwierdzono brak aktywności hydrolitycznej wobec żelatyny. Preparaty enzymatyczne z drożdży hodowanych na podłożu z glukozą (PG) zawierały ponad dwukrotnie więcej białka enzymatycznego niż preparat uzyskany z podłoża z olejem (PO), co potwierdza, że organizmy te lepiej rosną w środowisku z cukrami prostymi [24].

Ocena stopnia degradacji skór wieprzowych poddanych działaniu preparatów enzymatycznych

Wyniki oznaczeń zawartości białka, wolnych grup aminowych i hydroksyproliny w roztworach po hydrolizie przedstawiono w tab. 3.

Tabela 3

Charakterystyka roztworów po hydrolizie skór wieprzowych.
Profiles of solutions after the hydrolysis of pigskins.

A. Po degradacji skór rozdrobnionych w wilku.

A. After comminuting pigskins in a grinder.

Zmienna zależna Dependent variable	Wariant hydrolizy Variant of hydrolysis	Rodzaj preparatu enzymatycznego Type of enzymatic preparation			
		E1	E2	E3	E4
Białko ogółem Total protein [µg]	A	751,31a	606,90bc	620,9b	721,75a
	B	648,71b	560,27cd	519,71cd	667,81ab
	C	422,33d	376,66d	513,16cd	462,80cd
Grupy aminowe Amine groups [µg Gly]	A	32,92a	25,45b	26,79b	34,09a
	B	28,34b	28,06b	29,18ab	33,96a
	C	19,51c	20,40c	19,72c	19,57c
Hydroksyprolina Hydroxyproline [µg]	A	1,91d	2,37ab	2,54a	1,95cd
	B	1,80d	2,13abc	2,46a	1,87d
	C	2,18abc	2,34ab	2,47a	1,55e

B. Po degradacji skór pokrojonych w paski.

B. After the degradation of pigskins cut in strips.

Zmienna zależna Dependent variable	Wariant hydrolizy Variant of hydrolysis	Rodzaj preparatu enzymatycznego Type of enzymatic preparation		
		E2	E3	E4
Białko ogółem Total protein [µg]	D	99,16d	145,00c	152,03c
	E	307,20b	294,20b	347,23a

Grupy aminowe Amine groups [µg Gly]	D	18,73e	21,48d	25,28c
	E	31,10b	32,88a	34,23a
Hydroksypolina Hydroxyproline [µg]	D	0,68de	0,72d	0,84b
	E	0,76c	0,78c	0,90a

Jednakowe litery dla każdej zmiennej zależnej oznaczają grupy jednorodne dla zmiennych niezależnych (rodzaj preparatu enzymatycznego i wariant hydrolizy);

The same letters used with each individual dependant variable designate homogenous groups for independent variables (type of enzymatic preparation and variant of hydrolysis).

Porównując efektywność degradacji skór poddanych działaniu enzymów doświadczalnych należy zauważyć, że poziom przyrostu białka i wolnych grup aminowych w roztworach był zawsze najintensywniejszy w przypadku zastosowania enzymu E1, czyli uzyskanego z hodowli na podłożu z olejem i oczyszczonego w Amiconie. W następnej kolejności wysoką aktywnością hydrolityczną wobec doświadczalnego surowca charakteryzował się enzym E4, będący mieszaniną preparatów uzyskanych z hodowli na obu podłożach (PO i PG). Natomiast preparaty E2 i E3 zastosowane osobno degradowały skóry w mniejszym stopniu i na porównywalnym poziomie. Odmiennie kształtowała się aktywność ocenianych preparatów wobec białek kolagenowych skór, gdzie preparaty E2 i E3 uwalniały największą ilość hydroksypoliny. Oceniając efektywność przyjętych w tym etapie badań wariantów hydrolizy należy podkreślić, że degradacja skór wieprzowych przebiegała najintensywniej podczas hydrolizy enzymatycznej prowadzonej w wyższej temperaturze (wariant A). Wydłużanie czasu trwania procesu poprzez prowadzenie hydrolizy kwasowej (wariant B), jak również wydłużanie czasu hydrolizy enzymatycznej przy jednoczesnym obniżeniu temperatury (wariant C), nie przyczyniło się do wzrostu degradacji białek skór. Analiza statystyczna wyników dowiodła, że zróżnicowane parametry procesu degradacji skór nie wpłynęły na aktywność kolagenolityczną poszczególnych preparatów (E1, E2, E3, E4). Była ona na zbliżonym poziomie w każdym z wariantów hydrolizy. Natomiast wykazano istotne różnice w aktywności proteolitycznej preparatów, wyrażonej ilością przyrostów białka i wolnych grup aminowych w roztworach, przy zróżnicowaniu warunków prowadzonego procesu.

W związku z brakiem oczekiwanej poprawy efektywności hydrolizy białek skór poprzez wprowadzenie hydrolizy kwasowej, w drugiej części doświadczenia, w której surowiec rozdrobniono w paski 1 x 5 cm, zastosowano tylko hydrolizę enzymatyczną prowadzoną w temperaturze 20°C w ciągu 8 i 24 h. Wydłużenie procesu przyniosło oczekiwany, istotny statystycznie, przyrost poziomu zawartości białka, hydroksypoliny i wolnych grup aminowych w roztworach. Ponadto nie stwierdzono istotnych różnic w zdolnościach hydrolitycznych porównywanych preparatów

enzymatycznych, chociaż wyższe wartości notowano przy zastosowaniu preparatów E4 i E3 (tab. 3). Poziom degradacji białek prób w tych wariantach hydrolizy (D i E) był istotnie niższy niż w przypadku skór bardziej rozdrobnionych (warianty hydrolizy A, B lub C).

Oznaczenia zawartości białka ogółem i kolagenu w skórach pozostałych po hydrolizie potwierdziły zmiany ilości tych składników wynikające z przejścia do roztworu (tab. 4).

Ekstrakcja białek z surowca była wynikiem nie tylko działania preparatu enzymatycznego, ale również buforu, w którym prowadzona była hydroliza skór. Wiadomo, że zastosowanie kwasów i buforów pozwala na rozpuszczenie mniej usieciowanych fragmentów kolagenu, a stwierdzona niska aktywność kolagenolityczna doświadczalnych preparatów enzymatycznych wskazuje bardziej na wpływ stosowanego buforu fosforanowo-cytrynianowego na ekstrakcję hydroksyproliny z surowca [2, 9, 21].

Tabela 4

Skład chemiczny skór wieprzowych.
Chemical composition of pigskins.

Parametr Parameter [%]	Skóra surowa Raw pigskin	Preparat enzymatyczny Enzymatic preparation	Skóry po hydrolizie Pigskins after hydrolysis				
			A	B	C	D	E
Białko Protein	30,18	E1	10,23	11,88	12,76	-	-
		E2	10,89	11,67	11,10	22,31	21,99
		E3	9,87	11,19	11,19	22,52	22,43
		E4	10,06	11,47	11,47	22,87	22,22
Kolagen Collagen	19,04	E1	6,57	7,63	8,25	-	-
		E2	7,31	7,75	7,44	15,81	15,65
		E3	6,66	7,18	7,75	15,97	15,48
		E4	7,14	7,01	7,56	15,53	15,06
Sucha masa Dry mass	37,10	E1	12,66	14,62	15,16	-	-
		E2	13,58	14,51	14,63	33,25	32,96
		E3	12,77	13,98	14,25	33,51	33,45
		E4	12,89	14,23	14,98	33,48	33,45

Wnioski

1. Preparaty enzymatyczne otrzymane z płynów pochodzących z szczepu PII6a charakteryzują się wyższą aktywnością proteolityczną i lipolityczną od uzyskanych ze szczepu A-101.
2. Aktywność kolagenolityczna doświadczalnych preparatów enzymatycznych jest nieznaczna.
3. Najwyższą aktywność proteolityczną wobec białek skór wieprzowych wykazuje preparat enzymatyczny E4 będący mieszaniną preparatów otrzymanych ze szczepu PII6a, z których jeden wyhodowano na podłożu z glukozą (E3), a drugi na podłożu z olejem słonecznikowym (E2).
4. Efektywność hydrolizy skór wieprzowych można istotnie poprawić poprzez technologiczne modyfikacje prowadzenia procesu (stopień rozdrobnienia surowca, czas i temperatura).

Praca wykonana w ramach grantu KBN 5 P06G 028 19.

Literatura

- [1] A.O.A.C.: Official Methods of Analysis 15th Edition: 1st Supplement, Hydroxyproline in Meat and Meat Products, 1990, pp. 36-37.
- [2] Bailey A., J., Light N., D.: Connective tissue in meat and meat products. Elsev. Appl. Sci., London 1989.
- [3] Bednarski W.: Enzymatyczna modyfikacja składników żywności. W: Biotechnologia żywności, pod red. W. Bednarskiego i A. Repsa. WNT, Warszawa 2001, s. 376-397.
- [4] Bichodka M.J., Khachatourians G.G.: Purification and properties of an extra-cellular proteinase produced by entomopathogenic fungi. Appl. Environ. Microbiol., 1987, **7**, 1679-1684.
- [5] Buckenhüskes H., J.: Enzyme in der Fleischverarbeitung. Fleischwirts., 2000, **3**, 29-33.
- [6] Frokjaer S.: Use of hydrolysates for protein supplementation. Food Technol., 1994, **10**, 86-88.
- [7] Gdula A., Skiba A., Chrzanowska J., Wojtatowicz M.: *Yarrowia lipolytica* – jej aktywność hydrolityczna i potencjalny udział w procesie dojrzewania serów. Mat. Konf. XXIX Sesji Nauk. KTiChŻ PAN, Olsztyn, 1998, s. 207.
- [8] Kalinowska H., Bielecki S., Turkiewicz M.: Enzymy nowej generacji w produkcji żywności. Cz. I. Przem Spoż., 2000, **10**, 3-5.
- [9] 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.
- [10] Krasnowska G.: Kolagen – właściwości i znaczenie technologiczne. Zesz. Nauk. AR we Wrocławiu, 1998, **328**, 137-147.
- [11] Kuchroo C.V., Ramilly I.P., Fox P.F.: Assessment of proteolysis in cheese by reaction with trinitrobenzenesulphonic acid. J. Food Technol., 1983, **7**, 129-133.
- [12] Leger R.J., Cooper R.M., Charnley A.K.: Cuticle-degradation enzymes of entomopathogenic fungi. Cuticle degradation in vitro by enzymes from entomopathogen. J. Invertebr. Pathol., 1986, **47**, 167-177.
- [13] Mejbaum-Katzenellenbogen W., Mochnacka I.: Kurs praktyczny biochemii. PWN, Warszawa 1968.

- [14] Morihara K., Tsuzuki H.: Elastolytic properties of various proteinases from microbiologic origin. Arch. Biochem. Biophys., 1967, **120**, 68-78.
- [15] Powell T.H., Hunt M.C., Dickeman M.E.: Enzymatic assay to determine collagen thermal denaturation and solubilization. Meat Sci., 2000, **54**, 307-311.
- [16] PN-ISO 1442:2000. Mięso i przetwory mięsne. - Oznaczanie zawartości wody (metoda odwoławcza).
- [17] PN-75/A-04018. Produkty rolno-żywnościowe. Oznaczanie azotu metodą Kiejdahla i przeliczanie na białko.
- [18] Robak M.: Studia nad wykorzystaniem octanu i wydzielaniem cytrynianu przez drożdże *Yarrowia lipolytica*. Zesz. Nauk. AR, Rozprawy, Wrocław 2002, 442.
- [19] 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.
- [20] Sawicka – Żukowska R.: Zastosowanie preparatów enzymatycznych w przemyśle rolno-spożywczym. Przem. Spoż., 1998, **3**, 19-22.
- [21] Sikorski Z.E.: Charakterystyka białek głównych surowców żywnościowych. W: Chemia żywności, pod red. Z.E. Sikorskiego, WNT, Warszawa 2002, 304-333.
- [22] Snyder S. L., Sobociński P.Z.: An improved 2,4,6-trinitrobenzosulphonic acid method for determination of amines. Analys. Bioch., 1975, **64**, 285-288.
- [23] Warchalewski J.R.: Zastosowanie enzymów w produkcji żywności na przełomie wieków. Przem. Spoż., 2001, **8**, 40-44.
- [24] 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.

PROTEOLYTIC QUALITIES OF ENZYMATIC PREPARATIONS OBTAINED FROM VARIOUS STRAINS OF THE *YARROWIA LIPOLYTICA* YEAST

S u m m a r y

The objective of the investigations was to compare the hydrolytic activity of enzymatic preparations obtained from post-culture fluids of two yeast strains: *Yarrowia lipolytica* PII6a and A-101, and to test the possibility of using them in the hydrolysis of pigskins. The enzymatic preparations were obtained from the yeast cultured in media with two different sources of carbon (oil or glucose). It was stated that the collagenolytic activity of all enzymatic preparations investigated was low. Their proteolytic and lipolytic activity was determined, and, on this basis, the preparations obtained from the PII6a strain were selected for the hydrolysis of pigskins. The efficiency of enzymatic hydrolysis of pigskins, expressed as an amount of: released hydroxyproline, free amine groups, and protein, was the highest in the case of applying a mixture of enzymatic preparations obtained from the cultures developed in the two media as indicated above. Moreover, it was stated that the appropriate selection of the fitting process conditions (temperature, pH, and raw material comminution) might significantly enhance the process efficiency. The results of the investigations performed confirm that this inexpensive source of enzymes could be widely used for the degradation of proteins in pigskins.

Key words: proteolytic enzymes, collagenolytic activity, enzymatic hydrolysis, pigskins 