

ACTA SCIENTIARUM POLONORUM

Czasopismo naukowe założone w 2001 roku przez polskie uczelnie rolnicze

Biotechnologia

Biotechnologia

Biotechnology

10 (1) 2011



Bydgoszcz Kraków Lublin Olsztyn
Poznań Siedlce Szczecin Warszawa Wrocław

Executive Board of *Acta Scientiarum Polonorum*

Jerzy Sobota (Wrocław) – chairman

Wiesław Nagórko (Warszawa), Janusz Falkowski (Olsztyn), Florian Gambuś (Kraków),
Franciszek Kluza (Lublin), Janusz Prusiński (Bydgoszcz), Stanisław Socha (Siedlce),
Waldemar Uchman (Poznań), Bogdan Lasota (Szczecin)

Scientific Board of *Biotechnology*

Danuta Witkowska – (Wrocław University of Environmental and Life Sciences, Poland) – chairman
e-mail: danuta.witkowska@up.wroc.pl

Włodzimierz Bednarski (University of Warmia and Mazury, Olsztyn, Poland),
Włodzimierz Grajek (Poznań University of Life Sciences, Poland), Anna Maraz (Corvinus
University Budapest, Hungary), Zdzisław Targoński (Lublin University of Life Science, Poland)
Vesna Zechner-Krpan (University of Zagreb, Croatia)

Covered by: Agro, Ulrich's Database, Copernicus Index, EBSCOhost

ISSN 1644–065X (print) ISSN 2083–8654 (on-line)

Print edition is an original (reference) edition

Cover design
Daniel Morzyński

Text editor
Ewa Jaworska, e-mail: ewa.jaworska@up.wroc.pl

© Copyright by Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
Sopocka 23, 50-344 Wrocław, Poland
e-mail: wyd@up.wroc.pl <http://www.up.wroc.pl>

Printed: 150 + 16 copies Publishing sheets: 2,5 Printing sheets: 2,5

Szanowni Państwo,

Przekazujemy Państwu kolejny zeszyt ACTA SCIENTARUM POLONORUM serii Biotechnologia, czasopisma naukowego wydawanego przez wszystkie polskie uczelnie rolnicze i przyrodnicze w 14 seriach. Seria Biotechnologia ukazuje się nakładem Wydawnictwa Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu od 2002 roku.

Czasopismo nasze publikuje oryginalne prace z zakresu biotechnologii drobnoustrojów, roślin i zwierząt, z naciskiem na aspekty praktyczne. Publikowane są oryginalne prace badawcze a także artykuły o charakterze monograficznym, w języku polskim lub angielskim ze streszczeniami w obu językach. Wszystkie opisy rysunków i tabel są dwujęzyczne. Prace są recenzowane przez najlepszych specjalistów z danej dziedziny.

Od 2007 roku czasopismo wydawane jest jako kwartalnik. Wymogi redakcyjne oraz szczegóły dotyczące przygotowania artykułu można znaleźć na stronie www.acta.media.pl

Zespół Redakcyjny

Dear Readers,

It is great pleasure to introduce you the next issue of ACTA SCIENTARUM POLONORUM Biotechnologia, a scientific journal published by all polish universities of environmental sciences. The series of Biotechnologia is released by publishing house of Wroclaw University of Environmental and Life Sciences since 2002.

The journal publishes original papers in the field of biotechnology of microorganisms, plants and animals with emphasis on practical aspects. There are published both original research articles and monographs, in Polish or English, with abstracts in both languages. The all figures' and tables' captions are bilingual. The papers are reviewed by the best specialists in the field. This issue is also dominated by the application problems.

Since 2007 the journal has been published as quarterly. The editorial requirements and details concerning the instruction for authors can be found et: www.media.pl.

Editorial Team

IZOLACJA, IDENTYFIKACJA ORAZ AKTYWNOŚĆ PROTEOLITYCZNA I LIPOLITYCZNA MIKROORGANIZMÓW ARKTYCZNYCH

Anna Krasowska, Marcin Łukaszewicz

Uniwersytet Wrocławski

Streszczenie. Szesnaście szczepów bakterii wyizolowanych z próbek wody i gleby ze Spitsbergenu (Arktyka) zidentyfikowano do gatunku na podstawie sekwencjonowania pojedynczej 16S rRNA. Trzydzieści szczepów określono jako *Pseudomonas fluorescens*, a trzy jako *Pseudomonas syringae*. Przebadano aktywności proteolityczne i lipolityczne oznaczonych szczepów. Aktywność proteolityczną wykazywały wszystkie badane mikroorganizmy i wahała się ona od 58,5 do 139,6 U/ml. Aktywność lipolityczną wykazywało tylko sześć bakterii, przy czym lipazy trzech z tych szczepów (BD1, BD5 oraz BD25) rozkładały ester sorbitolu (Tween 80), a lipazy z dwóch mikroorganizmów (BD22 i BD30) rozkładały palmitnian p-nitrofenolu. Tylko szczep BD3 wydzieliał lipazy aktywne w obydwóch stosowanych testach.

Słowa kluczowe: *Pseudomonas*, proteaza, lipaza

WSTĘP

Znane i powszechne w użyciu proteazy, takie jak na przykład papaina, znajdują zastosowanie między innymi w przemyśle spożywczym [Diaz i in. 1996, Ashie i in. 2002]. O zapotrzebowaniu na proteazy świadczy fakt, że produkcja tego enzymu sięga 400 megaton dla rynku amerykańskiego i 50 megaton dla rynku japońskiego rocznie [Agribusiness Development Centre 2000].

W środowiskach, w których panują ekstremalne warunki temperaturowe, zasolenia, zakwaszenia itp., często żyją mikroorganizmy o odmiennej budowie i unikalnym metabolizmie wynikającym z adaptacyjnej ewolucji. Takie drobnoustroje mogą wydzielać enzymy o specyficznych właściwościach, na przykład aktywnych w wysokich lub niskich temperaturach lub w pH o skrajnych wartościach.

Enzymy pochodzące z bakterii psychrofilnych i psychrotolerancyjnych znajdują szerokie zastosowanie w medycynie, biotechnologii, ochronie środowiska i w przemyśle

spożywczym [Russell 1998]. Najczęściej wykorzystywane enzymy to proteazy oraz lipazy. Wiele reakcji zachodzić może w temperaturze niższej niż optimum działania enzymów mezofilnych. Elastyczność „zimnych” enzymów sprawia, że są one w stanie katalizować przemiany chemiczne, np. w rozpuszczalnikach organicznych powszechnie używanych w przemyśle [Aehle 2004]. Lipaza izolowana z *Candida antarctica* jest używana jako katalizator wielu reakcji zachodzących w rozpuszczalnikach organicznych [Anderson i in. 1998, Bélafi-Bakó i in. 2002].

Lipazy i proteazy wykorzystywane są także do produkcji serów, a także wraz z celulazami i amylazami dodawane są do detergentów. Obecnie dostępne są już proszki do prania, które dzięki zawartości „zimnych” proteaz skutecznie usuwają zabrudzenia już w 30°C [Georgette i in. 2004]. Ponadto proteazy to jeden ze składników płynów do odkazania i przechowywania soczewek kontaktowych [Wilcox i Holden 2001]; enzymy te dodaje się również do mięsa w celu jego zmiękczenia [Koothmarai 1996].

Przedmiotem niniejszej pracy było zidentyfikowanie szczepów bakterii arktycznych wyizolowanych z próbek wody i gleby Spitsbergenu, a także oznaczenie ich właściwości proteolitycznych i lipolitycznych.

MATERIAŁY I METODY

Identyfikacja szczepów

Próbki wody i gleby wysiewano na podłoża YPD (Yeast extract 1%, Bacto pepton 1%, glukoza 2%, agar-agar 2%, Difco) i hodowano w temp. 30°C przez 24 godziny. Uzyskano 132 morfologicznie różne kolonie, które scharakteryzowano biochemicznie za pomocą testów API: Api 20 E, Api 10 S, Api Coryne, Api Staph (BioMerieux). Do dalszych identyfikacji wybrano 16 szczepów wydzielających do podłoża enzymy, w przypadku których odczytano różne wyniki w testach API.

Z każdego badanego szczepu wyizolowano genomowy DNA, na matrycy którego w reakcji PCR namnożono fragment kodujący podjednostkę 16S rRNA (najbardziej konserwatywny odcinek genomu bakterii) o długości około 1400 pz. Wynik pozytywny reakcji PCR uzyskano u wszystkich badanych mikroorganizmów.

W celu ostatecznej identyfikacji mikroorganizmów namnożone fragmenty DNA zsekwenjonowano (firma GENOMED). W przypadku trzech badanych mikroorganizmów (BD2, BD23 i BD33) uzyskane sekwencje okazały się zbyt krótkie do analizy. Pozostałe uzyskane sekwencje porównano z sekwencjami znajdującymi się w bazie danych serwisu NCBI- National Center for Biotechnology Information [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>], przy pomocy narzędzia BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Tab. 2).

Analiza filogenetyczna szczepów

Drzewo filogenetyczne badanych szczepów sporządzono w programach VNTI Vector, Clustal X oraz MEGA 3.1.

Aktywność proteolityczna szczepów na podłożu stałym

Szczepy hodowano na podłożu stałym (agarze technicznym 2%) z dodatkiem 10% mleka w temperaturze 28°C przez 72 godziny. Po 24, 48 oraz 72 godzinach sprawdzano obecność i rozmiar przejaśnionej strefy wokół wysianych mikroorganizmów.

Aktywność proteolityczna szczepów w teście enzymatycznym z użyciem kazeiny

Hodowle mikroorganizmów prowadzono w podłożu płynnym (10% mleko) w 28°C przy wytrząsaniu 190 rpm przez 72 godziny. Do każdej próby dodano po 500 µl roztworu 0,5% kazeiny w buforze Tris-HCl o odpowiednim pH oraz po 200 µl samego buforu. Następnie do prób dodano po 100 µl hodowli bakteryjnej. Reakcję prowadzono przez 30 minut w temperaturze 50°C, w pH 9.5. Reakcję zatrzymywano, dodając do prób po 500 µl zimnego roztworu 10% TCA. Następnie próby wirowano w 4°C przez 10 minut przy 15000 g. Pomiar absorbancji wolnej tyrozyny prowadzono przy długości fali 275 nm. W próbach kontrolnych TCA dodawano przed dodaniem hodowli.

Aktywność lipolityczna szczepów na podłożu stałym

Szczepy hodowano na podłożu stałym YPD z Tween 80 (10%) w temperaturze 28°C przez 72 godziny. Po 24, 48 oraz 72 godzinach sprawdzano obecność i rozmiar zmętniałej strefy wokół wysianych mikroorganizmów.

Aktywność lipolityczna szczepów w teście z użyciem palmitynianu 4-nitrofenolu

Do oznaczenia aktywności enzymatycznej lipaz posługiwano się zmodyfikowaną metodą z palmitynianem 4-nitrofenolu (pNPP) [Gupta i in. 2002]. Skład mieszaniny reakcyjnej: guma arabska w ilości 9 mg na każde 10 ml końcowej objętości roztworu, 1 część roztworu Tritonu X-100 o stężeniu 40 mg/ml, 1 część buforu Tris HCL pH=8,8 o stężeniu 0,5 M, 1 część roztworu pNPP w 2-propanolu o stężeniu 3 mg/ml, 6 części wody dejonizowanej. Jedną jednostkę aktywności zdefiniowano jako 1 nmol uwolnionego 4-nitrofenolu w ciągu 1 minuty w warunkach reakcji.

Test prowadzono na płytkach 96-dołkowych, w temperaturze pokojowej, przez okres 1 godziny, prowadząc odczyty absorbancji przy $\lambda = 410$ nm co 10 minut przy użyciu spektrofotometru ASYS UVM 340. Do pojedynczego dołka dodawano 230 µl mieszaniny reakcyjnej i 20 µl odpowiednio rozcieńczonego badanego roztworu enzymu z jednej z testowanych hodowli szczepów. Aktywność odczytywano z tej części krzywej przyrostu absorbancji w czasie, która miała charakter liniowy. Ilość jednostek aktywności enzymatycznej wyznaczano na podstawie poniższego wzoru:

$$Akt. = \frac{\text{średnia } \Delta A_{410} \cdot 50}{0,0413 \cdot 10} \text{ [nmol/min/ml]}$$

gdzie:

Akt. – aktywność [nmol/min/ml],

średnia ΔA_{410} – przyrost absorbancji odczytywanej przy $\lambda = 410$ nm,

0,0413 – współczynnik określający ilość uwolnionego pNP, wyznaczony na podstawie krzywej standardowej poniżej,

10 – czas dla jakiego wyciągano średni przyrost absorbancji [min],

50 – współczynnik uwzględniający ilość użytego do reakcji preparatu enzymatycznego.

WYNIKI I DISKUSJA

Na podstawie obserwacji morfologii kolonii, określenia właściwości biochemicznych w testach API oraz sekwencjonowania podjednostki 16S rRNA określono przynależność gatunkową szczepów arktycznych. Dla 13 z nich wykazano najwyższą homologię do gatunku *Pseudomonas fluorescens*, a dla 3 do *Pseudomonas syringae* (tab. 1).

Tabela 1. Identyfikacja badanych mikroorganizmów na podstawie sekwencji 16S rRNA
 Table 1. Identification of investigated microorganisms according to 16S rRNA sequence

Szczep Strain	Długość sekwencji 16S rRNA [nukleotydy] Length of 16S rRNA sequence [nucleotides]			Homologia Homology	
	powielona w PCR amplified by PCR	podpisana przez BLAST BLAST aligned	identyczna identical	%	do gatunku to species
BD1	1396	1401 (10)*	1383	98	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
BD3	1405	1411 (11)*	1391	98	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
BD5	1406	1413 (12)*	1393	98	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
BD18	1406	1413 (15)*	1384	97	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
BD20	1399	1403 (12)*	1373	97	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
BD21	1396	1402 (12)*	1372	97	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
BD22	1405	1412 (15)*	1381	97	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
BD24	1385	1354 (94)*	1335	98	<i>Pseudomonas syringae</i>
BD25	1388	1359 (40)*	1339	98	<i>Pseudomonas syringae</i>
BD26	1387	1356 (4)*	1337	98	<i>Pseudomonas syringae</i>
BD28	1399	1407 (15)*	1377	97	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
BD29	1394	1401 (14)*	1371	97	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
BD30	1408	1416 (15)*	1385	97	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
BD31	1397	1404 (15)*	1374	97	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
BD32	1378	1350 (2)*	1332	98	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
BD34	1396	1403 (14)*	1374	97	<i>Pseudomonas fluorescens</i>

*w () podano liczbę przerw; in () number of GAPS

Na podstawie uzyskanych sekwencji skonstruowano drzewo filogenetyczne, uwzględniające nowo odkryte szczepy, izolowane z terenów Arktyki (rys. 1). Analiza sekwencji wykazała, że wszystkie wyizolowane szczepy z rodzaju *Pseudomonas* grupują się w trzech klastrach. Szczepy *P. syringae* nie tworzą odrębnego klastra, grupując się w jednym klastrze razem z czterema szczepami *P. fluorescens*. Podobne wyniki uzyskali Bodilis i in. [2004]. Autorzy ci wykazali, że *P. fluorescens* grupuje się w dwóch odrębnych klastrach nazwanych fluorescens 1 o-cluster i fluorescens 2 o-cluster. Wyizolowane szczepy arktyczne mieszczą się w obrębie fluorescens 1 o-cluster.



Rys. 1. Drzewo filogenetyczne badanych szczepów
Fig. 1. Phylogenetic tree for investigated strains

Enzymy proteolityczne stanowią ogromny potencjał z punktu widzenia komercyjnego. Z danych z 1996 roku wynika, że całkowita światowa sprzedaż enzymów sięgnęła 1 miliarda dolarów, z czego około 60% przypadło na enzymy proteolityczne [Godfrey i West 1996]. Obecnie większość enzymów znajdujących się na rynku jest pochodzenia mikrobiologicznego. Jest to spowodowane tym, że takie enzymy najłatwiej uzyskać przy użyciu relatywnie niskich środków. Innym, istotnym aspektem proteaz mikrobiolo-

gicznych jest to, że można uzyskać bardzo duże ilości enzymu w stosunkowo krótkim czasie, z racji częstych podziałów komórek mikroorganizmów. Dodatkowym atutem jest fakt, że w ogromnej większości enzymy te są wydzielane zewnątrzkomórkowo, rzadziej w postaci ciałek inkluzyjnych. Proteazę wydzielaną do podłoża dużo łatwiej oczyścić, omijając etapy izolacji enzymu z wnętrza komórek, co przy produkcji na skalę przemysłową ma istotne znaczenie [Rao i in. 1998].

Szczepy pochodzenia arktycznego przebadano między innymi pod względem wydzielania przez nie proteaz. Wstępne badania przeprowadzono na podłożu agarowym z dodatkiem 10% mleka i po 72 godzinach inkubacji mierzono średnice stref powstałych dookoła posiewu. Oznaczono aktywność z użyciem kazeiny jako substratu, potwierdzono aktywność proteolityczną badanych szczepów (tab. 2). Aktywność proteolityczna badanych szczepów wahała się w granicach od 58,5 do 139,6 U/ml (tab. 2) i była od 1,5 do 28 razy wyższa od aktywności proteaz uzyskanych ze szczepów *Bacillus* sp. badanych przez Prakasham i in. [2005].

Tabela 2. Aktywność proteolityczna badanych mikroorganizmów wykazana **A.** wielkością strefy przejaśnienia na podłożu stałym, **B.** w teście z kazeiną, po 72 godzinach wzrostu na podłożu płynnym (10% mleko).

Table 2. Proteolytic activity of investigated microorganisms **A.** the diameter of zone around colony on the solid medium **B.** in test with casein after 72 h incubation on liquid medium (10% milk).

Szczep Strain	Aktywność proteolityczna Proteolytic activity	
	A średnica strefy, zone diameter [cm]	B z kazeiną, casein with [U/ml]
BD1	1,8	100,65
BD3	1,2	69,6
BD5	2	105
BD18	1,9	68,13
BD20	1,8	112
BD21	1,7	83,3
BD22	1,9	58,5
BD24	1,8	139,6
BD25	1,8	113
BD26	1,9	99
BD28	1,5	135,9
BD29	1,8	138,5
BD30	1,7	89,35
BD31	1,8	131,74
BD32	1,8	83,5
BD34	2	133,9

Różnorodność reakcji, jakie mogą być katalizowane przez lipazy, czyni je potencjalnie bardzo ważnymi enzymami z punktu widzenia przemysłowego. Poza reakcją hydrolizy, w odpowiednich warunkach lipazy są zdolne również do prowadzenia reakcji: transestryfikacji, estryfikacji czy też polimeryzacji wynikającej z tworzenia wiązań estrowych [Reis i in. 2009].

Przebadano zdolność badanych mikroorganizmów do wydzielania lipaz, stosując dwa testy. Pierwszy test wskazywał na możliwość wydzielania do podłoża lipaz rozkładających ester sorbitolu, a drugi test – lipaz rozkładających palmitynian p-nitrofenolu.

Wykonując pierwszy test, badane mikroorganizmy hodowano na podłożu stałym z dodatkiem Tween 80. Po 72 h inkubacji na podstawie obecności strefy przejaśnienia wokół kolonii określono, które ze szczepów za pomocą wydzielanych do podłoża lipaz rozkładają ester sorbitolu (Tween 80) (tab. 3). Tylko 6 szczepów z badanych szesnastu wykazywało aktywność lipolityczną. Szczepy BD1, BD5 oraz BD25 wydzielały lipazy rozkładające ester sorbitolu, co przejawiało się powstaniem stref wokół kolonii, ale te nie wydzielały lipaz rozkładających palmitynian p-nitrofenolu (tab. 3). Odwrotną sytuację zaobserwowano w przypadku szczepów BD22 i BD30 (tab. 3). Jedynie szczep BD3 wydzielał lipazy wykazujące aktywność wobec obu substratów.

Tabela 3. Aktywność lipolityczna badanych mikroorganizmów wykazana **A.** wielkością strefy zmętnienia na podłożu stałym, **B.** w teście z palmitynianem 4-nitrofenolu, po 72 godzinach wzrostu na podłożu płynnym (10% mleko)

Table 3. Lipolytic activity of investigated microorganisms **A.** the diameter of zone around the colony on the solid medium, **B.** in the test with palmitynian of p-nitrophenol after 72 h of incubation in liquid medium (10% milk)

Szczep Strain	Aktywność proteolityczna Proteolytic activity	
	A średnica strefy, zone diameter [cm]	B z palmitynianem p-nitrofenolu with p-nitrophenol palmitate [U/ml]
BD1	0,4	0
BD3	1	1,04
BD5	0,3	0
BD22	0	2,14
BD25	0,4	0
BD30	0	0,92

Szczepy hodowane na 10% mleku z dodatkiem 2% oleju, na mleku 100% i podłożu LB nie wykazywały aktywności lipolitycznej (dane nie pokazane). Przyczyną słabej lub braku aktywności lipolitycznej badanych szczepów może być aktywność proteolityczna. Wydzielane proteazy mogą rozkładać lipazy. Znalezienie lipaz, odpornych na proteolityczną degradację miałyby walory aplikacyjne. Takiego typu lipazy znalazłyby zastosowanie chociażby w kosmetykach lub proszkach do prania.

WNIOSKI

1. Wśród 16 badanych szczepów, izolowanych z próbek wody i gleby z Arktyki, trzynaście szczepów oznaczono jako *Pseudomonas fluorescens*, a trzy jako *Pseudomonas syringae*.
2. Wszystkie przebadane szczepy wykazywały aktywność proteolityczną, wahającą się, w zależności od szczepu, od 58,5 do 139,6 U/ml.
3. Aktywność lipaz była sprawdzana wobec Tween 80 oraz palmitynianu p-nitrofenolu. Badane lipazy różniły się specyficznością substratową.
4. Tylko sześć szczepów wykazywało aktywność lipolityczną. Trzy z nich rozkładały ester sorbitolu, dwa reagowały z palmitynianem p-nitrofenolu, a jeden szczep wykazywał aktywność wobec obu substratów, co obrazuje duże zróżnicowanie produkowanych enzymów.
5. Obserwowano duże zróżnicowanie produkowanych lipaz.

PIŚMIENNICTWO

- Agribusiness Development Centre (2000). ADC Commercialization Bulletin. #13: Papain. Agribusiness Development Centre, Kampala, Uganda.
- Aehle W., 2004. Enzymes in Industry. Production and Applications. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- Ashie N.A., Sorensen T.L., Nielsen P.M., 2002. Effects of papain and a microbial enzyme on meat proteins and beef tenderness. *J. Food Sci.*, 67, 2138–2142.
- Anderson E.M., Larsson K.M., Kirk O., 1998. One Biocatalyst – Many Applications: The Use of *Candida Antarctica B-Lipase* in Organic Synthesis. *Biocatalysis and Biotransformation*, 16, 181–204.
- Bélafi-Bako K., Kovács F., Gubicza L., Hancsók J., 2002. Enzymatic biodiesel production from sunflower oil by *Candida antarctica* lipase in a solvent-free system. *Biocatalysis and Biotransformation*, 20, 437–439.
- Bodilis J., Calbrix R., Guerillon J., Merieau A., Pawlak B., Orange N., Barray S., 2004. Phylogenetic relationships between environmental and clinical isolates of *Pseudomonas fluorescens* and related species deduced from 16S rRNA gene and OprF protein sequences. *Syst. Appl. Microbiol.*, 27, 93–108.
- Díaz O., Fernández M., García de Fernando G.D., de la Hoz L., Ordóñez J.A., 1996. Effect of the addition of papain on the dry fermented sausage proteolysis. *J. Sci. Food Agric.*, 71, 13–21.
- Georgette D., Blaise V., Collins T., D'Amico S., Gratia E., Hoyoux A., 2004. Some like it cold: biocatalysis at low temperatures. *FEMS Microbiology Reviews*, 28, 25–42.
- Gupta N., Rathi P., Gupta R., 2002. Simplified para-nitrophenyl palmitate assay for lipases and esterases. *Anal. Biochem.*, 311, 98–99.
- Godfrey T., West S., 1996. *Industrial enzymology*, Macmillan Publishers Inc., New York, N.Y., 2nd ed. London.
- Koohmaraie M., 1996. Biochemical factors regulating the toughening and tenderization processes of meat. *Meat Science*, 43, 193–201.
- Prakasham R.S., Rao C.S., Rao R.S., Rajesham S., Sarma P.N., 2005. Optimization of alkaline protease production by *Bacillus* sp. using Taguchi methodology. *Applied Biochem. Biotech.*, 120, 133–144.
- Rao M.B., Tanksale A.M., Ghatge M.S., Deshpande V.V., 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microb. Mol. Biol. Rev.*, 62, 597–635.

- Reis P., Holmberg K., Watzke H., Leser M.E., Miller R., 2009. Lipases at interfaces: a review. *Adv. Col. Inter. Sci.*, 147–148, 237–250.
- Russell N.J., 1998. Molecular adaptations in psychrophilic bacteria: potential for biotechnological applications. *Biotech. Extrem.*, 61, 1–21.
- Willcox M.D.P., Holden B.A., 2001. Contact lens related corneal infections. *Bioscience Reports*, 21, 445–461.

ISOLATION, IDENTIFICATION, PROTEOLYTIC AND LIPOLYTIC ACTIVITY OF ARCTIC MICROORGANISMS.

Abstract. Sixteen bacterial strains isolated from fresh water and soil of Spitsbergen (Arctic) were identified by 16S rRNA sequencing. Thirteen strains as *Pseudomonas fluorescens* and as *Pseudomonas syringae* (six strains). The proteolytic and lipolytic activity of strains was investigated. All strains were active in proteolysis in the range from 58,5 to 139,6 U/ml but only six strains had lipolytic activity. Strains BD1, BD5 and BD25 secreted lipases which break down Tween 80, lipase from BD22 and BD30 strains were active in the reaction with p-nitrophenol palmitate and lipase from BD3 strain was active in both tests.

Key words: *Pseudomonas*, protease, lipase

Accepted for print – Zaakceptowano do druku: 30.03.2011

For citation – Do cytowania: Krasowska A., Łukaszewicz M., 2011. Izolacja, identyfikacja oraz aktywność proteolityczna i lipolityczna mikroorganizmów arktycznych. *Acta Sci. Pol. Biotechnol.*, 10 (1), 5–14.

SKRINING SZCZEPÓW DROŻDZY *YARROWIA LIPOLYTICA* DO BIOSYNTETY ERYTRYTOLU Z GLICEROLU

Ludwika Tomaszewska, Anita Rywińska, Izabela Musiał,
Marta Utecht, Piotr Juszczyk, Waldemar Rymowicz,
Maria Wojtatowicz, Xymena Połomska

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Streszczenie. Zbadano zdolność ośmiu szczepów drożdży z gatunku *Yarrowia lipolytica* do produkcji erytrytolu z glicerolu w 10-dniowych hodowlach wstrząsanych. Drożdże produkowały od 27,9 do 33,6 g · dm⁻³ erytrytolu, z wydajnością w zakresie 0,36–0,53 g · g⁻¹.

Na podstawie analizy statystycznej wytypowano do dalszych badań szczep produkcyjny *Y. lipolytica* A-10. W hodowlach wglębnych w bioreaktorze oceniono wydajność i dynamikę produkcji erytrytolu z glicerolu przez wybrany szczep. Drożdże produkowały 63 oraz 59 g · dm⁻³ erytrytolu z wydajnością 0,41 oraz 0,37 g · g⁻¹ w hodowlach zawierających odpowiednio 150 g · dm⁻³ glicerolu czystego lub odpadowego. Najwyższą szybkość objętościową (0,74 g · dm⁻³) i właściwą produkcji erytrytolu (0,048 g · g⁻¹ · h⁻¹) uzyskano w hodowli z czystym glicerolem. W zależności od zastosowanego glicerolu stężenie wewnątrzkomórkowego erytrytolu było w zakresie od 77,3 do 112,9 mg · g⁻¹ s.m.

Słowa kluczowe: erytrytol, glicerol, glicerol odpadowy, *Yarrowia lipolytica*, hodowle okresowe

WSTĘP

Erytrytol jest składnikiem naturalnie obecnym w diecie ludzi, występującym w miodzie, owocach takich jak melony, gruszki i winogrona, a także fermentowanej żywności – serach, sake, winie oraz piwie, sosie sojowym i paście miso. Ten czterowęglowy alkohol cukrowy jest również metabolitem oraz substancją zapasową grzybów i wodorostów

© Copyright by Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Badania realizowane w ramach projektu nr POIG.01.01.02-00-074/09; "Biotechnologiczna konwersja glicerolu do polioli i kwasów dikarboksylowych".

Adres do korespondencji – Corresponding author: Anita Rywińska, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, ul. C.K. Norwida 25, 50-375 Wrocław, e-mail: anita.rywinska@up.wroc.pl

[Bernt i in. 1996, Goossens i Röper 1994, Shindou i in. 1988a]. Erytrytol ma umiarkowanie słodki smak (60–80% słodczy w porównaniu z sacharozą), bez posmaku gorzkiego [de Cock i Bechert 2002]. Dzięki najniższej masie cząsteczkowej wśród polioli stosowanych jako zamienniki cukru roztwory erytrytoli charakteryzują się odmiennymi od pozostałych właściwościami – wyższym ciśnieniem osmotycznym i niższą aktywnością wody [Goossens i Röper 1994].

Erytrytol wykorzystywany jest w przemyśle chemicznym, kosmetycznym, farmaceutycznym oraz spożywczym. Do żywności dodawany jest przede wszystkim jako substancja słodząca, ale także jako substancja utrzymująca wilgoć, wzmacniacz aromatów, środek zagęszczający, stabilizator, środek teksturotwórczy oraz sekwestrant. Dzięki swoim cennym właściwościom stosowany jest w cukiernictwie (czekolada, cukierki, galaretki, gumy do żucia), produkcji napojów bezalkoholowych, piekarnictwie oraz mleczarstwie (jogurty) [Bernt i in. 1996, Mitsubishi i Nikken 1996]. Do stosowania bez ograniczeń w produkcji żywności erytrytol został dopuszczony w 1999 roku przez FAO/WHO. W Unii Europejskiej wykorzystanie erytrytoli w przemyśle spożywczym możliwe jest od roku 2003, natomiast w Polsce od roku 2008 na mocy Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 18 września w sprawie dozwolonych substancji dodatkowych. W 2008 roku konsumpcja erytrytoli w Europie Wschodniej wynosiła 2666 ton, zaś w Europie Zachodniej jego spożycie było ponad dwukrotnie wyższe [www.foodnavigator.com]. Obecnie obserwuje się wzrost zainteresowania erytrytolem, ponieważ cechuje się on bardzo niską kalorycznością (0–0,2 kcal/g) w odróżnieniu od innych polioli, nie wywołuje nietolerancji pokarmowej, a jego spożycie nie wpływa na poziom insuliny we krwi – może być zatem bezpiecznie stosowany przez diabetyków oraz w dietach niskoenergetycznych [de Cock i Bechert 2002, Park i in. 2005, Röper i Goossens 1993]. Erytrytol produkowany jest na drodze naturalnej i może być stosowany w żywności ekologicznej [Moon i in. 2010]. Dodatkowo, stosowanie erytrytoli ogranicza rozwój próchnicy zębów, gdyż nie jest on metabolizowany przez bakterie obecne w jamie ustnej [Makinen i in. 2001]. Badania prowadzone przez den Hartog i in. [2009] wykazały, iż erytrytol działa jako przeciwutleniacz oraz może chronić przed uszkodzeniem naczyń w wyniku hiperглиkemii.

Produkcja erytrytoli możliwa jest na drodze chemicznej poprzez konwersję skrobi w wysokiej temperaturze w obecności katalizatora niklowego. Proces ten jest jednak nieefektywny i kosztowny [Pfeifer i in. 1960], dlatego też przemysłowa produkcja odbywa się z udziałem mikroorganizmów. Wykazano, iż do produkcji erytrytoli zdolne są drożdże z rodzajów *Candida*, *Moniliella*, *Pichia*, *Torula*, *Torulopsis*, *Trichosporon*, *Trigonopsis*, *Zygopichia* oraz bakterie z gatunku *Leuconostoc oenos*. Większość z tych drobnoustrojów nie może być jednak wykorzystana do produkcji erytrytoli ze względu na zbyt dużą ilość produktów ubocznych. Przemysłowa produkcja erytrytoli odbywa się przy udziale *Aureobasidium* [Hajny i in. 1964, Kim i in. 2000, Onishi 1960, Park i in. 1998, Sawada i in. 2009, Veiga-da-Cunha i in. 1993], a stosowanymi substratami są glukoza lub sacharoza [Aoki i in. 1993, Hiele i in. 1993]. Ostatnie badania wskazują na możliwość efektywnej i wydajnej produkcji erytrytoli z glicerolu odpadowego, powstającego podczas produkcji biodiesla, z udziałem drożdży *Yarrowia lipolytica* [Rymowicz i in. 2008, 2009].

Celem pracy był dobór szczepów drożdży *Y. lipolytica* do produkcji erytrytoli z glicerolu oraz ocena kinetyki i efektywności biosyntezy erytrytoli z glicerolu czystego i odpadowego przez wybrany szczep produkcyjny.

MATERIAŁY I METODY

Mikroorganizmy. Przedmiotem badań było 8 szczepów drożdży *Yarrowia lipolytica*: szczep ATCC8661 pochodzący z kolekcji amerykańskiej, szczep CCY-29-26-5 z kolekcji czeskiej oraz 6 szczepów pochodzących z kolekcji własnej Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu: A-101-1.31-1.22, A-61, A-I-5, A-8, A-311, A-10. Szczepy przechowywano na skosach YM, w temperaturze 4°C.

Substrat. W badaniach wykorzystano czysty glicerol (98%) oraz glicerol odpadowy z produkcji biodiesla, pochodzący z dwóch różnych źródeł: (W) o zawartości 873 g · dm⁻³ i 43 g · dm⁻³ NaCl (Wratislavia-BIO, Wrocław) oraz (L) zawierający 760 g · dm⁻³ glicerolu i 73 g · dm⁻³ NaCl (Lotos, Czechowice-Dziedzice).

Podłoża. Podłoże inokulacyjne do hodowli bioreaktorowych zawierało (g · dm⁻³): glicerol (98%) – 50,0; ekstrakt drożdżowy – 3,0; ekstrakt słodowy – 3,0; bactopecton – 5,0; woda destylowana do 1 dm³.

Podłoże produkcyjne do hodowli wstrząsanych zawierało (g · dm⁻³): glicerol – 100,0; NH₄Cl – 4,56; MgSO₄ · x 7H₂O – 1,0; ekstrakt drożdżowy – 1,0; CuSO₄ – 0,7 · 10⁻³; MnSO₄ · x H₂O – 32,6 · 10⁻³; 0,72 M bufor fosforanowy KH₂PO₄/Na₂HPO₄ o pH ~ 4,3 – do 1 dm³.

Do przygotowanie podłoża produkcyjnego do hodowli w bioreaktorach wykorzystano (g · dm⁻³): glicerol – 150,0; NH₄Cl – 2,0; MgSO₄ · x 7H₂O – 1,0; KH₂PO₄ – 0,2; ekstrakt drożdżowy – 1,0; NaCl – 25 (glicerol czysty) lub 18 (glicerol odpadowy W i L); woda wodociągowa – do 1 dm³.

Podłoża sterylizowano w 121°C przez 20 minut.

Warunki prowadzenia hodowli

Hodowle inokulacyjne. Hodowle inokulacyjne prowadzono na wstrząsarce rotacyjnej typu CERTOMAT IS (Sartorius Stedim Biotech GmbH), w 300 cm³ kolbach stożkowych zawierających 50 cm³ podłoża inokulacyjnego przez 72 godziny w temperaturze 29,5°C, przy 140 rpm. Do zaszczepienia podłoża produkcyjnego w bioreaktorze używano 200 cm³ zawiesiny komórek namnożonych w hodowli inokulacyjnej.

Hodowle produkcyjne wstrząsane. Hodowle szczepiono materiałem komórkowym pochodzącym ze skosów. Hodowle prowadzono na wstrząsarce rotacyjnej j/w, w 300 cm³ kolbach stożkowych zawierających 30 cm³ zbuforowanego podłoża produkcyjnego, przez 10 dni. Próby do analiz pobierano po zakończeniu hodowli.

Hodowle produkcyjne bioreaktorowe. Proces biosyntezy erytrytolu prowadzono w 5-litrowym bioreaktorze Biostat B Plus przy objętości roboczej 2 dm³. Szybkość przepływu powietrza wynosiła 0,6 vvm, szybkość obrotowa mieszadła 800 rpm, temperatura 30°C. W czasie procesu pH = 3,0 utrzymywano automatycznie za pomocą 20% NaOH. Próby do oznaczeń biomasy, glicerolu oraz zewnątrzkomórkowych metabolitów z hodowli bioreaktorowych pobierano z częstotnością zaznaczoną na wykresach w części wynikowej pracy.

Metody analityczne

Biomasę oznaczano metodą wagową.

Stężenie glicerolu, erytrytolu, mannitolu, kwasu cytrynowego oraz kwasu α-ketoglutazarowego oznaczano metodą HPLC na kolumnie HyperRez XP carbohydrate

H⁺ (Dionex, UltiMate 3000 Series) połączonej z detektorami UV ($\lambda=210$ nm) i IR, w temperaturze 65°C, przy szybkości przepływu fazy ciekłej (25 mM kwasu trifluorooctowego; TFA) przez kolumnę równej 0,6 cm³ · min⁻¹.

Oznaczenia metabolitów wewnątrzkomórkowych wykonano w biomase uzyskanej po zakończeniu hodowli bioreaktorowych. Biomase dwukrotnie przemywano buforem Tris HCl (0,05 M). Naważkę (5 g mokrej masy drożdży) poddawano działaniu promieniowania mikrofalowego (30 s). Proces ekstrakcji prowadzono za pomocą 50% wodnego roztworu etanolu, przez 90 min, przy użyciu mieszadła magnetycznego z płytą grzejącą (MS 11HS) w temperaturze wrzenia. Stosunek mokrej masy do rozpuszczalnika był równy 1:10. Uzyskaną mieszaninę wirowano przez 10 min w temperaturze 4°C przy 5500 rpm, w supernatancie oznaczano zawartość alkoholi cukrowych i kwasów organicznych.

Analiza statystyczna

Analizę danych wykonano przy wykorzystaniu oprogramowania Statistica 9.1 (Stat-Soft Incorporated, Tulsa, OK).

Spis symboli

X – biomasa (biomass), GLY – glicerol (glycerol), ERY – erytrytol (erythritol), MAN – mannitol (mannitol), KC – kwas cytrynowy (citric acid), KG – kwas α -ketoglutarynowy (α -ketoglutaric acid), Q_{ERY} – szybkość produkcji erytrytolu (erythritol volumetric productivity), q_{ERY} – szybkość właściwa produkcji erytrytolu (erythritol specific production rate), Y_{ERY} – wydajność erytrytolu (g wytworzonego ERY / g zużytego substratu) (erythritol yield; g of produced erythritol / g of used substrate).

WYNIKI I DYKUSJA

Skrining szczepów *Y. lipolytica* do biosyntezy erytrytolu z glicerolu

W pierwszym etapie badań w hodowlach wstrząsanych oceniono zdolność 8 szczepów drożdży gatunku *Y. lipolytica* do biosyntezy erytrytolu z glicerolu czystego. W zastosowanym zbuforowanym podłożu hodowlanym początkowa wartość pH wynosiła około 4,3; po 10 dniach hodowli odczyn środowiska obniżył się do około 2,6 (dane nieprezentowane). Stwierdzono znaczne zróżnicowanie w stężeniu biomasy, które było najniższe dla szczepu ATCC 8661 (5,7 g · dm⁻³), natomiast prawie dwukrotnie wyższe dla szczepu A-311 (10,9 g · dm⁻³) (tab. 1). Wszystkie spośród badanych szczepów produkowały erytrytol, którego stężenie na końcu hodowli wynosiło od 27,9 do 33,6 g · dm⁻³ (tab. 1). Największa ilość produktu, uzyskana dla szczepu A-10 (33,6 g · dm⁻³), była zbliżona do stężenia erytrytolu (35,2 g · dm⁻³) otrzymanego w hodowlach wstrząsanych z glukozy przez drożdże *Moniliella tomentosa* [Hajny i in. 1964]. W badaniach prowadzonych przez Lee i in. [2001] nad biosyntezą erytrytolu z glukozy przez *Torula* sp. dodatek odpowiednich witamin umożliwił zwiększenie uzyskiwanych ilości erytrytolu z 46,3 do 58,3 g · dm⁻³. Drożdże *Trichosporonoides* sp. 331-1 produkowały w hodowlach wstrząsanych 43 g · dm⁻³ erytrytolu z glukozy z wydajnością 0,43 g · g⁻¹ [Aoki i in. 1993]. Badania nad wykorzystaniem różnych źródeł węgla do biosyntezy erytrytolu, w tym glicerolu, prowadził Jeya i in. [2009]. Glicerol oraz laktoza (30%) okazały się najgorszym substratem, a uzyskane stężenia erytrytolu wynosiły odpowiednio 11,3 oraz 9,1 g · dm⁻³, podczas gdy w hodowli

z glukożą ten sam szczep produkował $134 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ erytrytolu z wydajnością $0,45 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$. W prezentowanej pracy wydajność produkcji erytrytolu była zróżnicowana i w zależności od szczepu kształtowała się w przedziale $0,39 - 0,53 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ (tab. 1).

Możliwość wykorzystania drożdży *Y. lipolytica* do produkcji erytrytolu opisano w patentcie japońskiej firmy Mitsubishi Chemical Corporation Chiyoda-ku [Ueda i Yamagishi 1997]. Autorzy koncentrują się na wykorzystaniu w tym procesie glukozy w stężeniu 10–60%, ale podają również, że możliwa jest produkcja erytrytolu z glicerolu. W hodowlach wstrząsanych szczep *Y. lipolytica* ATCC 8661, w podłożu zawierającym 20% glicerolu oraz 1% ekstraktu drożdżowego, produkował $43,2 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ erytrytolu z wydajnością $0,21 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$, a więc niższą niż w prezentowanej pracy oraz 2,5 razy niższą niż z glukozy.

Tabela 1. Charakterystyka biosyntezy erytrytolu z glicerolu przez drożdże *Y. lipolytica* w hodowlach wstrząsanych

Table 1. Characteristic of the erythritol biosynthesis from glycerol by *Y. lipolytica* yeast in flask cultures

Szcep Strain	X [g · dm ⁻³]	ERY [g · dm ⁻³]	MAN [g · dm ⁻³]	KC [g · dm ⁻³]	KG [g · dm ⁻³]	Y _{ERY} [g · g ⁻¹]
A-8	7,1	31,4	n.d.	n.d.	3,4	0,48
A-10	7,1	33,6	0,7	n.d.	4,6	0,45
A-61	6,1	29,1	0,4	≤ 0,1	4,1	0,39
A-311	10,9	32,0	0,7	n.d.	3,7	0,53
A-101-1.31-1.22	7,1	27,9	0,6	≤ 0,1	3,6	0,40
A-I-5	8,3	29,7	1,2	≤ 0,1	4,5	0,36
ATCC8661	5,7	29,9	0,4	n.d.	2,84	0,43
CCY-29-26-5	10,0	31,7	0,9	n.d.	3,6	0,42

n.d. – nie wykryto – not detected

Podczas drożdżowej biosyntezy erytrytolu z glukozy produkowane mogą być również inne poliole, w tym mannitol, arabitol oraz rybitol [Almagro i in. 2001, Moon i in. 2010]. W prezentowanej pracy po 10 dniach hodowli stwierdzono obecność niewielkich ilości mannitolu, od $0,4$ do $1,2 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$, który produkowany był przez wszystkie użyte szczepy, z wyjątkiem szczepu A-8. W środowisku hodowlanym wykazano również obecność kwasu α -ketoglutazarowego, którego stężenie nie przekraczało $4,6 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ (tab. 1).

Wykazano, iż statystycznie najlepszym producentem erytrytolu w hodowlach wstrząsanych był szczep A-10 (tab. 2). Ze względu na możliwość lepszej kontroli podstawowych parametrów hodowlanych, takich jak natlenienie, temperatura oraz pH, w czasie trwania procesu [Rymowicz i in. 2005], ocenę kinetyczną procesu produkcji erytrytolu przez szczep *Y. lipolytica* A-10 przeprowadzono w hodowlach wglębnych w bioreaktorze.

Tabela 2. Analiza statystyczna danych uzyskanych z hodowli wstrząsanych (Statistica 9.1)
 Table 2. Flask cultures statistical data analysis (Statistica 9.1)

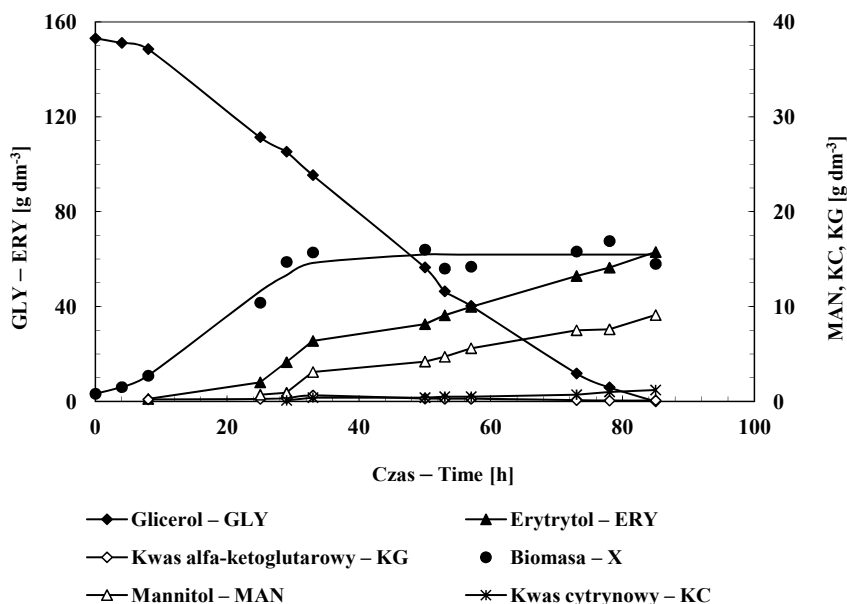
ANOVA; test Duncana, $\alpha = 0,05$; zmienna: erytrytol; grupy jednorodne ANOVA; Duncan test, $\alpha = 0,05$; variable: erythritol; homogenous groups				
Szczep Strain	ERY [g · dm ⁻³]	1	2	3
A-101-1.31-1.22	27,9	****		
A-61	29,1	****	****	
A-311	29,7	****	****	
A-I-5	29,9	****	****	****
A-8	31,4	****	****	****
CCY-29-26-5	31,7	****	****	****
ATCC8661	32,0		****	****
A-10	33,6			****

Biosynteza erytrytolu w okresowych hodowlach bioreaktorowych

Przebieg procesu biosyntezy erytrytolu z glicerolu czystego i odpadowego (W oraz L) przez szczep A-10 przedstawiono na rysunkach 1 oraz 2, a końcowe rezultaty zestawiono w tabeli 3. Procesy hodowlane prowadzono do całkowitego wykorzystania źródła węgla w środowisku.

W procesie, w którym zastosowano czystą glicerynę, całkowite wyczerpanie substratu nastąpiło po 85 h (rys. 1). Fazę stacjonarną drożdże osiągnęły w około 30 h hodowli, a końcowe stężenie biomasy wyniosło 15,5 g · dm⁻³. Jak podaje Vogt [2004], frakcja glicerynowa zawiera niewielkie ilości białek i peptydów, które po ekstrakcji wodą są obecne w glicerolu odpadowym i stanowią dodatkowe źródło azotu dla drożdży. W hodowlach z wykorzystaniem glicerolu odpadowego nie stwierdzono znaczących różnic w ilości uzyskanej biomasy, w porównaniu z procesami z wykorzystaniem czystego glicerolu (tab. 3). W procesie prowadzonym w podłożu z glicerolem odpadowym zaobserwowano natomiast wydłużenie fazy wzrostu, fazę stacjonarną drożdże osiągnęły w około 40 h hodowli (rys. 2). Czas potrzebny do całkowitego wyczerpania źródła węgla był zróżnicowany i wynosił 77 h w przypadku glicerolu odpadowego W (rys. 2A) oraz 99 h przy użyciu glicerolu odpadowego L (rys. 2B).

W hodowli z czystym glicerolem końcowe stężenie erytrytolu wyniosło 63 g · dm⁻³. W podłożach, w których substratem była gliceryna odpadowa, uzyskano niższe stężenia erytrytolu, przy czym różnica ta była znacznie mniejsza w przypadku gliceryny L (59 g · dm⁻³) niż gliceryny W (52,2 g · dm⁻³) (tab. 3). Ponadto, w procesie z wykorzystaniem glicerolu L końcowe stężenie mannitolu wynosiło 4,8 g · dm⁻³ i było prawie dwukrotnie niższe w odniesieniu do wyników uzyskanych dla dwóch pozostałych substratów (tab. 3). Oprócz alkoholi cukrowych zaobserwowano w hodowlach bioreaktorowych produkcję niewielkich ilości kwasów organicznych, cytrynowego i α -ketoglutarynowego, których łączne stężenie nie przekroczyło 1,6; 2,2 i 3,2 g · dm⁻³ odpowiednio w przypadku gliceryny czystej i odpadowej W oraz L.

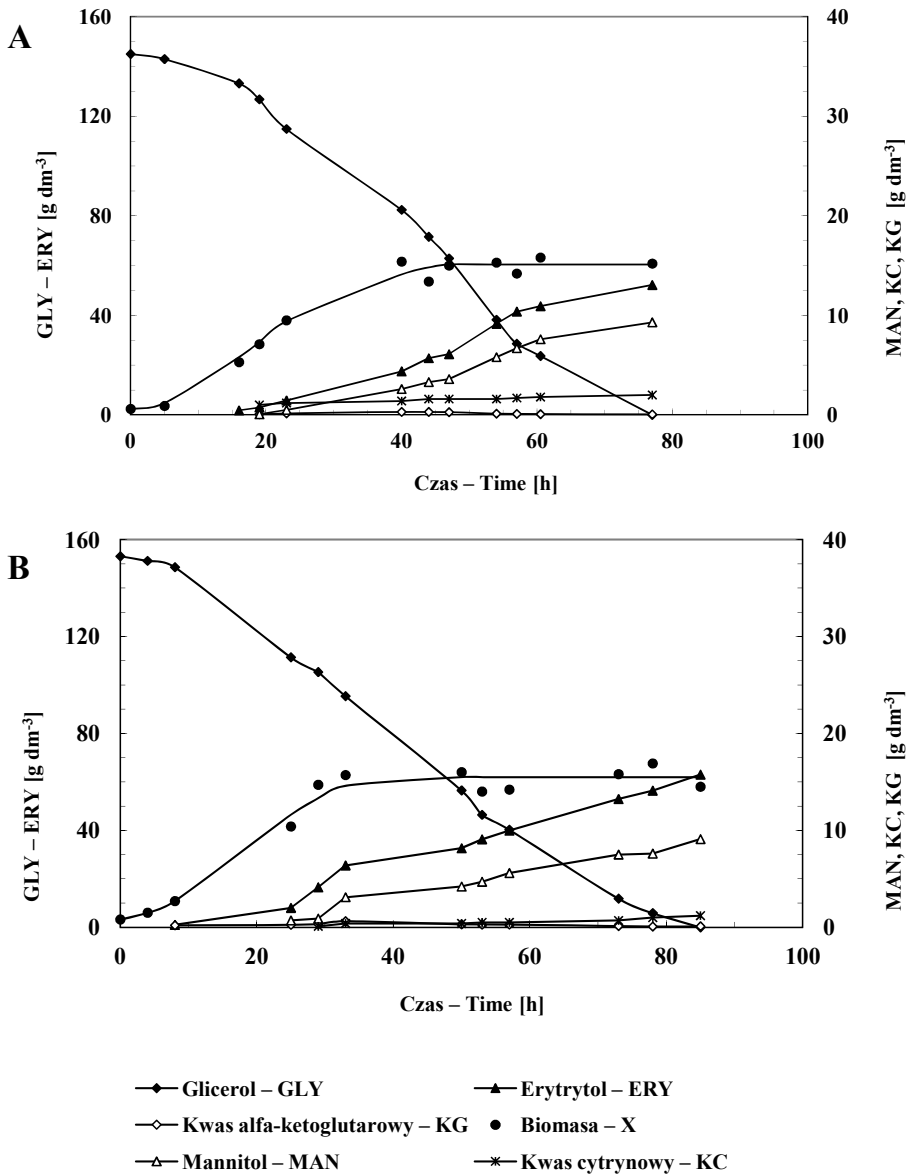


Rys. 1. Produkcja biomasy, alkoholi cukrowych, kwasów organicznych oraz zużycie glicerolu (98%) przez *Y. lipolytica* A-10 w hodowli okresowej

Fig. 1. Production of biomass, sugar alcohols, organic acids and consumption of glycerol (98%) by *Y. lipolytica* A-10 in batch culture

W badaniach prowadzonych przez Rymowicza i in. [2009] drożdże *Y. lipolytica* K1 w hodowli z zasilaniem produkowały 170 g · dm⁻³ erytrytolu z glicerolu odpadowego (300 g · dm⁻³), natomiast w podłożach z glukozą (300 g · dm⁻³) stężenie produktu nie przekroczyło 23 g · dm⁻³. Studia nad biosyntezą erytrytolu przy użyciu innych mikroorganizmów skupiają się głównie na wykorzystaniu glukozy jako źródła węgla. Przy wykorzystaniu tego substratu uzyskana ilość erytrytolu zależy od użytego mikroorganizmu, systemu hodowlanego oraz składu podłoża i waha się w szerokich granicach od 18 do 243 g · dm⁻³ [Jeya i in. 2009, Kim i in. 1997, Koh i in. 2003, Lee i in. 2001, Lin i in. 2001, 2010, Oh i in. 2001, Park i in. 1998, Ryu i in. 2000, Yang i in. 1999]. Najwyższe stężenie erytrytolu (243 g · dm⁻³) zostało uzyskane przez drożdże *Pseudozyma tsukubaensis* w podłożu zawierającym 400 g · dm⁻³ glukozy [Jeya i in. 2009].

Ważnymi parametrami charakteryzującymi biosyntezę pod względem ekonomicznym są: wydajność, szybkość objętościowa oraz właściwa szybkość produkcji określonego metabolitu. Wydajność produkcji erytrytolu przez szczep A-10 była porównywalna w procesach, w których wykorzystano glicerol odpadowy (0,36 i 0,37 g · g⁻¹) (tab. 3). Wyższą wartość tego parametru, równą 0,41 g · g⁻¹ (tab. 3), uzyskano w hodowli bioreaktorowej z czystą gliceryną, jednak wartość ta była niższa od wyniku uzyskanego w hodowli wstrząsanej (0,45 g · g⁻¹) (tab. 1). Podobną wydajność produkcji erytrytolu (0,41 g · g⁻¹) uzyskano przy użyciu *Candida magnoliae* w podłożach z glukozą [Ryu i in. 2000]. Najwyższa jak dotąd wydajność produkcji erytrytolu, równa 0,63 g · g⁻¹, została uzyskana w hodowli z udziałem szczepu *Moniliella* sp. 440 N61188-12 [Lin i in. 2010].



Rys. 2. Produkcja biomasy, alkoholi cukrowych, kwasów organicznych oraz zużycie glicerolu przez *Y. lipolytica* A-10 w hodowli okresowej; substrat: glicerol odpadowy W (A), glicerol odpadowy L (B)

Fig. 2. Production of biomass, sugar alcohols, organic acids from glycerol by *Y. lipolytica* A-10 in batch culture; substrate: raw glycerol W (A), raw glycerol L (B)

Tabela 3. Charakterystyka okresowej biosyntezy erytrytoli z glicerolu przez szczep *Y. lipolytica* A-10Table 3. Characteristic of the erythritol biosynthesis from glycerol in batch culture by A-10 strain of *Y. lipolytica*

Substrat Substrate	Parametr Parameter	Czas Time [h]	X [g·dm ⁻³]	ERY [g·dm ⁻³]	MAN [g·dm ⁻³]	Q _{ERY} [g·dm ⁻³ ·h ⁻¹]	q _{ERY} [g·g ⁻¹ ·h ⁻¹]	Y _{ERY} [g·g ⁻¹]
Czysty glicerol Pure glycerol		85	15,5	63,0	9,0	0,74	0,048	0,41
Glicerol odpadowy W Raw glycerol W		77	15,1	52,2	9,3	0,68	0,045	0,36
Glicerol odpadowy L Raw glycerol L		99	15,8	59,0	4,8	0,60	0,038	0,37

Objętościowa szybkość produkcji erytrytoli wynosiła 0,60 g·dm⁻³·h⁻¹ i 0,68 g·dm⁻³·h⁻¹ przy wykorzystaniu odpowiednio gliceryny odpadowej L i W oraz 0,74 g·dm⁻³·h⁻¹ przy zastosowaniu czystej gliceryny (tab. 2). Uzyskana szybkość produkcji erytrytoli była znacznie wyższa od wyników osiągniętych przez Kim i in. [1997], a także porównywalna z wynikami uzyskanymi przez Lin i in. [2001] dla różnych szczepów drożdży z gatunku *Moniliella*. W zależności od stężenia glukozy w podłożu (14, 22 i 30%) synteza erytrytoli przy wykorzystaniu drożdży *Trichosporon* sp., przebiegała z szybkością objętościową produkcji równą odpowiednio 1,08, 1,51 i 1,23 g·dm⁻³·h⁻¹ [Park i in. 1998]. Wyższe wartości tego parametru w hodowlach okresowych, 1,65 g·dm⁻³·h⁻¹ oraz 1,98 g·dm⁻³·h⁻¹, odnotowano w przypadku biosyntezy erytrytoli przez *Pseudozyma tsukubaensis* KN75 [Jeya i in. 2009] oraz *Moniliella* sp. N61188-12 [Lin i in. 2010].

Szybkość właściwa produkcji erytrytoli była najwyższa w procesie z czystą gliceryną (0,048 g·g⁻¹·h⁻¹), w hodowlach z substratem odpadowym W i L wynosiła odpowiednio 0,045 oraz 0,038 g·g⁻¹·h⁻¹. Wykorzystanie drożdży innych gatunków oraz glukozy umożliwiło osiągnięcie podobnych lub wyższych wartości tego parametru, od 0,045 do 0,098 g·g⁻¹·h⁻¹ [Koh i in. 2003, Oh i in. 2001, Park i in. 1998], niż w prezentowanej pracy.

Wewnątrzkomórkowa zawartość erytrytoli i mannitolu w komórkach drożdży *Y. lipolytica* A-10

Tworzenie alkoholi wielowodorotlenowych jest integralną częścią metabolizmu wielu mikroorganizmów, ściśle związaną z warunkami środowiska hodowlanego [Lucca i in. 2002]. Są wytwarzane jako endogenne rezerwy wykorzystywane w sposób ciągły oraz pełnią funkcje stabilizujące ciśnienie osmotyczne wewnątrz komórek [Dijkema i in. 1985]. Jednak w znacznych ilościach poliole są nagromadzone przede wszystkim przez drobnoustroje osmotolerancyjne, a więc odporne na stres wynikający ze zmian ciśnienia osmotycznego środowiska, objawiający się dehydratacją komórek [Alba-Lois i in. 2004]. Do najpowszechniejszych czynników stresujących należą zasolenie, pH i temperatura [Betts i in. 1999]. Strategie adaptowania się do warunków, w których występuje wysokie stężenie soli, mogą być różne. Może to być wydzielanie sodu z cytoplazmy lub akumulacja jonów sodu bez ich toksycznego oddziaływania na komórkę. Innym mechanizmem jest wewnątrzkomórkowa akumulacja wysokich stężeń substancji ochronnych, w tym

alkoholi wielowodorotlenowych, takich jak glicerol, arabitol, mannitol czy erytrytol, które zapobiegają utracie wody [Almagro i in. 2001, Moon i in. 2010]. Niepublikowane jeszcze wyniki badań autorów tego opracowania wskazują, że jednym z podstawowych czynników wpływających na zwiększenie zewnątrzkomórkowej produkcji erytrytolu w niskim pH, zwłaszcza przy stosowaniu czystego glicerolu, jest dodatek soli. W zaprezentowanych w niniejszej pracy procesach produkcyjnych stosowano dodatek NaCl, którego całkowite stężenie w hodowli z czystym glicerolem wynosiło $25 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$. Zawartość NaCl w substracie odpadowym była różna, stąd całkowita ilość soli w tych procesach wynosiła $25 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ w hodowli z glicerolem odpadowym W oraz $32,5 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ w hodowli z glicerolem odpadowym L. W biomasie drożdży pobranej po zakończeniu hodowli stwierdzono obecność znacznych ilości erytrytolu i mannitolu. Najwyższe stężenie erytrytolu ($112,9$ i $108,7 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ s.m.}$) zawierały komórki odpowiednio z hodowli z glicerolem odpadowym L oraz z hodowli z czystym substratem (tab. 4), co koreluje z wysokim stężeniem erytrytolu zewnątrzkomórkowego. Podobną zależność stwierdzono również w przypadku mannitolu, więcej tego alkoholu wielowodorotlenowego wykazano w płynie po hodowli z czystym glicerolem i glicerolem W oraz w komórkach pochodzących z tych hodowli, odpowiednio $29,11$ oraz $25,38 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ s.m.}$ W dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono informacji na temat zawartości wewnątrzkomórkowych polioli w komórkach drożdży *Y. lipolytica*. Halofilne czarne drożdże *Hortaea werneckii* zdolne do wzrostu przy stężeniu NaCl wynoszącym nawet $5,2 \text{ M}$ nagromadzały w zależności od stężenia soli od $1,95$ do $88,8 \text{ mg}$ erytrytolu na gram s.m [Plemenitas i in. 2008]. Średnia zawartość erytrytolu w komórkach *Pichia sorbitophila* narażonych na stres osmotyczny wynosiła $32,13 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{ s.m.}$ [Kayingo i in. 2001].

Tabela 4. Zawartość polioli i kwasów organicznych w komórkach drożdży *Y. lipolytica* A-10
Table 4. Intracellular amounts of polyols and organic acids in *Y. lipolytica* A-10

Substrat Substrate	Parametr Parameter	ERY	MAN	KC	KG
		[mg · g ⁻¹ s.m.] [mg · g ⁻¹ d.w.]			
Glicerol kosmetyczny; Pure glycerol		108,73	29,11	2,14	≤1,0
Glicerol odpadowy W; Raw glycerol W		77,26	25,38	2,55	≤1,0
Glicerol odpadowy L; Raw glycerol L		112,9	20,5	n.d.	≤1,0

n.d. – nie wykryto – not detected

PODSUMOWANIE

Wszystkie spośród badanych szczepów drożdży *Y. lipolytica* były zdolne do biosyntezy erytrytolu z glicerolu. Wybrany szczep produkcyjny A-10 produkował znaczne ilości erytrytolu zarówno z glicerolu czystego, jak i odpadowego, z niewielkim udziałem produktów ubocznych. W ostatnich latach, ze względu na wzrost produkcji biodiesła, zwiększyła się podaż glicerolu odpadowego. Wyniki uzyskane w prezentowanej pracy wskazują na możliwość zastosowania wybranego szczepu do doskonalenia procesu produkcji erytrytolu z taniego i atrakcyjnego surowca, jakim jest glicerol odpadowy.

PIŚMIENNICTWO

- Alba-Lois L., Segal C., Rodarte B., Valdes-Lopez V., DeLuna A., Cardenas R., 2004. NADP-glutamate dehydrogenase activity is increased under hyperosmotic conditions in the halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Curr. Microbiol.*, 48, 68–72.
- Almagro A., Prista C., Begona B., Loureiro-Dias M.C., Ramos J., 2001. Cloning and Expression of Two Genes Coding for Sodium Pumps in the Salt-Tolerant Yeast *Debaryomyces hansenii*. *J. Bacteriol.*, 183, 3251–3255.
- Aoki M., Pastore G., Park Y., 1993. Microbial transformation of sucrose and glucose to erythritol. *Biotechnol. Lett.*, 15(4), 383–388.
- Bernt W., Borzelleca J., Flamm G., Munro I., 1996. Erythritol: a review of biological and toxicological studies. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 24, 191–197.
- Betts G.D., Linton P., Betteridge R.J., 1999. Food spoilage yeasts: effects of pH, NaCl and temperature on growth. *Food Control*, 10, 27–33.
- de Cock P., Bechert C.-L., 2002. Erythritol. Functionality in noncaloric functional beverages. *Pure Appl. Chem.* 74(7), 1281–1289.
- Dijkema C., Kester H.C.M., Visser J., 1985. ¹³C NMR studies of carbon metabolism in the hyphal fungus *Aspergillus nidulans*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 82, 14–18.
- Goossens J., Röper H., 1994. Erythritol: a new sweetener. *Food Sci. Technol. Today*, 8 (3), 144–149.
- Hajny G., Smith J., Garver J., 1964. Erythritol production by a yeast-like fungus. *Appl. Microbiol.* 12 (3), 240–246.
- den Hartog G.J.M., Boots A.W., Adam-Perrot A., Brouns F., Verkooijen I.W.C.M., Weseler A.R., Haenen G.R.M.M., Bast A., 2009. Erythritol is a sweet antioxidant. *Nutrition*, 26 (4), 449–458.
- Hiele G., Ghoo Y., Rutgeerts P., Vantrappen G., 1993. Metabolism of erythritol in humans: comparison with glucose and lactitol. *Nr. J. Nutr.*, 69, 169–176.
- Jeya M., Lee K.-M., Kumar T. M., Kim J.-S., Gunasekaran P. Kim S.-Y., Kim I.-W., Lee J.-K., 2009. Isolation of a novel high erythritol-producing *Pseudozyma tsukubaensis* and scale-up of erythritol fermentation to industrial level. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 83, 225–231.
- Kayingo G., Kilian S.G., Prior B., 2001. Conservation and release of osmolytes by yeasts during hypo-osmotic stress. *Arch. Microbiol.*, 177, 29–35.
- Kim S.Y., Lee K.H., Kim J.H., Oh D.K., 1997. Erythritol production by controlling osmotic pressure in *Trigonopsis variabilis*. *Biotechnol. Lett.*, 19 (8), 727–729.
- Kim K.A., Noh B.S., Lee J.K., Kim S.Y., Park Y.C., Oh D.K., 2000. Optimization of culture conditions for erythritol production by *Torula* sp. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 10, 69–74.
- Koh E.S., Lee T.H., Lee D.Y., Kim H.J., Ryu Y.W., Seo J.H., 2003. Scale-up of erythritol production by an osmophilic mutant of *Candida magnoliae*. *Biotechnol. Lett.*, 25, 2103–2105.
- Lee J.K., Ha S.J., Kim S.Y., Oh D.K., 2001. Increased erythritol production in *Torula* sp. With inositol and phytic acid. *Biotechnol. Lett.*, 23, 497–500.
- Lin S.J., Wen C.Y., Liao J.C., Chu W.S., 2001. Screening and production of erythritol by newly isolated osmophilic yeast-like fungi. *Proc. Biochem.*, 36, 1249–1258.
- Lin S.J., Wen C.J., Wang P.M., Huang J.C., Wei C.L., Chang J.W., Chu W.S., 2010. High-level production of erythritol by mutants of osmophilic *Moniliella* sp. *Proc. Biochem.*, 45 (6), 973–979.
- Lucca M.E., Spencer J.F.T., de Figueroa L.I.C., 2002. Glycerol and arabitol production by an intergeneric hybrid, PB2, obtained by protoplast fusion between *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulasporea delbrueckii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 59, 472–476.

- Makinen K., Isotupa K., Kivilompolo T., Makinen P., Toivanen J., Soderling E., 2001. Comparison of erythritol and xylitol saliva stimulants in the control of dental plaque and mutants *Streptococci*. *Caries Res.*, 35, 129–135.
- Mitsubishi, Nikken, 1996. Private communication from Mitsubishi Chemical Corp. and Nikken Chemical Co.
- Moon H.J., Jeya M., Kim I.W., Lee J.K., 2010. Biotechnological production of erythritol and its applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 86, 1017–1025.
- Oh D.K., Cho C.H., Lee J.K., Kim S.Y., 2001. Increased erythritol production in fed-batch cultures of *Torula* sp. by controlling glucose concentration. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 26, 248–252.
- Onishi H., 1960. Studies on osmophilic yeasts. Isolation of a new obligate halophilic yeast and some consideration on halophilism. *Bull. Agric. Chem. Soc. Jpn.*, 24, 226–230.
- Park J.B., Seo B.C., Kim J.R., Park Y.K., 1998. Production of erythritol in fed-batch cultures of *Trichosporon* sp. *J. Ferment. Bioeng.*, 86, 577–580.
- Park Y.C., Lee D.Y., Lee D.H., Kim H.J., Ryu Y.W., Jin H., Seo J.H., 2005. Proteomics and physiology of erythritol-producing strains. *J. Chromatogr.*, 815, 251–260.
- Pfeifer V., Sohns V., Conway H., Lancaster E., Dabic S., Griffin E., 1960. Two stage process for dialdehyde starch using electrolytic regeneration of periodic acid. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 52, 201–206.
- Plemenitas A., Vaupotic T., Lenassi M., Kogej T., Gunde-Cimerman N., 2008. Adaptation of extremely halotolerant black yeast *Hortaea werneckii* to increased osmolarity: a molecular perspective at a glance. *Studies in Mycology*, 61, 67–75.
- Rymowicz W., Juszczak P., Rywińska A., Żarowska B., Musiał I., 2005. Produkcja kwasu cytrynowego z odpadowego glicerolu przez drożdże *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnologia Monografie*, 2 (2), 46–54.
- Rymowicz W., Rywińska A., Gładkowski W., 2008. Simultaneous production of citric acid and erythritol from crude glycerol by *Yarrowia lipolytica*. *Chem. Pap.*, 60, 391–394.
- Rymowicz W., Rywińska A., Marcinkiewicz M., 2009. High-yield production of erythritol from raw glycerol in fed-batch cultures of *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol., Lett.*, 31, 377–380.
- Ryu Y.W., Park C.Y., Park J.B., Kim S.Y., Seo J.H., 2000. Optimization of erythritol production by *Candida magnoliae* in fed-batch culture. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 25, 100–103.
- Röper H., Goossens J., 1993. Erythritol, a new raw material for food and non-food applications. *Starch*, 45 (11), 400–405.
- Sawada K., Taki A., Yamakawa T., Seki M., 2009. Key role for transketolase activity in erythritol production by *Trichosporonoides megachiliensis* SN-G42. *J. Biosci. Bioeng.*, 108, 385–390.
- Shindou T., Sasaki Y., Miki H., Hagiwara K., Ichikawa T., 1988a. Determination of erythritol in fermented foods by high performance liquid chromatography. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, 29 (6), 419–422.
- Ueda M., Yamagishi K., 1997. Method for producing erythritol. European Patent Application EP0770683
- Veiga-da-Cunha M., Santos H., Van Schaftingen E., 1993. Pathway and regulation of erythritol formation in *Leuconostoc oenos*. *J. Bacteriol.*, 175, 3941.
- Vogt A., 2004. Nowa technologia otrzymywania estrów etylowych wyższych kwasów tłuszczowych z tłuszczów roślinnych i zwierzęcych – komponentów biopaliw i surowców oleochemicznych. *Mat. Konf. Regionalna konferencja naukowo-techniczna: fakty i mity o biopaliwach*, Wrocław, 17–32.
- Yang S.-W., Park J.-B., Han N.S., Ryu Y.-W., Seo J.-H., 1999. Production of erythritol from glucose by an osmophilic mutant of *Candida magnoliae*. *Biotechnol Lett.*, 21, 887–890.
- www.foodnavigator.com

SCREENING OF *YARROWIA LIPOLYTICA* YEAST STRAINS FOR ERYTHRITOL PRODUCTION FROM GLYCEROL

Abstract. The ability of eight strains of *Yarrowia lipolytica* yeast to produce erythritol from glycerol was investigated in ten-days flask cultures. The yeast produced 27.9–33.6 g · dm⁻³ of erythritol with yield varying from 0.36 to 0.53 g · g⁻¹.

After statistical analysis *Y. lipolytica* A10 strain was chosen for further investigation. The yield and kinetics of erythritol production by selected strain were examined in batch culture conducted in bioreactor. Tested strain produced 63 and 59 g · dm⁻³ of erythritol with yield 0.41 and 0.37 g · g⁻¹ in cultures containing 150 g · dm⁻³ of pure and raw glycerol, respectively. The highest volumetric productivity (0.74 g · dm⁻³) and specific production rate of erythritol (0.048 g · g⁻¹ · h⁻¹) was achieved in the culture with pure glycerol. Intracellular erythritol concentration was ranging between 77.3–112.9 mg · g⁻¹ d.w., depending on type of glycerol used.

Key words: erythritol, glycerol, raw glycerol, *Yarrowia lipolytica*, batch culture

Accepted for print – Zaakceptowano do druku: 30.03.2011

For citation – Do cytowania: Tomaszewska L., Rywińska A., Musiał I., Utecht M., Juszczak P., Rymowicz W., Wojtatowicz M., Połomska, X., 2011. Skrining szczepów drożdży *Yarrowia lipolytica* do biosyntezy erytrytolu z glicerolu. Acta Sci. Pol. Biotechnol., 10 (1), 15–28.

PORÓWNANIE METOD EKSTRAKCJI DNA Z KOMÓREK RÓŻNYCH GATUNKÓW DROŻDŻY

Michał Piegza, Wojciech Barszczewski, Piotr Juszczyk,
Maria Wojtatowicz, Małgorzata Robak

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Streszczenie. W diagnostyce mikrobiologicznej coraz częściej stosowane są metody oparte na powieleniu DNA. Jednym z czynników ograniczającym amplifikację fragmentów genu jest metoda ekstrakcji DNA.

Dlatego celem pracy było porównanie trzech metod ekstrakcji genomowego DNA z komórek szczepów drożdży: *Yarrowia lipolytica*, *Geotrichum candidum*, *Rhodotorula rubra*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida famata*, *Candida guilliermondii* oraz *Schizosaccharomyces pombe*. Skuteczność ekstrakcji oceniano na podstawie obecności produktu amplifikacji fragmentu rDNA zawartego pomiędzy sekwencjami komplementarnymi do pary primerów: NS3 i ITS4.

Stosując do izolacji DNA najprostszą metodę ekstrakcji (metoda A), nie otrzymano produktu PCR w przypadku szczepów z trzech gatunków. Metoda Hoffmanna (metoda C) umożliwiła uzyskanie ze wszystkich badanych izolatów wystarczającej ilości DNA i otrzymanie produktu PCR wybranego fragmentu genu rRNA. W odniesieniu do szczepów z gatunku *G. candidum* pozytywne wyniki otrzymano także przy zastosowaniu metody opartej na termicznej lizie komórek (metoda B). Wykazano, że zastosowana metoda nie ma wpływu na wielkość powielanego fragmentu rDNA.

Słowa kluczowe: drożdże, metody ekstrakcji DNA, NS3-ITS4 rDNA

WSTĘP

Łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR), opisana w 1985 roku przez Kary Mullisa [Mullis i in., 1986] stała się przełomową metodą umożliwiającą zwielokrotnienie materiału genetycznego niezbędnego do identyfikacji i różnicowania organizmów. Bazując na PCR, opracowano wiele technik, które są stosowane w kryminalistyce, medycynie, badaniach filogenetycznych [Słomski 2004]. Także w diagnostyce mikrobiologicznej coraz częściej wykorzystuje się metody oparte na powieleniu DNA. Najczęściej stosowane jest

© Copyright by Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Adres do korespondencji – Corresponding author: Małgorzata Robak, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, ul. Chełmońskiego 37/41, 51-630 Wrocław; malgorzata.robak@up.wroc.pl

tak zwane rybotypowanie, czyli ustalenie podobieństwa sekwencji nukleotydowej fragmentu genów rRNA kodujących 16SrRNA i 18SrRNA, odpowiednio dla bakterii i drobnoustrojów eukariotycznych. Stosowane są także metody losowo amplifikujące matrycowe DNA za pomocą wybranych sekwencji starterowych [Williams i in. 1990; Welsh i Mc Clelland 1990, Robak i in. 2005]. Jakkolwiek na rynku dostępne są już gotowe zestawy do molekularnej identyfikacji niektórych gatunków bakterii [Alpco Diagnostic, Dr.Chip Biotechnology Inc., BioChain], to badania zmierzające do opracowania rutynowych testów diagnostycznych w przypadku innych drobnoustrojów, w tym również drożdży, są w toku realizacji.

Czynniki, które wpływają na końcowy wynik reakcji PCR, to przede wszystkim: profil temperaturowo-czasowy, stężenie reagentów, sekwencje starterów, stosunek stężenia matrycy DNA do stężenia starterów, pochodzenie polimerazy DNA oraz jakość odczynników [Meunier i in. 1993, Micheli i in. 1994, Tyler i in. 1997]. Czynnikiem ograniczającym jest również metoda ekstrakcji DNA. W piśmiennictwie, w odniesieniu do drożdży opisano kilka sposobów uzyskania genomowego DNA [Piper 1996, Sambrook i in., 1998]. Powszechnie stosowana jest metoda Hoffmana i jej modyfikacje, wprowadzające np. szklane perełki jako czynnik efektywnie rozbijający komórki drożdży *Yarrowia lipolytica* [Barth i Gaillardin 1996, Barszczewski i Robak 2004]. Niektórzy badacze opisują wyniki PCR otrzymane poprzez zastosowanie materiału bez izolacji DNA i przeprowadzając amplifikację DNA na biomacie pobranej bezpośrednio z agaru, stosując hydrolizę alkaliczną lub poddając komórki obróbce termicznej [Deak i in. 2000, Marcellino i in., 2001]. Stosowane modyfikacje wypływają z faktu, że do PCR potrzebna jest niewielka ilość DNA, 5–20 ng (czasami wystarczy 1 ng), a zawsze poszukiwana jest możliwość uproszczenia metodologii, nie tylko ze względu na jej pracochłonność, ale często z powodu ograniczeń finansowych. Uproszczenie metody ekstrakcji DNA i wyeliminowanie pewnych jej etapów jest uzasadnione ekonomicznie, ponieważ wynik możemy uzyskać w krótszym czasie i przy niższych nakładach finansowych.

Dlatego celem prezentowanej pracy było porównanie trzech metod ekstrakcji DNA z komórek drożdży należących do gatunków filogenetycznie dość odległych od siebie. Do badań wybrano szczepy z następujących gatunków : *Yarrowia lipolytica*, *Geotrichum candidum*, *Rhodotorula rubra*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida famata*, *Candida guilliermondii* oraz *Schizosaccharomyces pombe*. Skuteczność ekstrakcji była oceniana na podstawie obecności produktu amplifikacji fragmentu rDNA zawartego pomiędzy sekwencjami komplementarnymi do pary primerów NS3 i ITS4 [White i in., 1990]. Wykorzystanie PCR-rDNA jako metody do oceny skuteczności ekstrakcji dostarczy nowych informacji na temat wielkości tego fragmentu genu dla kilku innych niż *S. cerevisiae* gatunków drożdży.

MATERIAŁY I METODY

Szczepy drożdży i warunki hodowli. Listę oraz pochodzenie piętnastu szczepów drożdży stosowanych w pracy podano w tabeli 1, zestawiając je według kolejności ścieżek w prezentowanych rozdziałach elektroforetycznych (Lp.= numer ścieżki). Szczepy pochodziły z własnej kolekcji czystych kultur (Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, AR Wrocław) oraz z następujących uznanych światowych kolekcji: ATCC

(American Type Culture Collection), CLIB (Collection des Levures d'Intere Biotechnologique, France), PCM (Polish Collection of Microorganismes), NCAIM (National Collection of Agriculture and Industrial Microorganisms, Węgry), CBS (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Holandia).

Hodowle drożdży prowadzono w 25 ml podłoża YM, w kolbach o pojemności 250 ml, na wytrząsarce (160 ± 5 rpm), w temperaturze 30°C przez 20 godzin. Podłoże YM miało następujący skład w g x l⁻¹: glukoza (10), pepton (5), ekstrakt maltozowy (3) oraz ekstrakt drożdżowy (3).

Tabela 1. Pochodzenie szczepów

Table 1. Strains provenance

Lp. No	Szczep Strain	Pochodzenie szczepów Strains provenance
1.	<i>Yarrowia lipolytica</i> A 101 1.31	A-101 UV Mutant ^a
2.	<i>Y. lipolytica</i> A 101	Gleba – Soil ^a
3.	<i>Y. lipolytica</i> W 29	Gleba – Soil ^a
4.	<i>Y. lipolytica</i> ATCC 32328A	Gleka – Soil ^a
5.	<i>Y. lipolytica</i> PH6a	Mleko – Milk ^a
6.	<i>Geotrichum candidum</i> MSK(3)11	Słód – Malt ^a
7.	<i>G. candidum</i> PH1	Pióra kurze – chicken feathers ^a
8.	<i>G. candidum</i> OL	Mleko – Milk ^a
9.	<i>G. candidum</i> KB5	Ser – Cheese ^a
10.	<i>G. candidum</i> KB6	Ser – Cheese ^a
11.	<i>S. cerevisiae</i> PCM 2103	Muzealny szczep – type strain
12.	<i>Rhodotorula rubra</i>	Piwo – Beer ^a
13.	<i>Candida famata</i> NCAIM 898	Muzealny szczep – type strain
14.	<i>C. guilliermondii</i> CBS 566	Muzealny szczep – type strain
15.	<i>pombe</i> CBS 356	Muzealny szczep – type strain

^a szczepy zdeponowane w Kolekcji Czystych Kultur Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu

^a strains deposited at the Pure Cultures Collection of the Department of Biotechnology and Food Microbiology of the Wrocław University of Environmental and Life Sciences

Metody ekstrakcji DNA. Materiał genetyczny ekstrahowano z biomasy uzyskanej z 1 ml 20-godzinnej hodowli drożdży. Stosowano trzy metody ekstrakcji: metodę (A), polecaną przez Deák i in. [2000]; metodę (B), procedurę wykorzystywaną przez Al-Rawi'ego i Kavanagh [1998], w której zastosowano temperaturę 50°C zamiast 100°C , nieznacznie zmieniono skład buforu oraz wprowadzono etapy dezintegracji z perełkami szklanymi; metodę (C), metodę Hoffmana zmodyfikowaną poprzez zastosowanie szklanych perełek [Barth i Gaillardin 1998]. W tabeli 2 zestawiono główne etapy i wypunktowano zasadnicze różnice postępowania w stosowanych metodach ekstrakcji DNA. Szczegółowe postępowanie w przypadku metody (A) było zgodne z procedurą opisaną przez Deák i in. [2000], natomiast detale dotyczące metody (B) i (C) zawarto w opublikowanych pracach, odpowiednio Piegza i in. [2006] oraz Barszczewski i Robak [2004].

Tabela 2. Porównanie metod ekstrakcji DNA
Table 2. Comparison of DNA extraction methods

Główne etapy ekstrakcji DNA Main step of DNA extraction	Metoda – Method		
	A (Deak)	B (Al-Rawi &Kavanagh)	C (Hofman)
Płukanie – Washing	H ₂ O	PBS	H ₂ O
Obróbka termiczna Thermal treatment	100°C 10 min	50°C 1 h	no
Mechaniczna dezintegracja komórek Mechanical disintegration of cells	no	perelki szklane trawione HNO ₃ HNO ₃ treated glass beads	perelki szklane trawione HNO ₃ HNO ₃ treated glass beads
Liza chemiczna Chemical lysis	no	Bufor SS, SDS, mercaptoetanol Buffer SS, SDS, mercaptoethanol	Bufor BB Buffer BB SDS, Triton –X100
Ekstrakcja – Extraction	no	PCIA*	PCIA*
Precypitacja – Precipitation	no	Etanol – Ethanol	Etanol – Ethanol
Oczyszczanie – Purification	no	RNaza – RNase	RNaza – RNase

*PCIA : fenol, chloroform, alkohol izoamylowy [25:24:1]
phenol, chloroform, isoamyl alcohol [25:24:1]

PCR. Ocenę skuteczności ekstrakcji genomowego DNA przeprowadzono na podstawie obecności produktu amplifikacji regionu rDNA ograniczonego primerami NS3: 5'-GCA-AGTCTGGTGCCAGCAGCC-3' oraz ITS4 :5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3', które generują w przypadku szczepu *S. cerevisiae* S288C produkt o wielkości 2059 pz (wielkość obliczona na podstawie sekwencji zawartej w Saccharomyces Genome Database, SGD). Warunki PCR oraz wizualizacje produktów przeprowadzono zgodnie z wcześniej opisaną metodyką [Barszczewski i Robak 2004]. W miarę możliwości stosowano odczynniki tej samej firmy. Enzymy restrykcyjne zakupiono w litewskiej firmie Fermentas.

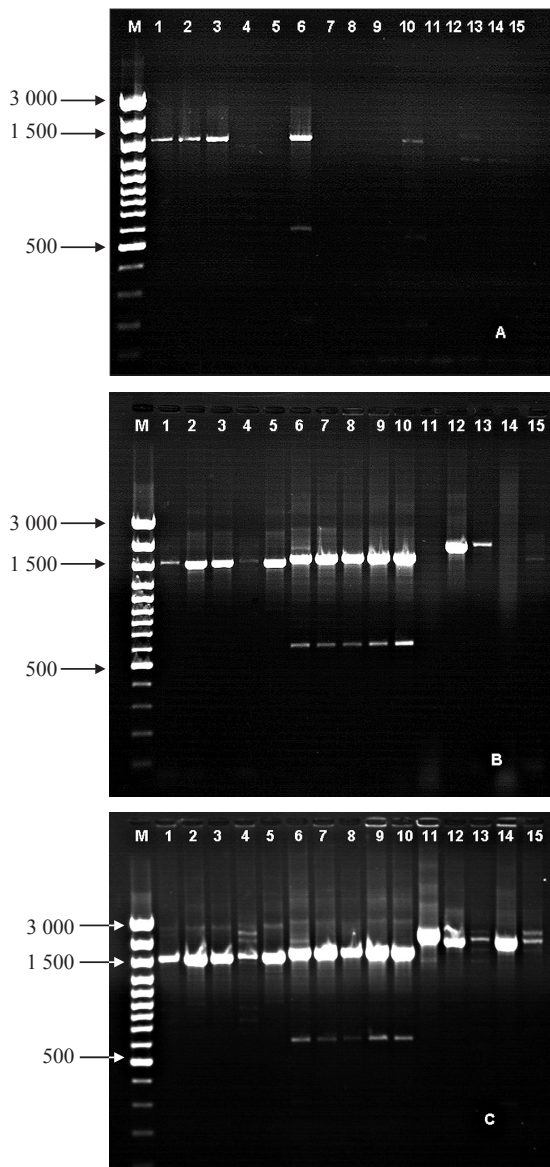
WYNIKI I DYSKUSJA

Metody oparte na PCR są wszechstronnie stosowane w analityce mikroorganizmów. Umożliwiają nie tylko powielenie określonego genu czy jego fragmentu, ale są także stosowane do różnicowania i identyfikacji szczepów, np. drożdży [Cadez i in., 2002, Perez i in., 2001, Petersen i in., 2001, Andrade i in.2009, Fadda i in. 2010]. Pomimo stosunkowo łatwej metodyki ekstrakcji DNA i udogodnień, jakimi dysponują dostępne handlowo gotowe zestawy (kity), materiał genetyczny z niektórych gatunków drożdży jest trudny do uzyskania. W niniejszej pracy najlepsze wyniki, w postaci obecności produktu amplifikacji wszystkich szczepów, uzyskano, stosując metodę C, czyli zmodyfikowaną metodę Hoffmana (rys. 1C). W przypadku zastosowania metody B, zmodyfikowanej procedury Al-Rawi'ego i Kavanagh [1998] nie otrzymano wyników w odniesieniu do *S. cerevisiae* (L 11), *C. guilliermondii* (L 14), *Schizosaccharomyces pombe* (L15) (rys. 1 B). Stosując

metodę A, z gotowaniem biomasy według Deáka i in. [2000], „czytelne” produkty otrzymano tylko dla pięciu z piętnastu szczepów: trzech szczepów *Y. lipolytica* oraz dwóch *G. candidum* (rys. 1 A). Obecności produktów można się jeszcze „dopatrzeć” na ścieżkach nr 13 i 14, odpowiednio dla *C. famata* oraz *C. guilliermondii*.

W przypadku szczepów, dla których otrzymano wyniki w dwóch lub trzech analizach, amplifikowany produkt był zawsze jednakowej wielkości. U szczepów *Y. lipolytica* oraz *G. candidum* otrzymany „główny” produkt był podobnej wielkości, odpowiednio 1578 i 1661pz. Obok tego produktu, w odniesieniu do wszystkich szczepów *G. candidum*, wykazano obecność mniejszego produktu około 630 pz, a w niektórych szczepach *Y. lipolytica* obecność jednego lub dwóch produktów o większej masie, około 2000 i 2500 pz. Niewiele jest wiadomo o budowie genu kodującego rRNA w komórkach *G. candidum*. W przypadku pięciu kolejnych szczepów *Galactomyces geotrichum* (teleomorficzna postać *G. candidum*) poznano sekwencje obejmujące fragmenty 18SrRNA i 26SrRNA, o wielkości od 200 do 1800pz [Boekhout i in. 2000, Gente i in. 2002]. Natomiast w odniesieniu do drożdży *Y. lipolytica* wiadomo, że pakiet kodujący poszczególne rRNA występuje na kilku chromosomach w różnej liczbie tandemowych powtórzeń [Casaregola i in. 2000]. W przypadku obu gatunków istnieje możliwość powielenia dwóch lub trzech różnych fragmentów genów rRNA, np. niezawierających pełnych sekwencji intronowych (ITS1 i ITS2) lub różniących się budową innych jego regionów. Biorąc pod uwagę *G. candidum*, obserwowano nawet zmienną wielkość chromosomów [Gente i in. 2002, de Hoog i Smith 2004]. Istnieje także możliwość powielenia pozachromosomowych elementów genetycznych, np. mtDNA, którego sekwencja i wielkość do dziś nie jest poznana u *G. candidum*. Mniejszy produkt (630 pz) może być powielonym fragmentem mitochondrialnego rDNA.

Dla pozostałych szczepów – *R. rubra*, *C. famata* NCAIM 898, *C. guilliermondii* CBS 566, *S. pombe* CBS 356 – otrzymano jeden produkt zawierający od 2000 do 2464 pz. Wielkość tego produktu jest zbliżona do teoretycznie wyznaczonej wielkości dla szczepu *S. cerevisiae* S288C (dla którego całkowicie poznano sekwencje genomu). Wielkość tego fragmentu wynosi 2059 pz. Wielkość otrzymanego produktu dla szczepów tej ostatniej grupy wskazuje również na duże podobieństwo budowy zespołu rDNA. Lepingle i in. [2000] wykazali dużą, bo wynoszącą 89–94% homologię sekwencji regionów kodujących poszczególne rRNA u *S. cerevisiae* i *Debaryomyces hansenii* (*C. famata*).



Rys. 1. Produkty amplifikacji genomowego DNA wyizolowanego z poszczególnych szczepów drożdży trzema metodami: wg Deáka (A), zmodyfikowaną metodą Al-Rawi'ego i Kavanagh (B) oraz zmodyfikowaną metodą Hoffmana (C). M, marker Gene Ruler 100bp DNA Ladder Plus. Kolejność ścieżek odpowiada liczbie porządkowej szczepów podanej w tabeli 1

Fig. 1. Amplification products of genomic DNA isolated from particular yeast strains by three methods: according to Deak (A), modified Al-Rawi and Kavanagh (B), and modified Hoffman (C). M, marker Gene Ruler 100bp DNA Ladder Plus. Lane labeling is in concordance with the strain number in Table 1.

PODSUMOWANIE

Najprostsza metodyka ekstrakcji, według Deáka i in., zastosowana do izolacji DNA z badanych szczepów, nie dała zadowalającego efektu, nie otrzymano produktu amplifikacji w przypadku szczepów z trzech gatunków. Metoda Hoffmanna, z zastosowaniem szklanych perełek trawionych kwasem azotowym, umożliwiła uzyskanie z wszystkich badanych izolatów takiej ilości odpowiednio czystego preparatu DNA, który doprowadził do otrzymania produktu amplifikacji wybranego fragmentu genu rRNA. W odniesieniu do szczepów z gatunku *G. candidum* pozytywne wyniki otrzymano również przy zastosowaniu drugiej w kolejności metody opartej na termicznej lizie komórek, czyli zmodyfikowanej metody Al-Rawi'ego i Kavanagh.

W pracy wykazano także, że zastosowana metoda nie ma wpływu na wielkość fragmentu amplifikacji rDNA z wykorzystaniem primerów NS3 i ITS4. Dla *R. rubra*, *C. famata* NCAIM 898, *C. guilliermondii* CBS 566 oraz *S. pombe* CBS 356 otrzymano amplikony o wielkości podobnej do wielkości fragmentu NS3-ITS4 rDNA u *S. cerevisiae*. Natomiast dla *Y. lipolytica* i *G. candidum* fragmenty te były o 480–600 pz krótsze.

PIŚMIENNICTWO

- Al-Rawi N., Kavanagh K., 1998. A rapid method for the extraction of whole cell proteins from *Candida* species, *Journal of Microbiological Methods*, 34, 107–112.
- Andrade M.J., Rodriguez M., Casado E.M., Bermudez E., Cordoba J.J., 2009. Differentiation of yeasts growing on dry Iberian ham by mitochondrial DNA restriction analysis, RAPD-PCR and their volatile compounds production. *Food Microbiology*, 26, 578–586
- Barth G., Gaillardin C., 1996. *Yarrowia lipolytica* in Non-conventional Yeasts in Biotechnology, ed K. Wolf, Springer, Berlin, 334–380.
- Barszczewski W., Robak M., 2004. Differentiation of contaminating yeasts in brewery by PCR-based techniques. *Food Microbiology*, 21, 227–231.
- Boekhout T., Robert V., Smith M.T., Stulpers J., Yarrow D., Boer D., Buis R., Gijswijt G., Kurtzman C.P., Fell J.W., Gueho E., Guillot J., Roberts I., 2000. Yeast of the Word, ETI & CBS, CD version 2.
- Cadez N., Raspor P., de Cock A. W. A. M., Boekhout T., Smith M. T., 2002. Molecular identification and genetic diversity within species of the genera *Hanseniaspora* and *Kloeckera*. *FEMS Yeast Research*, 1 (4), 279–289.
- Casaregola S., Neuveglise C., Lepingle A., Bon E., Feynerol C., Artiguenave F., Wincker P., Gaillardin C., 2000. Genomic exploration of the *Hemiascomycetous* Yeasts: 17. *Yarrowia lipolytica*, *FEBS Letters*, 487, 95–100.
- Deák T., Chen J., Beuchat L.R., 2000. Molecular characterization of *Yarrowia lipolytica* and *Candida zeylanoides* Isolated from Poultry. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66 (10), 4340–4344.
- de Hoog G.S., Smith M.Th., 2004. Ribosomal gene phylogeny and species delimitation in *Geotrichum* and its teleomorphs, *Studies in Mycology*, 50, 489–515.
- Fadda M.E., Viale S., Deplano M., Pisano M.B., Cosentino S., 2010. Characterization of yeast population and molecular fingerprinting of *Candida zeylanoides* isolated from goats' milk collected in Sardinia. *International Journal of Food Microbiology*, 136, 376–380.
- Gente S., Desmasures N., Panoff J-M., Guegue M., 2002. Genetic diversity among *Geotrichum candidum* strains from various substrates studied using RAM and RAPD-PCR, *Journal of Applied Microbiology*, 92, 491–501.

- Lepingle A., Casaregola S., Neuveglise C., Bon E., Nguyen H-V., Artiguenave F., Wincker P., Gailardin C., 2000. Genomic exploration of the *Hemiascomycetous* Yeasts: 14. *Debaryomyces hansenii*, FEBS Letters, 487, 82–86.
- Marcellino N., Beuvier E., Grappin R., Gueguen M., Benson D.R., 2001. Diversity of *Geotrichum candidum* Strains Isolated from Traditional Cheese making Fabrications in France. Appl. Environ. Microbiol., 67 (10), 4752–4759.
- Meunier J-R., Grimont P.A.D., 1993. Factors Affecting Reproducibility of Random Amplified Polymorphic DNA fingerprinting. Res. Microbiol., 144, 373–379.
- Micheli M.R., Bova R., Pascale E., D'Ambrosio E., 1994. Reproducible DNA fingerprinting with the Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Method. Nucl. Acid. Res., 22 (10), 1921–1922.
- Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki S., Horn G., Erlich H., 1986. Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction w: Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 51, 263–273.
- Perez M. A., Gallego F. J., Hidalgo P., 2001. Evaluation of molecular techniques for the genetic characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains, FEMS Microbiology Letters, 205, 375–378.
- Petersen K.M., Moller P.L., Jespersen L., 2001, DNA typing methods for differentiation of *Debaryomyces hansenii* strains and other yeasts related to surface ripened cheeses. Int. J. Food Microbiol., 69, 11–24.
- Piegza M., Barszczewski W., Witkowska D., Stempniewicz R., Robak M., 2006, Differentiation of *Geotrichum candidum* yeasts by PCR-RFLP rDNA and RAPD, EJPAU, 9(3), art. 21.
- Piper P., 1996. Isolation of yeast DNA, in Methods in molecular Biology , vol 53, Yeast Protocols edited by: I.Evans Humana Press Inc.Totowa, NJ.
- Robak M., Baranowska K., Barszczewski W., Wojtatowicz M., 2005, RAPD jako metoda różnicowania i identyfikacji drożdży. Biotechnologia, 4(71), 142–155.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Mantias T., 1998, Molecular cloning. A laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- Słomski R., 2004. Przykłady analiz DNA, Wydawnictwo Akademii Rolniczej im. Augusta Cieszkowskiego w Poznaniu.
- Tyler K.D., Wang G., Tyler S.D., Johnson W.M., 1997, Factors Affecting Reliability and Reproducibility of Amplification-based DNA Fingerprinting of Representative Bacterial Pathogens. J. Clin. Microbiol. 1997, 339–346.
- Welsh i Mc Clelland, 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers . Nucl.Acids. Res.18(24),7213–7218
- Williams J.G.K., Kubelic A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S., 1990. DNA Polymorphisms Amplified by Arbitrary Primers are Useful as Genetic Markers. Nucl.Acid.Res., 18 (22), 6531–6535.
- White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. [in:] PCR Protocols: A guide to methods and application, eds: Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J., Academic Press, London, 315–322.

COMPARISON OF DNA EXTRACTION METHODS FROM CELLS OF DIFFERENT YEASTS SPECIES

Abstract. Recently, increased usage of methods based on DNA amplification in microbial diagnostics is observed. One of the limiting factors of these methods is the extraction of DNA. The aim of this paper was to compare three extraction methods of DNA from yeast cells of *Yarrowia lipolytica*, *Geotrichum candidum*, *Rhodotorula rubra*, *Saccharomyces*

cerevisiae, *Candida famata*, *Candida guilliermondii* and *Schizosaccharomyces pombe*. The effectiveness of extraction method was estimated by the presence of rDNA fragment amplified with NS3 and ITS4 primers.

In case of the simplest method of DNA isolation (method A) no PCR products were detected for strains of three tested species. Hoffman's method (method C) allowed to receive enough DNA and to obtain appropriated products in PCR for all tested isolates. In the case of *G. candidum* strains the positive results were obtained for thermal lysis of the cells (method B). It was confirmed that the method of DNA extraction had no influence on size of amplified region of rDNA.

Key words: yeasts, DNA extraction methods, NS3-ITS4 rDNA

Accepted for print – Zaakceptowano do druku: 30.03.2011

For citation – Do cytowania: Piegza M., Barszczewski W., Juszczak P., Wojtatowicz M., Robak M., 2011. Porównanie metod ekstrakcji DNA z komórek różnych gatunków drożdży. *Acta Sci. Pol. Biotechnol.*, 10 (1), 29–38.

SPIS TREŚCI CONTENTS

Anna Krasowska, Marcin Łukaszewicz

- Izolacja, identyfikacja oraz aktywność proteolityczna i lipolityczna mikroorganizmów arktycznych..... 5
Isolation, identification, proteolytic and lipolytic activity of Arctic microorganisms

Ludwika Tomaszewska, Anita Rywińska, Izabela Musiał, Marta Utecht, Piotr Juszczyk, Waldemar Rymowicz, Maria Wojtatowicz, Xymena Połomska

- Skrining szczepów drożdży *Yarrowia lipolytica* do biosyntezy erytrytolu z glicerolu..... 15
Screening of *Yarrowia lipolytica* yeast strains for erythritol production from glycerol

Michał Piegza, Wojciech Barszczewski, Piotr Juszczyk, Maria Wojtatowicz, Małgorzata Robak

- Porównanie metod ekstrakcji DNA z komórek różnych gatunków drożdży 29
Comparison of DNA extraction methods from cells of different yeasts species