

ACTA SCIENTIARUM POLONORUM

Czasopismo naukowe założone w 2001 roku przez polskie uczelnie rolnicze

Biotechnologia

Biotechnologia

6(4) 2007



Bydgoszcz Kraków Lublin Olsztyn
Poznań Siedlce Szczecin Warszawa Wrocław

Rada Programowa *Acta Scientiarum Polonorum*

Kazimierz Banasik (Warszawa), Janusz Falkowski (Olsztyn),
Florian Gambuś (Kraków), Franciszek Kluza (Lublin), Edward Niedźwiecki (Szczecin),
Janusz Prusiński (Bydgoszcz), Jerzy Sobota (Wrocław) – przewodniczący,
Stanisław Socha (Siedlce), Waldemar Uchman (Poznań)

Rada Naukowa serii *Biotechnologia*

Danuta Witkowska (Wrocław) – przewodnicząca, Włodzimierz Bednarski (Olsztyn),
Włodzimierz Grajek (Poznań), Anna Maraz (Budapeszt, Węgry),
Zdzisław Targoński (Lublin), Vesna Zechner-Krpan (Zagrzeb, Chorwacja)

Korekta:

Janina Szydłowska
Elżbieta Winiarska-Grabosz

Łamanie

Teresa Alicja Chmura

Projekt okładki

Daniel Morzyński

ISSN 1644–065X

*Wydanie publikacji dofinansowane ze środków Uniwersytetu Przyrodniczego
we Wrocławiu*

© Copyright by Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu,
Wrocław 2007

Redaktor Naczelny – prof. dr hab. Andrzej Kotecki
ul. Sopocka 23, 50–344 Wrocław, tel./fax (71) 328–12–77
e-mail: wyd@ozi.ar.wroc.pl <http://www.up.wroc.pl>

Nakład 300 + 16 egz. Ark. druk. 2,5

Drukarnia: F.P.H. „ELMA”

WZROST I AKTYWNOŚĆ HYDROLITYCZNA SZCZEPÓW DROŻDŻY POCHODZĄCYCH Z SERA W MLEKU

Agata Czajgucka, Marek Szoltyś, Piotr Juszczyk,
Monika Żelazko, Xymena Połomska, Anna Dąbrowska,
Maria Wojtatowicz, Józefa Chrzanowska

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Streszczenie. Celem pracy było zbadanie zdolności siedmiu szczepów drożdży: *Candida famata* MI1a, *C. intermediata* BI2a, *C. kefyr* PII1b, *C. sphaerica* FII7a, *Geotrichum penicillatum* EII6a, *Sacharomyces kluyveri* BII3a oraz *Yarrowia lipolytica* PII6a wyizolowanych z serów z przerostem pleśniowym Rokpol do wzrostu w mleku oraz określenie stopnia degradacji składników mleka zachodzącej pod ich wpływem. Wykazano, że wszystkie badane szczepy były zdolne do wzrostu w mleku. We wszystkich próbach obserwowano spadek pH, a każdy ze szczepów odmiennie wpływał na zmiany zawartości poszczególnych kwasów organicznych w mleku. Wzrost drożdży *C. kefyr* PII1b, *C. sphaerica* FII7a i *C. intermediata* BI2a wiązał się głównie z nagromadzeniem znacznych ilości kwasu octowego, a *C. sphaerica* FII7a, *S. kluyveri* BII3a i *C. famata* MI1a z akumulacją kwasu propionowego. Natomiast szczep *Y. lipolytica* PII6a zutylizował kwas cytrynowy i mlekowy. Wykazano także, że w obecności drożdży zachodzi wyraźna degradacja białek i lipidów mleka. Największy stopień hydrolizy białka stwierdzono podczas wzrostu *Y. lipolytica* PII6a i *C. sphaerica* FII7a. Poziom $N_{\text{rozp.}}$ we frakcji rozpuszczalnej w pH 4,6 wynosił w tych próbach odpowiednio 30,2 i 28,4%, a zawartość wolnych grup aminowych odpowiednio 2612 i 2175 $\mu\text{mol Gly} \cdot 100 \text{ ml}^{-1}$. Drożdże te wykazywały również największe uzdolnienia do uwalniania kwasów tłuszczowych z triacylogliceroli, których zawartość w 12 dniu inkubacji mleka wynosiła 3310 i 2900 $\text{mg} \cdot 100 \text{ ml}^{-1}$.

Słowa kluczowe: drożdże, wzrost, mleko, kwasy organiczne, proteoliza, lipoliza

WSTĘP

Sery ze względu na swój bogaty skład chemiczny stanowią doskonale środowisko dla rozwoju drobnoustrojów zarówno starterowych, wprowadzanych do mleka w procesie

Adres do korespondencji – Corresponding author: Józefa Chrzanowska, Katedra Technologii Surowców Zwierzęcych i Zarządzania Jakością, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, ul. C.K. Norwida 25/27, 50-375 Wrocław, e-mail: jch@wnoz.ar.wroc.pl

produkcyjnym, jak i dzikich stanowiących ich mikroflorę zanieczyszczającą. Jedną z najliczniejszych grup wśród tych mikroorganizmów są drożdże [Jakobsen i Narvhus 1996, Mayoral i in. 2005, Gardini i in. 2006]. Ich najwyższą liczebność na poziomie 10^4 - 10^9 j.t.k./1g stwierdza się najczęściej w serach miękkich i półmiękkich, natomiast w serach twardych i półtwardych jest ona niższa i na ogół zawiera się w przedziale od 10^4 - 10^6 j.t.k. \cdot g $^{-1}$ [Fleet 1992, Wojtatowicz i in. 2001]. Występowanie tych mikroorganizmów w tak dużej liczbie, a także ich wysokie uzdolnienia hydrolityczne zarówno proteolityczne, jak i lipolityczne nie są obojętne dla przemian zachodzących podczas procesu dojrzewania serów [Fleet 1992, Addis i in. 2001, Gardini in. 2006], co istotnie wpływa na kształtowanie się cech jakościowych tych produktów. Wpływ ten może być zarówno pozytywny, jak i negatywny. Niekorzystne zmiany wiążą się najczęściej z powstawaniem niepożądanego zapachu i smaku, śluzowaceniem masy sera czy zmianami jego tekstury na skutek gazowania i puchnięcia [Fleet 1992]. Niektóre gatunki drożdży występujące w serach wykazują jednak pożądane właściwości. Dzięki wysokiej aktywności proteolitycznej i lipolitycznej biorą one udział w tworzeniu związków kształtujących profil smakowo-zapachowy serów oraz przyczyniają się do przyspieszenia ich dojrzewania [Chrzanowska i Wojtatowicz 2001, Suzzi i in. 2001, Florez i Mayo 2006, Czajgucka i in. 2006].

pozytywne aspekty występowania drożdży w serach dopiero od niedawna zwróciły uwagę na możliwość ich wykorzystania w produkcji serowarskiej [Tempel i Jakobsen 2000, Ferreira i Vilijoen 2003, Czajgucka i in. 2006, Alvarez-Martin i in. 2008]. Dokładne scharakteryzowanie uzdolnień metabolicznych drożdży występujących w serach, szczególnie w środowisku mleka, pozwala na wybranie tych, które w przyszłości mogłyby być wprowadzone do serów. Pozwoliłoby to na wyeliminowanie zmienności i przypadkowości mikroflory drożdżowej w serach, a tym samym wpłynęłoby na poprawę cech jakościowych tych produktów.

W podjętych badaniach przeanalizowano 7 szczepów drożdży, należących do gatunków z rodzaju: *Candida*, *Geotrichum*, *Sacharomyces* i *Yarrowia*, które wyizolowano z polskich serów z przerostem pleśniowym Rokpol i wytypowano jako potencjalne kultury starterowe wspomagające dla serowarstwa.

MATERIAŁY I METODY

Przedmiotem badań były szczepy drożdży *Candida famata* MI1a, *C. intermedia* BI2a, *C. kefir* PII1b, *C. sphaerica* FII7a, *Geotrichum penicillatum* EII6a, *Sacharomyces kluyveri* BII3a oraz *Yarrowia lipolytica* PII6a wyizolowane z serów z przerostem pleśniowym Rokpol i pochodzące z kolekcji Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu.

Drożdże namnożono w hodowli prowadzonej metodą wstrząsarkową, na podłożu YCG zawierającym (g \cdot l $^{-1}$): ekstrakt drożdżowy – 1,7; kazeinę – 2,0; glukozę – 10, w temperaturze 28 °C przez 48 h. Po zakończeniu hodowli biomasę odwirowano i wprowadzono do sterylnego mleka w ilości 10⁵ j.t.k. ml $^{-1}$. Zaszczepione mleko inkubowano w temperaturze pokojowej przez okres 12 dni. Próbę kontrolną stanowiło mleko bez dodatku drożdży. Po 0, 2, 4, 6, 8 i 12 dniach pobierano próby, w których oznaczano ogólną liczbę drożdży, a w ostatnim dniu inkubacji określano stopień zaawansowania zmian hydrolitycznych białek i lipidów oraz poziom kwasów organicznych.

Ogólną liczbę drożdży oznaczano metodą płytkową na podłożu OGY o składzie (g l^{-1}): agar – 15,0; ekstrakt drożdżowy – 5,0; glukoza – 20,0; chlorowodorek oksytetracykliny – 0,1. Płytki inkubowano w temperaturze 30 °C, przez 72 godziny.

Stopień degradacji białek określono ilościowo, poprzez pomiar przyrostu zawartości związków azotowych rozpuszczalnych w pH 4,6 metodą Kjehdahl [Zmarlicki 1982] i wolnych grup aminowych, których poziom oznaczono przy użyciu kwasu trójnitrobenzenosulfonowego (TNBS) według zmodyfikowanej metody Kuchroo i in. [1983], tak we frakcji rozpuszczalnej w pH 4,6, jak i wydzielonej z niej metodą według Jarret i in. [1982] frakcji rozpuszczalnej w kwasie fosfowolframowym (PTA). Stopień zaawansowania procesów proteolizy śledzono także metodą elektroforezy według Andrews [1983], którą prowadzono w 12,5% żelu poliakrylamidowym w buforze TRIS-Glicyna o pH 8,3. Żele wybarwiano barwnikiem Coomassie Blue w 50-procentowym roztworze metanolu zawierającego 1,25% TCA.

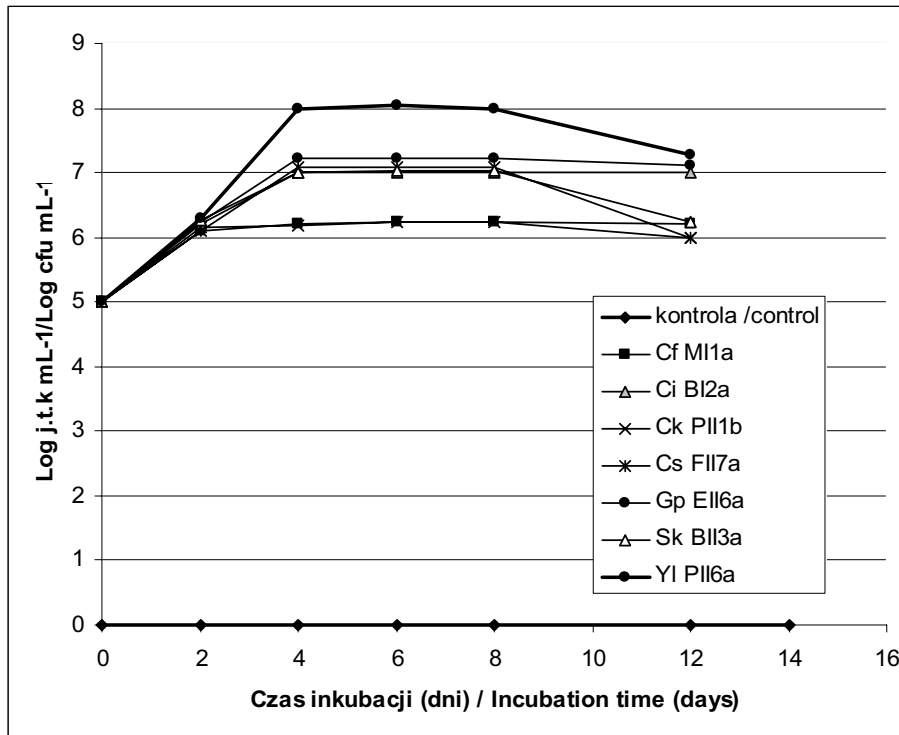
Zmiany lipolityczne kontrolowano w oparciu o pomiar przyrostu wolnych kwasów tłuszczowych wydzielonych z mleka według Deeth'a i in. [1983]. Analizowane związki ekstrahowano z mleka mieszaniną heksan-eter dwuetylowy (1:1; v/v), a następnie adsorbowano na obojętnym tlenku glinu. Z fazy stacjonarnej kwasu zwalniano przy użyciu eteru dwuizopropylowego zawierającego 6% kwasu mrówkowego. Otrzymane wolne kwasy tłuszczowe przeprowadzano w pochodne metylowe, a następnie poddawano analizie chromatograficznej (GC/MS) w następujących warunkach: kolumna kapilarna Agilent DB-225MS, 60 m x 250 μm x 0,25 μm , temperatura kolumny 140 °C (5 min) do 240 °C (4 °C $\cdot\text{min}^{-1}$), gaz nośny – hel (20 cm^3s^{-1}), nastrzyk 1 μl , 260 °C, split 100:1.

Kwasy organiczne ekstrahowano z mleka acetonitrylem według Roostita i Fleet [1996] i rozdzielano przy wykorzystaniu wysoko sprawnej chromatografii cieczowej (HPLC), na kolumnie Aminex HPX-87H, w temperaturze 55-60 °C, w gradiencie 0,07-0,10% (v/v) kwasu ortofosforowego, przy szybkości przepływu 0,5 mL min^{-1} .

OMÓWIENIE I Dyskusja Wyników

Szczepy: *C. famata* MI1a, *C. intermediata* BI2a, *C. kefyr* PII1b, *C. sphaerica* FII7a, *G. penicillatum* EII6a, *S. kluyveri* BII3a oraz *Y. lipolytica* PII6a wprowadzono do mleka w celu sprawdzenia ich potencjalnej przydatności jako ko-starterów w produkcji serowarskiej. Wybrano je spośród 113 szczepów wyizolowanych z polskich serów z przerostem pleśniowym Rokpol na podstawie wstępnej charakterystyki obejmującej właściwości fizjologiczne, zdolność wzrostu w różnych środowiskach i wymagania pokarmowe [Juszczak 2002] oraz uzdolnienia hydrolityczne [Czajgucka 2002].

Podczas 12 inkubacji monitorowano wzrost ich liczebności w mleku (rys. 1). We wszystkich badanych próbach początkowa wielkość populacji była zbliżona i kształtowała się na poziomie ok. 10^5 j.t.k. ml^{-1} . Podczas kolejnych dni obserwowano zróżnicowany wzrost poszczególnych szczepów drożdży. Jakkolwiek u większości z nich był on najintensywniejszy podczas pierwszych 2-4 dni inkubacji. Największą jednak dynamiką wzrostu wyróżnił się szczep *Y. lipolytica* PII6a, który już w 4 dniu osiągał liczebność $1,0\text{-}1,4 \times 10^8$ j.t.k ml^{-1} , najniższą natomiast *C. famata* MI1a i *C. kefyr* PII1b, u których maksymalną liczebność $1,9 \times 10^6$ j.t.k obserwowano dopiero w 8 dniu inkubacji.



Rys. 1. Wzrost drożdży w mleku
Fig. 1. Growth of yeasts in milk

Otrzymane wyniki są zbieżne z doniesieniami innych autorów [Roostita i Fleet 1996, Gadaga i in. 2001, Szołtysik i in. 2006], którzy wykazali, że populacje drożdży izolowanych z różnych produktów mleczarskich i wprowadzonych do mleka UHT najczęściej osiągały liczebność 10^7 - 10^8 j.t.k.ml⁻¹, przy czym kinetyka wzrostu poszczególnych szczepów była również zróżnicowana.

Jednocześnie ze wzrostem drożdży w mleku obserwowano przyrost jego kwasowości. Jedynie w próbie kontrolnej pH mleka utrzymywało się na stałym poziomie 6,6. Natomiast w obecności drożdży: *C. famata* MI1a, *C. intermedia* BI2a, *S. kluyveri* BII3a i *Y. lipolytica* PII6a kwasowość czynna mleka ulegała obniżeniu i po dwunastu dniach inkubacji zawierała się w przedziale 5,9-6,1. Największy spadek pH do poziomu 4,7-5,0 zaobserwowano w próbach, do których wprowadzono szczepy: *C. kefir* PII1b i *C. sphaerica* FII7a, wykazujące zdolność fermentowania laktozy do kwasu mlekowego [Juszczak 2002]. Podobny poziom obniżenia się pH mleka w obecności innych szczepów tych samych gatunków wykazywali też inni autorzy [Besancon i in. 1992, Roostita i Fleet 1996, Gadaga i in. 2001]. Spadek pH mleka do wartości 5,9 podczas wzrostu w nim szczepu *Y. lipolytica* PII6a mógł być natomiast spowodowany uwolnieniem innych niż kwas mlekowy metabolitów, gdyż gatunek ten znany jest z braku zdolności fermentacji laktozy [Besancon i in. 1992, Roostita i Fleet 1996, Juszczak 2002].

Pod koniec okresu inkubacji przedstawiciele różnych gatunków drożdży izolowanych z serów w mleku zaobserwowano istotne różnice w zawartości wybranych kwasów organicznych (tab. 1). Jak wykazano, wzrost drożdży *Y. lipolytica* związany był głównie z utylizacją kwasu cytrynowego oraz kwasu mlekowego. Obserwacje te potwierdzają wyniki badań Freitas i in. [1999], którzy analizując zmiany wywołane obecnością tych drożdży w mleku pochodzącym od różnych gatunków przeżuwaczy, wykazywali w trakcie ich inkubacji ubytek tych samych kwasów. Znaczny przyrost kwasu mlekowego stwierdzono natomiast w mleku inkubowanym z dodatkiem szczepu z gatunku *C. kefir*, wykazującego zdolność fermentowania laktozy [Juszczyk 2002]. Podczas dojrzewania serów z dodatkiem szczepów *C. kefir* PII1b, *C. sphaerica* FII7a, *C. intermedia* BI2a obserwowano wyraźny przyrost kwasu octowego, a w próbach do których wprowadzono *C. sphaerica* FII7a, *S. kluyveri* BII3a i *C. famata* MIIa – kwasu propionowego. Zwiększanie zawartości tych kwasów w mleku zaszczepionym gatunkami: *C. sphaerica* i *C. kefir* obserwowali także Besancon i in. [1992] oraz Roostita i Fleet [1996].

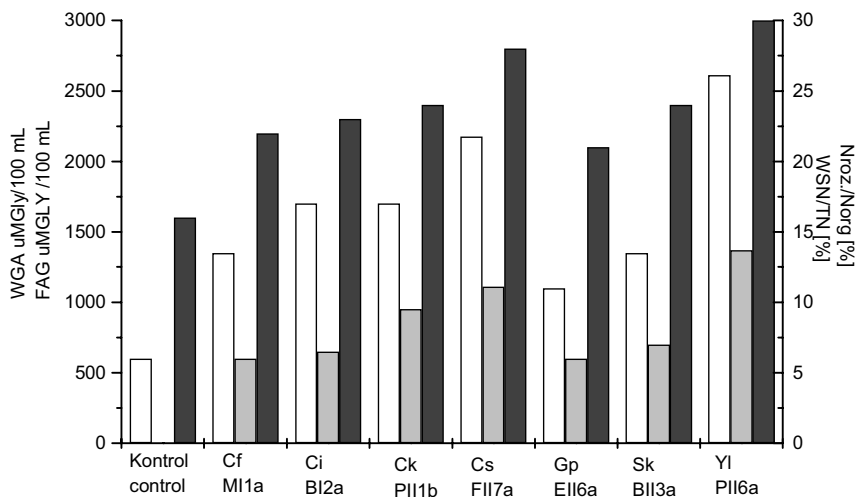
Tabela 1. Zawartość kwasów organicznych w mleku inkubowanym z drożdżami [mg l⁻¹]Table 1. Organic acids content in milk incubated with selected yeast strains [mg l⁻¹]

| Kwas organiczny Organic acid | Kontrola Control | <i>C. famata</i> MIIa | <i>C. intermedia</i> BI2a | <i>C. kefir</i> PII1b | <i>C. sphaerica</i> FII7a | <i>G. penicillatum</i> EII6a | <i>S. kluyveri</i> BII3a | <i>Y. lipolytica</i> PII6a |
|---------------------------------|---------------------|--------------------------|------------------------------|--------------------------|------------------------------|---------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| Cytrynowy Citric | 3,420 | 3,210 | 3,110 | 3,210 | 3,280 | 3,390 | 3,400 | 0,092 |
| Mlekowy Lactic | 0,620 | 0,656 | 0,740 | 1,180 | 0,810 | 0,480 | 0,711 | 0,042 |
| Mrówkowy Formic | 0,410 | 0,360 | 0,320 | 0,350 | 0,140 | 0,397 | 0,268 | 0,05 |
| Bursztynowy Succinic | 0,150 | 0,017 | 0,080 | 0,013 | 0,010 | 0,029 | 0,081 | 0,015 |
| Octowy Acetic | 0,018 | 0,017 | 0,250 | 0,089 | 0,310 | 0,019 | 0,021 | 0,019 |
| Masłowy Butyric | 0,014 | 0,016 | 0,076 | 0,105 | 0,016 | 0,015 | 0,018 | 0,280 |
| Propionowy Propionic | 0,012 | 0,100 | 0,021 | 0,032 | 0,190 | 0,048 | 0,172 | 0,013 |

Enzymy hydrolityczne wydzielane przez drożdże prowadzą do degradacji składników mleka. Poziom proteolizy w 12 dniu inkubacji drożdży w mleku określono na podstawie oznaczeń zawartości związków azotowych rozpuszczalnych w pH 4,6, wyrażonej jako procent azotu ogólnego, oraz poziomów wolnych grup aminowych we frakcji rozpuszczalnej w pH 4,6 i kwasie fosfowolframowym. Wyniki tych analiz przedstawiono na rysunku 2.

Przyrost poziomu związków azotowych rozpuszczalnych w pH 4,6 był obserwowany jedynie w mleku zaszczepionym wyselekcjonowanymi szczepami drożdży, podczas gdy w mleku kontrolnym utrzymywał się na stałym poziomie 16,5% przez 12 dni. W czasie wzrostu drożdży *Y. lipolytica* PII6a i *C. sphaerica* FII7a w mleku stwierdzono

największy stopień rozkładu białka, co ujawniło się podwyższeniem zawartości N we frakcji rozpuszczalnej w pH 4,6 odpowiednio od 16,2 do 30,2% i od 16,3 do 28,4% w pierwszym i ostatnim dniu. Pozostałe szczepy w mniejszym stopniu wpływały na przyrost rozpuszczalnych związków azotowych. W końcowym etapie ich inkubacji w mleku zawartość rozpuszczalnych związków azotowych wynosiła 21,3-24,2% w stosunku do N ogółem.



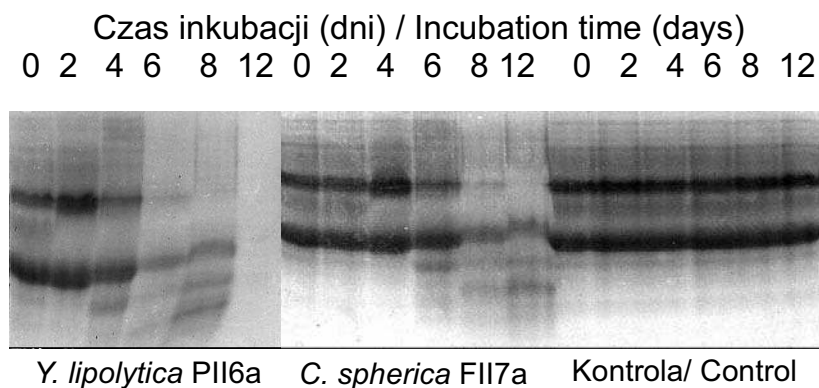
Rys. 2. Zawartość azotu rozpuszczalnego w pH 4,6 (Nrozp.) wyrażona w % N ogólnego (Nog) (■) oraz wolnych grup aminowych (WGA) we frakcji rozpuszczalnej w pH 4,6 (□) i kwasie fosfowolframowym (▒), wydzielonych z mleka inkubowanego z drożdżami
 Fig. 2. Contents of nitrogen soluble at pH 4.6 (WSN) expressed as % of N total (TN) (■) and free amino groups (FAG) in fractions isolated from milk incubated with yeasts :soluble at pH 4.6 (□) and phosphotungstic acid (▒)

Poziom degradacji białek mleka pod wpływem drożdży analizowano również przez oznaczenie przyrostu wolnych grup aminowych we frakcji rozpuszczalnej w pH 4,6 oraz we frakcji rozpuszczalnej w kwasie fosfowolframowym (PTA), (rys. 2). Poziom przyrost związków białkowych rozpuszczalnych w wodzie jak i niskocząsteczkowych związków rozpuszczalnych w PTA świadczy o aktywności endo- i egzopeptydazowej poszczególnych szczepów drożdży.

Największy wzrost zawartości tych grup w 12 dniu inkubacji odnotowano dla drożdży *Y. lipolytica* PII6a i *C. sphaerica* FII7a i wynosił on odpowiednio 2612 i 2175 µmol Gly100 ml⁻¹, a we frakcji rozpuszczalnej w PTA odpowiednio 1369 i 1109 µmol Gly 100 ml⁻¹. Przyrost wolnych grup aminowych w mleku zaszczeplonym pozostałymi drożdżami był znacznie mniejszy. W ostatnim dniu inkubacji w mleku osiągał poziom od 1201 do 1691 µmol Gly100 ml⁻¹ we frakcji rozpuszczalnej w pH 4,6 i 603 do 981 µmol Gly100 ml⁻¹ we frakcji rozpuszczalnej w PTA.

Według Roostita i Fleet [1996] najwyższy poziom przyrostu wolnych aminokwasów obserwowano w mleku inkubowanym z drożdżami *Y. lipolytica*. Wysoki poziom proteolizy w mleku pod wpływem enzymów drożdży tego gatunku wykazał także Szołtysik i in. [2006].

Analizując podatność frakcji kazeinowych na działanie proteinaz pochodzenia drożdżowego wykazano, że w obecności szczepów *Y. lipolytica* JII1c i *C. sphaerica* FII7a intensywnie degradowana była zarówno β -, jak i α_{s1} -kazeina, co można było zaobserwować już w 6 i 8 dniu inkubacji (rys. 3).



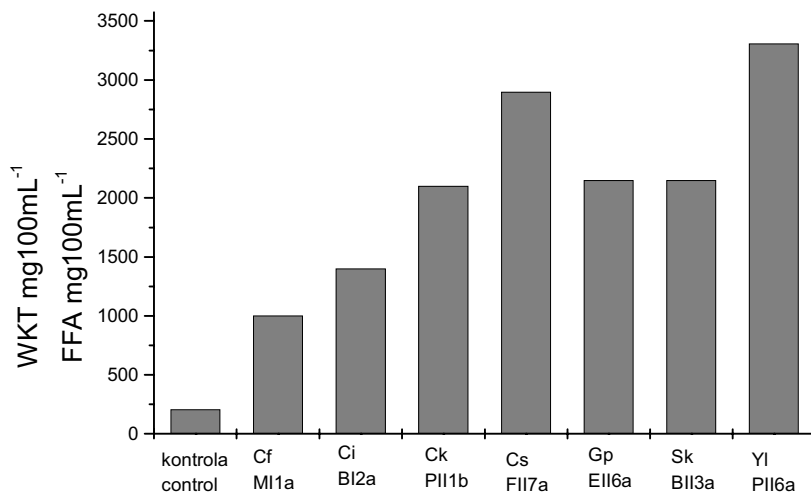
Rys. 3. Rozdział elektroforetyczny białek mleka inkubowanego ze szczepami drożdży *Y. lipolytica* PII6a i *C. sphaerica* FII7a

Fig. 3. SDS – PAGE of protein of milk incubated with yeast strains *Y. lipolytica* PII6a and *C. sphaerica* FII7a

W próbkach mleka zaszczipionych drożdżami: *C. famata* MIIa, *G. penicillatum* EII6a i *S. kluyveri* BII3a po dwunastu dniach wzrostu obserwowano niemal całkowity rozkład β -kazeiny, przy jednoczesnym braku widocznych zmian w obrębie pasma pochodzącego od α_{s1} -kazeiny. Drożdże *C. intermediata* BI2a degradowały głównie α_{s1} -kazeinę, a *C. kefyra* PIIIb β -kazeinę (dane nie prezentowane).

Poza właściwościami proteolitycznymi bardzo ważną z technologicznego punktu widzenia cechą jest zdolność drożdży do syntezy zewnątrz- i wewnątrzkomórkowych enzymów lipolitycznych. Hydroliza triacylogliceroli, jaka ujawnia się w serach poprzez nagromadzenie się wolnych kwasów tłuszczowych, w dużej mierze determinuje cechy sensoryczne tych produktów. Związki te bezpośrednio przyczyniają się do kształtowania smaku i zapachu, ale mogą być także prekursorami innych, takich jak metyloketony, alkohole czy estry, które również wpływają na ostateczną jakość serów [Jollivet i in. 1994; Molimard i Spinnler 1996, Gardini i in. 1999, Pandey i in. 1999, McSweeney i Sousa 2000].

W mleku inkubowanym z dodatkiem badanych szczepów drożdży oznaczano poziom uwalnianych kwasów tłuszczowych (rys. 4). Wyższe poziomy ich zawartości wynoszące 2900-3310 mg 100 ml⁻¹ wykazano w obecności szczepów *C. sphaerica* i *Y. lipolytica* PII6a.



Rys. 4. Ogólna zawartość wolnych kwasów tłuszczowych w mleku inkubowanym z poszczególnymi szczepami drożdży

Fig. 4. Total contents of free fatty acids in milk incubated with yeasts

Wyrównany poziom lipolizy wynoszący średnio 2125 mg 100 ml⁻¹ obserwowano w próbach mleka inkubowanych z dodatkiem szczepów należącymi do trzech gatunków: *C. kefyri*, *S. kluyveri*, *G. penicillatum*.

Najniższy natomiast poziom uwalnianych kwasów tłuszczowych stwierdzono w mleku, do którego wprowadzano szczep *C. famata* MI1a. Badania prowadzone przez Besancon i in. [1992], Lopez-Diaz in. [1995], Welthagen i in. [1998 i 1999], van den Tempel i Jakobsen [1998] potwierdzają również niewielką zdolność do syntezy lipaz u drożdży z gatunku *C. famata*.

Charakteryzując dokładniej proces lipolizy oceniono zawartość poszczególnych wolnych kwasów tłuszczowych (WKT) (tab. 2). Wszystkie szczepy drożdży preferencyjnie uwalniały kwas oleinowy (C_{18:1}), a także mirystynowy (C₁₄). Po 12 dniach zawartość tych kwasów stanowiła odpowiednio od 30,22% (*C. famata* MI1a) do 38,36% (*C. kefyri* PII1b) oraz od 14,57% (*C. famata* MI1a) do 36,34% (*G. penicillatum* EII6a) ogółu WKT. Znaczny udział w puli uwolnionych przez drożdże kwasów tłuszczowych stanowił też kwas palmitynowy (C₁₆) (15,97-28,03%). Natomiast w niewielkim stopniu odłączany był tak kwas linolowy, jak i kwasy tłuszczowe krótkołańcuchowe (C₄-C₁₀).

Tabela 2. Zawartość procentowa wolnych kwasów tłuszczowych w mleku inkubowanym z poszczególnymi szczepami drożdży

Table 2. Relative contents (%) of free fatty acids in milk incubated with yeasts

| Kwas tłuszczowy Fatty acid | Kontrola Control | <i>C. famata</i> MIIa | <i>C. intermedia</i> BIIa | <i>C. kefir</i> PIIb | <i>C. sphaerica</i> FII7a | <i>G. penicillatum</i> EII6a | <i>S. kluyveri</i> BII3a | <i>Y. lipolytica</i> PII6a |
|-------------------------------|---------------------|--------------------------|------------------------------|-------------------------|------------------------------|---------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| C4 | 1,00 | 0,82 | 1,83 | 0,37 | 0,13 | 0,21 | 0,20 | 0,84 |
| C6 | 0,93 | 0,66 | 1,13 | 0,38 | 0,87 | 0,24 | 0,93 | 1,12 |
| C8 | 1,33 | 1,66 | 1,72 | 0,21 | 0,61 | 0,43 | 0,97 | 0,68 |
| C10 | 1,33 | 1,76 | 1,86 | 0,91 | 0,90 | 0,96 | 0,60 | 1,25 |
| C12 | 5,00 | 5,53 | 7,52 | 3,78 | 9,27 | 2,56 | 8,65 | 7,95 |
| C14 | 11,0 | 14,57 | 16,53 | 32,68 | 19,82 | 36,34 | 27,80 | 17,62 |
| C16 | 32,68 | 22,26 | 28,03 | 18,10 | 21,24 | 18,89 | 17,10 | 15,97 |
| C18:0 | 12,00 | 14,18 | 5,19 | 2,78 | 12,46 | 5,64 | 5,78 | 17,61 |
| C18:1 | 26,02 | 30,22 | 30,77 | 38,36 | 31,60 | 32,65 | 30,79 | 35,75 |
| C18:2 | 8,71 | 8,32 | 5,42 | 2,43 | 3,10 | 2,35 | 7,18 | 1,21 |

PODSUMOWANIE

Wprowadzenie do mleka przedstawicieli wybranych gatunków drożdży izolowanych z serów, a także prześledzenie ich wzrostu w tym środowisku stanowi istotny etap badań, pozwalający wyselekcjonować szczepy przydatne w serowarstwie. W przedmiotowej pracy wykazano, że wszystkie analizowane drożdże wykazywały zdolność wzrostu w mleku. Duże zróżnicowanie ich aktywności hydrolitycznej pozwoliło na wytypowanie dwóch szczepów: *Y. lipolytica* III1c i *C. sphaerica* FII7a, których obecność w mleku przyczyniła się do znacznego zintensyfikowania przemian degradacyjnych białek i tłuszczu. Wybranie drożdży, które wykazują pozytywne właściwości, pozwoli w przyszłości na konstruowanie szczepionek drożdżowych przydatnych w serowarstwie.

PIŚMIENNICTWO

- Addis E., Fleet G.H., Cox J.M., Kolak D., Leung T., 2001. The growth, properties and interactions of yeasts and bacteria associated with the maturation of Camembert and blueveined cheese, *Int. J. Food Microbiol.*, 69, 25-36.
- Álvarez-Martin P., Flórez A.B., Hernández-Baranco A., Mayo B., 2008. Interaction between dairy yeast and lactic acid bacteria strains during milk fermentation, *Food Control*, 19, 62-70.
- Andrews, A. T. 1983. Proteinases in normal bovine milk and their action on caseins, *J. Dairy Res.*, 50, 45-55.
- Besançon X., Smet C., Chabaliér C., Rivemale M., Revelbel J.P., Ratomahenina R., Galzy P., 1992. Study of surface yeast flora of Roquefort cheese, *Int. F. Food Microbiol.*, 17, 9-18.
- Chrzanowska J., Wojtatowicz M., 2001. Pozytywne i negatywne aspekty obecności drożdży w produktach mleczarskich, *Przegląd Mleczarski*, 5, 230-233.

- Czajgucka A., 2002. Charakterystyka zdolności hydrolitycznych szczepów drożdży wydzielonych z serów pleśniowych. Praca doktorska wykonana w Katedrze Technologii Surowców Zwierzęcych i Zarządzania Jakością Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu.
- Czajgucka A., Chrzanowska J., Juszczyk P., Szoltyś M., Połomska X., Wojtatowicz M., 2006. Wzrost drożdży w modelowym serze i ich wpływ na degradację białek i tłuszczu, *Acta Sci. Pol., Biotechnologia* 5, 95-103.
- Deeth H.C., Fitz-Gerald C.H., Snow A.J., 1983. A gas chromatographic method for the quantitative determination of free fatty acids in milk and milk products. *J. Dairy Sci. Technol.*, 18, 230-233.
- Fleet G., 1992. Spoilage Yeast's, *Critical Reviews in Biotechnology*, 12, 1-44.
- Ferreira A.D., Viljoen B.C., 2003. Yeasts as adjunct starters in matured Cheddar cheese, *Int. J. Food Microbiol.* 86, 131-140.
- Florez A. B., Mayo B., 2006. Microbial diversity and succession during the manufacture and ripening of traditional Spanish blue-veined Cabrales cheese, as determined PCR-DGGE. *Int. J. Food Microbiol* 110, 165-171.
- Freitas A.C., Pintado A.E., Pintado M.E., Malcata F.X., 1999. Role of dominant microflora of Picante cheese on proteolysis and lipolysis, *Int. Dairy J.*, 9, 593-603.
- Gardini F., Tofalo R., Belletti N., Iucci L., Suzzi G., Torriani S., Guerzoni M.E., Lanciotti R., 2006. Characterization of yeasts involved in the ripening of Pecorino Crotonese cheese, *Food Microbiol.*, 23, 641-648.
- Gadaga T.H., Mutukumira A.N., Narvhus J.A., 2001. The growth and interaction of yeasts and lactic acid bacteria isolated from Zimbabwean naturally fermented milk in UHT milk, *Int. J. Food microbial*, 68, 21-32.
- Jacobsen M., Narvhus J., 1996. Yeast and their possible beneficial and negative effects on the quality of dairy products, *Int. Dairy J.*, 6., 755-768.
- Jarret W.D., Aston J.W., Dulley J.R., 1982. A simple method for estimating free amino acids in Cheddar cheese, *Aust. J. Dairy Technol.*, 6, 55-58.
- Jollivet N., Chataud J., Vayssier Y., Bensoussan M., Belin J.M., 1994. Production of volatile compounds in model milk and cheese media by eight strains of *Geotrichum candidum* Link, *J. Dairy Res.*, 61, 241-248.
- Juszczyk P., 2002. Charakterystyka mikroflory drożdżowej z serów z przerostem pleśni. Praca doktorska wykonana w Katedrze Biotechnologii I Mikrobiologii Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu.
- Kuchroo C.N., Rahilly J., Fox P.F., 1983. Assessment of proteolysis in cheese by reaction with trinitrobenzene sulphonic acid, *Ir. J., Food Sci. Technol.* 7, 129-133.
- Lopez-Diaz T.M., Alonso C., Santos J., Garcia M.L., Moreno B., 1995. Microbiological changes during manufacture and ripening of a naturally ripened blue cheese (Valdona, Spain), *Milchwissenschaft*, 50, 381-384.
- Mayoral M.B., Martin R., Sanz A., Hernández P.E., González, Garcia T., 2005. Detection of *Kyuyveromyces marxianus* and other spoilage yeasts in yoghurt using PCR-culture technique. *Int. J. Food. Microbiol.*, 105, 27-34.
- McSweeney P.L.H., Sousa M.J., 2000. Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheese during ripening: A review, *Le Lait*, 80, 293-324.
- Molimard P., Spinnler H.E., 1996. Review: Compounds involved in the flavor of surface mold-ripened cheese: origins and properties, *J. Dairy Sci.*, 79, 169-184.
- Pandey A., Banjamin S., Soccol C.R., Nigam P., Krieger N., Soccol V.T., 1999. The realm of microbial lipases in biotechnology, *Biotechnol. App. Biochem.*, 29, 119-131.
- Roostita R., Fleet G.H. 1996. Growth of yeasts in milk and associated changes to milk composition. *International Journal of Food Microbiology*, 31, 205-219.

- Suzzi G., Lanorte M.T., Galgano F., Andrighetto C., Lombardi A., Lanciotti R. and Guerzoni M.E., 2001. Proteolytic, lipolytic and molecular characterization of *Yarrowia lipolytica* isolated from cheese, *Int. J. Food Microbiol.*, 69, 69-71.
- Szołtysik M., Żelazko M., Rak L., Połomska X., Dąbrowska A., Wojtatowicz M., Chrzanowska J., 2006. Zdolność drożdży *Yarrowia lipolytica* pochodzących z sera do wytwarzania amin biogennych w mleku, *Acta Sci. Pol., Biotechnologia* 5, 87-94.
- van den Tempel T. and Jakobsen M., 2000. The technological characteristics of *Debaryomyces hansenii* and *Yarrowia lipolytica* and their potential as starter cultures for production of Danablu, *Int. Dairy J.*, 10, 263-270.
- Welthagen J.J., Vilioen B.C., 1998. Feast profile in Gouda cheese during processing and ripening, *Int. J. Food Microbiol.*, 41, 185-194.
- Welthagen J.J., Vilioen B.C., 1999. The isolation and identification of yeasts obtained during the manufacture and ripening of cheddar cheese, *Food Microbiol.*, 16, 63-73.
- Wojtatowicz M., Chrzanowska J., Juszczyk P., Skiba A., Gdula A., 2001. Identification and biochemical characteristic of yeast microflora of Rokpol cheese, *Int. J. Food Microbiol.*, 69, 135-140.
- Zmarlicki S., 1981. Ćwiczenia z analizy mleka i produktów mlecznych, Warszawa, 1981.

YEAST STRAINS ISOLATED FROM ROKPOL CHEESE – THEIR GROWTH IN MILK AND HYDROLYTIC ACTIVITY AGAINST MILK COMPONENTS

Abstract. The purpose of the study was to examine 7 yeast strains: *Candida famata* MII1a, *C. intermediata* BII2a, *C. kefir* PII1b, *C. sphaerica* FII7a, *Geotrichum penicillatum* EII6a, *Sacharomyces kluyveri* BII3a and *Yarrowia lipolytica* PII6a, representing main species of the microflora occurring in Rokpol cheese. They were introduced aseptically to milk at 10^5 cfu ml⁻¹ and incubated for 12 days. Their growth as well as their activity against milk components were evaluated. All the strains under investigation showed a different growth pattern in milk. The highest growth dynamics was exhibited by *Y. lipolytica* PII6a. On the 4th day of incubation, its level reached of $1.0-1.4 \times 10^8$ cfu ml⁻¹, while *C. famata* MII1a and *C. kefir* PII1b at the 8th day reached only 1.9×10^6 cfu ml⁻¹. A decrease in the pH value was observed in all the samples. Each yeast strain affected the changes in organic acid content of milk to a different extend. The growth of *C. kefir*, *C. sphaerica* and *C. intermediata* was correlated with the accumulation of vast amounts of acetic acid, *C. sphaerica* FII7a, *S. kluyveri* BII3a and *C. famata* MII1a with propionic acid and *Y. lipolytica* with butyric acid.

Yeast growth was accompanied with an intensive degradation of milk proteins and lipids. The highest rate of proteolysis of milk proteins was noted in the samples incubated with *Y. lipolytica* PII6a and *C. sphaerica* FII7a. The levels of nitrogen soluble at pH 4.6 in those samples were 30.2% and 28.4%, and free amino groups were 2612 and 2173 μ Mgly100mL⁻¹ of milk respectively. Those two strains also showed the highest ability to release free fatty acids (FFA) from triacylglycerols. On day 12 of incubation the FFA levels were 3320 and 2900 mg/100 ml⁻¹, respectively. The dominant FFAs were: oleic and myristic acids.

Key words: yeast, milk, growth, organic acids, proteolysis, lipolysis

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 18.12.2007

ENANCJOSPECYFICZNA REDUKCJA KETONÓW AROMATYCZNYCH W KULTURZE *PEZICULA CINNAMOMEA*

Ewa Brzezowska¹, Bogdan Jarosz¹, Tadeusz Kowalski²

¹ Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

² Akademia Rolnicza w Krakowie

Streszczenie. Badany był przebieg reakcji redukcji siedmiu prochiralnych ketonów aromatyczno-alifatycznych: acetofenonu i jego pochodnych oraz naftyloketonów w kulturze endofitycznego grzyba *Pezicula cinnamomea*. We wszystkich przypadkach zanotowano enancjospetyczny przebieg transformacji, przy czym nadmiar enancjomeryczny enancjomery będącego w przewodzie oraz wydajność otrzymanego alkoholu drugorzędowego zależały przede wszystkim od struktury substratu, w mniejszym stopniu od czasu reakcji.

Słowa kluczowe: *Pezicula cinnamomea*, bioredukcja, enancjospetyczność, redukcja ketonów

WSTĘP

Optycznie czynne związki organiczne są ważnymi blokami budulcowymi w syntezie substancji użytecznych jako leki, pestycydy i feromony, związki zapachowe – tak spożywcze, jak i stosowane w przemyśle perfumeryjnym. Najprostszą, bo jednoetapową metodą otrzymywania asymetrycznych alkoholi drugorzędowych polega na redukcji odpowiednich ketonów. Optycznie czynne produkty otrzymać można metodami „chemicznymi”, w których używa się drogich chiralnych reagentów i metali ciężkich [Ohkuma i in., 1995]. Stosowanie do tego celu dużo tańszych bioreagentów jest w ostatnim czasie przedmiotem wielu doniesień literaturowych [Soni i in. 2005, Utsukihara i in. 2006, Yang i in. 2006, Bruni i in. 2006, Li i in. 2007].

Pezicula cinnamomea (DC.: Fr.) Sacc. jest stadium generatywnym (teleomorfa) gatunku, który w stadium wegetatywnym znany jest pod nazwą *Cryptosporiopsis grisea* (Pers.: Fr.) Petr. Występuje na różnych gatunkach drzew liściastych, a najczęściej na dębach, zwłaszcza dębie czerwonym [Kowalski 1983, Kowalski i Kehr 1992]. Użyty

do badań prowadzonych przez autorów niniejszej pracy szczep *P. cinnamomea* 15753 pochodził z kolekcji Katedry Fitopatologii Leśnej Akademii Rolniczej w Krakowie.

MATERIAŁY I METODY

Użyte do badań substraty: acetofenon [1], o-metyloacetofenon [2], m-metyloacetofenon [3], o-metoksyacetofenon [4], α,α,α -trifluoroacetofenon [5], oraz 1-acetylo-naftalen [6] i 2-acetylo-naftalen [7] pochodziły z firmy Fluka. Próbki wzorców produktów redukcji wymienionych substratów (tzn. odpowiadających im alkoholi drugorzędowych) użyte do celów identyfikacji w chromatografii gazowej (GC) otrzymano redukując wymienione ketony borowodorkiem sodu w metanolu z niewielkim dodatkiem wody, bez izolowania preparatywnego.

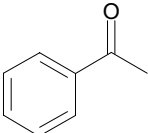
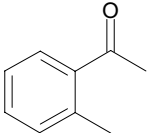
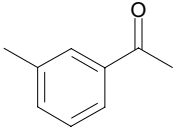
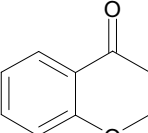
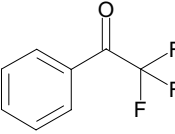
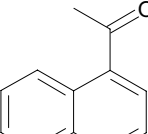
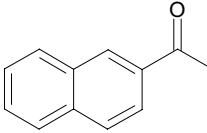
Transformacje prowadzono w kolbach stożkowych o pojemności 250 cm³, zawierających 50 cm³ pożywki o składzie 3% glukozy i 1% peptonu. Substraty dodawane były do 9-dniowej kultury mikrostrzykawką w stężeniu nie przekraczającym 1,0 g w 1 dm³ pożywki. Transformacje prowadzono metodą wgłębną w różnym czasie dla różnych substratów: od 1 do 13 dni, w zależności od szybkości jego redukcji. Przebieg reakcji kontrolowano w czasie, pobierając strzykawką (w warunkach sterylnych) około 5 cm³ mieszaniny reakcyjnej.

Produkty transformacji ekstrahowano eterem etylowym, a ekstrakty suszono bezwodnym siarczanem magnezu. Chromatografia cienkowarstwowa (płytki aluminiowe z żelazem krzemionkowym 60 F₂₅₄ firmy Merck) pozwalała na stwierdzenie obecności produktów reakcji przez porównanie wartości R_F ze wzorcami przy użyciu następujących eluentów (v/v): heksan-aceton (8:1), oraz heksan-chloroform-izopropanol (10:9:1). Czystość optyczną alkoholi oznaczono za pomocą GC na podstawie czasów retencji z użyciem wzorców, wykorzystując kolumnę z chiralną fazą (permetylowana cyklodekstryna) na aparacie Hewlett Packard 5890 Series II wyposażonym w detektor FID. Temperatury dozownika i detektora wynosiły 200 °C, początkowa temperatura kolumny 140 °C utrzymywana była przez 15 min, a następnie wzrastała w tempie 2 °C/min do 200 °C; temperatura końcowa utrzymywana przez dodatkowe 2 min. Wydajność chemiczna określona była na podstawie ilości produktu wyizolowanego w drodze chromatografii kolumnowej na żelu krzemionkowym G firmy Merck o wielkości ziaren odpowiadającej 230-400 mesh stosując eluenty, jak w TLC.

WYNIKI

Wybrane ketony transformowane były w różnym czasie – od 1 do 13 dni, tak aby w miarę możliwości osiągnąć znaczący stopień konwersji substratu. Szybkość redukcji zależała od jego budowy. W każdym przypadku reakcja miała przebieg stereospecyficzny: otrzymane alkohole drugorzędowe miały różną czystość optyczną, która obliczana była jako nadmiar enancjomeryczny enancjomeru będącego w przewodzie na podstawie analiz składu mieszaniny reakcyjnej w chromatografii gazowej przy zastosowaniu kolumny chiralnej. Wyniki podane są w tabeli 1.

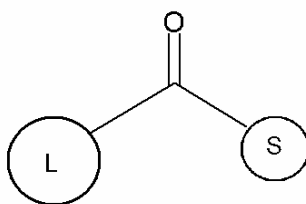
Tabela 1. Przebieg redukcji ketonów aromatycznych w kulturze *P. cinnamomea* 15753
 Table 1. Reduction course of aromatic ketones in *P. cinnamomea* 15753 culture

| | Substrat Substrate | Czas transformacji [dni] Transformation period [days] | Produkt – Product | |
|-----|---|--|---|---|
| | | | wydajność chemiczna [%] chemical yield | czystość optyczna [ee, %] {konfiguracja abs.} optical purity {absolute configuration} |
| [1] |  | 1 | 64 | 90 {S} |
| | | 3 | 91 | 88 {S} |
| | | 9 | 100 | 70 {S} |
| [2] |  | 1 | 16 | 100 {S} |
| | | 6 | 87 | 100 {S} |
| | | 13 | 91 | 100 {S} |
| [3] |  | 1 | 18 | 92 {S} |
| | | 6 | 36 | 64 {S} |
| | | 13 | 57 | 43 {S} |
| [4] |  | 1 | 46 | 98 {R} |
| | | 6 | 100 | 87 {R} |
| | | 13 | 89 | 77 {R} |
| [5] |  | 1 | 94 | 33 {R} |
| | | 6 | 96 | 31 {R} |
| | | 13 | 97 | 31 {R} |
| [6] |  | 1 | 18.5 | 100 {R} |
| | | 7 | 23 | 100 {R} |
| [7] |  | 1 | 24 | 58 {S} |
| | | 7 | 34 | 56 {S} |

Wydajności reakcji redukcji badanych acetofenonów zależały w sposób jednoznaczny od struktury substratu i mieściły się w szerokich granicach od kilkunastu do 100%. Również stereospecyficzność procesu podana jako nadmiar enancjomeryczny (ee) przy określonej preferencji struktury produktu (R/S) była różna dla poszczególnych związków; w większości przypadków można ją określić jako dobrą.

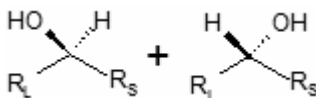
DYSKUSJA WYNIKÓW I WNIOSKI

P. cinnamomea 15753 prowadził stereospecyficzną redukcję prochiralnych ketonów posiadających w swojej strukturze dwa nierówne objętościowo podstawniki: aromatyczny – „większy” oraz alifatyczny – „mniejszy” (rys. 1).



Rys. 1. Struktura prochiralnego ketonu
Fig. 1. The structure of a prochiral ketone

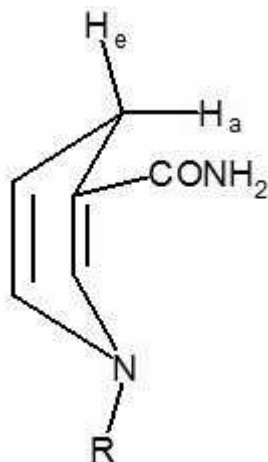
Efektom redukcji w pięciu badanych przypadkach: ketonów [1], [3], [4], [5] i [7] była mieszanina enancjomerycznych alkoholi (rys. 2):



Rys. 2. Struktura enancjomerycznych alkoholi
Fig. 2. The structure of enantiomeric alcohols

przy nadmiarze enancjomerycznym przekraczającym 50%, z wyjątkiem fluorowanej pochodnej acetofenonu [5], dla której wartość ta przekraczała 30%. Zmniejszoną stereospecyficzność dla tego ostatniego substratu obserwuje się dla wielu bioreagentów [Jarosz i Siewiński 1996, Brzezowska i in. 2006, Janeczko 2007].

Enzymy redukujące grupy karbonylowe aldehydów i ketonów posiadają NAD lub NADP jako kofaktor, w którym rolę przekaźnika elektronów pełni zredukowany układ pirydynowy. Posiadając niesymetrycznie (pozycja 3 pierścienia pirydynowego) względem osi układu heterocyklicznego podstawioną grupę amidową, kofaktor przyjmując odpowiednią konformację może być skoordynowany z cząsteczką substratu karbonylowego w określony sposób, przy czym okazuje się, że oba atomy wodoru w pozycji 4 są nierównocenne: jeden zajmuje pozycję aksjalną (H_a), drugi – ekwatorialną (H_e) (rys. 3):



Rys. 3. Struktura przestrzenna zredukowanego kofaktora

Fig. 3. The spatial structure of a reduced cofactor

Względy elektronowe decydują o tym, że atom wodoru z pozycji aksjalnej powinien być odrywany w sposób uprzywilejowany [Nambiar i in. 1983].

W ten sposób wytłumaczyć można z wcześniejszych rozważań regułą Preloga [1964]. Taki przebieg reakcji, kiedy produktem redukcji acetofenonu był alkohol o konfiguracji absolutnej *S* (jak to zaobserwował w swojej pracy Prelog używając gatunku *Curvularia falcata*), określany jest jako zgodny z *regułą Preloga*, ale często obserwuje się przebieg reakcji niezgodny z tą regułą (kiedy powstaje enancjomer *R*), co wytłumaczyć można inną budową centrum aktywnego enzymu. W praktyce często ma miejsce redukcja ketonów do obu enancjomerów, przy czym powstają one na ogół z różną szybkością, co z kolei świadczy o obecności w komórce różnych enzymów prowadzących procesy oksydoredukcyjne przebiegające z udziałem tych samych kofaktorów (NAD i/lub NADPH).

Dla ketonów [1], [2], [3] i [7] preferowany był kierunek reakcji dający enancjomer *S* w przewodzie, a więc zgodnie z *regułą Preloga*, w pozostałych trzech przypadkach ten sam bireagent dawał w sposób uprzywilejowany konfigurację przeciwną. Wydaje się, że substraty [4] i [6] redukowane niezgodnie z wymienioną regułą mają pewną cechę wspólną: mianowicie zwiększoną gęstość elektronową w pobliżu grupy karbonylowej w postaci elektronów atomu tlenu grupy metoksylowej ketonu [4] i elektronów „dodatkowego” pierścienia aromatycznego 1-acetylnaftalenu [6]; dla 2-acetylnaftalenu [7] elektrony te znajdują się w dalszej odległości. Te różnice strukturalne wydają się sprawiać, że substraty [4] i [6] mają powinowactwo do innego enzymu niż pozostałe. Natomiast konfiguracja preferowanego produktu w przypadku redukcji fluorowanego acetofenonu [5] świadczy o kierunku reakcji zgodnym z *regułą Preloga*, a zmniejszona enancjoseptyczność jest wynikiem efektu elektronów atomów fluoru.

PIŚMIENNICTWO

- Bruni R., Fantin G., Maietti S., Medici A., Pedrini P., Sacchetti G., 2006. Plants-mediated reduction in the synthesis of homochiral secondary alcohols. *Tetrahedron: Asymmetry* 17, 2287-2291.
- Brzezowska E., Dmochowska-Gładysz J., Jarosz B., Kowalski T., 2006. Enancjospecyficzna redukcja ketonów aromatycznych w kulturze *Gremmeniella abietina*. *Acta Scientiarum Polonorum* 5, 105-110.
- Janeczko T., 2007. Biotransformacje ketonów przez wybrane szczepy grzybów strzępkowych. Praca doktorska, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu.
- Jarosz B., Siewiński A., 1996. Enantiospecific reduction of prochiral ketones of aromatic type to optically active alcohols in *Nigrospora oryzae* culture. *J. Basic Microbiol.* 36, 245-253.
- Kowalski T., 1983. Vorkommen von Pilzen in durch Luftverunreinigung geschädigten Wäldern im Oberschlesischen und Krakauer Industriegebiet. IX. Mykoflora von *Quercus robur* L. und *Q. rubra* L. an einem Standort mit mittlerer Immissionsbelastung. *Eur. J. For. Path.* 13, 46-59.
- Kowalski T., Kehr R.D., 1992. Endophytic fungal colonization of branch bases in several forest tree species. *Sydowia* 44, 137-168.
- Li Y.-N., Shi X.-A., Zong M.-H., Meng C., Dong Y.-Q., Guo Y.-H., 2007. Asymmetric reduction of 2-octanone in water/organic solvent biphasic system with Baker's yeast FD-12. *Enz. Microb. Technol.* 40, 1305-1311.
- Nambiar K.P., Stauffer D.M., Kolodziej P.A., Benner S.A., 1983. A Mechanistic Basis for the Stereoselectivity of Enzymatic Transfer of Hydrogen from Nicotinamide Cofactors. *J. Am. Chem. Soc.* 105, 5886-5890.
- Ohkuma T., Ooka H., Hashiguchi S., Ikariya T., Noyori R., 1995. Practical Enantioselective Hydrogenation of Aromatic Ketones. *J. Am. Chem. Soc.* 117, 2675-2676.
- Prelog V., 1964. Specification of the stereospecificity of some oxido-reductases by diamond lattice sections. *Pure Appl. Chem.* 9, 119-130.
- Soni P., Kaur G., Chakraborti A.K., Banerjee U.C., 2005. *Candida viswanathii* as a novel biocatalyst for stereoselective reduction of heteroaryl methyl ketones: a highly efficient enantioselective synthesis of (*S*)- α -(3-pyridyl)ethanol. *Tetrahedron: Asymmetry* 16, 2425-2428.
- Utsukihara T., Misumi O., Kato N., Kuroiwa T., Horiuchi C.A., 2006. Reduction of various ketones by red algae. *Tetrahedron: Asymmetry* 17, 1179-1185.
- Yang W., Xu J.-H., Xie Y., Xu Y., Zhao G., Lin G.-Q., 2006. Asymmetric reduction of ketones by employing *Rhodotorula* sp. AS2.2241 and synthesis of the b-blocker (R)-nifenalol. *Tetrahedron: Asymmetry* 17, 1769-1774.

ENANTIOSPECIFIC REDUCTION OF AROMATIC KETONES IN A *PEZICULA CINNAMOMEA* CULTURE

Abstract. A *Pezicula cinnamomea* strain, an endophytic fungus, was used to investigate its ability to reduce seven prochiral aromatic ketones: acetophenones and naphthylketones. In all cases enantiospecificity of the process was recorded, and the enantiospecificity, calculated as the enantiomeric excess, as well as resulting secondary alcohol yield, depended primarily on the structure of a given substrate, and to the lesser extent on the reaction time.

Key words: *Pezicula cinnamomea*, bioreduction, enancjospecyficity, ketone reduction

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 18.12.2007

OCENA WZROSTU TRANSFORMANTÓW DROŻDŻY *YARROWIA LIPOLYTICA* W OBECNOŚCI LAKTOZY

Ewa Walczak¹, Zbigniew Lazar¹, Stephan Mauesberger²,
Małgorzata Robak¹

¹Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

²Uniwersytet Techniczny w Dreźnie

Streszczenie. Celem podjętych badań była ocena wpływu: kwasu oleinowego, etanolu, glicerolu, heksadekanu oraz glukozy na indukcję promotorów wprowadzonych z genem LacZ do genomu drożdży *Y. lipolytica*. Indukcję oceniano poprzez wzrost 12 transformantów w obecności laktozy i wykazanie aktywności β -galaktozydazy. Pomimo obecności w podłożu niezbędnych do indukcji promotorów substancji badane transformanty drożdży nie były zdolne do wykorzystania laktozy do wzrostu. Obserwowany słaby wzrost niektórych transformantów był prawdopodobnie wynikiem wykorzystania jako źródło węgla zastosowanego induktora. Szczególnie, że przeprowadzony test ONPG nie potwierdził ekspresji genu LacZ u żadnego z badanych szczepów.

Słowa kluczowe. *Yarrowia lipolytica*, LacZ, laktoza

WSTĘP

Zdolność do metabolizowania nietypowych (hydrofobowych) źródeł węgla, produkcja kwasów organicznych, laktonów, aktywność proteolityczna i lipolityczna to największe z punktu widzenia biotechnologii atuty szczepów drożdży z gatunku *Yarrowia lipolytica* [Barth i in. 1997]. Z kolei budowa genomu, odmienna niż u konwencjonalnych gatunków drożdży, czyni go jednocześnie atrakcyjnym obiektem i narzędziem w dziedzinie inżynierii genetycznej [Casaregola i in. 2000]. Do 2007 roku otrzymano ponad 40 transformowanych szczepów, potencjalnych producentów heterologicznych białek [Madzak i in. 2005, Nicaud i in. 2002].

Są pośród nich enzymy, np. endoglukanaza I z *Trichoderma reesei* czy lakkaza z *Pycnoporus cinnabarinus* [Park i in. 2000, Madzak i in. 2005], antygeny, ludzki

czynnik wzrostu [Hamsa i in. 1998] i koagulacji krwi XIIIa, analogi insuliny i insulino-tropina [Tharaud i in. 1992, James i Strick 1993].

Drożdże *Y. lipolytica* jako niepatogeniczny organizm [Yoshida i Hashimoto, 1986] stanowią jeden z eukariotycznych modeli komórkowych w realizacji celów zarówno badań poznawczych, jak i aplikacyjnych [Madzak i in. 2004]. Są obiektem badań mitochondrialnego kompleksu I [Kerscher i in. 2002], stanowią organizm modelowy w badaniach nad wydzielaniem białek [Beckerich i in. 1998] oraz peroksosomami [Titorenko i in. 2000]. Pośród wielu użytecznych cech tego gatunku za niekorzystne uznaje się brak wzrostu na dwucukrach, takich jak laktoza czy sacharoza [Madzak i in. 2005, Van den Temple i Jakobsen 2000]. Substraty te są bowiem niedrogie i nawet otrzymane na dużą skalę są stosunkowo czyste chemicznie, gwarantując opłacalność produkcji heterologicznego białka.

Celem podjętych badań była ocena wpływu wybranych źródeł węgla: kwasu oleinowego, kwasu octowego, etanolu, glicerolu, heksadekanu oraz glukozy na indukcję promotorów wprowadzonych z genem LacZ do genomu drożdży *Y. lipolytica*. Indukcję oceniano poprzez wzrost transformantów w obecności laktozy i aktywność β -galaktozydazy.

MATERIAŁY I METODY

Mikroorganizmy. Przedmiotem badań było trzynaście zmodyfikowanych genetycznie szczepów drożdży *Yarrowia lipolytica* Po1d udostępnionych przez Instytut Mikrobiologii Uniwersytetu Technicznego w Dreźnie oraz dziki szczep *Y. lipolytica* A-101 z kolekcji kultur Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Wyszczególnione w tabeli 1 szczepy *Y. lipolytica* Po1d otrzymali Juretek i in. [2000] w oparciu o szczep wyjściowy *Y. lipolytica* Po1d (MATA LEU2 ura3-302) na drodze transformacji plazmidami wprowadzającymi sekwencję genu LacZ znajdującego się pod kontrolą jednego z indukcyjnych promotorów następujących genów: liazы izocytrynianowej (pICL1), oksydazy acylo-CoA (pPOX2), regulatora szlaku glioksalowego (pGPR1), dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego (pG3PB1, pG3PB2) bądź pod kontrolą hybrydowego promotora pXPR2c, aktywnego konstytutywnie, podczas wzrostu drożdży.

Hodowle stacjonarne prowadzono w 50 ml kolbach Erlenmayera zawierających 10 ml syntetycznego podłoża płynnego z tiaminą (MMT) z dodatkiem 1% laktozy jako źródła węgla oraz 20 mgx^{-1} uracylu, przez 96 godzin, w temperaturze 28°C stosując 180 rpm. Jako czynnik indukujący poszczególne promotory warunkujące ekspresję genu LacZ wykorzystano odpowiednie źródła węgla w ilości 0,01%; 0,1% lub 1% dodane do hodowli przegłodzonych komórek. Wzrost oraz rozmnażanie komórek obserwowano w preparatach przyżyciowych wykonywanych co godzinę, począwszy od przeniesienia dwudziestogodzinnego inokulum do podłoża zawierającego 1% laktozy. W tabeli 2 zestawiono promotory i indukujące je źródła węgla. Dziki szczep *Y. lipolytica* A-101 wyrastający na glukozie, glicerolu i heksadekanie stanowił pozytywną kontrolę.

Tabela 1. Szczepy *Y. lipolytica*
Table 1. *Y. lipolytica* strains

| Numer Number | <i>Yarrowia lipolytica</i> | Genotyp Genotype | Opis w dokumentach Description in documents |
|-----------------|-------------------------------|---|--|
| 1. | Po1d (pLG3) clone 1 | MATA LEU2 ura3-302 pICL1-lacZ-GFP _{SKL} | Klon 1 |
| 2. | Po1d (pLG3) clone 2 | MATA LEU2 ura3-302 pICL1-lacZ-GFP _{SKL} | Klon 2 |
| 3. | Po1d (pLG3) T3 | MATA LEU2 ura3-302 pICL1-lacZ-GFP _{SKL} | T3 |
| 4. | Po1d (pLG3) T4 | MATA LEU2 ura3-302 pICL1-lacZ-GFP _{SKL} | T4 |
| 5. | Po1d (LacZ) T13 | MATA LEU2 ura3-302 pICL1-lacZ (to be clarified) | T13 |
| 6. | Po1d (pI-NA354lacZ-GFPSKL) T5 | MATA LEU2 ura3-302 pICL1-lacZ-GFPSKL | T5 |
| 7. | Po1d (pINA354b-POX2) | MATA LEU2 ura3-302 pPOX2-lacZ | POX2 |
| 8. | Po1d (pINA354b-ICL1) | MATA LEU2 ura3-302 pICL1-lacZ | ICL1 |
| 9. | Po1d (pINA354b-G3PB1) | MATA LEU2 ura3-302 pG3PB1-lacZ | G3PB1 |
| 10. | Po1d (pINA354b-G3PB2) | MATA LEU2 ura3-302 pG3PB2-lacZ | G3PB2 |
| 11. | Po1d (pINA354b-GPR1) | MATA LEU2 ura3-302 pGPR1-lacZ | GPR1 |
| 12. | Po1d (pINA354b-XPR2c) | MATA LEU2 ura3-302 pXPR2c-lacZ | XPR2c = hp4d |
| 13. | Po1d L Clone 12 | MATA LEU2 ura3-302 | Clone12 (rodzic/ parent) |
| 14. | A-101 | Szczep dziki (LEU2 URA3) Wild type (LEU2 URA3) | A-101 (dziki/wild) |

Dla wybranych szczepów drożdży kolejne hodowle przeprowadzono w aparacie do mikrohodowli BioscreenC. 50 µl inokula, o gęstości optycznej (OD_{550nm}) w zakresie 0,23-0,25 wprowadzono do 300 µl płynnego podłoża syntetycznego z tiaminą (MMT) zawierającego 1% laktozy jako główne źródło węgla oraz 20 mgx⁻¹ uracylu. Do hodowli dodano induktor: 0,1% kwas oleinowy do indukcji promotorów: pICL1, pPOX2, pG3PB1, pG3PB2; 0,1% heksadekan do indukcji pGPR1 i 0,01% glukozy do hodowli szczepu z pXPR2c. Hodowle prowadzono 72 h w temperaturze 28 °C, z wstrząsaniem. Dla każdego wariantu wykonano 3 powtórzenia. Wzrost poszczególnych szczepów określono na podstawie pomiarów OD (420-580 nm).

Test ONPG. Obecność β-galaktozydazy oceniano w oparciu o test ONPG (o-nitrofenyl-b-D-galaktopiranozyd) – o wyniku pozytywnym świadczył żółty produkt hydrolizy ONPG – orto-nitrofenol. W 1 ml hodowli umieszczono krążek ONPG i inkubowano w temperaturze 35-37 °C przez okres 10 min – 24 h. Test ONPG przeprowadzono przed i po sonifikacji prób z hodowli. Dezintegrację ultradźwiękami przeprowadzono w całości zawiesiny hodowlanej z zastosowaniem chłodzenia i pięciu piętnastominutowych cykli dezintegracji. Pozytywną kontrolę testu ONPG stanowiła hodowla *E. coli*, dla której po 10 minutach obserwowano żółte zabarwienie mieszaniny reakcyjnej.

Tabela 2. Ocena wzrostu transformantów *Y. lipolytica* w podłożu z 1% laktozą i induktorem promotoraTable 2. *Y. lipolytica* transformants growth on 1% lactose and promoter inducitor

| Numer Number | Szczep Strain | Induktor Inductor | Wzrost 24/48 godzin Growth 24/48h |
|-----------------|---------------------------|------------------------------|--------------------------------------|
| 1. | Klon 1 | 1% glicerol, 1% glycerol | -/- |
| | Clone 1 | 1% etanol, 1% ethanol | +/- |
| 2. | Klon 2 | 1% glicerol, 1% glycerol | -/- |
| | Clone 2 | 1% etanol, 1% ethanol | +/- |
| 3. | T3 | 1% glicerol, 1% glycerol | -/- |
| | | 1% etanol, 1% ethanol | +/- |
| 4. | T4 | 1% glicerol, 1% glycerol | -/- |
| | | 1% etanol, 1% ethanol | +/- |
| 5. | T13 | 1% glicerol, 1% glycerol | -/- |
| | | 1% etanol, 1% ethanol | +/- |
| 6. | T5 | 1% glicerol, 1% glycerol | +/+ |
| | | 1% etanol, 1% ethanol | +/- |
| 7. | POX2 | 1% heksadekan, 1% hexadecane | -/- |
| 8. | ICL1 | 1% glicerol, 1% glycerol | +/+ |
| | | 1% etanol, 1% ethanol | +/+ |
| 9. | G3PB1 | 1% glicerol, 1% glycerol | +/+ |
| | | 1% glukoza, 1% glucose | +/+ |
| 10. | G3PB2 | 1% glicerol, 1% glycerol | -/- |
| | | 1% glukoza, 1% glucose | -/+ |
| 11. | GPR1 | 1% heksadekan, 1% hexadecane | -/- |
| 12. | XPR2c = hp4d | 0,01% glukoza, 0,01% glucose | +/+ |
| | | 0,1% glukoza, 0,1% glucose | +/- |
| 13. | Clone 12 (rodzic) | 0,01% glukoza, 0,01% glucose | +/+ |
| | Clone 12 (parent) | 1% glicerol, 1% glycerol | -/- |
| | | 1% heksadekan, 1% hexadecane | -/- |
| 14. | A-101 dziki (kontrola) | 1% glukoza, 1% glucose | +/+ |
| | A-101 wild type (control) | 1% glicerol, 1% glycerol | +++ |
| | | 1% heksadekan, 1% hexadecane | +++ |

-/- brak wzrostu na początku i na końcu hodowli – no growth at the beginning and the end of the culture,

+/+ słaby wzrost podczas hodowli – poor growth during culture,

+/- słaby wzrost po 48 godzinach hodowli – poor growth after 48 h of the culture,

+/- wzrost w oparciu o materiał zapasowy w komórce – growth on the basis of reserve material in the cell,

+++ bardzo dobry wzrost podczas pierwszych trzech dni hodowli – very good growth during first three days of culture.

WYNIKI

Wyniki hodowli stacjonarnych w kolbach – zestawiono w tabeli 2. Sugerują one indukcję niektórych promotorów zastosowanymi źródłami węgla. W obecności glicerolu obserwowano wzrost szczepu Po1d (pINA354b-LacZ-GFPSKL) T5 oraz Po1d (pINA354b-ICL1) zawierającego gen LacZ pod kontrolą promotora ICL1. Pozytywny wpływ na wzrost szczepów zawierających promotory pG3PB1 i pG3PB2 (dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego) wykazano przy dodatku 1% glicerolu, 1% glukozy lub 1% etanolu do podłoża laktozowego. Natomiast szczepy zawierające promotor ICL1 opisane jako: klon 1, klon 2, T3, T4 oraz T13 w hodowli stacjonarnej nie wykorzystywały laktozy do wzrostu w podłożu zawierającym 1% glicerolu jako czynnik indukujący ekspresję genu LacZ. Szczepy te, a także szczep Po1d (pINA354b-LacZ-GFPSKL) T5 na podłożu zawierającym 1% etanolu jako czynnik indukujący rosły aż do wyczerpania materiału zapasowego w komórce. Zaobserwowany wzrost mógłby być wynikiem hydrolizy laktozy, czyli ekspresji promotorów indukcyjnych, jednakże test ONPG nie potwierdził obecności β -galaktozydazy. Dla żadnego z badanych transformantów, nawet po 24-godzinnej inkubacji enzymatycznej i dezintegracji komórek, nie uzyskano pozytywnego wyniku świadczącego o obecności aktywnej β -galaktozydazy.

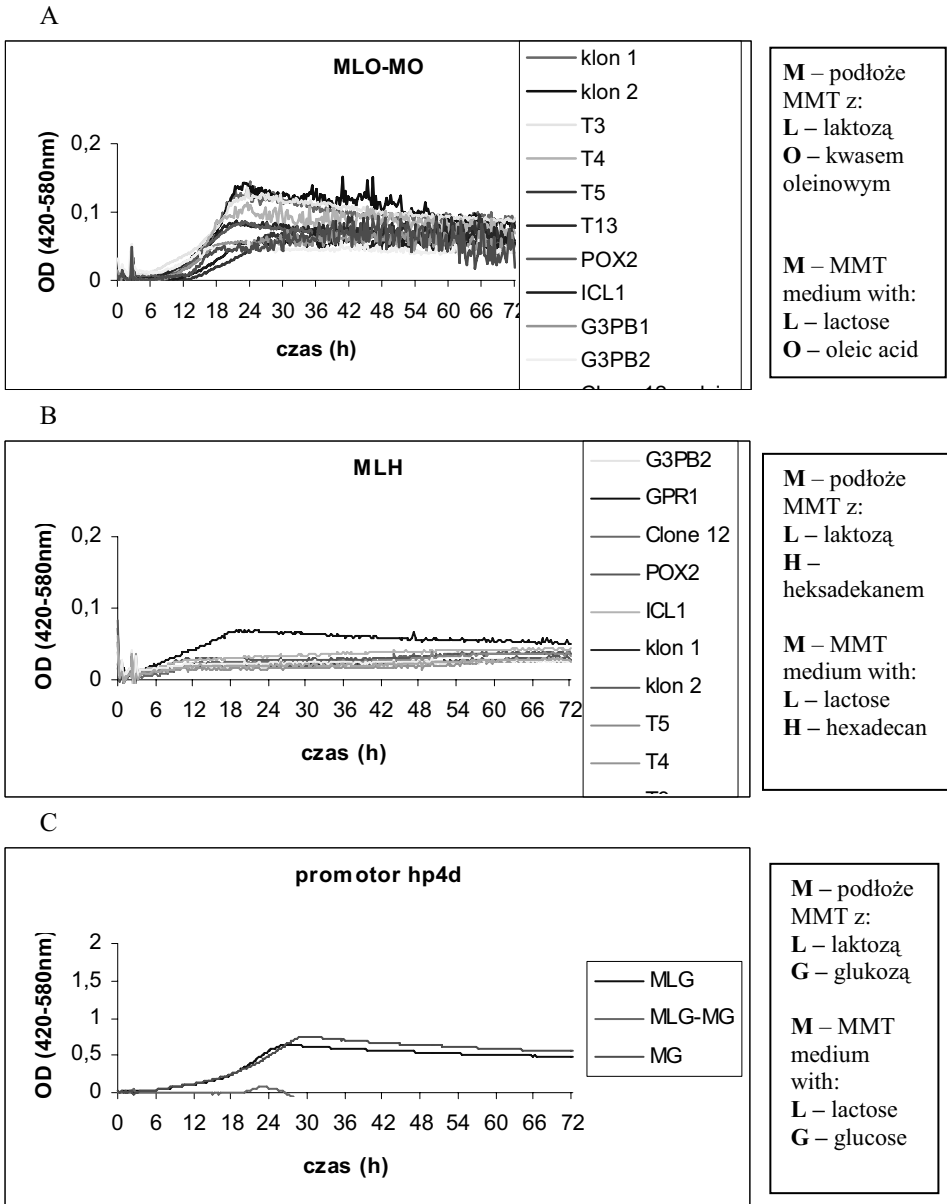
Dodatek 1% heksadekanu pozostał bez wpływu na indukcję promotora genu POX2 (oksydaza acylo-CoA) oraz promotora genu GPR1 (regulator szlaku glioksalowego).

W hodowli szczepu Po1d (pINA354b-XPR2c) zawierającego syntetyczny promotor hp4d (XPR2c) zależny od wzrostu komórek wykazano wzrost badanego szczepu już przy 0,01% dodatku glukozy. Wzrost oraz pączkowanie komórek obserwowano w preparatach przyżyciowych wykonywanych co godzinę, począwszy od przeniesienia dwudziestogodzinnego inokulum do podłoża zawierającego 1% laktozy. Wynika z nich, że komórki wykorzystywały do wzrostu zgromadzony materiał zapasowy (tab. 2).

W kolejnych hodowlach, w aparacie BioscreenC zmieniono źródło węgla indukujące promotory. Zastosowano 0,1% kwas oleinowy, induktor promotorów: pICL1, pPOX2, pG3PB1, pG3PB2, oraz 0,1% heksadekan jako induktor pGPR1 i 0,01% dodatek glukozy w hodowli szczepu z promotorem hp4d. W hodowli w aparacie BioscreenC wykazano niski wzrost wszystkich badanych szczepów niezależnie od zastosowanego induktora. Wzrost szczepów serii Po1d opisanych jako: klon 1, klon 2, T3, T4, T13, (pINA354b-POX2) w podłożu z laktozą w obecności kwasu oleinowego nie przekraczał wartości OD_{550} 0,2 (rys. 1A). Najsilniej indukowane były promotory ICL1 oraz POX2, z wyjątkiem dwóch szczepów Po1d (pINA354b-ICL1) i Po1d (pINA354b-LacZ-GFPSKL) T5. Indukcja promotorów pG3PB1 i pG3PB2 była mniejsza: obserwowano dwukrotnie niższy wzrost, a szczep Po1d (pINA354b-G3PB1) zawierający promotor pG3PB1 wyrastał najslabiej.

Równolegle, w hodowli szczepów w obecności 0,1% heksadekanu jako czynnika indukującego wykazano słaby wpływ tego źródła węgla na indukcję badanych promotorów (rys. 1B). Najsilniejszy jego wpływ odnotowano dla promotora pGPR1. Wzrost szczepu Po1d (pINA354b-GPR1) był dwukrotnie wyższy niż pozostałych.

W hodowli szczepu Po1d (pINA354b-XPR2c) zawierającego promotor syntetyczny hp4d zaobserwowano dobry wzrost w podłożu z 0,01% oraz nieznaczny w obecności 0,1% glukozy. Wypadkowa krzywa wzrostu tego szczepu w obecności laktozy wskazuje na wykorzystanie jedynie glukozy (rys. 1C).



Rys. 1. Wzrost szczepów na podłożach z laktozą i źródłem węgla indukującym ekspresję genu LacZ: A – kwasem oleinowym, B – heksadekanem, C – glukozą

Fig. 1. Growth of strains on medium with lactose and source of carbon for induction of LacZ gene expression: A – oleic acid, B – hexadecan, C – glucose

DYSKUSJA

Naturalne izolaty drożdży *Yarrowia lipolytica* nie zawierają genu β -galaktozydazy, a tym samym nie są zdolne do hydrolizy laktozy i wzrostu, gdy stanowi ona jedyne źródło węgla. Zespół naukowy Uniwersytetu Technicznego w Dreźnie na drodze transformacji oraz rekombinacji wprowadził do genomu szczepu *Y. lipolytica* Po1d kasetę zawierającą sekwencję wybranego promotora (naturalnego bądź hybrydowego) oraz znajdującą się pod jego kontrolą sekwencję genu reporterowego LacZ [Juretzek i in. 2000]. Zespół, oceniając obecność niebieskich kolonii w podłożu YPD z X-gal, otrzymał zestaw transformantów różniących się wprowadzonym promotorem warunkującym ekspresję genu LacZ. Według autorów najsilniejszymi promotorami, łatwo indukowanymi tanimi źródłami węgla są POX2, ICL1, POT1. Niemniej, otrzymane przez Juretzek i in. [2000] wyniki nie są jednoznaczne. Hodowle w podłożu stałym nie potwierdziły wyników z hodowli w podłożu płynnym, a indukcja promotorów nie była trwała. Badacze tylko przez 3-5 godzin obserwowali efekt indukcji mierzony jako aktywność β -galaktozydazy, a w zestawieniu brak jest wyników dla szczepu dzikiego. Ponadto niemieccy uczeni nie badali wzrostu otrzymanych transformantów przy zastosowaniu laktozy jako głównego źródła węgla. Wyniki przedstawione w tej pracy również nie są jednoznaczne. Wzrost badanych szczepów prawdopodobnie nie jest wynikiem ekspresji promotorów i hydrolizy laktozy. Mógł on być spowodowany wykorzystaniem do wzrostu indukcyjnych źródeł węgla. Gęstość hodowli, mierzona jako OD, mogła być wynikiem wzrostu nawet na 0,01% glukozie. Jej wartość jest bowiem porównywalna do wartości otrzymanych w innych badaniach [Robak 2002]. Należy jednak podkreślić, że szczep rodzicielski nie korzystał z glicerolu, a w przypadku trzech transformantów obserwowano wzrost w podłożu zawierającym glicerol i laktozę. Bardzo interesujące jest również, że niektóre genetycznie transformowane szczepy rosą, gdy w podłożu obecna jest laktoza i drugie źródło węgla (glicerol, etanol), a inne nie. Dlaczego? W szczepach Po1d (pINA354lacZ-GFPSKL) T5, Po1d (pINA354b-ICL1) oraz Po1d (pINA354b-G3PB1) laktoza obecna w podłożu wywarła prawdopodobnie wpływ na metabolizm drugiego źródła. Ostatnio opisano brak wzrostu mutantów *Y. lipolytica* w podłożach z dwoma źródłami węgla: z octanem i glicerolem oraz z octanem i etanolem [Robak 2007]. Szczepy te wyrastały przynajmniej na jednym z tych źródeł, gdy był on jedynym substratem i wyrastały, gdy w podłożu była glukoza i octan. W analizowanym problemie poruszonym w pracy sytuacja jest odwrotna. Dodatek laktozy umożliwił wykorzystanie glicerolu i etanolu. Te intrygujące spostrzeżenia wymagają dalszych szczegółowych badań.

Brak wzrostu na laktozie może być tłumaczony brakiem u badanych szczepów pozostałych genów bakteryjnego operonu laktozowego. Szczególnie brak permeazy laktozowej (LacY) odpowiedzialnej za transport laktozy do wnętrza komórki [Juretzek i in. 2000] może być w tym przypadku ważny. Brak transacetylazy tiogalaktozydowej (LacA) ma mniejsze znaczenie. Niektóre dzikie szczepy *Y. lipolytica* korzystają z galaktozy [Barnett i in. 1983] i drożdże te muszą mieć system aktywacji tego monosacharydu. Natomiast brak aktywności β -galaktozydazy w komórkach transformantów świadczy jednoznacznie, że nie doszło do indukcji promotorów. Ekspresja genu LacZ nie zależy od obecności permeazy.

POSDUMOWANIE

Pomimo obecności w podłożu substancji niezbędnych do indukcji promotorów badane transformanty drożdży *Yarrowia lipolytica* Po1d, po modyfikacji genetycznej polegającej na wprowadzeniu genu LacZ kodującego β -galaktozydazę, nie były zdolne do wykorzystania laktozy do wzrostu. Zauważony słaby wzrost niektórych transformantów w hodowli stacjonarnej był prawdopodobnie wynikiem wykorzystania do wzrostu nie laktozy, a dodanego w dużej ilości (1%) drugiego źródła węgla stosowanego do indukcji promotorów. Jedną z przyczyn braku wzrostu na laktozie może być brak permeazy umożliwiającej transport laktozy do wnętrza komórki. Nie tłumaczy to jednak, dlaczego przeprowadzony test ONPG nie potwierdził ekspresji genu LacZ u żadnego z badanych szczepów.

PIŚMIENICTWO

- Barnett J.A., Payne R.W., Yarrow D., 1983. Yeast: characteristics and identification, Cambridge University Press, Cambridge.
- Barth G., Gaillardin C., 1997. Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. FEMS Microbiol. Reviews 19, 219-237.
- Barth G., Gaillardin C., 1996. *Yarrowia lipolytica* [In:] Nonconventional Yeasts in Biotechnology (Wolf, K), A Handbook, 313-388, Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
- Beckerich J.M., Boisrame-Baudevin A., Gaillardin C., 1998. *Yarrowia lipolytica*: a model organism for protein secretion studies. Internal Microbiol 1: 123-130.
- 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.
- Hamsa V.P., Kachroo P., Chattoo B.B., 1998. Production and secretion of biological active human epidermal growth factor in *Yarrowia lipolytica*. Curr. Genet. 33: 231-237.
- James L.C., Strick C.A. 1993. Multiple integrative vectors and *Yarrowia lipolytica* transformants. US Patent Application US08/117.375 (WO95/06739).
- Juretzek T., Wang H.J., Nicaud J.M., Mauersberger S., Barth G., 2000. Comparison of promoters suitable for regulated overexpression of β -galactosidase in the alkane-utilizing yeast *Yarrowia lipolytica*. Biotechnol. Bioprocess Eng. 5:320-326.
- Kerscher S., Droese S., Zwicker K., Zickermann V., Brandt U., 2002. *Yarrowia lipolytica*, a yeast genetic system to study mitochondrial complex I. BBA, 1555, 83-91.
- Madzak C., Gaillardin C., Beckerich J.M., 2004. Heterologous protein expression and secretion in the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*: a review. Journal of Biotechnology 109, 63-81.
- Madzak C., Otterbein L., Chamkha M, Moukha S., Asther M., Gaillardin C., 2005. Heterologous production of laccase from the basidiomycetes *Pycnoporus cinnabarinus* in the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica*. FEMS Yeasts Research, 5, (6-7), 635-646.
- Nicaud J.M., Madzak C., van den Broek, Gysler C., Duboe P., Niederberger P., Gaillardin C., 2002. Protein expression and secretion in the yeast *Yarrowia lipolytica*. FEMS Yeast Research 2, 371-379.
- Park C.S., Chank C.C., Ryu, Devey D.Y., 2000. Expression and high-level secretion of *Trichoderma reesei* endoglucanase I in *Yarrowia lipolytica*. Applied Biochemistry and Biotechnology Volume 86, Issue: 1, pp. 1-15.

- Robak M., 2002. Studia nad wykorzystaniem octanu i wydzielaniem cytrynianu przez drożdże *Yarrowia lipolytica* [Study of acetate utilisation and citrate secretion by *Yarrowia lipolytica* yeast], Zeszyty Naukowe AR Wrocław, Technologia Żywności, Nr 442, Rozprawy CXCI, 1-91.
- Robak M., 2007. *Yarrowia lipolytica* specific growth rate on acetate medium supplemented with glucose, glycerol or ethanol. Acta Sci. Polon, Biotechnologia 6(1):23-31.
- Titorenko V.I., Smith J.J., Szilard R.K., Rachubiński R.A., 2000. Peroxisome biogenesis in the yeast *Yarrowia lipolytica*. Cell Biochemistry and Biophysics, 32(1-3), 21-26.
- Tharaud C., Ribet A.M., Costes C., Gaillardin C., 1992. Secretion of human blood coagulation factor XIIIa by the yeast *Yarrowia lipolytica*. Gene 121, 111-119.
- Van den Temple T., Jakobsen M., 2000. The technological characteristics of *Debaryomyces hansenii* and *Yarrowia lipolytica* and their potential as starter cultures for production of Danablu. International Dairy Journal, Volume: 10, Issue: 4, pp. 263-270.
- Yoshida M., Hashimoto K., 1986. Assessment of the pathogenicity of Yeasts used in the production of single cell protein. Agric. Biol. Chem. 50(8), 2117-2118.

EVALUATION OF *YARROWIA LIPOLYTICA* TRANSFORMANTS GROWTH ON LACTOSE

Abstract. The aim of the study was the evaluation of induction by: oleic acid, ethanol, glycerol, hexadecane and glucose of promoters introduced with gene Lac Z into *Yarrowia lipolytica* genome. Induction effects were estimated by the growth of 12 transformants on lactose and by the measurement of β -galactosidase activity. Despite the presence of suitable promoters inductors in the medium tested yeasts clones were unable to utilize lactose for their growth. Weak growth observed for some clones, was probably caused by inductors utilization as C source. Especially that the ONPG test did not confirm LacZ gene expression in any of studied strains.

Key words: *Yarrowia lipolytica*, LacZ, lactose

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 18.12.2007

WPŁYW MAKROELEMENTÓW NA PROCES BIOSYNTETY KWASU CYTRYNOWEGO Z GLICEROLU PRZEZ *ASPERGILLUS NIGER* W78B

Ewa Foryś, Waldemar Podgórski, Marta Kaczyńska

Akademia Ekonomiczna we Wrocławiu

Streszczenie. Celem autorów pracy było zbadanie możliwości wykorzystania glicerolu w procesie biosyntezy kwasu cytrynowego przez szczep *Aspergillus niger* W78B oraz ustalenie optymalnego stężenia makroelementów w podłożu dla tego procesu. Hodowle prowadzono techniką hodowli wstrząsanej w podłożach syntetycznych z gliceryną jako substratem, rozcieńczoną wodą wodociągową i uzupełnionych źródłami makroelementów. W wyniku badań ustalono, że optymalne stężenia NH_4NO_3 , KH_2PO_4 i $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ wynoszą odpowiednio: 2,48, 0,3 i 0,3 g dm^{-3} . W tych warunkach uzyskano ponad 59 g dm^{-3} kwasu cytrynowego tworzącego się z wydajnością ($Y_{P/S}$) 0,39 g g^{-1} i produktywnością (Q_P) 0,99 g $\text{dm}^{-3} \text{h}^{-1}$. Jedynym produktem ubocznym powstającym w śladowych ilościach w czasie badanego procesu był kwas szczawiowy.

Słowa kluczowe: kwas cytrynowy, glicerol, biodiesel, *Aspergillus niger*, bioutylizacja

WSTĘP

Ustawa o biopaliwach i biokomponentach ciekłych [2006] nakłada obowiązek stosowania biokomponentów i paliw odnawialnych w paliwach ciekłych i biopaliwach. Zgodnie z obecnie obowiązującym Rozporządzeniem Rady Ministrów w tej sprawie [2007] dodatek biokomponentów do paliw powinien rosnać od 3,45% do 7,10% w latach 2008-2013, by zgodnie z Dyrektywą UE [2003] w roku 2020 osiągnąć wartość 20% [Walisiewicz-Niedbalska i in. 2006]. W najbliższych latach nastąpi więc zwiększenie produkcji biopaliw w Polsce, a ilość powstającego odpadowego glicerolu przy produkcji biodiesla przekroczy znacznie jego rynkowe zapotrzebowanie [Lesisz i Pindel 2006]. Do tej pory rozpoznane możliwości zagospodarowania tego odpadu ograniczone są głównie do otrzymywania gliceryny bezwodnej i kosmetycznej [Rymowicz i in. 2005]. Problemy z zagospodarowaniem gliceryny będą wpływać znacząco na efektywność ekonomiczną produkcji biopaliw [Tęcza i in. 2006]. Konieczne jest zatem poszu-

kiwanie nowych kierunków wykorzystania powstającego odpadowego glicerolu, między innymi jako składnika podłoży hodowlanych w procesach biotechnologicznych. Jednym ze znaczących kierunków jego zagospodarowania może być zastąpienie nim drogich substratów, a więc cukru białego, skrobi czy syropów glukozy, w procesie biosyntezy kwasu cytrynowego. Możliwość takiej substytucji jest obecnie w fazie badań laboratoryjnych [Levinson i in. 2007, Imandi i in. 2007, Papanikolaou i in. 2002]. Literatura tematu charakteryzuje się jednak brakiem doniesień dotyczących produkcji kwasu cytrynowego przez pleśń z rodzaju *Aspergillus*, pomimo że szczepy z gatunku *Aspergillus niger* uznawane są za najlepszego producenta tego kwasu.

Celem autorów pracy było zbadanie możliwości wykorzystania glicerolu jako jedyne źródła węgla i energii w procesie biosyntezy kwasu cytrynowego przez szczep *Aspergillus niger* W78B oraz ustalenie optymalnego stężenia makroelementów w podłożu dla tego procesu.

MATERIAŁ I METODY

Drobnoustroje i warunki hodowli

W badaniach stosowano szczep *A. niger* W78B pochodzący z kolekcji Instytutu Chemii i Technologii Żywności Akademii Ekonomicznej we Wrocławiu. Hodowle prowadzono na podłożach syntetycznych z gliceryną (99,5%), rozcieńczoną wodą wodociągową do stężenia 150 g dm⁻³. Podłoża uzupełniano źródłami makroelementów w postaci: NH₄NO₃, KH₂PO₄ i MgSO₄·7H₂O. Odczyn podłoży ustalono kwasem mineralnym na poziomie 2,8 jednostek pH. Hodowle prowadzono przez 20 dni w temperaturze 30 °C w kolbach o pojemności 750 cm³ wypełnionych 125 cm³ podłoża umieszczonych na wstrząsarce posuwisto-zwrotnej o częstotliwości 148 ruchów · min⁻¹ i amplitudzie 3,5 cm.

Metody analityczne

Kwasy organiczne oznaczano za pomocą wysoko sprawnej chromatografii cieczowej HPLC (Perkin Elmer) przy użyciu kolumny Aminex HPX-87H (Bio-Rad Lab., Richmond, Calif., USA) oraz detektora UV/VIS o długości fali 210 nm (Perkin Elmer). Fazą mobilną był 5 mM H₂SO₄. Szybkość przepływu wynosiła 0,6 cm³ min⁻¹, a temperatura 20 °C. Stężenie biomasy oznaczano przez odfiltrowanie i suszenie w temperaturze 105 °C do stałej masy.

Metody statystyczne

Do planowania wariantów badawczych zastosowano statystyczną metodę optymalizacji eksperymentów w postaci Centralnego Planu Kompozytowego Boxa-Wilsona. Do opracowania wyników stosowano system analizy danych STATISTICA, wersja 7.1. StatSoft, Inc. (2005).

WYNIKI I DISKUSJA

Skład chemiczny podłoży syntetycznych w procesie biosyntezy kwasu cytrynowego jest na ogół modyfikacją medium stosowanego przez Shu i Johnsona [1948]. Autorzy ci

określili podstawowe składniki pożywki niezbędne dla efektywnej biosyntezy tego metabolitu, stwierdzając, że poza źródłem węgla podłoża płynne powinny być uzupełniane w: NH_4NO_3 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 oraz cynk i żelazo. Stosując zamiast wody destylowanej wodę wodociągową, która posiada zazwyczaj wystarczającą ilość mikroelementów, skład podłoża ulega dalszemu uproszczeniu, nie wymagając dodatku jonów cynku i żelaza [Leśniak i in. 2002, Podgórski 2005].

Jako źródło węgla i energii powszechnie stosowane są węglowodany. W badaniach będących przedmiotem niniejszej pracy w miejsce cukrów zastosowano glicerol. W celu zbadania możliwości jego wykorzystania w procesie biosyntezy kwasu cytrynowego posłużono się statystyczną metodą planowania eksperymentów z zastosowaniem centralnego planu kompozycyjnego Boxa-Wilsona [Foryś i Podgórski 2004]. Stosując wodę wodociągową optymalizowano stężenie makroelementów w podłożu, będących źródłem azotu, siarki, magnezu i fosforu. Składy podłoży w poszczególnych wariantach fermentacyjnych prezentuje tabela 1.

Tabela 1. Składy podłoży hodowlanych
Table 1. Composition of the fermentation medium

| Wariant Variant Nr No | Opis wariantów Variants definition | Makroelementy w podłożu [g dm^{-3}] Macroelements in medium [g dm^{-3}] | | | |
|--------------------------------|---------------------------------------|--|--------------------------|---|------|
| | | NH_4HO_3 | KH_2PO_4 | $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | |
| 1 | punkty czynnikowe factorial points | 0.60 | 0.10 | 0.10 | |
| 2 | | 0.60 | 0.10 | 0.50 | |
| 3 | | 0.60 | 0.50 | 0.10 | |
| 4 | | 0.60 | 0.50 | 0.50 | |
| 5 | | 2.00 | 0.10 | 0.10 | |
| 6 | | 2.00 | 0.10 | 0.50 | |
| 7 | | 2.00 | 0.50 | 0.10 | |
| 8 | | 2.00 | 0.50 | 0.50 | |
| 9 | punkty gwiazdne star points | 0.12 | 0.30 | 0.30 | |
| 10 | | 2.48 | 0.30 | 0.30 | |
| 11 | | 1.30 | 0.00 | 0.30 | |
| 12 | | 1.30 | 0.64 | 0.30 | |
| 13 | | 1.30 | 0.30 | 0.00 | |
| 14 | | 1.30 | 0.30 | 0.64 | |
| 15 | | punkty centralne center points | 1.30 | 0.30 | 0.30 |
| 16 | | | 1.30 | 0.30 | 0.30 |

Źródło: badania własne

Wyniki badań przedstawione w tabeli 2 można było opisać następującym równaniem kwadratowym:

$$[CA] = 31,8 - 26,4[N] + 10,5[N]^2 + 145,3[P] - 141,5[P]^2 - 80,3[Mg] + 121,6[Mg]^2 - 20,6[N][P] + 34,6[N][Mg] - 117,2[P][Mg] \quad (1)$$

gdzie nawiasy oznaczają stężenie produktu oraz makroelementów w podłożu w g dm^{-3} .

Równanie (1) stwarza możliwość kalkulacji teoretycznych wartości stężenia produktu, które powinny być uzyskane w poszczególnych wariantach hodowlanych (tab. 2 – kwas cytrynowy, wartości spodziewane).

Tabela 2. Wyniki procesu biosyntezy kwasu cytrynowego dla poszczególnych wariantów hodowlanych

Table 2. Results of citric acid biosynthesis in the fermentation medium variants

| Wariant Variant Variant | Kwas cytrynowy (CA) [g dm ⁻³] Citric acid (CA) [g dm ⁻³] | | | Kwas szczawiowy (OA) [g dm ⁻³] Oxalic acid (OA) [g dm ⁻³] | Homofermentatywność [%]: Chemical selectivity [%]: CA · 100/ (CA + OA) | Biomasa [g dm ⁻³] Biomass [g dm ⁻³] |
|-------------------------------|---|------------------------------|-----------------------|--|--|--|
| Nr No | Otrzy- mane Ob- tained | Spodzie- wane Expected | Różnica Difference | Otrzymane Obtained | | |
| 1 | 38,2 | 25,7 | 12,5 | 0,1 | 99,7 | 9,9 |
| 2 | 41,2 | 26,4 | 14,8 | 0,1 | 99,8 | 9,7 |
| 3 | 48,2 | 40,2 | 8,0 | 0,1 | 99,8 | 9,7 |
| 4 | 28,2 | 22,1 | 6,1 | 0,2 | 99,3 | 8,8 |
| 5 | 30,1 | 28,9 | 1,2 | 0,6 | 98,0 | 9,6 |
| 6 | 48,2 | 48,9 | -0,7 | 0,8 | 98,4 | 11,8 |
| 7 | 24,3 | 31,8 | -7,5 | 0,1 | 99,6 | 13,0 |
| 8 | 27,9 | 33,1 | -5,2 | 0,2 | 99,3 | 12,2 |
| 9 | 15,4 | 36,4 | -21,0 | 0,2 | 98,7 | 2,5 |
| 10 | 59,1 | 48,3 | 10,8 | 0,4 | 99,3 | 11,4 |
| 11 | 0,0 | 15,5 | -15,5 | 0,0 | – | 0,1 |
| 12 | 12,9 | 10,9 | 2,0 | 0,1 | 99,2 | 11,3 |
| 13 | 32,2 | 38,0 | -5,8 | 0,1 | 99,7 | 16,2 |
| 14 | 37,1 | 42,7 | -5,6 | 0,3 | 99,2 | 14,7 |
| 15 | 20,1 | 27,8 | -7,7 | 0,1 | 99,5 | 17,3 |
| 16 | 37,5 | 27,8 | 9,7 | 0,8 | 97,9 | 15,6 |

Źródło: badania własne

Najwyższe stężenie produktu (59,1 g dm⁻³) uzyskano w wariantcie 10 hodowli w podłożu o składzie: NH₄NO₃ 2,48 g dm⁻³, KH₂PO₄ 0,3 g dm⁻³, MgSO₄·7H₂O 0,3 g dm⁻³. Według zastosowanej metody wynik rzeczywisty obarczony był błędem i różnił się od wartości spodziewanej o ponad 10 g dm⁻³. Wartość spodziewana stężenia kwasu cytrynowego dla tego wariantu wyniosła 48,3 g dm⁻³. Wysokie rzeczywiste stężenia produktu (48,2 g dm⁻³) uzyskano również w wariantach: 3 (NH₄NO₃ 0,6 g dm⁻³, KH₂PO₄ 0,5 g dm⁻³, MgSO₄·7H₂O 0,1 g dm⁻³) i 6 (NH₄NO₃ 2,0 g dm⁻³, KH₂PO₄ 0,1 g dm⁻³, MgSO₄·7H₂O 0,5 g dm⁻³). Zgodnie z modelem ilość kwasu cytrynowego w tych wariantach powinna wynieść odpowiednio: 40,2 g (wariant 3) i 48,9 g dm⁻³ (wariant 6). Wynik rzeczywisty procesu w wariantcie nr 6 charakteryzował się ponadto wysoką korelacją z wartością spodziewaną. Różnica była niższa od 1 g dm⁻³ (0,7).

Oprócz wariantów maksymalizujących wydajność produktu interesująca wydaje się być analiza efektów niedoboru określonych makroelementów w podłożu. I tak w wariantcie 11 hodowli, charakteryzującym się brakiem fosforu, zaobserwowano brak rozwoju grzybni i w konsekwencji zerową nadprodukcję kwasu cytrynowego. Wynik ten został przez model statystyczny uznany za błędny. Wartość spodziewana stężenia produktu kształtowała się na poziomie 15,5 g dm⁻³. Jeszcze większym odchyleniem wartości rzeczywistej od spodziewanej, wynoszącym 21 g dm⁻³, charakteryzował się wynik uzyskany w wariantcie 9 hodowli (NH₄NO₃ – 0,12 g dm⁻³, KH₂PO₄ – 0,3 g dm⁻³, MgSO₄·7H₂O – 0,3 g dm⁻³).

Powtórzenie wykonanych eksperymentów (tab. 2) potwierdziło poziom uzyskanych wartości rzeczywistych stężenia produktu, dokumentując, że zwłaszcza obecność

fosforu w podłożu jest czynnikiem krytycznym efektywności przebiegu całego procesu. Stwierdzono również, że zbyt niskie stężenie azotu ma podobne oddziaływanie do limitujących wartości stężenia fosforu. Zastosowanie NH_4NO_3 w ilości $0,12 \text{ g dm}^{-3}$, a więc stężenia na poziomie co najmniej 5-krotnie niższym niż w pozostałych wariantach (wariant 9), wpłynęło na około 4-krotne ograniczenie wzrostu biomasy ($2,5 \text{ g dm}^{-3}$) w stosunku do wariantu optymalnego i w konsekwencji niskie, wynoszące $15,4 \text{ g dm}^{-3}$, wartości stężenia otrzymanego produktu. Oddziaływanie magnezu i siarki na przebieg procesu nie było tak krytyczne. Brak dodatku do podłoża tych makroelementów ograniczał przyrost produktu o około 5 g dm^{-3} (wariant 13 i 14).

Uzyskane w badaniach i przedstawione w tabeli 2 zależności zwracają uwagę na potrzebę dogłębnej analizy wyników i weryfikacji wniosków sugerowanych przez stosowane metody statystyczne. Wynika z nich, że model matematyczny trzeba traktować z rezerwą, jako że stosowanie matematyki do procesów życiowych nie zawsze odwziewiedla i przewiduje zachowanie drobnoustrojów, zwłaszcza w warunkach ekstremalnych. Model statystyczny nie był w stanie uznać za prawidłowy wynik procesu, w którym następuje całkowite załamanie opisywanego równaniem (1) trendu na skutek dramatycznego niedoboru określonego składnika, warunkującego zachowanie podstawowych reakcji metabolicznych hodowanych drobnoustrojów [Foryś i Podgórski 2004].

Prezentowane w tabeli 2 wyniki, oprócz wysokiego poziomu ilości otrzymanego produktu, dokumentują także wysokie wartości współczynników homofermentatywności prowadzonego procesu, które kształtowały się w zakresie 97,9-99,8%. Jedynym produktem ubocznym był kwas szczawiowy tworzący się w ilości nie przekraczającej $0,8 \text{ g dm}^{-3}$. Taka selektywność chemiczna procesu biosyntezy jest znacznie lepsza od poziomów prezentowanych w literaturze przez innych badaczy [Levinson i in. 2007, Rymowicz i in. 2005].

WNIOSKI

Glicerol w procesie biosyntezy kwasu cytrynowego okazał się dobrym źródłem węgla i energii dla badanego szczepu *A. niger* W78B. Hodowle z udziałem tego substratu charakteryzowały się współczynnikiem homofermentatywności na poziomie wyższym od 97%. Jedynym produktem ubocznym procesu był kwas szczawiowy tworzący się w ilości nie wyższej niż $0,8 \text{ g dm}^{-3}$. Najlepsze wyniki bioprodukcji – blisko 60 g dm^{-3} – kwasu cytrynowego uzyskano w wariantach podłoża zawierającym: $2,48 \text{ g dm}^{-3}$ NH_4NO_3 , i po $0,3 \text{ g dm}^{-3}$ KH_2PO_4 i $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Brak fosforu w podłożu był czynnikiem krytycznym wzrostu biomasy, całkowicie eliminując także nadprodukcję kwasu cytrynowego. Istotnym składnikiem podłoża okazał się również azot. Hodowla realizowana w wariantach ze zbyt niskim stężeniem tego makroelementu ($0,12 \text{ g NH}_4\text{NO}_3 \text{ dm}^{-3}$) charakteryzowała się zbyt słabym wzrostem biomasy i w konsekwencji niskimi wartościami stężenia produktu. Obecność soli magnezu i siarki w podłożu nie była krytyczna dla przebiegu procesu. Brak dodatku do podłoża tych makroelementów ograniczał przyrost produktu o około 5 g dm^{-3} .

Przeprowadzone badania pozwalają z optymizmem patrzeć na możliwość zastosowania odpadowego glicerolu z produkcji biodiesla do produkcji kwasów organicznych po przeprowadzeniu odpowiednich prac badawczych z jego użyciem.

PIŚMIENNICTWO

- Directive 2003/30/EC of the European Parliament and of the Council of 8 May 2003 on the promotion of the use of biofuels or other renewable fuels for transport.
- Foryś E., Podgórski W., 2004. Application of replicated 2^3 full factorial central composite circumscribed design of experiment (CCC DOE) for the optimization of oxalate biosynthesis by *Aspergillus niger* W78C. *Acta Scientiarum Polonorum. Biotechnologia*, 3 (1-2), 43-53.
- Imandi S.B., Bandaru V.V.R., Somalanka S.R., Garapati H.R., 2007. Optimisation of medium constituents for the production of citric acid from byproduct glycerol using Doehlert experimental design. *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 1367-1372.
- Lesisz M., Pindel M., 2006. Lotos Biopaliwa – producent FAME w Grupie Lotos. *Przemysł Chemiczny*, 12 (85), 1580-1584.
- Leśniak W., Pietkiewicz J., Podgórski W., 2002. Citric acid fermentation by trace metal resistant mutant of *Aspergillus niger* on starch and dextrose syrups. *Biotechnology Letters*, 24 (13), 1065-1067.
- Levinson W.E., Kurtzman C.P., Kuo T.M., 2007. Characterization of *Yarrowia lipolytica* and related species for citric acid production from glycerol. *Enzyme and Microbial Technology*, 41, 292-295.
- Papanikolaou S., Muniglia L., Chevalot I., Aggelis G., Marc I., 2002. *Yarrowia lipolytica* as a potential producer of citric acid from raw glycerol. *Journal of Applied Microbiology*, 92, 737-744.
- Podgórski W., 2005. Kinetyczny model wzrostu *Aspergillus niger* W78B w okresowym procesie biotransformacji glukozy do kwasu glukonowego. *Inżynieria i Aparatura Chemiczna*, 44 (36), 79-80.
- Rozporządzenie Rady Ministrów z dnia 15 czerwca 2007 r. w sprawie Narodowych Celów Wskaźnikowych na lata 2008-2013. *Dziennik Ustaw 2007 nr 110 poz. 757*.
- Rymowicz W., Juszcak P., Rywińska A., Żarowska B., Musiał I., 2005. Produkcja kwasu cytrynowego z odpadowego glicerolu przez drożdże *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnologia. Monografie*, 2 (2), 46-54.
- Shu P., Johnson M.J., 1948. The interdependence of medium constituents in citric acid production by submerged fermentation. *Journal of Bacteriology*, 56 (5), 577-585.
- Ustawa z dnia 25 sierpnia 2006 r. o biokomponentach i biopaliwach ciekłych. *Dziennik Ustaw 2006 nr 169 poz. 1199*.
- Tęcza W., Kijeński J., Jamróz M.E., 2006. Etery alkilowe gliceryny jako efektywne dodatki do paliw silnikowych. *Przemysł Chemiczny*, 12 (85), 1594-1596.
- Walisiewicz-Niedbalska W., Kijeński J., Lipkowski A.W., Różycki K., 2006. Postępy w rozwoju badań nad otrzymywaniem biodiesla. *Przemysł Chemiczny*, 12 (85), 1586-1591.

INFLUENCE OF MACROELEMENTS ON BIOSYNTHESIS OF CITRIC ACID BY *ASPERGILLUS NIGER* W78B WITH GLYCEROL AS A CARBON SOURCE

Abstract. The aim of the work was to study the possibility of glycerol utilization for citric acid biosynthesis with *Aspergillus niger* W78B strain and determining the optimum macroelements concentration in synthetic medium for this process. The experiments were carried out in shaken flasks on medium containing glycerin as a substrate diluted with tap water and supplemented with macroelements. The maximum product formation occurred in medium variant containing $2,48 \text{ g dm}^{-3} \text{ NH}_4\text{NO}_3$, $0,3 \text{ g dm}^{-3} \text{ KH}_2\text{PO}_4$ and $0,3 \text{ g dm}^{-3}$

MgSO₄·7H₂O. In these conditions 59,1 g dm⁻³ of citric acid was obtained with yield factor ($Y_{P/S}$) equaled 0,39 g g⁻¹ and productivity Q_p 0,99 g dm⁻³ h⁻¹. Bioprocesses were characterized by high chemical selectivity as only accompanying acid was oxalic one, present in trace amount in fermentation broth.

Key words: citric acid, glycerol, biodiesel, *Aspergillus niger*, bioutilization

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 18.12.2007

SPIS TREŚCI CONTENTS

**Agata Czajgucka, Marek Szoltysik, Piotr Juszczyk, Monika Żelazko,
Xymena Polomska, Anna Dąbrowska, Maria Wojtatowicz,
Józefa Chrzanowska**

Wzrost i aktywność hydrolityczna szczepów drożdży
pochodzących z sera w mleku 3
Yeast strains isolated from Rokpol cheese – their growth in milk
and hydrolytic activity against milk components

Ewa Brzezowska, Bogdan Jarosz, Tadeusz Kowalski

Enancjosepcyficzna redukcja ketonów aromatycznych
w kulturze *Pezicula cinnamomea* 15
Enantiospecific reduction of aromatic ketones
in a *Pezicula cinnamomea* culture

**Ewa Walczak, Zbigniew Lazar, Stephan Mauesberger,
Małgorzata Robak**

Ocena wzrostu transformantów drożdży *Yarrowia lipolytica*
w obecności laktozy 21
Evaluation of *Yarrowia lipolytica* transformants growth on lactose

Ewa Foryś, Waldemar Podgórski, Marta Kaczyńska

Wpływ makroelementów na proces biosyntezy kwasu cytrynowego
z glicerolu przez *Aspergillus niger* W78B 31
Influence of macroelements on biosynthesis
of citric acid by *Aspergillus niger* W78B with glycerol
as a carbon source