

# **ACTA SCIENTIARUM POLONORUM**

Czasopismo naukowe założone w 2001 roku przez polskie uczelnie rolnicze

**Biotechnologia**

Biotechnologia

7(1) 2008



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:  
dr Ewa Jaworska  
Janina Szydłowska  
mgr Elżbieta Winiarska-Grabosz

Łamanie  
Halina Sebzda

Projekt okładki  
Daniel Morzyński

ISSN 1644–065X

*Wydanie publikacji dofinansowane ze środków Uniwersytetu Przyrodniczego  
we Wrocławiu*

© Copyright by Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu,  
Wrocław 2008

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

Nakład 200 + 16 egz. Ark. druk. 2,5  
Druk i oprawa: Wydawnictwo Tekst Sp. z o.o.  
ul. Kossaka 72, 85–307 Bydgoszcz

## AKTUALNY STAN WIEDZY Z ZAKRESU GENETYKI WAŻNIEJSZYCH ROŚLIN SADOWNICZYCH I ZASTOSOWANIE JEJ W PRAKTYCE

Kamila Bokszczanin, Andrzej A. Przybyła

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

**Streszczenie.** Ostatnie lata przyniosły bardzo szybki rozwój badań molekularnych roślin sadowniczych. Brzoskwinia, z racji swego stosunkowo małego genomu, samopłodności oraz krótkiego okresu juvenilnego, jest jednym z gatunków najlepiej scharakteryzowanych pod względem genetycznym i tym samym stanowi model dla innych gatunków z rodziny *Rosaceae*. Mapy genomowe, skonstruowane na podstawie markerów molekularnych, stały się w ostatnim dziesięcioleciu jednym z głównych narzędzi badania cech ilościowych. Identyfikacja genów o dużym efekcie fenotypowym stwarza możliwość zwiększenia efektywności hodowli przez bezpośrednią selekcję materiału hodowlanego na podstawie markerów blisko sprzężonych ze zidentyfikowanym QTL. Mapowanie QTL za pomocą markerów molekularnych i ulepszanie cech ilościowych to ważne cele w programach hodowlanych. Dla roślin sadowniczych, szczególnie dla drzew owocowych, opracowanie nowych technik molekularnych, które pozwalają na wczesną selekcję siewek posiadających wartościowe cechy, jest zadaniem priorytetowym, gdyż umożliwiają one selekcję o kilka lat wcześniej niż w przypadku hodowli klasycznej.

**Słowa kluczowe:** rośliny sadownicze, badania molekularne, hodowla

### WSTĘP

W regionach świata o klimacie umiarkowanym rośliny sadownicze z rodziny *Rosaceae* zajmują czołowe miejsce pod względem znaczenia ekonomicznego. Do najważniejszych gatunków uprawnych z rodziny *Rosaceae* należą: jabłoń (*Malus*), grusza (*Pyrus*), pigwa (*Cydonia*), pestkowe z rodzaju *Prunus*, takie jak brzoskwinia, nektaryna, morela, śliwa, migdał, wiśnia i czereśnia [Georgi i in. 2002], malina i jeżyna (*Rubus*) oraz truskawka (*Fragaria*). Większość wymienionych gatunków to wieloletnie rośliny drzewiaste dużych rozmiarów, z długim okresem juvenilnym, co utrudnia badanie ich metodami genetyki klasycznej. Z drugiej strony, rośliny te charakteryzują się długim

---

Adres do korespondencji – Corresponding author: Kamila Bokszczanin, Katedra Sadownictwa, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa, e-mail: [kamilabokszczanin@o2.pl](mailto:kamilabokszczanin@o2.pl)

okresem życia oraz możliwościami efektywnego rozmnażania wegetatywnego. Do gatunków sadowniczych o małym genomie należą: poziomka (*Fragaria vesca*), zawierająca 164 Mbp DNA w genomie haploidalnym [Akiyama i in. 2001], oraz brzoskwinia, zawierająca 290 Mbp DNA w genomie haploidalnym [Baird i in. 1994].

## BADANIA MOLEKULARNE ROŚLIN SADOWNICZYCH

Wielkość genomu organizmów należących do *Eucaryota* jest ogromnie zróżnicowana. Większość DNA w bardzo dużych genomach jest niekodująca, a liczba genów – stosunkowo stała. *Arabidopsis thaliana* (wielkość genomu w stanie haploidalnym 120 Mb) zawiera więcej niż 25 000 genów, natomiast genom ludzki o wielkości 3200 Mb w stanie haploidalnym zawiera 20 000–25 000 genów [International Human Genome Sequencing Consortium 2004]. Dotychczas scharakteryzowano jedynie 31 genów głównych brzoskwini [Monet i in. 1996] i trzy geny migdała [Socias i Company 1998]. Brzoskwinia jest samopłodnym gatunkiem diploidalnym ( $2n=2x=16$ ). Zawartość DNA w jądrze wynosi jedynie  $0.60 \pm 0.03$  pg [Baird i in. 1994] – około dwa razy więcej niż w jądrze *Arabidopsis thaliana*. Większość zachodnich odmian brzoskwini pochodzi od kilku genotypów sprowadzonych w XIX w. do USA z południowych Chin. Z tego powodu odmiany brzoskwini są wysoce wsobne i charakteryzują się bardzo małą zmiennością genetyczną [Scorza i in. 1985]. Te cechy, jak również relatywnie krótki, dwu- lub trzyletni okres juwenilny, sprawiają, że brzoskwinia stała się jednym z gatunków najlepiej scharakteryzowanych pod względem genetycznym i tym samym rośliną modelową dla innych gatunków z rodziny *Rosaceae* [Jung i in. 2008]. Utworzono mapy markerów molekularnych brzoskwini i biblioteki klonów oraz uzyskano interesujące mutanty [Georgi i in. 2002].

Badania genetyczne rośliny modelowej mogą znacznie przyspieszyć zrozumienie genetyki pozostałych gatunków w obrębie tej samej rodziny. Wynika to z faktu, że techniki markerów molekularnych rozwinięte dla brzoskwini mogą z łatwością być stosowane w badaniach innych gatunków z rodziny *Rosaceae*. Doskonałym przykładem wykorzystania strategii porównywania genomów jest użycie danych uzyskanych w wyniku mapowania fizycznego ryżu w badaniach innych gatunków uprawnych w obrębie rodziny *Poaceae* [Delseny i in. 2001].

Dla rodziny *Rosaceae* podjęto dwa główne kierunki badań z wykorzystaniem brzoskwini jako rośliny modelowej:

1. Genomika strukturalna – utworzenie mapy fizycznej genomu brzoskwini i naniesienie na nią markerów genetycznych cech ważnych z ekonomicznego punktu widzenia dla gatunków *Rosaceae*.
2. Genomika funkcjonalna – utworzenie bazy danych Sekcji Znaczników Sekwencji Ulegających Ekspresji (ang. Expressed Sequence Tags, EST) dla tkanek owoców, pędów i nasion wraz z mapami – fizyczną i genetyczną – brzoskwini.

Obecnie genom brzoskwini jest sekwencjonowany w Clemson University, Genomics Institute, USA, natomiast genom jabłoni, jednego z najważniejszych gatunków drzew owocowych klimatu umiarkowanego – w Nowej Zelandii, w The Horticulture and Food Research Institute of New Zealand.

Mapy genomów roślin uprawnych, zbudowane na bazie markerów molekularnych, stały się w ostatnim dziesięcioleciu jednym z głównych narzędzi badania cech ilościowych. W przypadku roślin aktualnie dysponujemy kompletnymi mapami genowymi

rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana*), ryżu (*Oryza sativa*), topoli (*Populus trichocarpa*) i lucerny (*Medicago truncatula*). Mapy genetyczne umożliwiają poznanie struktury i ewolucji genomów. Służą do wykrywania *loci* kontrolujących zmienność cech ilościowych o znaczeniu ekonomicznym oraz związanych ze stresem, wywołanym czynnikami biotycznymi lub abiotycznymi. Analiza tych informacji stwarza możliwość zrozumienia procesów regulacji genów oraz funkcji produktów genowych. Wiedza ta ma również duże znaczenie w hodowli roślin sadowniczych.

Ważnym nurtem współczesnych badań genetycznych jest poszukiwanie związku między markerem a cechą użytkową. Większość cech fenotypowych, istotnych z punktu widzenia ekonomii, jest uwarunkowana wieloma genami z różnych *loci* (poligeny), których efekty sumują się, powodując nasilenie cechy. Identyfikacja genów o dużym efekcie fenotypowym stwarza możliwość zwiększenia efektywności hodowli przez bezpośrednią selekcję materiału hodowlanego na podstawie markerów blisko sprzężonych ze zidentyfikowanym QTL, co nosi nazwę selekcji przy użyciu markerów (MAS – Marker-Assisted Selection). Mapowanie QTL za pomocą markerów molekularnych i ulepszanie cech ilościowych jest ważnym celem w programach hodowli roślin.

Hodowla drzew owocowych jest trudna ze względu na ich długi okres juwenilny i wysoki poziom heterozygotyczności, uniemożliwiający całkowite dziedziczenie wartościowych cech obecnych w jednym z rodziców. Opracowanie nowych technik wczesnej selekcji siewek o wartościowych cechach stało się zadaniem priorytetowym programów hodowlanych. Rozwinięcie markerów molekularnych sprzężonych z ważnymi cechami agronomicznymi umożliwia poprawę i przyspieszenie niektórych etapów selekcji. Wczesna selekcja z wykorzystaniem technik molekularnych pozwala na dokładną ocenę siewek o kilka lat wcześniej niż w przypadku selekcji klasycznej, prowadzonej w warunkach polowych.

Obecnie dysponujemy wieloma mapami genetycznymi brzoskwini i innych gatunków z rodzaju *Prunus*. Najważniejszą dla rodzaju *Prunus* jest mapa uzyskana na podstawie segregacji markerów molekularnych w potomstwie otrzymanym ze skrzyżowania odmiany migdała Texas i odmiany brzoskwini Earlygold [Howad i in. 2005]. Wykorzystywana jest jako mapa referencyjna w mapowaniu innych gatunków tego samego rodzaju, jak również stanowi szkielet mapy fizycznej i mapy transkryptomu brzoskwini [Jung i in. 2008].

Dotychczas u różnych gatunków *Prunus* zmapowano 28 *loci* głównych cech agronomicznych i naniesiono na mapę 'Texas' x 'Earlygold'. U brzoskwini do niektórych z nich należy biały i żółty kolor miąższu owocu (gen *Y* w pierwszej grupie sprzężeń) [Bliss i in. 2002], kolor miąższu wokół pestki (gen *Cs*, 3 grupa sprzężeń) [Yamamoto i in. 2001], cecha odchodzenia pestki od miąższu (gen *F*, 4 grupa sprzężeń) [Dettori i in. 2001, Yamamoto i in. 2001], smak owocu gorzki/słodki (gen *Sk(Sw)*, 5 grupa sprzężeń) [Bliss i in. 2002], owłosienie skórki owocu (gen *G*, 5 grupa sprzężeń) [Bliss i in. 2002, Dirlewanger i in. 1998, Dirlewanger i in. 1999], kształt owocu (spłaszczony, okrągły) (gen *S*, 6 grupa sprzężeń) [Dirlewanger i in. 1998, Dirlewanger i in. 1999], kolor kwiatu (gen *B*, 1 i 3 grupa sprzężeń) [Jáuregui 1998], antocyjanowy lub żółty kolor pylników (gen *Ag*, 3 grupa sprzężeń) [Joobeur 1998], powtórne kwitnienie (gen *DI*, 2 grupa sprzężeń) [Chaparro i in. 1994], pora kwitnienia (gen *Lb*, 4 grupa sprzężeń) [Ballester i in. 2001], męska sterility (gen *Ps*, 6 grupa sprzężeń) [Dirlewanger i in. 1998], wielosłupkowość (gen *Pcp*, 3 grupa sprzężeń) [Bliss i in. 2002], charakter wzrostu – standardowy lub kolumnowy (gen *Br*, 2 grupa sprzężeń) [Scorza i in. 2002], wysokość

drzewa – standardowe lub karłowe (gen *Dw*, 6 grupa sprzężeń), kształt liścia (szeroki lub wąski) (gen *NI*, 6 grupa sprzężeń) [Yamamoto i in. 2001], kształt gruczołków na liściach (nerkowaty/kulisty) (gen *E*, 7 grupa sprzężeń) [Dettori i in. 2001]. Główny gen warunkujący twardość łupiny migdała położony jest w drugiej grupie sprzężeń [Sánchez-Pérez i in. 2007]. Markery położone blisko dwóch genów odporności na mącznika korzeniowego (*Heterodera radicola*) umożliwiają selekcję odpornych podkładek rodzaju *Prunus*. Marker *Ma/ma* wyizolowany ze śliwy Myrobalan, zlokalizowany w siódmej grupie sprzężeń mapy *Prunus*, i marker *Mi/mi* odmiany brzoskwini Nemared, zlokalizowany w drugiej grupie sprzężeń tej samej mapy, posłużyły w selekcji podkładek zawierających oba te markery w potomstwie brzoskwini, migdała i śliwy Myrobalan. Marker blisko sprzężony z genem warunkującym odporność na wirusa wywołującego ospowatość śliwy (szarkę) zlokalizowany jest w pierwszej grupie sprzężeń mapy moreli [Vilanova i in. 2003]. Gen *Sf*, odpowiedzialny za odporność na mączniaka, znajduje się w siódmej grupie sprzężeń. QTL związane z porą kwitnienia, dojrzewaniem i jakością owoców wykryto u brzoskwini i jabłoni. Niektóre QTL związane z dziedziczeniem cech jakościowych owoców i porą kwitnienia zlokalizowane są w regionach genomu, w których wcześniej opisano gen *D/d* odpowiedzialny za niską kwasowość owoców u brzoskwini, gen *Ma/ma* kodujący kwas jabłkowy w owocach jabłoni i gen *Lb/lb* warunkujący porę kwitnienia u migdała. U migdała QTL związany z porą kwitnienia zidentyfikowano w czwartej grupie sprzężeń [Sánchez-Pérez i in. 2007].

Pomimo że brzoskwinia została uznana za roślinę modelową dla gatunków z rodziny *Rosaceae*, w ostatnich latach obserwuje się bardzo intensywny rozwój badań genomu jabłoni. Większość zidentyfikowanych markerów jest sprzężonych z cechami monogenicznymi, tzn. warunkowanymi jednym genem, głównie z odpornością na patogeny i szkodniki. W przypadku jabłoni najliczniejszą grupę stanowią markery *locus* odporności na parcha – *locus Vf*. Hodowla odpornościowa przeciwko parchowi powodowanemu przez patogen *Venturia inaequalis* jest jednym z głównych celów programów hodowlanych jabłoni na świecie. Głównym źródłem odporności jabłoni na parcha jest gen odporności *Vf* z *Malus floribunda* 821. *Locus Vf* został zmapowany genetycznie i fizycznie [Koller i in. 1994, Gianfranceschi i in. 1996, Patocchi i in. 1999a, Tartarini i in. 1999, Xu i in. 2001] oraz wyizolowany [Patocchi i in. 1999b, Xu i Korban 2002a]. W jego regionie zidentyfikowano zestaw kandydujących genów odporności [Vinatzer i in. 2001, Xu i Korban 2002b]. Stwierdzono, że geny te wykazują homologię do rodziny genu odporności *Cf* i dlatego nazwano je *HcrVf* (homologii genów odporności na *Cladosporium fulvum* w regionie *Vf*). Udowodniono, że przynajmniej jeden z tych genów – *Hcrvf2* – jest odpowiedzialny za całkowitą odporność na parcha w jabłoniach transformowanych [Barbieri i in. 2003, Belfanti i in. 2003]. Od czasu, kiedy odporność *Vf* została przełamana przez rasy 6 i 7 *V. inaequalis* [Parisi i in. 1993, Bénaouf i Parisi 2000], hodowcy jabłoni kontynuują poszukiwanie nowych genów odporności na parcha. Znalezione różne źródła tej odporności, głównie w azjatyckich gatunkach *Malus* o małych owocach. Do zidentyfikowanych genów odporności oprócz *Vf* z *M. floribunda* 821 należą: *Vr*, *Vh<sub>2</sub>* i *Vh<sub>4</sub>* (zwany również *Vx* lub *Vr<sub>1</sub>*) z *M. pumila* R12740-7a; *Vbj* z *M. baccata* var. *jackii*; *Vb* z ‘Hansen’s *baccata* #2’; *Va* z odmiany Antonówka PI172623; *Vm* z *M. micromalus* 245-38 i *M. atrosanguinea* 804; *Vg* z ‘Golden Delicious’; *Vr<sub>2</sub>* z GMAL 2473, *Vd* z ‘Durello di Forli’; *Vj* z ‘Jonsib’ i *Vc* z ‘Cathay crab’ [Williams i Dayton 1968, Williams i Kuc 1969, Lespinasse 1989, Hemmat i in. 2002, Durel i in. 2000, Patocchi i in. 2004, Bus i in. 2005, Tartarini i in. 2004, Boudischevskaia

i in. 2004]. Geny *Vbj*, *Vr<sub>2</sub>*, *Vh<sub>2</sub>* i *Vh<sub>4</sub>* zmapowano w trzech różnych regionach drugiej grupy sprzężeń [Gygax i in. 2004, Patocchi i in. 2004, Bus i in. 2005]. Geny *Vf*, *Vb* i *Va* zmapowano w trzech różnych regionach pierwszej grupy sprzężeń [Maliapaard i in. 1998, Hemmat i in. 2003]. Gen *Vg* i *Vd* zmapowano odpowiednio w dwunastej i dziesiątej grupie sprzężeń [Durel i in. 2000, Tartarini i in. 2004]. Stwierdzono, że dziedziczenie odporności na parcha jabłoni z *M. micromalus* 245-38 i *M. atrosanguinea* 804 jest kompleksowe [Shay i Hough 1952, Dayton i Williams 1970]. Nowym zidentyfikowanym genem odporności jest gen nazwany *Vh8* sprzężony z genem *Vh2* (lub będący jego formą alleliczną), wcześniej zidentyfikowany w siewce *M. pumila* o numerze R12740-7a. Gen ten położony jest w dolnym końcu drugiej grupy sprzężeń *Malus* [Bus i in. 2005].

Kilka głównych genów (*Vf*, *Vm*, *Vr*, *Vg*, *Vb*, *Vbj* i *Va*) pochodzących z azjatyckich gatunków *Malus* nadaje jabłoni rasowo-specyficzną odporność na parcha. Wszystkie te odporności zostały przełamane przez patogen. Istnieje zatem potrzeba znalezienia trwałych źródeł odporności i introgresji genów warunkujących tę odporność do nowych odmian. Jedyną możliwością jest wprowadzenie kilku źródeł odporności przez piramidyzację głównych genów lub przez połączenie efektów głównych genów z QTL-ami warunkującymi częściową odporność. Piramidyzacja głównych genów odporności na parcha otrzymywana jest w wyniku krzyżowania dwóch odmian posiadających dwa geny odporności różniące się pod względem funkcji, a następnie selekcji roślin posiadających oba te geny z wykorzystaniem markerów molekularnych. Zidentyfikowano osiem QTL związanych z odpornością liści na parcha i dwa QTL odporności owoców na parcha [Bus i in. 2005].

Inną ważną chorobą jabłoni jest mączniak prawdziwy, wywołany przez *Podosphaera leucotricha*. Do tej pory zidentyfikowano kilka źródeł odporności na ten patogen. Główne geny, którymi są *Pl1* z *Malus robusta* i *Pl2* z *Malus zumi* [Knight i Alston 1968], wykorzystano w programach hodowlanych jabłoni. Do pozostałych genów głównych należą: *Plw* z White Angel – ozdobnej odmiany jabłoni typu „krab” [Gallot i in. 1985], *Pld* z klonu D12 [Visser i Verhaegh 1979] i *Plmis* z ‘Mildew Immune Seedling’ [Dayton 1977]. Ze względu na obecność różnych ras fizjologicznych patogenu rozważa się istnienie rasowo-specyficznych genów odporności. Zatem uzyskanie trwałej odporności na mączniaka wiąże się z piramidyzacją genów głównych. Wczesna ocena podatności na mączniaka w segregującym potomstwie jest bardzo trudna. Dlatego też dużego znaczenia nabiera niezawodny system markerów molekularnych. Stwierdzono, że gen *Pl1* znajduje się w dolnej części dwunastej grupy sprzężeń [Dunemann i in. 2007]. W regionie tym zmapowano również gen główny odporności na mączniaka *Pld* [James i in. 2004], stabilny QTL odporności na mączniaka w klonie jabłoni U211 [Stankiewicz-Kosyl i in. 2005], gen *Vg* nadający odporność na rasę 7 parcha [Durel i in. 2000] oraz główny gen odporności na parcha *Vb* [Erdin i in. 2006]. W wyniku porównania pozycji markerów molekularnych na dwóch mapach genetycznych otrzymanych przez Calenge i in. [2004] stwierdzono, że geny *Pl1* i *Vg* mogą być ze sobą silnie sprzężone. Innymi regionami genomu jabłoni, w których stwierdzono zgrupowanie genów odporności na parcha i na mączniaka, są grupy sprzężeń: 2, 8 i 17. W górnej części drugiej grupy sprzężeń znajdują się główne geny odporności na parcha, takie jak *Vr1* [Boudichevskaja i in. 2006], *Vr2* [Patocchi i in. 2004] i *Vh4* [Bus i in. 2005] razem ze stabilnym QTL odporności na mączniaka [Calenge i Durel 2006] i kilkoma markerami NBS-LRR RGA [Baldi i in. 2004, Calenge i in. 2005].

Zaraza ogniowa, powodowana przez Gram-ujemną bakterię *Erwinia amylovora*, jest jedną z najgroźniejszych chorób roślin należących do rodziny *Rosaceae*. Według Gardener i innych [1980] odporność na zarazę ogniową w przypadku *Malus x robusta* 5 i odmiany Novole *Malus x sublobata* może być warunkowana genami dominującymi. Ostatnie badania molekularne potwierdziły monogeniczne dziedziczenie odporności na zarazę ogniową u *Malus x robusta* 5. Wykazano, że główny QTL znajduje się w trzeciej grupie sprzężeń [Peil i in. 2007]. Korban i inni [1988] udowodnili poligeniczne dziedziczenie odporności na zarazę ogniową wśród analizowanego potomstwa otrzymanego przez skrzyżowanie odmiany jabłoni odpornej i podatnej na parcha. W wyniku ostatnich badań molekularnych zidentyfikowano główny QTL odporności na zarazę ogniową u jabłoni w siódmej grupie sprzężeń mapy odmiany Fiesta oraz kilka mniejszych QTL w grupach sprzężeń 3, 12 i 13 w potomstwie 'Fiesta' x 'Discovery' i 'Prima' x 'Fiesta' [Calenge i in. 2005]. Opisane dwa typy dziedziczenia odporności na zarazę ogniową u jabłoni: monogeniczny i poligeniczny tłumaczy się prawdopodobieństwem występowania różnych mechanizmów reakcji odporności u jabłoni lub możliwością istnienia w obrębie *locus* trzeciej grupy sprzężeń różnych alleli warunkujących różny stopień odporności [Peil i in. 2007].

Po raz pierwszy odporność na mszycę jabłoniową (*Dysaphis devector* Wlk.) stwierdzono w przypadku odmiany jabłoni Pomarańczowa Koksa [Dicker 1954]. Alston i Briggs [1968] wykazali, że odporność na ten patogen u odmian: Pomarańczowa Koksa, James Grieve, Northern Spy i Ashmead's Kernel kontrolowana jest przez pojedynczy 'gen' lub *locus*. Gen pochodzący z odmiany Pomarańczowa Koksa odpowiedzialny za odporność na biotypy patogenu 1 i 2 oznaczono symbolem *Sd-1*, natomiast gen pochodzący z Northern Spy i odpowiedzialny za odporność jedynie na biotyp 1 nazwano *Sd-2*. Gen *Sd-3* z *Malus x robusta* i *M. zumi* warunkuje odporność na biotyp 3 [Alston i Briggs 1977]. Gen *Sd-1* zlokalizowano w górnej części siódmej grupy sprzężeń *Malus* [Cevik i King 2002]. Stwierdzono, że geny *Sd-1* i *Sd-2* są ze sobą sprzężone i tym samym mogą stanowić różne allele lub komponenty jednego kompleksowego *locus* [Cevik i King 2002].

W celu podniesienia odporności podkładek jabłoni na bawełnicę korówkę w programach hodowlanych wykorzystuje się geny główne – *Er1* z odmiany Northern Spy [Crane i in. 1936, Knight i in. 1962] i gen *Er2* z odmiany Robusta 5 [King i in. 1991, Alston i in. 2000]. Rezultatem ostatnich badań jest identyfikacja genu głównego *Er3* w odmianie Atoea 1 *Malus sieboldii* [Bus i in. 2002]. Ustalono, że markery molekularne sprzężone z genami *Er1* i *Er3* znajdują się w ósmej grupie sprzężeń jabłoni. Gen *Er2* zlokalizowano w siedemnastej grupie sprzężeń 'Robusta 5' [Bus i in. 2007]. Chociaż geny *Er1* i *Er3* znajdują się w tym samym regionie genomu, to fakt, że jedynie odporność warunkowana genem *Er1* została przełamana przez jeden z biotypów bawełnicy koróWKi [Sandanayaka i in. 2003], wskazuje, że są to geny różne, ale silnie sprzężone lub też allele o różnej funkcji w obrębie tego samego *locus*. W tym samym regionie ósmej grupy sprzężeń oprócz już wspomnianych genów *Er1* i *Er3* zmapowano *locus* odporności na mączniaka w odmianie Discovery [Calenge i in. 2005] oraz główny gen odporności na mączniaka prawdziwego jabłoni *Pl-w* [Evans i James 2003]. W ósmej grupie sprzężeń znajdują się również dalej położone od genów *Er*: gen *Vfh* odpowiedzialny za odporność na parcha i gen *Dp-fl* odpowiedzialny za odporność na mszycę jabłoniową [Durel 2006]. Z uwagi na występowanie tak wielu genów odporności i ich grupowanie się na jednym chromosomie uzasadnione jest kompletne zsekwencjonowanie



chromosomu 8 i sklonowanie położonych na nim pięciu genów odporności [Bus i in. 2007].

Kolumnowy pokrój drzewa charakteryzujący się osłabionym wzrostem, nielicznymi rozgałęzieniami bocznymi, dużą liczbą krótkopędów i skróconymi międzywęzłami jest jedną z ważniejszych gospodarczo cech roślin drzewiastych. Drzewa w formie wąskiego wrzeciona nie są już sadzone w sadach towarowych. Ta forma korony jest jednak polecana dla drzew zapylaczy sadzonych między drzewami odmian produkcyjnych. Gen *Co* z odmiany McIntosh Wjick [Lapins i Watkins 1973], decydujący o kolumnowym pokroju drzewa, zmapowano w dziesiątej grupie sprzężeń jabłoni [Fernández-Fernández i in. 2008].

Cecha czerwonego zabarwienia tkanek rośliny, wynikająca z systemicznej obecności antocyjanin, pochodzi z gatunku *Malus pumila* var. *niedzwetzkyana* [Lewis i Crane 1938] i została przypisana genowi *Rt* [Alston i Watkins 1975]. Gen ten zlokalizowano w dziewiątej grupie sprzężeń na mapie 'Fiesta' (*M. pumila*) x 'Totem' (międzygatunkowy mieszańiec *Malus*). Genotypy będące homozygotą recesywną pod względem genu *Rt* posiadają zielono wybarwione tkanki, natomiast tkanki heterozygot wybarwiają się na czerwono [Fernández-Fernández i in. 2008].

Zidentyfikowano kilka markerów umożliwiających selekcję siewek o określonej jakości owoców, np. o owocach kwaśnych (gen *Ma*) [Visser i Verhaegh 1978] i o czerwonym lub żółtym kolorze skórki (gen *Rf*) [Cheng i in. 1996, Melounová i in. 2005]. Gen *Ma* zmapowano w dolnej części szesnastej grupy sprzężeń, zaś gen *Rf* w dziewiątej grupie sprzężeń [Maliepaard i in. 1998]. Badania przyczyniające się do zrozumienia kompleksowej genetycznej kontroli dojrzewania owoców mają duże znaczenie w przechowalnictwie. Gen receptora etylenu *ETRI* kontrolujący dojrzewanie owoców zmapowano w piętnastej grupie sprzężeń [Fernández-Fernández i in. 2008]. Inne dwa geny, *ACO1* i *ACSI*, związane z metabolizmem tego hormonu, zmapowano w 10 i 15 grupie sprzężeń [Costa i in. 2005].

W badaniach nad dziedziczeniem barwy miąższu jabłek Alston i Watkins [1975] obserwowali dominację żółto-kremowego wybarwienia nad zielonym. Fernández-Fernández i in. [2008] zmapowali gen *Gfc* w dziewiątej grupie sprzężeń, zakładając, że zielone wybarwienie miąższu jest cechą dominującą.

Aktualne prace hodowlane, prowadzone z wykorzystaniem technik molekularnych, mają na celu uzyskanie odmian jabłoni o owocach z dużą zawartością antocyjanów warunkujących czerwone zabarwienie miąższu aż do gniazda nasiennego. Zidentyfikowano locus *Rni*, głównego determinanta czerwonego zabarwienia liści i czerwonego koloru miąższu jabłek. Wykazano, że regulatorowy gen kandydujący MdMYB10, odpowiedzialny za biosyntezę antocyjanów, kosegreguje z locus *Rni* i znajduje się w dziewiątej grupie sprzężeń genomu jabłoni [Chatne i in. 2007].

Jedną z cech agronomicznych ostatnio badanych z wykorzystaniem metod molekularnych w programach hodowlanych migdała, moreli, czereśni, gruszy i jabłoni jest samoniezgodność gametofityczna. Zjawisko to warunkowane jest wysoce polimorficznym locus *S* z serią alleli wielokrotnych. Znajomość alleli *S* jest niezbędna przy projektowaniu sadów i doborze odmian wzajemnie zapylających się, jak również przy wyborze odpowiednich strategii hodowlanych w celu uniknięcia krzyżowań sterylnych. Ocena fenotypowa krzyżowalności odmian jest utrudniona, ponieważ mają na nią wpływ zarówno czynniki środowiskowe, jak i fizjologiczne. U *Prunus* locus *S* zmapowano w dolnej części szóstej grupy sprzężeń. Locus *S* u jabłoni i gruszy, które należą do pod-

rodziny *Pomoideae*, jest ewolucyjnie konserwowany i znajduje się w górnej części grupy siedemnastej [Maliepaard i in. 1998, Yamamoto i in. 2007]. Jednym z ostatnio zidentyfikowanych alleli S jest allel oznaczony jako S-kb, obecny w polskiej odmianie Odra, o numerze akcesyjnym EU178108. W wyniku porównania jego sekwencji z innymi allelami genu *S* stwierdzono wysokie podobieństwo allela S-kb do allela jarząbu (*Sorbus aucuparia*) [Bokszczanin i in. 2007]. Wyniki tych badań pozwolą na analizę filogenetyczną wspomnianych gatunków.

## PIŚMIENNICTWO

- Akiyama Y., Yamamoto Y., Ohmido N., Oshima M., Fukui K., 2001. Estimation of the nuclear DNA content of strawberries (*Fragaria* spp.) compared with *Arabidopsis thaliana* by using Dual-step Flow Cytometry, *Cytologia* 66, 431–436.
- Alston F.H., Briggs J.B., 1968. Resistance to *Sappaphis devectora* (Wlk) in apple, *Euphytica*, 17, 468–472.
- Alston F.H., Briggs J.B., 1977. Resistance genes in apple and biotypes of *Dysaphis devectora*, *Ann Appl. Biol.*, 87, 75–81.
- Alston F.H., Watkins R., 1975. Apple breeding at East Malling. Proceedings Eucarpia Symposium on Tree Fruit Breeding 1973, Canterbury, 14–29.
- Alston F.H., Phillips K.L., Evans K.M., 2000. A *Malus* gene list. *Acta Hort.* 538, 561–570.
- Baird W.V., Estager A.S., Wells J., 1994. Estimating nuclear DNA content in peach and related diploid species using laser flow cytometry and DNA hybridization, *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 119, 1312–1316.
- Baldi P., Patocchi A., Zini E., Toller C., Velasco R., 2004. Cloning and linkage mapping of resistance gene homologues in apple, *Theor. Appl. Genet.*, 109, 231–239.
- Barbieri M., Belfanti E., Tartarini S., Vinatzer B.A., Sansavini S., Dilworth E., Gianfranceschi L., Hermann D., Patocchi A., Gessler C., 2003. Progress of the map based cloning of the *Vf*-resistance gene and functional verification: preliminary results from expression studies in transformed apple. *Hort. Sci.*, 38, 1–3.
- Ballester J., Socias I Company R., Arus P., De Vicente M.C., 2001. Genetic mapping of a major gene delaying blooming time in almond, *Plant Breed*, 120 (3), 268–270.
- Belfanti E., Silfverberg-Dilworth E., Tartarini S., Patocchi A., Barbieri M., Zhu J., Vinatzer B.A., Gianfranceschi L., Gessler C., Sansavini S., 2003. The *HcrVf2* gene from a wild apple confers scab resistance to a transgenic cultivated variety, *PNAS*, 101, 886–890.
- Bénaouf G., Parisi L., 2000. Genetics of host-pathogen relationships between *Venturia inaequalis* race 6 and race 7 and *Malus* species, *Phytopathology*, 90, 236–242.
- Bliss F.A., Arulsekar S., Foolad M.R., Becerra V., Gillen A.M., Warburton M.L., Dandekar A.M., Kocsisne G.M., Mydin K.K., 2002. An expanded genetic linkage map of *Prunus* based on an interspecific cross between almond and peach, *Genome*, 45, 520–529.
- Boudichevskaia A., Flachowsky H., Fischer C., Hanke V., Dunemann, F., 2004. Development of molecular markers for Vr1, a scab resistance factor from R12740-7A apple. *Acta Hort.*, 663, 171–175.
- Boudichevskaia A., Flachowsky H., Peil A., Fischer C., Dunemann F., 2006. Development of a multiallelic SCAR marker for the scab resistance gene *Vr1/Vh4/Vx* from R12740-7A apple and its utility for molecular breeding, *Tree Genet. Genomes*, 2, 186–195.
- Bokszczanin K., Palucha A., Przybyła A., 2007. Identification of S-alleles in several apple cultivars, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, accession EU178108.

- Bus V., White A., Gardiner S., Weskett R., Ranatunga C., Samy A., Cook M., Rikkerink E., 2002. An update on apple scab resistance breeding in New Zealand, *Acta Hort.*, 595, 43–47.
- Bus V.G.M., Rikkerink E.H.A., van de Weg W.E., Rusholme R.L., Gardiner S.E., Bassett H.C.M., Kodde L.P., Parisi L., Laurens F.N.D., Meulenbroek E.J., Plummer K.M., 2005. The *Vh2* and *Vh4* scab resistance genes in two differential hosts derived from Russian apple R12740-7A map to the same linkage group of apple, *Mol. Breed.*, 15, 103–116.
- Bus V.G.M., Chagné D., Bassett H.C.M., Bowatte D., Calenge F., Celton J.-M., Durel C.-E., Malone M. T., Patocchi A., Ranatunga A.C., Rikkerink E.H.A., Tustin D.S., Zhou J., Gardiner S.E., 2007. Genome mapping of three major resistance genes to woolly apple aphid (*Eriosoma lanigerum* Hausm.), *Tree Genet. Genomes* DOI: 10.1007/s11295-007-0103-3.
- Calenge F., Durel C.E., 2006. Both stable and unstable QTLs for resistance to powdery mildew are detected in apple after four years of field assessments, *Mol. Breed.*, 17, 329–339.
- Calenge F., Van der Linden C.G., van de Weg E., Schouten H.-J., Van Arkel G., Denance C., Durel C. E., 2005. Resistance gene analogues identified through NBS-profiling method map close to major genes and QTL for disease resistance in apple, *Theor. Appl. Genet.*, 110, 660–668.
- Calenge F., Faure A., Goerre M., Gebhardt C., van de Weg W.E., Parisi L., Durel C.E., 2004. Quantitative trait loci (QTL) analysis reveals both broad-spectrum and isolate-specific QTL for scab resistance in an apple progeny challenged with eight isolates of *Venturia inaequalis*, *Phytopathology*, 94, 370–379.
- Cevik V., King G.J., 2000. Molecular genetic analysis of the *Sd1* aphid resistance locus in *Malus*, *Acta Hort.*, 538, 553–559.
- Cevik V., King G.J., 2002. High-resolution genetic analysis of the *Sd-1* aphid resistance locus in *Malus* spp, *Theor. Appl. Genet.*, 105, 346–354.
- Chaparro J.X., Werner D.J., O'Malley D., Sederoff R.R., 1994. Targeted mapping and linkage analysis of morphological, isozyme, and RAPD markers in peach, *Theor. Appl. Genet.*, 87, 805–815.
- Chatne D., Carlisle C.M., Blond C., Volz R.K., Whitworth C.J., Oraguzie N.C., Crowhurst R.N., Allan A.C., Espley R.V., Hellens R.P., Gardiner S.E., 2007. Mapping a candidate gene (*Md-MYB10*) for red flesh and foliage colour in apple, *BMC Genomics*, 8 (1), 212.
- Cheng F.S., Weeden N.F., Brown S.K., 1996. Identification of co-dominant RAPD markers tightly linked to fruit skin color in apple, *Theor. Appl. Genet.*, 93, 222–227.
- Crane M.B., Greenslade R.M., Massee A.M., Tydeman H.M., 1936. Studies on the resistance and immunity of apples to the woolly apple aphid, *Eriosoma lanigerum* (Hausm.), *J. Pomol. Hort. Sci.*, 14, 137–163.
- Costa F., Stella S., Van deWeg W.E., Guerra W., Cecchinell M., Dallavia J., Koller B., Sansavini S., 2005. Role of the genes *Md-ACO1* and *Md-ACSI* in ethylene production and shelf life of apple (*Malus x domestica* Borkh), *Euphytica*, 141, 181–190.
- Dayton D.F. 1977. Genetic immunity to apple mildew incited by *Podosphaera leucotricha*. *Hort. Sci.*, 12, 225–226.
- Dayton D.F., Williams E.B. 1970. Additional allelic genes in *Malus* for scab resistance of two reaction types, *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, 95, 735–773.
- Delseny M., Salses J., Cooke R., Sallaud C., Regad F., Lagoda P., Guideroni E., Ventelon M., Brugidou C., Ghesquiere A., 2001. Rice genomics: present and future, *Plant Physiol. Biochem.*, 39, 323–334.
- Dettori M. T., Quarta R., Verde I., 2001. A peach linkage map integration RFLPs, SSRs, RAPDs, and morphological markers, *Genome*, 44 (5), 783–790.
- Dicker G.H.L 1954. The apple, pear and quince aphids, *Rep. E. Malling Res. Stn.*, 1953, 213–217.

- Dirlewanger E., Pronier V., Parvery C., Rothan C., Guye A., Monet R., 1998. Genetic linkage map of peach [*Prunus persica* (L.) Batsch] using morphological and molecular markers. *Theor. Appl. Genet.*, 97 (5/6), 888–895.
- Dirlewanger E., Moing A., Rothan C., Svanella L., Pronier V., Guye A., Plomion C., Monet R., 1999. Mapping QTLs controlling fruit quality in peach (*Prunus persica* (L.) Batsch). *Theor. Appl. Genet.*, 98 (1), 18–31.
- Dunemann F., Peil A., Urbanietz A., Garcia-Libreros T., 2007. Mapping of the apple powdery mildew resistance gene *Pl1* and its genetic association with an NBS-LRR candidate resistance gene. *Plant Breed.*, 126, 476–481.
- Durel C.-E., 2006. Genetic localization of new major and minor pest and disease factors in the apple genome. *Rosaceae Genomics Conference 3*, Napier, New Zealand.
- Durel C.E., Van de Weg W.E., Venisse J.S., Parisi L., 2000. Localisation of a major gene for apple scab resistance on the European genetic map of the Prima × Fiesta cross. [In:] *Integrated Control of Pome Fruit Diseases*. IOBC/WPRS Bull., 23, 245–246.
- Erdin N., Tartarini S., Broggin G.A.L., Gennari F., Sansavini S., Gessler C., Patocchi A., 2006. Mapping of the apple scab resistance gene *Vb.*, *Genome*, 49, 1238–1245.
- Evans K.M., James C.M., 2003. Identification of SCAR markers linked to *Pl-w* mildew resistance in apple. *Theor. Appl. Genet.*, 106, 1178–1183.
- Fernández-Fernández F., Evans K.M., Clarke J.B., Govan C.L., James C.M., Marić S., Tobutt K.R., 2008. Development of an STS map of an interspecific progeny of *Malus*. *Tree Genet. Genomes* DOI 10.1007/s11295-007-0124-y.
- Gallot J. C., Lamb R.C., Aldwinckle H.S., 1985. Resistance to powdery mildew from some small-fruited *Malus* cultivars. *Hort. Sci.*, 20, 1085–1087.
- Gardener R.G., Cummins J.N., Aldwinckle H.S., 1980. Inheritance of fire blight resistance in *Malus* in relation to rootstock breeding. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, 105, 912–916.
- Georgi L., Wang Y., Yvergnaux D., Ormsbee T., Inigo M., Reighard G., Abbott G., 2002. Construction of a BAC library and its application to the identification of simple sequence repeats in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]. *Theor. Appl. Genet.*, 105, 1151–1158.
- Gianfranceschi L., Koller B., Seglias N., Kellerhals M., Gessler C., 1996. Molecular selection in apple for resistance to scab caused by *Venturia inaequalis*. *Theor. Appl. Genet.*, 93, 199–204.
- Gygax M., Gianfranceschi L., Liebhard R., Kellerhals M., Gessler C., Patocchi A., 2004. Molecular markers linked to the apple scab resistance gene *Vbj* derived from *Malus baccata jackii*. *Theor. Appl. Genet.*, 109, 1702–1709.
- Hemmat M., Brown S.K., Weeden N.F., 2002. Tagging and mapping scab resistance genes from R12740-7A apple. *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, 127, 365–370.
- Hemmat M., Brown S.K., Aldwinckle H.S., Weeden N.F., 2003. Identification and mapping of markers for resistance to apple scab from ‘Antonovka’ and ‘Hansen’s baccata #2’. *Acta Hort.*, 622, 153–161.
- Howad W., Yamamoto T., Dirlewanger E., Testolin R., Cosson P., Cipriani G., Monforte A.J., Georgi L., Abbott A.G., Arús., 2005. Mapping with a few plants: using selective mapping for microsatellite saturation of the *Prunus* reference map. *Genetics*, 171, 1305–1309.
- International Human Genome Sequencing Consortium., 2004. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*, 431 (7011), 931–945.
- James C.M., Clarke J.B., Evans K.M., 2004. Identification of molecular markers linked to the mildew resistance gene *Pl-d* in apple. *Theor. Appl. Genet.*, 110, 175–181.
- Jáuregui B. 1998. Localización de marcadores moleculares ligados a caracteres agronomicos en un cruzamiento interespecifico almendro×melocotonero. PhD Thesis. University of Barcelona, Spain.
- Joobeur T., 1998. Construcción de una mapa de marcadores moleculares y análisis genético de caracteres agronomicos en *Prunus*. PhD Thesis. Universidad de Lleida, Spain.

- Jung S., Staton M., Lee T., Blenda A., Svancara R., Abbott A., Main D., 2008. GDR (Genome Database for *Rosaceae*): integrated web-database for *Rosaceae* genomics and genetics data, *Nucleic Acids Research* 36, DOI:10.1093/nar/gkm803.
- King G.J., Alston F.H., Battle I., Chevreau E., Gessler C., Janse J., Lindhout P., Manganaris A.G., Sansavini S., Schmidt H., Tobutt K.R., 1991. The 'European Apple Genome Mapping Project'—developing a strategy for mapping genes coding for agronomic characters in tree species, *Euphytica*, 56, 89–94.
- Knight R.L., Alston F.H., 1968. Sources of field immunity to mildew (*Podosphaera leucotricha*) in apple, *Can. J. Genet., Cytol.* 10, 294–298.
- Knight R.L., Briggs J.B., Masee A.M., Tydeman H.N., 1962. The inheritance of resistance to woolly aphid, *Eriosoma lanigerum* (Hausm.), in the apple, *J. Hort. Sci.*, 37, 207–218.
- Koller B., Gianfranceschi L., Seglias N., McDermott, Gessler C., 1994. DNA-markers linked to the *Malus floribunda* 821 scab resistance, *Plant. Mol. Biol.*, 26, 597–602.
- Korban S.S., Ries S.M., Klopmeier M.J., Morissey J.F., Hattermann D.R., 1988. Genotypic responses of scab-resistant apple cultivar/selections to two strains of *Erwinia amylovora* and the inheritance of resistance to fire blight, *Ann. Appl. Biol.*, 113, 101–105.
- Lapins K.O., Watkins R., 1973. Genetics of compact growth. [In:] Annual Report of the East Malling Research Station for 1972, East Malling Research Station, UK, 136.
- Lespinnasse Y., 1989. Breeding pome fruits with stable resistance to diseases. 3. Genes, resistance mechanisms, present work, and prospects. Colloque OILB Integrated Control of Pome Fruit Diseases. Vol. II, Gessler, Butt, et Koller., 100–115.
- Lewis D., Crane M.B., 1938. Genetical studies in apples II, *J. Genet.*, 37, 119–128.
- Maliepaard C., Alston F.H., van Arkel G., Brown L.M., Chevreau E., Dunemann F., Evans K.M., Gardiner S., Guilford P., van Heusden A.W., Janse J., Laurens F., Lynn J.R., Manganaris A.G., den Nijs A.M.P., Periam N., Rikkerink E., Roche P., Ryder C., Sansavini S., Schmidt H., Tartarini S., Verhaegh J.J., Vrielink-van Ginkel M., King G.J., 1998. Aligning male and female linkage maps of apple (*Malus pumila* Mill.) using multi-allelic markers, *Theor. Appl. Genet.*, 97, 60–73.
- Melounová M., Vejl P., Sedlák P., Blažek J., Zoufalá J., Milec Z., Blažková H., 2005. Alleles controlling apple skin colour and incompatibility in new Czech apple varieties with different degrees of resistance against *Venturia inaequalis* CKE, *Plant Soil Environ*, 51 (2), 65–73.
- Monet R., Guye A., Roy M., Dachary N., 1996. Peach Mendelian genetics: a short review and new results, *Agronomie*, 16, 321–329.
- Parisi L., Lespinasse Y., Guillaumes J., Kruger J., 1993. A new race of *Venturia inaequalis* virulent to apples with resistance due to the *Vf* gene, *Phytopathology*, 83, 533–537.
- Patocchi A., Gianfranceschi L., Gessler C., 1999a. Towards the map-based cloning of *Vf*: fine and physical mapping of the *Vf* region, *Theor. Appl. Genet.*, 99, 1012–1017.
- Patocchi A., Bigler B., Koller B., Kellerhals M., Gessler C., 2004. *Vr<sub>2</sub>*: a new apple scab resistance gene, *Theor. Appl. Genet.*, 109, 1087–1092.
- Patocchi A., Vinatzer A.B., Gianfranceschi L., Tartarini S., Zhang H.B., Sansavini S., Gessler C., 1999b. Construction of a 550 kb BAC contig spanning the genomic region containing the apple resistance gene *Vf*, *Mol. Gen. Genet.*, 262, 884–891.
- Peil A., Garcia-Libreros T., Richter K., Trognitz F.C., Trognitz B., Hanke M.-V., Flachovsky H., 2007. Strong evidence for a fire blight resistance gene of *Malus robusta* located on linkage 3, *Plant Breed.*, 126, 470–475.
- Sandanayaka W.R.M., Bus V.G.M., Connolly P., Newcomb R., 2003. Characteristics associated with woolly apple aphid *Eriosoma lanigerum*, resistance of three apple rootstocks. *Entomol. Exp. Appl.*, 109, 63–72.

- Sánchez-Pérez R., Howard W., Dicenta F., Arús P., Martínez-Gómez P., 2007. Mapping major genes and quantitative trait loci controlling agronomic traits in almond, *Plant Breed.*, 126 (3), 310–318.
- Scorza R., Mehlenbacher A., Lightner G.W., 1985. Inbreeding and coancestry of freestone peach cultivars of the eastern United States and implications for peach germplasm improvement, *J. Am. Soc. Hort. Sci.*, 110, 547–552.
- Scorza R., Melnicenco L., Dang P., Abbott A.G., 2002. Testing a microsatellite marker for selection of columnar growth habit in peach (*Prunus persica* (L.) Batsch), *Acta Hort.*, 592, 285–289.
- Shay J.R., Hough L.F., 1952. Evaluation of apple scab resistance in selections in *Malus*. [In:] Blažek J., Kloutvorová J. 1999. Segregation of seedlings with resistance to scab in selected progenies of apple, *Zahradnictví – Hort. Sci.*, 26, 2, 33–40.
- Socias i Company R., 1998. Fruit tree genetics at a turning point: the almond example, *Theor. Appl. Genet.*, 96, 588–601.
- Stankiewicz-Kosyl M., Pitera E., Gawroński S.W., 2005. Mapping QTL involved in powdery mildew resistance of the apple clone U 211, *Plant Breed.*, 124, 63–66.
- Tartarini S., Gianfranceschi L., Sansavini S., Gessler C., 1999. Development of reliable PCR markers for the selection of the *Vf* gene conferring scab resistance in apple, *Plant Breed.*, 118, 183–186.
- Tartarini S., Gennari F., Pratesi D., Palazzetti C., Sansavini S., Parisi L., Fouillet A., Fouillet V., Durel C.E., 2004. Characterization and genetic mapping of a major scab resistance gene from the old Italian cultivar 'Durello di Forlì', *Acta Hort.*, 663, 129–134.
- Tian Y.-K., Wang C.-H., Zhang J.-S., James C., Dai H.-Y., 2005. Mapping *Co*, a gene controlling the columnar phenotype of apple, with molecular markers, *Euphytica*, 145, 181–188.
- Vilanova S., Romero C., Abbott A.G., Llácer G., Badenes M.L., 2003. An apricot (*Prunus armeniaca* L.) F2 progeny linkage map based on SSR and AFLP markers, mapping plum pox virus resistance and self-incompatibility traits, *Theor. Appl. Genet.*, 107, 239–247.
- Vinatzer B.A., Patocchi A., Gianfranceschi L., Tartarini S., Zhang H.-B., Gessler C., Sansavini S., 2001. Apple (*Malus* sp.) contains receptor-like genes homologous to the *Cf* resistance gene family of tomato with a cluster of such genes co-segregating with *Vf* apple scab resistance, *MPMI* 14, 508–515.
- Visser T., Verhaegh J.J., 1979. Resistance to powdery mildew (*Podosphaera leucotricha*) of apple seedlings growing under glasshouse and nursery conditions, *Proc. Eucarpia Meet. of Fruit Tree Breeding*, Angers, 1979, 111–120.
- Visser T., Verhaegh J.J., 1978. Inheritance and selection of some fruit characters of apple. I. Inheritance of low and high acidity, *Euphytica*, 27 (3), 753–760.
- Williams E.B., Dayton D.F., 1968. Four additional sources of the *Vf* locus for *Malus* scab resistance, *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.*, 92, 95–98.
- Williams E.B., Kuc J., 1969. Resistance in *Malus* to *Venturia inaequalis*, *Ann. Rev. Phytopathol.*, 7, 223–246.
- Xu M.L., Korban S.S., 2002a. AFLP-derived SCARs facilitate construction of a 1.1 Mb sequence-ready map of a region that spans the *Vf* locus in the apple genome, *Plant Mol. Biol.*, 50, 803–818.
- Xu M.L., Korban S.S., 2002b. A cluster of four receptor-like genes resides in the *Vf* locus that confers resistance to apple scab disease, *Genetics*, 162, 1995–2006.
- Xu M.L., Huaracha E., Korban S.S., 2001. Development of sequence-characterized amplified regions (SCARs) from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers tightly linked to the *Vf* gene in apple, *Genome*, 44, 63–70.

- Yamamoto T., Kimura T., Terakami S., Nishitani C. Sawamura Y., Saito T., Kotobuki K. Hayashi T., 2007. Integrated reference genetic linkage map of pear based on SSR and AFLP markers, *Breed. Sci.*, 57, 321–329.
- Yamamoto T., Shimada T., Imai T., Yaegaki H., Haji T., Matsuta N., Yamaguchi M., Hayashi T., 2001. Characterization of morphological traits based on a genetic linkage map in peach, *Breed. Sci.*, 51, 271–278.

### **THE PRESENT STAGE OF KNOWLEDGE ON GENETICS OF MORE IMPORTANT FRUIT PLANTS AND APPLICATION OF THIS KNOWLEDGE IN THE PRACTICE**

**Abstract.** Last years brought very fast development of molecular studies in fruit plants. Peach, because of its relatively small genome became a model plant for such studies. Genome maps, constructed on the base of molecular markers became in the last decade one of the main tools for studies of quantitative traits. Mapping of QTLs with molecular markers and improvement of quantitative traits is very important goal in plant breeding programmes. For fruit plants, especially for fruit trees elaboration of new, molecular techniques of early selection of seedlings that possess valuable traits became priority task of breeding programmes. Such techniques enable selection several years earlier than in the case of classical selection in the field.

**Key words:** fruit plants, molecular studies, breeding

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 31.03.2008

Do cytowania – For citation: Bokszczanin K., Przybyła A.A., 2008. Aktualny stan wiedzy z zakresu genetyki ważniejszych roślin sadowniczych i zastosowanie jej w praktyce. *Acta Sci. Pol. Biotechnol.* 7(1), 3-15.

## BIOSYNTETA WYBRANYCH ENZYMÓW LITYCZNYCH W PODŁOŻU ZAWIERAJĄCYM ODPADOWE KACZANY KUKURYDZIANE PRZEZ GRZYBY STRZĘPKOWE Z RODZAJU *TRICHODERMA*

Anna Kancelista, Danuta Witkowska

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

**Streszczenie.** W pracy badano dwa szczepy grzybów strzępkowych z rodzaju *Trichoderma* w kierunku syntezy zewnątrzkomórkowych enzymów celulo- i ksylanolitycznych. W tym celu prowadzono hodowle wstrząsane z udziałem badanych mikroorganizmów w podłożu Mandelsa-Sternburga, gdzie głównym źródłem węgla były odpadowe kaczany kukurydziane. Hodowle prowadzono przez 14 dni, a w otrzymanych płynach pohodowlanych mierzono aktywność FP-az, CMC-az i ksylanaz oraz poziom pH. Aktywność badanych hydrolaz była uzależniona od ilości glukozy stanowiącej dodatkowe źródło węgla oraz od stężenia jonów wodorowych, a maksimum ich syntezy przypadało na 10–14 dobę hodowli. Stwierdzono także, że poziom ksylanaz kilkakrotnie przewyższał aktywność pozostałych enzymów, a najwyższa ich aktywność syntetyzowanych przez *T. harzianum* T33 wyniosła 72,2 nKat·cm<sup>-3</sup>.

**Słowa kluczowe:** odpady ligninocelulozowe, kaczany kukurydziane, celulazy, ksylanazy, *Trichoderma*

### WSTĘP

Odpady ligninocelulozowe, m.in. takie jak kaczany kukurydziane, stanowią dużą ilość produktów ubocznych, jakie są generowane przez zakłady spożywcze. Z tego samego powodu także przemysł włókienniczy, papierniczy i rolnictwo powodują zagrożenie dla środowiska naturalnego. Biorąc jednak pod uwagę fakt, że biomasa ligninocelulozowa jest surowcem odnawialnym, odpady te stanowią mogą potencjalne surowce wyjściowe w produkcji wielu pożądaných produktów. W związku z tym, w ostatnich dziesięcioleciach znacznie wzrosło zainteresowanie odpadami ligninocelulozowymi, przede wszystkim ze względu na ochronę środowiska, i wykorzystuje się je jako tanie i niezagospodarowane źródło węgla i energii.

---

Adres do korespondencji – Corresponding author: Anna Kancelista, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, ul. Norwida 25, 50-375 Wrocław, e-mail: a\_kancelista@op.pl



Ligninoceluloza jest zbudowana z dwóch polisacharydów (celuloza i ksylan) oraz ligniny. Drobnoustroje celulolityczne produkujące kompleks celulaz odpowiedzialne są za hydrolizę celulozy. Proces celulozy jest złożony i przebiega z udziałem kilku enzymów: celulazy (EC 3.2.1.4), egzo- $\beta$ -1,4-glukanazy (EC 3.2.1.91, EC 3.2.1.74) oraz  $\beta$ -glukozydazy (3.2.1.21) [Russel i in. 2005]. Enzymy te znajdują zastosowanie przede wszystkim w przemyśle spożywczym i jako enzymy paszowe, a produkowane są głównie przez grzyby strzępkowe z rodzaju *Trichoderma* [Wen i in. 2005, Velkowska i in. 1997]. Najważniejszym zastosowaniem enzymów ksylanolitycznych jest hydroliza substratów hemicelulozowych do cukrów prostych, ksylobiozy, ksylotriozy, a także kwasów uronowych. Produkty te mogą być dalej wykorzystywane w produkcji ksylitolu, etanolu, trójglicerów, a w ostatnich latach prowadzone są także próby wykorzystania enzymów ksylanolitycznych w procesie wybielania pulpy drzewnej [Janas i in. 2002]. Enzymatyczny rozkład ligniny jest procesem dalece skomplikowanym i nadal nie do końca poznany. Grzyby, w zależności od uzdolnień do biosyntezy określonych enzymów, mogą rozkładać wybiórczo ligninę bądź celulozę, albo w różnych proporcjach równocześnie oba te związki. Wśród mikroorganizmów zdolnych do hydrolizy ligniny wyróżniamy grzyby tzw. białego, brunatnego i szarego rozkładu [Górska i in. 2006], a produkowane przez nie lakazy i peroksydazy to główne enzymy lignolityczne, biorące udział w rozkładzie tej najbardziej odpornej frakcji.

W niniejszej pracy podjęto próbę oceny stopnia biosyntezy wybranych pozakomórkowych enzymów litycznych przez dwa szczepy z rodzaju *Trichoderma*. Celem prezentowanych badań było określenie, w jakim stopniu badane drobnoustroje są zdolne do wykorzystania odpadowych kaczanów kukurydzianych jako źródła węgla do produkcji celulaz i ksylanaz.

## MATERIAŁY I METODY

### Materiał badawczy

Badaniom poddano dwa szczepy grzybów strzępkowych *Trichoderma hamatum* C-1 i *T. harzianum* T33, pochodzące z kolekcji własnej Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Szczepy przechowywano na skosach PDA (Difco) w temp. 4°C.

### Metody prowadzenia hodowli

Hodowle wstrząsane prowadzono w kolbach o poj. 500 cm<sup>3</sup> zawierających 100 cm<sup>3</sup> podłoża Mandelsa-Sternburga [Shah i Madamwar 2005] o składzie: proteose-pepton 1.0 g·dm<sup>-3</sup>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.4 g·dm<sup>-3</sup>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.0 g·dm<sup>-3</sup>, mocznik 0.3 g·dm<sup>-3</sup>, CaCl<sub>2</sub> 0.3 g·dm<sup>-3</sup>, MgSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O 0.3 g·dm<sup>-3</sup>, FeSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O 5.0 mg·dm<sup>-3</sup>, MnSO<sub>4</sub>\*H<sub>2</sub>O 1.6 mg·dm<sup>-3</sup>, ZnSO<sub>4</sub>\*7H<sub>2</sub>O 1.4 mg·dm<sup>-3</sup>, CoCl<sub>2</sub> 2.0 mg·dm<sup>-3</sup>, Tween 80 0,1% (v/v); pH 5.0. Źródło węgla, a zarazem induktor badanych enzymów, stanowiły rozdrobnione odpadowe kaczany kukurydziane (2%) pochodzące z zakładu przemysłu spożywczego. Wszystkie hodowle prowadzono w czterech wariantach: bez dodatku glukozy (0% G), 0,25% glukozy (0,25% G), 0,5% glukozy (0,5% G), 0,75% glukozy (0,75% G), w dwóch powtórzeniach. Tak przygotowane podłoże sterylizowano dwukrotnie w temp. 121°C przez 30 min, a następnie zaszczepiano 1 cm<sup>3</sup> zawiesiny zarodników uzyskanej w wyniku zmywu ze skosu 0.1% roztworem Tween 80. Hodowle prowadzono przez 14 dni

w temperaturze  $\sim 28^{\circ}\text{C}$  na wstrząsarce rotacyjnej ( $170 \text{ obr.}\cdot\text{min}^{-1}$ ). Próby ( $5 \text{ cm}^3$ ) pobierano w 3, 5, 7, 10, 12, 14 dobie hodowli, a następnie odwirowywano w wirówce firmy Sigma typ 3-16K przez 30 min przy  $5500 \text{ obr.}\cdot\text{min}^{-1}$ . W otrzymanym supernatancie oznaczono ogólną aktywność enzymów scukrzających celulozę (FP-azy), aktywność karboksymetylocelulazy (CMC-azy) oraz aktywność ksylanaz, a także mierzono poziom pH w dniu pobierania prób.

### Oznaczenia analityczne

Ogólną aktywność celulolityczną (Filter Paper Activity) oznaczano metodą Mandels'a [Mandels i in. 1976]. Paski bibuły filtracyjnej Whatman No. 1 ( $0.5 \text{ cm} \times 6 \text{ cm}$ ) umieszczano w probówkach i dodawano  $0,25 \text{ cm}^3$   $0,05 \text{ M}$  buforu octanowego o pH 4.8 i  $0.25 \text{ cm}^3$  odpowiednio rozcieńczonego płynu pohodowlanego. Próby inkubowano przez 60 min w temp.  $50^{\circ}\text{C}$ . Aktywność karboksymetylocelulazy oznaczano wobec 1% CMCNa (sól sodowa karboksymetylocelulozy) [Mandels i in. 1976].  $0.25 \text{ cm}^3$  substratu i  $0.25 \text{ cm}^3$  odpowiednio rozcieńczonego płynu pohodowlanego umieszczano w probówkach i inkubowano przez 30 min w temp.  $50^{\circ}\text{C}$ . W obu przypadkach reakcję przerywano przy użyciu  $1,5 \text{ cm}^3$  odczynnika DNS, a następnie oznaczono ilość uwolnionych cukrów redukujących metodą kolorymetryczną [Miller 1959]. Analogicznie wykonano próby kontrolne, przy czym roztwór badanego enzymu wprowadzono po dodaniu odczynnika DNS.

Do oznaczenia aktywności ksylanolitycznej użyto 1-procentowego roztworu ksylanu z brzozy (Sigma) jako substratu [Deschamps i Huet 1985]. Mieszaninę reakcyjną ( $0.25 \text{ cm}^3$  substratu i  $0.25 \text{ cm}^3$  rozcieńczonego enzymu) inkubowano w temp.  $50^{\circ}\text{C}$  przez 30 min, a uwolnione cukry redukujące oznaczano ilościowo metodą kolorymetryczną przy użyciu odczynnika zawierającego kwas 3,5-dinitrosalicylowy (DNS) [Miller 1959]. Równocześnie wykonano próby kontrolne.

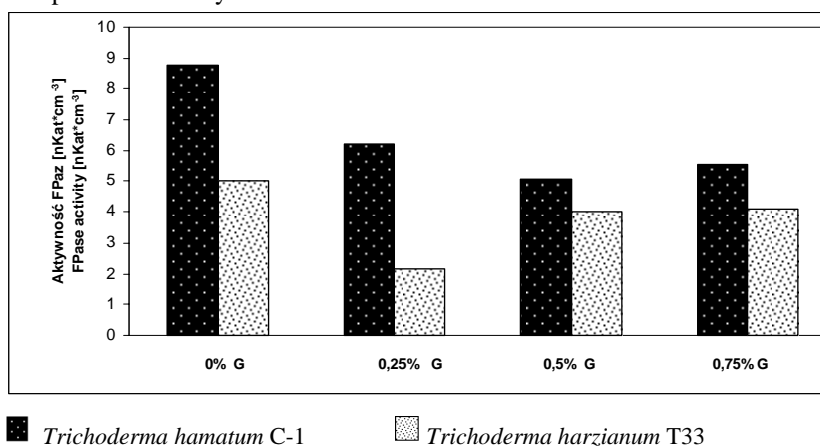
Za jednostkę aktywności [ $\text{nKat}\cdot\text{cm}^{-3}$ ] przyjęto ilość nmoli cukrów redukujących uwalnianych z substratu podczas 1 s przez enzymy zawarte w  $1 \text{ cm}^3$  płynu pohodowlanego.

## OMÓWIENIE I DYSKUSJA WYNIKÓW

W prezentowanej pracy badano dwa szczepy grzybów strzępkowych z rodzaju *Trichoderma* w kierunku syntezy wybranych zewnątrzkomórkowych enzymów litycznych. Głównym czynnikiem różnicującym ich wytwarzanie był skład podłoża hodowlanego, a dokładnie poziom glukozy jako dodatkowego źródła węgla, przy czym główne źródło węgla stanowiły rozdrobnione kaczany kukurydziane (2%). Oba szczepy syntetyzowały większą ilość ksylanaz w porównaniu do pozostałych enzymów, przy czym produkcja FP-az była najniższa. Poszczególne szczepy uwalniały celulazy, FP-azy i ksylanazy przez cały czas trwania hodowli z obserwowaną tendencją wzrostową, a najwyższe ich wartości odnotowano w 10, 12 lub 14 dobie, w zależności od badanego szczepu i wytwarzanego enzymu (rys. 1, 2, 3).

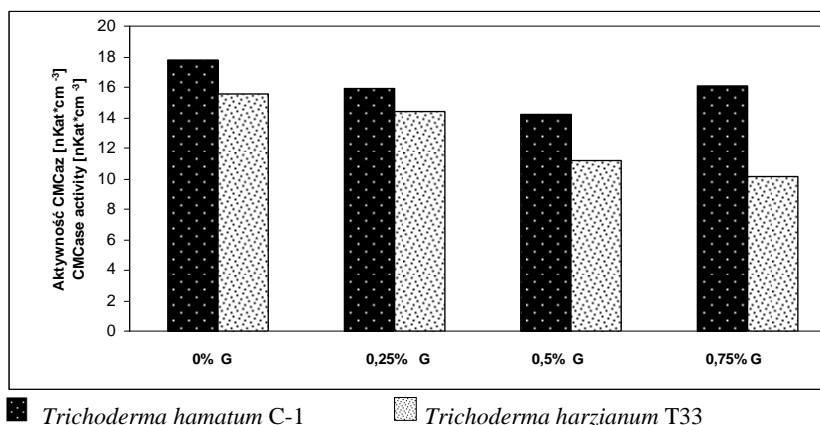
Biorąc pod uwagę mikroorganizmy wykorzystane w niniejszym doświadczeniu, największe zróżnicowanie w otrzymanych wynikach zaobserwowano w produkcji FP-az, tj. ogólnych enzymów scukrzających celulozę (rys. 1). W płynach pohodowlanych szczepu *T. hamatum* C-1 zmierzono wyższe aktywności FP-az, przy czym mieściły się one w zakresie od  $5,08 \text{ nKat}\cdot\text{cm}^{-3}$  do  $8,77 \text{ nKat}\cdot\text{cm}^{-3}$  (odpowiednio 0,5% i 0% glukozy w podłożu). W przypadku obu szczepów stwierdzono także, że glukoza jako

dotatkowe źródło węgla negatywnie wpłynęła na syntezę tych enzymów. W swoich badaniach Domingues i in. [2001] podjęli próbę oceny stopnia syntezy FP-az podczas hodowli zmutowanego szczepu *Trichoderma reesei* Rut-C30 w podłożu minimalnym z dodatkiem glukozy ( $30 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ ). Autorzy wykazali, że po 96 h hodowli ogólna aktywność enzymów scukrzających celulozę była na poziomie  $0,9 \text{ U}\cdot\text{cm}^{-3}$ , co odpowiada  $\sim 15 \text{ nKat}\cdot\text{cm}^{-3}$ . Z kolei Bollok i Reczey [2000] w przeprowadzonym doświadczeniu z udziałem *T. viride* OKI B1 wykorzystali odpady papierowe jako substrat do produkcji enzymów. Okazało się, że szczep ten uwalniał FP-azy począwszy od pierwszej doby hodowli, przy czym najwyższą ich aktywność autorzy odnotowali w 3 dobie hodowli ( $0,59 \text{ U}\cdot\text{cm}^{-3} \sim 9,8 \text{ nKat}\cdot\text{cm}^{-3}$ ), a następnie aktywność się zmniejszała. Porównanie wyników własnych z doniesieniami w literaturze pozwala stwierdzić, że synteza FP-az w obrębie grzybów z rodzaju *Trichoderma* jest bardzo zróżnicowana. Należy jednak zwrócić uwagę także na fakt, iż szczep wykorzystywany przez Domingues'a i in. [2001] jest szczepem zmutowanym.



Rys. 1. Porównanie najwyższych aktywności celulaz (FP-az) podczas hodowli wstrząsanej  
Fig. 1. The comparison of the highest cellulase (FPase) activity in submerged culture

Aby dokładniej poznać uzdolnienia badanych szczepów w kierunku syntezy pozakomórkowych hydrolaz, w dalszej części badań określono ich zdolność do syntezy innych enzymów celulolitycznych – endo- $\beta$ -1,4-glukanaz. Podobnie jak w poprzednim przypadku efektywniejszym producentem tych enzymów okazał się szczep *T. hamatum* C-1 (rys. 2), a zmierzona wobec karboksymetylocelulozy aktywność mieściła się w zakresie od  $14,24 \text{ nKat}\cdot\text{cm}^{-3}$  do  $17,79 \text{ nKat}\cdot\text{cm}^{-3}$ . Z danych znanych z literatury wynika, że nie tylko grzyby strzępkowe z rodzaju *Trichoderma* są zdolne do syntezy enzymów celulolitycznych w podłożach zawierających odpady z przemysłu spożywczego i rolniczego. Górská i in. [2006] zbadali zdolność do syntezy tych enzymów przez grzyb *Trametes versicolor*, należący do klasy *Basidiomycetes* i zaliczany do grzybów „białego rozkładu”. Zamiast rozpuszczalnego źródła węgla autorzy zastosowali zmieloną i pociętą słomę pszenżyta, a otrzymane wyniki nie wykazały istotnych różnic ze względu na sposób rozdrobnienia w przypadku hodowli wstrząsanych. Wyższe aktywności CMC-azy autorzy zmierzili natomiast w płynach pochodzących otrzymanych w wyniku hodowli stacjonarnej –  $120 \text{ mU}\cdot\text{cm}^{-3}$  i  $37 \text{ mU}\cdot\text{cm}^{-3}$ , odpowiednio dla słomy pociętej i zmielonej.



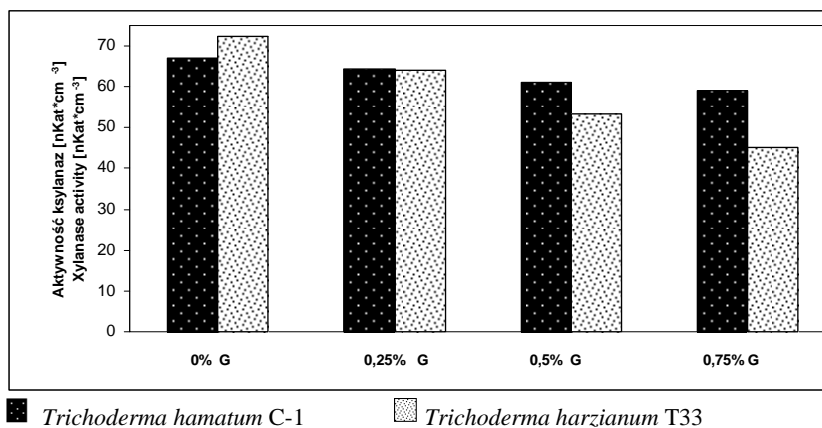
Rys. 2. Porównanie najwyższych aktywności karboksymetylocelulazy (CMC-azy) podczas hodowli wstrząsanej

Fig. 2. The comparison of the highest carboxymethylcellulase (CMCase) activity in submerged culture

W ostatnich latach coraz większe zainteresowanie wzbudza problem zagospodarowania odpadów przemysłowych, takich jak rozdrobnione kolby kukurydzy. Abd El-Nasser i in. [1997] donoszą, iż grzyby *Phanerochaete chrysosporium* NRRL 6359 są zdolne do syntezy CMC-az na poziomie 12 U·cm<sup>-3</sup> po upływie 48 h w podłożu zawierającym rozdrobnione kolby kukurydzy. Autorzy zbadali także wpływ dodatku glukozy (0,2%) na syntezę enzymów. W hodowlach, gdzie substrat stanowiły słoma pszenna i oczyszczona trzcina cukrowa, poziom badanych CMC-az obniżył się, natomiast dodatek ten nie miał wpływu na aktywność enzymów indukowanych obecnością rozdrobnionych kolb kukurydzy. Z kolei, w badaniach własnych zauważono negatywny wpływ wzrastającego stężenia glukozy w przypadku endoglukanaz syntetyzowanych przez grzyby strzępkowe *T. harzianum* T33, co można tłumaczyć obecnością łatwiej dostępnego źródła węgla, które hamuje zdolność badanego drobnoustroju do syntezy pożądanych enzymów celulozowych. Dodatek glukozy nie miał natomiast istotnego wpływu na CMC-azy produkowane przez szczep *T. hamatum* C-1 (rys. 2), gdzie poziom aktywności zmierzony w otrzymanych płynach pochodzących był podobny, gdy w podłożu nie było glukozy lub zastosowano jej dodatek w wysokości 0,75% (odpowiednio 17,79 nKat·cm<sup>-3</sup> i 16,07 nKat·cm<sup>-3</sup>).

Biomasa ligninocelulozowa jest odnawialnym surowcem występującym w ogromnych ilościach na kuli ziemskiej, wliczając w to także odpady zawierające ligninocelulozę. W niniejszym doświadczeniu podjęto próbę syntezy enzymów celulozowych i ksylanolitycznych, wykorzystując zalegające odpady jako źródło węgla. Powyżej została omówiona synteza enzymów degradujących celulozę, podstawowy polimer występujący w naszym środowisku. Obok celulozy wchodzi w skład omawianych odpadów także hemicelulozy, drugie po celulozie odnawialne polisacharydy, które chemicznie stanowią złożone wielocukry. W zależności od źródła, obok mannanów i glukanów, główną grupę hemiceluloz stanowią ksylany (6–90%), których łańcuchy stanowią jednostki D-ksylanopiranozowe połączone głównie wiązaniami β-1,4 lub β-1,3, a niezbędne w procesie hydrolizy hemiceluloz do cukrów prostych są enzymy ksylanolityczne [Janas i in. 2002].

Szczepy *T. hamatum* C-1 i *T. harzianum* T33 wykorzystane w badaniach własnych były bardziej efektywne w syntezie ksylanaz w porównaniu do pozostałych enzymów, przy czym szczep T33 produkował ich najwięcej w 14 dobie hodowli w podłożu nie zawierającym glukozy (rys. 3). Podobnie jak w przypadku omówionych wcześniej enzymów celulolitycznych synteza ksylanaz była również uwarunkowana dodatkiem glukozy. Zauważono, że im więcej glukozy dodano do podłoża, tym aktywność badanych enzymów była niższa, jednakże w przypadku szczepu *T. hamatum* C-1 różnice te okazały się nieznaczne, a zmierzona aktywność była na poziomie od 58,92 nKat·cm<sup>-3</sup> do 67,05 nKat·cm<sup>-3</sup>. Wcześniejsze badania własne dotyczące syntezy celulaz i ksylanaz w podłożu zawierającym inny ligninocelulozowy materiał odpadowy ukazują inną zależność. Badania prowadzono z udziałem szczepów *T. reesei* 7-1, *Aspergillus niger* XP i *A. niger* 270 i udowodniono, że niższe aktywności ksylanaz istnieją w podłożach bez dodatku glukozy oraz tam gdzie jej dodatek był największy, tj. 0,75%, co wskazuje na optymalny poziom glukozy w podłożu na poziomie 0,25% i 0,5% [Kancelista i Witkowska 2006]. Przeprowadzone badania własne pozwalają wywnioskować, że wpływ łatwo dostępnego źródła węgla, jakim była glukoza, na syntezę pożądaných enzymów zależy przede wszystkim od rodzaju substratu, jaki był stosowany w hodowli, a także od szczepu grzybów strzępkowych biorących udział w biosyntezie. Powszechnie wiadomo, że jednym z najefektywniejszych induktorów ksylanaz jest ksylan. Janas i in. [2002] wykazali kilkakrotny wzrost poziomu aktywności ksylanolitycznej w podłożu zawierającym ksylan z brzozy jako jedyne źródło węgla w porównaniu do hodowli prowadzonej w obecności 1% laktozy. Mutant *T. reesei* M-7 obecny w podłożu z ksylanem syntetyzował ksylanazy na poziomie 405,5 U·cm<sup>-3</sup>, natomiast w płynie pohodowlanym otrzymanym w wyniku hodowli z laktozą zmierzona aktywność była blisko 9-krotnie niższa (44,75 U·cm<sup>-3</sup>).

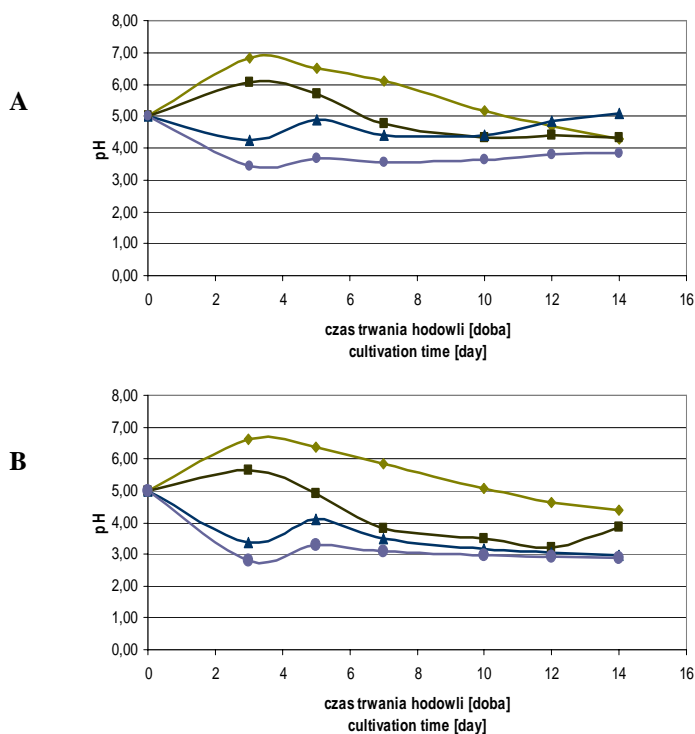


Rys. 3. Porównanie najwyższych aktywności ksylanaz podczas hodowli wstrząsanej  
Fig. 3. The comparison of the highest xylanases activity in submerged culture

Biosynteza wszystkich enzymów, w tym także celulo- i ksylanolitycznych, zależna jest od warunków hodowli, takich jak odpowiedni skład podłoża hodowlanego, optymalne pH i temperatura hodowli czy też obecność specyficznych induktorów. Poniższe doświadczenie prowadzono bez korekty pH podłoża, a poziom jonów wodorowych mierzono sześć razy w trakcie hodowli trwającej 14 dób. Zauważono, że wyższy dodatek

glukozy powodował obniżenie pH w trakcie trwania hodowli wstrząsanej (rys. 4), co prawdopodobnie miało bezpośredni wpływ na syntezę badanych enzymów.

Analizując poniższe wykresy (rys. 4), warto zwrócić uwagę na zależność występującą w przypadku obu badanych szczepów grzybów strzępkowych. W hodowlach z dodatkiem glukozy 0,25% i 0,5% stężenie jonów wodorowych wzrasta w 3 dobie, a następnie spada – odwrotnie w przypadku pozostałych hodowli. Nawiązując do zmierzonych aktywności, najefektywniejsza synteza badanych enzymów przypadała na 10–12 dobę hodowli, co odpowiada pH w zakresie 4,5–5,0. Jednoznacznie można stwierdzić, że stężenie jonów wodorowych poniżej i powyżej tej wartości nie sprzyja wydajnej syntezie FP-az, CMC-az oraz ksylanaz.



Rys. 4. Zmiana pH płynu pohodowlanego uzyskanego w wyniku hodowli wstrząsanej szczepu: A. *T. hamatum* C-1, B. *T. harzianum* T33. (◆) 0% G, (■) 0,25% G, (▲) 0,5% G, (●) 0,75% G  
 Fig. 4. pH changes of the culture supernatant fluid in submerged culture of: A. *T. hamatum* C-1, B. *T. harzianum* T33. (◆) 0% G, (■) 0,25% G, (▲) 0,5% G, (●) 0,75% G

Uzyskane w powyższych badaniach surowe preparaty enzymatyczne wykorzystane zostaną w procesie bezpośredniej hydrolizy odpadowej biomasy ligninocelulozowej, co pozwoli na opracowanie efektywnej metody biodegradacji uciążliwych dla przemysłu spożywczego odpadów ligninocelulozowych. Wyniki uzyskane w prezentowanej pracy stanowią podstawę do dalszych badań mających na celu modyfikację i udoskonalenie metod bezpośredniej biodegradacji, a jej intensyfikacja może dotyczyć zarówno modyfikacji enzymów, jak i samych substratów ligninocelulozowych.

## WNIOSKI

1. Szczepy *Trichoderma harzianum* T33 oraz *T. hamatum* C-1 są zdolne do syntezy pozakomórkowych enzymów litycznych, które mogą stanowić surowy preparat enzymatyczny przydatny w procesach bezpośredniej hydrolizy odpadów ligninocelulozowych.
2. Obecność odpadowych kaczanów kukurydzianych jako jedyne źródła węgla w podłożu korzystnie wpłynęła na syntezę FP-az, CMC-az i ksylanaz.
3. Badane szczepy grzybów strzępkowych charakteryzowały się efektywniejszą syntezą ksylanaz w porównaniu do celulaz.
4. pH podłoża hodowlanego miało istotny wpływ na produkcję zewnątrzkomórkowych celulaz i ksylanaz.

## PIŚMIENNICTWO

- Abd El-Nasser N.H., Helmy S.M., El-Gammal A.A., 1997. Formation of enzymes by biodegradation of agricultural wastes with white rot fungi. *Polymer Degradation and Stability*, 55, 249–255.
- Bollok M., Reczey K., 2000. Cellulase enzyme production by various fungal strains on different carbon sources. *Acta Alimentaria*, 29(2), 155–168.
- Deschamps F., Huet M.C., 1985. Xylanase production in solid state fermentation: a study of its properties. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 22, 177–180.
- Domingues F.C., Queiroz J.A., Cabral J.M.S., Fonseca L.P., 2001. Production of cellulases in batch culture using a mutant strain of *Trichoderma reesei* growing on soluble carbon source. *Biotechnology Letters*, 23, 771–775.
- Górska E.B., Kopczyńska J., Russel S., 2006. Wytwarzanie enzymów celulozowych i lignolitycznych w hodowli grzyba *Trametes versicolor* z dodatkiem słomy zbożowej o różnym stopniu rozdrobnienia. *Zeszyty Naukowe Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, Rolnictwo LXXXIX*, 546, 71–77.
- Janas P., Gustaw W., Targoński Z., Udeh K.O., Cmeko S., 2002. Zastosowanie substratów ligninocelulozowych do otrzymania preparatów ksylanolitycznych o niskiej aktywności celulaz. *Acta Scientiarum Polonorum. Biotechnologia*, 1(1-2), 5–17.
- Kancelista A., Witkowska D., 2006. Biosynteza celulaz i ksylanaz przez grzyby strzępkowe w hodowlach wglębnych z odpadowym materiałem ligninocelulozowym. *Materiały Konferencyjne, XIII Ogólnopolskie Seminarium Studentów i Doktorantów „Biotechnologia Środowiskowa”*, 191–196.
- Mandels M., Andreotti R., Roche C., 1976. Measurement of saccharifying cellulose. *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, 6, 17–34.
- Miller C.L., 1959. Use of dinitric acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, 31, 426–428.
- Russel S., Górska E.B., Wyczółkowski A.I., 2005. Enzymy biorące udział w hydrolizie celulozy. *Acta Agrophysica, Rozprawy i Monografie*, 3, 27–36.
- Shah A.R., Madamwar D., 2005. Xylanase production by a newly isolated *Aspergillus foetidus* strain and its characterization. *Process Biochemistry*, 40, 1763–1771.
- Wen Z., Liao W., Chen S., 2005. Production of cellulase by *Trichoderma reesei* from dairy manure. *Bioresource Technology*, 96 (4), 491–499.
- Velkowska S., Marten R.M., Ofllis D.F., 1997. Kinetic model for batch cellulase production by *Trichoderma reesei* RUT C30. *Journal of Biotechnology*, 54(2), 83–94.

**BIOSYNTHESIS OF SOME LYTIC ENZYMES  
IN MEDIUM CONTAINING WASTE CORN COBS  
BY FILAMENTOUS FUNGI FROM *TRICHODERMA* GENUS**

**Abstract.** In this paper strains of filamentous fungi from *Trichoderma* genus for their ability to extracellular cellulases and xylanases biosynthesis were examined. Two strains were cultivated in liquid Mandels-Sternburg medium in presence of waste corn cobs as a main carbon source. The submerged cultures were carried out for 14 days and FPase, CMCase, xylanase activities and pH level were determined. The maximum synthesis of some hydrolases was observed in 10-14 days and their activities were depended on glucose (supplementary soluble carbon source) and pH. The xylanases biosynthesis was the highest and *T. harzianum* T33 strain produced maximum xylanases activity (72,2 nKat·cm<sup>-3</sup>).

**Key words:** lignocellulosic wastes, corn cobs, cellulases, xylanases, *Trichoderma*

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 31.03.2008

Do cytowania – For citation: Kancelista A., Witkowska D., 2008. Biosynteza wybranych enzymów litycznych w podłożu zawierającym odpadowe kaczany kukurydziane przez grzyby strzępkowe z rodzaju *Trichoderma*. Acta Sci. Pol. Biotechnol. 7(1), 17-25.



## CHARAKTERYSTYKA PROCESU BIOSYNTETY KWASU CYTRYNOWEGO I POLIOLI Z GLICEROLU I GLUKOZY PRZEZ DROŹDŹE *YARROWIA LIPOLYTICA*

Anita Rywińska, Adam Skrzypiński, Piotr Juszczyk,  
Tomasz Boruczowski, Waldemar Rymowicz

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

**Streszczenie.** Porównano parametry kinetyki wzrostu oraz efektywności biosyntezy kwasu cytrynowego przez szczep *Yarrowia lipolytica* Wratislavia K1 z czystego glicerolu, glicerolu odpadowego, glukozy oraz mieszaniny glicerolu i glukozy w hodowlach okresowych. Stosowano dwa rodzaje mieszanin, jedną z czystym glicerolem, a drugą z odpadowym.

Najwyższą wydajność wzrostu ( $Y_{X/S}=0,6 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) stwierdzono w obecności glukozy jako źródła węgla. W hodowli z czystym glicerolem uzyskano natomiast najwyższe stężenie ( $37,5 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ ) i wydajność kwasu cytrynowego ( $Y^l_{CA}=0,37 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ ).

We wszystkich procesach hodowlanych tworzone były alkohole cukrowe, takie jak erytrytol i mannitol. Najwięcej tych polioli otrzymano w hodowli z czystym glicerolem, odpowiednio  $19,3 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$  i  $10,1 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ .

**Słowa kluczowe:** *Yarrowia lipolytica*, kwas cytrynowy, erytrytol, mannitol, glicerol, glukoza

### WSTĘP

Kwas cytrynowy (CA) zajmuje pierwszą pozycję spośród kwasów organicznych pod względem wielkości produkcji na drodze mikrobiologicznej. Światowa produkcja wynosi obecnie około 1,4 mln t [Soccoll i in. 2006]. Chociaż głównym mikroorganizmem stosowanym w skali przemysłowej do biosyntezy CA są grzyby strzępkowe *Aspergillus niger*,

---

Badania realizowane w ramach Grantu KBN 2P06T 044 33 9 (2006–2009).

---

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

wiele uwagi, zwłaszcza w ostatnich latach, poświęca się wykorzystaniu w tej dziedzinie drożdży *Yarrowia lipolytica* [Anastassiadis i Rhem 2005, Finogenova i in. 2005, Pazouki i Panda 1998]. Jednym z podstawowych aspektów przemawiających za stosowaniem drożdży jest ich zdolność do wykorzystywania w charakterze źródła węgla szerokiej gamy surowców, zwłaszcza niekonwencjonalnych. Jak wiadomo, używanie w procesach biotechnologicznych tanich odnawialnych surowców pozwala na znaczne obniżenie kosztów produkcji [Arzumanov i in. 2000, Crolla i Kennedy 2001, Kamzolova i in. 2005, Papanikolaou i in. 2002, Wojtatowicz i in. 1991, Venter i in. 2004]. W ostatnich latach, wraz z rozwojem produkcji biopaliw (biodiesla), atrakcyjnym i tanim surowcem stosowanym w procesach biotechnologicznych jest gliceryna. Szacuje się, że pod koniec 2010 r. na rynku europejskim będzie dostępnych około 1 mln ton gliceryny, którą zagospodaruje się różnymi metodami, w tym także metodami biotechnologicznymi. Jednak przetwarzanie glicerolu w użyteczne produkty w procesach biotechnologicznych znajduje się dopiero w fazie badań laboratoryjnych. Odpadowa gliceryna została wykorzystana szczególnie w procesach beztlenowych, m.in. do produkcji: 1,3 propanediolu, dihydroksyacetonu, kwasu bursztynowego i wodoru [Pachauri i He 2006]. W nielicznych pracach pokazano również możliwość wykorzystania surowej gliceryny, powstałej przy produkcji estrów metylowych wyższych kwasów tłuszczowych w procesach tlenowych, m.in. do produkcji CA przez drożdże z gatunku *Yarrowia lipolytica* [Papanikolaou i Aggelis 2003, Papanikolaou i in. 2002].

Wstępne badania, przeprowadzone przez autorów niniejszej pracy [Rymowicz i in. 2006], wskazują, że odpadowy glicerol zapewnia otrzymanie, w hodowlach z udziałem mutantów octanowych *Y. lipolytica*, wysokich ilości CA, dochodzących do 200 g·dm<sup>-3</sup>. Ponadto wydajność CA z tego surowca była wyższa w porównaniu do hodowli prowadzonych w podłożach glukozowych z udziałem takich drożdży. Interesujący jest również fakt, iż obok CA, w podłożach zawierających glicerol, szczep drożdży *Y. lipolytica* Wratislavia K1 produkuje także duże ilości alkoholi cukrowych, takich jak erytrytol i mannitol [Rymowicz i in. 2008]. Zdolność mutantów octanowych *Y. lipolytica* do nadprodukcji polioli z glicerolu, jak i z glukozy jest zjawiskiem nowym i mało poznanym.

Celem pracy jest porównanie parametrów kinetyki wzrostu oraz efektywności biosyntezy kwasu cytrynowego, erytrytolu i mannitolu przez mutant octanowego *Yarrowia lipolytica* Wratislavia K1 z glicerolu i glukozy w hodowlach stacjonarnych.

## MATERIAŁY I METODY

**Mikroorganizm.** Przedmiotem badań był mutant octanowy (oct-) *Yarrowia lipolytica* Wratislavia K1 o gładkim fenotypie kolonii, wyizolowany z hodowli chemostatowej szczepu *Yarrowia lipolytica* Wratislavia 1.31. Szczep ten pochodził z kolekcji własnej Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Szczep przechowywano na skosach YM, w temp. 4°C.

**Podłoża.** Podłoże inokulacyjne miało skład (g·dm<sup>-3</sup>): glicerol – 50,0 lub glukoza – 50,0; ekstrakt drożdżowy – 3,0; ekstrakt słodowy – 3,0; bactopecton – 5,0; woda destylowana do 1 dm<sup>3</sup>. Podłoże produkcyjne miało skład (g·dm<sup>-3</sup>): źródło węgla – 100,0; NH<sub>4</sub>Cl – 3,0; MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O – 1,0; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> – 0,2; ekstrakt drożdżowy – 1,0; woda wodociągowa – do 1 dm<sup>3</sup>.

Surowiec: czysty glicerol (czystość 98%); glicerol odpadowy, pochodzący z produkcji biodiesla (SG BODDINS GmbH, Niemcy), zawierający  $860 \text{ g dm}^{-3}$  glicerolu i  $65 \text{ g dm}^{-3}$  NaCl (EE86%Gly), czysta glukoza oraz glukoza i glicerol zmieszane w stosunku 1:1.

Podłoża sterylizowano w  $121^\circ\text{C}$  przez 20 min.

### Warunki prowadzenia hodowli

**Hodowla inokulacyjna.** Hodowle inokulacyjne prowadzono na wstrząsarce rotacyjnej typu Elpan, w  $250 \text{ cm}^3$  kolbach stożkowych, zawierających  $25 \text{ cm}^3$  podłoża inokulacyjnego, przez 72 godz. w temp.  $30^\circ\text{C}$ , przy 160 rpm. Do zaszczerpienia podłoża produkcyjnego w bioreaktorze używano  $0,05 \text{ dm}^3$  zawiesiny komórek namnożonych w hodowli inokulacyjnej.

**Hodowla produkcyjna.** Proces biosyntezy kwasu cytrynowego był prowadzony w 3,5-litrowym bioreaktorze BIOFLO III (New Brunswick), o objętości roboczej  $1,3 \text{ dm}^3$ , przy szybkości przepływu powietrza  $0,2 \text{ vvm}$ , szybkości obrotowej mieszadła 600 rpm, w temp.  $30^\circ\text{C}$ . W czasie procesu  $\text{pH}=5,5$  utrzymywano automatycznie za pomocą 40% NaOH.

### Metody analityczne

Biomasę oznaczano metodą wagową.

Kwas izocytrynowy (ICA) oznaczano metodą enzymatyczną przy udziale dehydrogenazy cytrynianowej [Goldberg i Ellis 1983].

Stężenie kwasu cytrynowego (CA), glicerolu (GLY), glukozy (GLU), erytrytolu (ER) i mannitolu (MAN) oznaczano metodą HPLC na kolumnie Aminex HPX87H podłączonej do detektorów UV ( $\lambda=210 \text{ nm}$ ) i IR w temperaturze pokojowej. Szybkość przepływu fazy ciekłej ( $20 \text{ mM H}_2\text{SO}_4$ ) przez kolumnę wynosiła  $0,6 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$ .

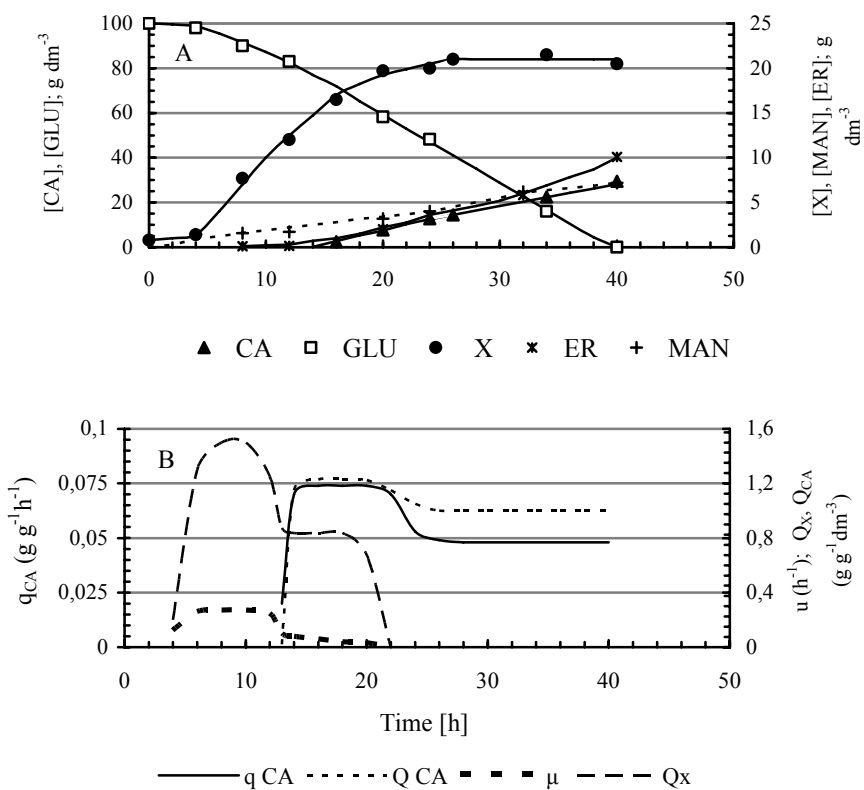
### Spis użytych symboli

- $\mu$  = szybkość właściwa wzrostu – specific growth rate ( $\text{h}^{-1}$ )
- $Q_X$  = szybkość produkcji biomasy – volumetric biomass productivity ( $\text{g} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$ )
- $q_{\text{CA}}^g$  = szybkość właściwa produkcji kwasu cytrynowego w fazie wzrostu  
– specific rate of citric acid production in the yeast growth phase ( $\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ )
- $q_{\text{CA}}^{n-g}$  = szybkość właściwa produkcji kwasu cytrynowego w fazie stacjonarnej  
– specific rate of citric acid production in the stationary phase ( $\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ )
- $Q_{\text{CA}}^g$  = szybkość produkcji kwasu cytrynowego w fazie wzrostu  
– volumetric citric acid productivity in the yeast growth phase ( $\text{g} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$ )
- $Q_{\text{CA}}^{n-g}$  = szybkość produkcji kwasu cytrynowego w fazie stacjonarnej  
– volumetric citric acid productivity in the stationary phase ( $\text{g} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$ )
- $Y_{\text{CA}}^P$  = wydajność kwasu cytrynowego – yield of citric acid ( $\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ )
- $Y_{\text{CA}}^t$  = wydajność całkowita kwasu cytrynowego – total yield of citric acid ( $\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ )
- $Y_{\text{ER}}^t$  = wydajność całkowita erytrytolu – yield of erythritol ( $\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ )
- $Y_{\text{MAN}}^t$  = wydajność całkowita mannitolu – yield of mannitol ( $\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ )

## OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA

Zbadano przebieg procesu okresowej biosyntezy kwasu cytrynowego (CA) przez szczep *Yarrowia lipolytica* Wratislavia K1 z glukozy i glicerolu oraz z glicerolu i glukozy zmieszanych w stosunku 1:1. W badaniach wykorzystano czysty glicerol oraz glicerol odpadowy z produkcji biodiesla. Wszystkie procesy hodowlane poprowadzono do całkowitego wyczerpania poszczególnych substratów.

Proces biosyntezy CA z glukozy trwał 40 h. Drożdże w 20 h osiągnęły fazę stacjonarną, przy plonie biomasy stabilizującym się na wysokim poziomie  $21 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$  (rys. 1A). Faza wzrostu logarytmicznego trwała pomiędzy 4 a 12 h hodowli. Wartość szybkości właściwej wzrostu była w tym czasie najwyższa i wynosiła  $\mu_{\max} = 0,27 \text{ h}^{-1}$ . Następnie w przebiegu wzrostu drożdży wyróżniono fazę liniową, w której szczep Wratislavia K1 rósł ze stałą objętościową szybkością wzrostu ( $Q_X = 0,83 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$ ) (rys. 1B).



Rys. 1A. Produkcja biomasy [X], kwasu cytrynowego [CA], erytrytolu [ER] i mannitolu [MAN] oraz zużycie glukozy [GLU] przez *Y. lipolytica* Wratislavia K1 w hodowli okresowej

Fig. 1A. Production of biomass [X], citric acid [CA], erythritol [ER] and mannitol [MAN] and glucose consumption [GLU] by *Y. lipolytica* Wratislavia K1 in batch bioreactor experiment

Rys. 1B. Szybkości produkcji biomasy ( $\mu$ ,  $Q_X$ ) i kwasu cytrynowego ( $q_{CA}$ ,  $Q_{CA}$ ) w funkcji czasu hodowli

Fig. 1B. Specific growth rate ( $\mu$ ), volumetric biomass productivity ( $Q_X$ ), specific rate of citric acid production ( $q_{CA}$ ) and volumetric citric acid productivity ( $Q_{CA}$ ) as a function of culture time

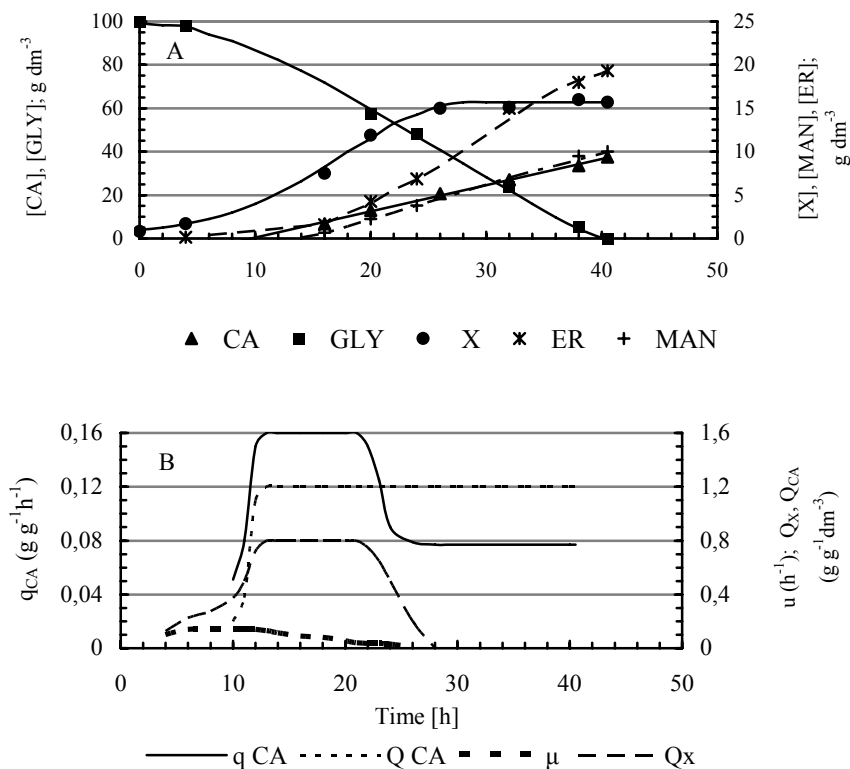
Produkcja CA rozpoczynała się po zakończeniu logarytmicznej fazy wzrostu, a jego końcowe stężenie wynosiło  $29,5 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$  (rys. 1A). W przebiegu krzywej tworzenia CA należy wyróżnić dwie fazy nadprodukcji CA, różniące się szybkością syntezy tego kwasu. Komórki rosnące drożdży (w trofofazie) produkowały CA z wyższą szybkością niż komórki nierosnące, będące w idiofazie. Takie zjawisko było obserwowane w przypadku wielu szczepów *Y. lipolytica* w procesach biosyntezy CA z glukozy i hydroflu glukozy [Bubbico i in. 1996, Moresi 1994, Parente i Ricciardi 1995, Wojtatowicz i Rymowicz 1991, Wojtatowicz i Rymowicz 1990]. W niniejszej pracy komórki rosnące produkowały CA z glukozy z szybkością właściwą  $q_{\text{CA}}^{\text{g}} = 0,074 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  i objętościową  $Q_{\text{CA}}^{\text{g}} = 1,23 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$ , a nierosnące – z szybkością  $q_{\text{CA}}^{\text{n-g}} = 0,048 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  i  $Q_{\text{CA}}^{\text{n-g}} = 1,0 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$ . Podobne wartości tych parametrów odnotowano w procesie biosyntezy CA z glukozy przez szczep *Y. lipolytica* 1.31 [Rywińska i in. 2006].

Drożdże *Y. lipolytica* Wratislavia K1 produkowały erytrytol i mannitol od początku procesu biosyntezy CA, a ich ilość na końcu procesu wynosiła odpowiednio  $10,1 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$  i  $7,2 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$  (rys. 1A).

W procesie biosyntezy CA z glicerolu fazę stacjonarną komórki osiągnęły dopiero w 22 h. W tym procesie odnotowano niższe stężenie biomasy ( $15,7 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ ). Komórki drożdży znacznie dłużej adaptowały się do warunków panujących w tej pożywce, o czym świadczy trwająca około 7 h lag faza (rys. 2A). W fazie logarytmicznej wzrostu komórki szczepu Wratislavia K1 rosły z maksymalną szybkością prawie dwukrotnie niższą niż w podłożu z glukozą (rys. 2B). Wartość objętościowej szybkości wzrostu w fazie liniowej ( $Q_x$ ), pomiędzy 12 a 22 h, była natomiast porównywalna z uzyskaną w hodowli z glukożą.

W około 40 h hodowli, podobnie jak w procesie z glukożą, nastąpiło całkowite wyczerpanie źródła węgla (glicerolu) w środowisku hodowlanym. W hodowli z glicerolem stwierdzono natomiast wyższe stężenie CA ( $37,5 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ ) (rys. 2A). Produkcja CA i ICA przebiegała nieco inaczej niż w podłożu z glukożą, w którym tworzenie CA rozpoczęło się po zakończeniu logarytmicznego wzrostu drożdży. Badany w niniejszej pracy szczep *Y. lipolytica* Wratislavia K1 rozpoczynał syntezę CA z glicerolu już podczas wzrostu logarytmicznego. Taki sposób tworzenia CA obserwowano także w hodowlach z udziałem innych szczepów *Y. lipolytica* na oleju rzepakowym i n-parafinach [Moresi i in. 1980]. W opinii niektórych autorów drożdże *Y. lipolytica* w podłożu zawierającym jedno źródło węgla produkują CA ze stałą szybkością podczas całego procesu [Klasson i in. 1989, Marchal i in. 1977]. W niniejszej pracy szybkość objętościowa ( $Q_{\text{CA}}$ ) również była stała. Od około 12 h do wyczerpania glicerolu wynosiła  $1,2 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$  (rys. 2B). W przypadku komórek rosnących szybkość właściwa syntezy CA, ( $q_{\text{CA}}^{\text{g}} = 0,16 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ) była dwukrotnie wyższa niż podczas fazy stacjonarnej. Podobnie wysoką szybkość właściwą produkcji CA stwierdzono dla szczepu *Y. lipolytica* 187/1 w podłożu z olejem rzepakowym, a także dla szczepu *Y. lipolytica* H222-S4(p671CLI) T5 w hodowlach zawierających sacharozę [Kamzolova i in. 2005, Förster i in. 2007].

W podłożu z glicerolem od początku procesu stwierdzono obecność erytrytolu w środowisku hodowlanym, którego końcowe stężenie wynosiło  $19,3 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Produkcja mannitolu rozpoczęła się po zakończeniu logarytmicznej fazy wzrostu i na końcu hodowli wynosiła aż  $10,2 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ .



Rys. 2A. Produkcja biomasy [X], kwasu cytrynowego [CA], erytrytolu [ER] i mannitolu [MAN] oraz zużycie glicerolu [GLY] przez *Y. lipolytica* Wratislavia K1 w hodowli okresowej

Fig. 2A. Production of biomass [X], citric acid [CA], erythritol [ER] and mannitol [MAN] and glycerol consumption [GLY] by *Y. lipolytica* Wratislavia K1 in batch bioreactor experiments

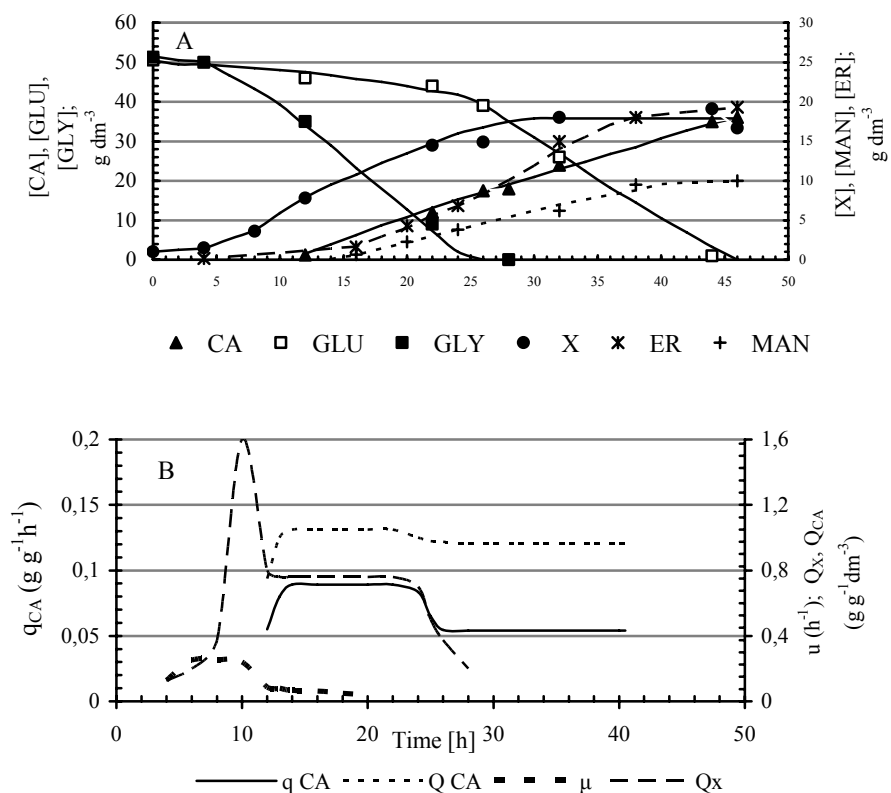
Rys. 2B. Szybkości produkcji biomasy ( $\mu$ ,  $Q_X$ ) i kwasu cytrynowego ( $q_{CA}$ ,  $Q_{CA}$ ) w funkcji czasu hodowli

Fig. 2B. Specific growth rate ( $\mu$ ), volumetric biomass productivity ( $Q_X$ ), specific rate of citric acid production ( $q_{CA}$ ) and volumetric citric acid productivity ( $Q_{CA}$ ) as a function of culture time

W hodowli, w której zastosowano glicerol i glukozę jako źródło węgla, stwierdzono wydłużenie procesu do 46 h (rys. 3A). Interesujący jest fakt, że drożdże najpierw utylizowały glicerol, a dopiero po jego wyczerpaniu ze środowiska hodowlanego korzystały z glukozy jako źródła węgla. Podobne zjawisko obserwowano m.in. u zrekombinowanych szczepów *Y. lipolytica*, wykazujących aktywność inwertazową w podłożach zawierających sacharozę. Szczepy te najpierw wykorzystywały glukozę, która stanowiła substrat zdecydowanie lepszy metabolicznie, a dopiero po jej wyczerpaniu utylizowały fruktozę [Kautola i in. 1992].

Podobnie jak w wyżej opisanych procesach z jednym źródłem węgla – w przebiegu wzrostu drożdży wyróżniono lag fazę, fazę logarytmiczną ( $\mu_{\max} = 0,25 \text{ h}^{-1}$ ) i fazę liniową, w której objętościowa szybkość produkcji biomasy ( $Q_X = 0,76 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$ ) była nieco tylko niższa niż we wcześniejszych procesach (rys. 3B). Fazę stacjonarną drożdże osiągnęły po 24 h procesu przy poziomie biomasy wynoszącym  $17,9 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$  (rys. 3A).

W procesie tym uzyskano  $36 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$  kwasu cytrynowego,  $14,9 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$  erytrytolu i  $5,8 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$  mannitolu (rys. 3A). W przebiegu krzywej tworzenia CA wyróżniono dwa etapy produkcji kwasu, przebiegającej z różną szybkością. Z jednej strony można przypuszczać, że zjawisko fazowości tworzenia CA w tym procesie mogło być spowodowane przejściem drożdży z fazy wzrostu liniowego w fazę stacjonarną. Z drugiej zaś warto jednak zauważyć, że w pierwszym etapie CA był tworzony z glicerolu, natomiast w drugim – powstawał z glukozy. Szybkości produkcji CA ( $Q_X$ ,  $q_{CA}$ ) w hodowli z glicerolem (rys. 2B) były wyższe, niż odnośne parametry uzyskane w procesie z glukozą (rys. 1B, 3B).



Rys. 3A. Produkcja biomasy [X], kwasu cytrynowego [CA], erytrytolu [ER] i mannitolu [MAN] oraz zużycie glicerolu [GLY] i glukozy [GLU] przez *Y. lipolytica* Wratislavia K1 w skojarzonej hodowli okresowej

Fig. 3A. Production of biomass [X], citric acid [CA], erythritol [ER] and mannitol [MAN] and degradation of glycerol [GLY] and glucose [GLU] in a batch mixed culture of *Y. lipolytica* Wratislavia K1

Rys. 3B. Szybkości produkcji biomasy ( $\mu$ ,  $Q_X$ ) i kwasu cytrynowego ( $q_{CA}$ ,  $Q_{CA}$ ) w funkcji czasu hodowli

Fig. 3B. Specific growth rate ( $\mu$ ), volumetric biomass productivity ( $Q_X$ ), specific rate of citric acid production ( $q_{CA}$ ) and volumetric citric acid productivity ( $Q_{CA}$ ) as a function of culture time

Przydatność drobnoustrojów w biotechnologii oceniana jest m.in. według takich cech użytkowych, jak: wydajność i szybkość tworzenia produktu; czystość produktu fermentacji; szybkość wzrostu; niepatogeniczność i brak produktów toksycznych; stabilność genetyczna i fenotypowa; wymagania pokarmowe, w tym przede wszystkim zdolność do utylizacji obecnych w środowisku fermentacyjnym źródeł węgla i energii oraz tolerancja na zmienne stężenie składników podłoża [Chmiel 1994]. W przeprowadzonych procesach biosyntezy CA przez drożdże *Y. lipolytica* Wratislavia K1 do produkcji kwasu wykorzystano nieoczyszczony glicerol, pochodzący z produkcji biodiesla, zawierający liczne zanieczyszczenia, w tym aż  $65 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$  NaCl. Nieoczyszczony glicerol był dobrym surowcem do produkcji CA. Zanieczyszczenia zawarte w glicerolu nie miały istotnego wpływu na parametry kinetyczne i wydajność procesu biosyntezy, co obrazują tab. 1 i 2. Procesy hodowlane, prowadzone w podłożu zawierającym glicerol odpadowy z czystą glukozą, zmieszane w stosunku 1:1, były zdecydowanie krótsze od tych, w których wykorzystano czyste źródła węgla. We wszystkich prezentowanych w niniejszej pracy hodowlach biosynteza CA prowadzona była w warunkach limitacji wzrostu stężeniem azotu amonowego na poziomie  $3 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$   $\text{NH}_4\text{Cl}$ , co w syntetycznym podłożu hodowlanym powinno zapewniać zbliżony plon biomasy w przypadku tego samego szczepu i źródła węgla. Jednak obfity wzrost szczepu w podłożu z glicerolem odpadowym ( $28 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ ), w porównaniu do glicerolu czystego ( $15,7 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ ), wskazuje prawdopodobnie na obecność przyswajalnego źródła azotu dla drożdży, co spowodowało wzrost stężenia biomasy. Przy tak wysokim poziomie biomasy pozostawała w pożywce mniejsza ilość źródła węgla, która mogła być przekształcona w CA. W efekcie końcowe stężenia CA wynosiły odpowiednio 22 i  $29 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ , odpowiednio w hodowli na glicerolu odpadowym i w hodowli skojarzonej (tab. 1). Nasuwa się przypuszczenie, że gdyby w tych procesach zastosowano niższe stężenie źródła azotu, ilość CA byłaby zdecydowanie wyższa. W podłożu z glicerolem odpadowym wydzielanie CA do środowiska przebiegało z tą samą szybkością objętościową ( $Q_{\text{CA}} = 1,0 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$ ) od około 12 h.

Tabela 1. Parametry kinetyczne wzrostu i biosyntezy kwasu cytrynowego z różnych substratów przez szczep *Y. lipolytica* Wratislavia K1

Table 1. Kinetic parameters of growth and citric acid fermentation on various substrates by strain of *Y. lipolytica* Wratislavia K1 strain

Parametr – Parameter	Glicerol odpadowy Crude glycerol	Glicerol odpadowy + glukoza (1:1) Crude glycerol + glucose (1:1)
Czas – Time, [h]	32	37,5
Biomasa – Biomass, X [ $\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ ]	28	28,2
Kwas cytrynowy – Citric acid, CA [ $\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ ]	22	29
Kwas izocytrynowy Isocitric acid, ICA [ $\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ ]	0,51	0,64
Erytrytol – Erythrytol, ER [ $\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ ]	16,0	9,8
Mannitol – Mannitol, MAN [ $\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ ]	5,8	3,3
$M_{\text{max}}$ [ $\text{h}^{-1}$ ]	0,227	0,225
$Q_X$ [ $\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$ ]	1,33	1,09
$q_{\text{CA}}^{\text{g}}$ [ $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ]	0,059	0,058
$q_{\text{CA}}^{\text{n-g}}$ [ $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ]	0,036	0,033
$Q_{\text{CA}}^{\text{g}}$ [ $\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$ ]	1,0	1,19
$Q_{\text{CA}}^{\text{n-g}}$ [ $\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$ ]	1,0	0,94



Tabela 2. Produkcja kwasu izocytrynowego przez *Y. lipolytica* Wratislavia K1 w hodowlach okresowych zawierających różne źródła węglaTable 2. Isocitric acid production by *Y. lipolytica* Wratislavia K1 strain in batch cultures with different kind of substrates

Parametr Parameter	Źródło węgla Carbon source				
	Czysty glicerol Pure glycerol	Glukoza Glucose	Czysty glicerol + glukoza (1:1) Pure glycerol + glucose (1:1)	Glicerol odpadowy Crude glycerol	Glicerol odpadowy + glukoza (1:1) Crude glycerol + glucose (1:1)
ICA [g·dm <sup>-3</sup> ]	0,56	1,31	1,44	0,51	0,64

Biorąc pod uwagę fakt, że jednym z kryteriów doboru szczepów przemysłowych jest czystość produktu fermentacji, w tym wypadku jak najmniejszy udział ICA w sumie kwasów, mutant octanowy Wratislavia K1 może być atrakcyjny przemysłowo. Naturalne szczepy drożdży akumulują CA ze znacznym udziałem ICA, zwłaszcza w podłożach niewęglowodanowych. Jego zawartość w sumie kwasów może sięgać nawet 50% w podłożach z n-parafinami i jeszcze więcej w pożywkach z alkoholami. W podłożach glukozowych czystość procesu jest zwykle wyższa, a CA stanowi 80–90% sumy tworzonych kwasów cytrynowych. Według autorów niniejszej pracy ilość ubocznie powstającego ICA nie przekraczała 1,4 g·dm<sup>-3</sup> (tab. 2). Podobnie niską produkcję ICA ten sam szczep prezentował podczas hodowli z wyższą zawartością glicerolu [Rymowicz i in. 2006] oraz podczas ciągłej biosyntezy CA w reaktorze membranowym z syropu fruktozowego i glukozowego [Rywińska i in. 2004, Żarowska i in. 2004]. Cechą charakterystyczną dla mutantu oct *Y. lipolytica* Wratislavia K1 była nadprodukcja alkoholi cukrowych w podłożach zawierających glicerol i glukozę jako źródło węgla. Ilość tych polioli zależała w dużym stopniu od zastosowanego źródła węgla. Powstawanie alkoholi cukrowych należy traktować jako produkty uboczne, co obniża selektywność procesu biosyntezy CA przez ten szczep drożdży. W efekcie, powstający erytrytol i mannitol wraz z wysokim plonem biomasy wpłynęły na niższą, niż można się było spodziewać, wydajność całkowitą procesu biosyntezy CA ( $Y_{CA}^t$ ), jako że parametr ten włącza substrat zużyty również na produkcję biomasy. Największą wartość tego parametru, 0,38 g·g<sup>-1</sup>, osiągnięto w podłożu z czystym glicerolem, nieco niższą w procesie z czystym glicerolem zmieszonym z glukozą. Z kolei efektywność konwersji substratu do CA, ( $Y_{CA}^p$ ), gdzie parametr ten nie obejmuje substratu zużywanego na syntezę biomasy, była bardzo wysoka, 1,35 g·g<sup>-1</sup>, w procesie z glicerolem odpadowym zmieszonym z glukozą. Wartość tego parametru była znacznie wyższa od uzyskanych przez inne szczepy *Yarrowia lipolytica* w hodowlach z glukozą [Enzminger i Asejno 1986, Klasson 1989, Stottmeister 1979].

Wydajność całkowita erytrytolu i mannitolu,  $Y_{ER}^t$ ,  $Y_{MAN}^t$ , była najwyższa w hodowli z czystym glicerolem, odpowiednio 0,19 g·g<sup>-1</sup> i 0,1 g·g<sup>-1</sup>. Natomiast, o ile w procesie z glicerolem odpadowym wydajność erytrytolu była tylko nieco niższa, o tyle wydajność mannitolu w tej hodowli znacznie się obniżyła. Może to świadczyć o tym, że duża ilość soli lub innych składników zawartych w tym produkcie odpadowym wpływa hamująco na syntezę mannitolu i może być cenną informacją wykorzystaną w przyszłości w celu wyeliminowania tego metabolitu ze środowiska hodowlanego szczepu Wratislavia K1.

Tabela 3. Wpływ źródła węgla na wydajność biomasy ( $Y_{X/S}$ ) i produktów ( $Y_{CA}^t$ ,  $Y_{CA}^p$ ,  $Y_{ER}^t$ ,  $Y_{MAN}^t$ ) w hodowli okresowej szczepu *Y. lipolytica* Wratislavia K1  
 Table 3. Effect of carbon source on biomass yield ( $Y_{X/S}$ ) and products yields ( $Y_{CA}^t$ ,  $Y_{CA}^p$ ,  $Y_{ER}^t$ ,  $Y_{MAN}^t$ ) in batch fermentation with *Y. lipolytica* Wratislavia K1 strain

Parametr Parameter	Źródło węgla Carbon source				
	Glukoza Glucose	Czysty glicerol Pure glycerol	Czysty glicerol + glukoza (1:1) Pure glycerol + glucose (1:1)	Glicerol odpadowy Crude glycerol	Glicerol odpadowy + glukoza (1:1) Crude glycerol + glucose (1:1)
$Y_{X/S}$ [g·g <sup>-1</sup> ]	0,60	0,26	0,29	0,42	0,34
$Y_{CA}^t$ [g·g <sup>-1</sup> ]	0,295	0,377	0,356	0,21	0,278
$Y_{CA}^p$ [g·g <sup>-1</sup> ]	0,46	0,96	0,91	0,62	1,35
$Y_{ER}^t$ [g·g <sup>-1</sup> ]	0,101	0,194	0,147	0,156	0,094
$Y_{MAN}^t$ [g·g <sup>-1</sup> ]	0,072	0,1	0,057	0,057	0,0316

Podsumowując wyniki badań, stwierdzić można, że dynamika wzrostu drożdży oraz efektywność produkcji biomasy, uzależniona od wykorzystanego źródła węgla, była najwyższa w hodowli z glukozą (wydajność wzrostu  $Y_{X/S}=0,60$  g·g<sup>-1</sup>). W hodowli z czystym glicerolem uzyskano natomiast najwyższą wydajność CA ( $Y_{CA}^t=0,37$  g·g<sup>-1</sup>). W podłożu z glicerolem odpadowym wydajność CA, ze względu na wysoki plon biomasy, była niższa i wynosiła  $Y_{CA}^t=0,21$  g·g<sup>-1</sup>. W hodowlach skojarzonych, w których zastosowano glicerol i glukozę, drożdże w pierwszej kolejności korzystały z glicerolu, a dopiero po jego wyczerpaniu utylizowały glukozę. W hodowlach z glukozą stwierdzono niższą szybkość właściwą i objętościową produkcji CA w porównaniu do hodowli, w których stosowano glicerol. We wszystkich procesach hodowlanych, równolegle z CA, tworzone były alkohole cukrowe, erytrytol i mannitol, których najwyższe stężenie otrzymano w hodowlach z czystym glicerolem, odpowiednio 19,3 i 10,02 g·dm<sup>-3</sup>. Wskazuje to na możliwość potencjalnego zastosowania szczepu Wratislavia K1 do biosyntezy polioli z glicerolu, zwłaszcza erytrytolu.

## PIŚMIENNICTWO

- Anastassiadis S., Rhem H., 2005. Continuous citric acid secretion by a high specific pH dependent active transport system in yeast *Candida oleophila* ATCC 20177. *Electron. J. Biotechnol.* 8, 147–161.
- Arzumanov T.E., Shishkanova N.V., Finogenova T.V., 2000. Biosynthesis of citric acid by *Yarrowia lipolytica* repeat-batch on culture on ethanol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53 (5), 525–529.
- Bubbico R., Presti S., Bravi M., Moresi M., Spinosi M., 1996. Repeated batch citrate production by *Yarrowia lipolytica* using yeast recycling by cross-flow microfiltration. *Agro Food-Ind. Hi-Tech.* 3, 35–38.
- Chmiel A., 1994. *Biotechnologia. Podstawy mikrobiologiczne i biochemiczne*. PWN, Warszawa.
- Crolla A., Kennedy K.J., 2001. Optimization of citric acid production from *Candida lipolytica* Y-1095 using n-paraffin. *J. Biotechnol.* 89, 27–40.
- Enzminger J.D., Asejno J.A., 1986. Use of cell recycle in the aerobic fermentative production of citric acid by yeast. *Biotechnol. Letters.* 8 (1), 7–12.

- Finogenova T.V., Morgunov I.G., Kamzolova S.V., Cheryavskaya O.G., 2005. Organic acid production by the yeast *Yarrowia lipolytica*: a review of prospects. Appl. Biochem. Microbiol. 41, 418–425.
- Förster A., Aurich A., Mauersberger S., Barth G., 2007. Citric acid production from sucrose using a recombinant strain of the yeast *Yarrowia lipolytica*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 75, 1409–1417.
- Goldberg D., Ellis G., 1983. Isocitrate dehydrogenase. [In:] Bergmeyer HU (ed). Methods of enzymatic analysis. Verlag Chemie, Weinheim, 3, 183–190.
- Kamzolova S.V., Morgunov I.G., Aurich A., Perevoznikova O.A., Shishkanova N.V., Finogenova T.V., Stottmeister U., 2005. Lipase secretion and citric acid production in *Yarrowia lipolytica* yeast grown on animal and vegetable fat. Food Technol. Biotechnol. 43, 113–122.
- Kautola K., Rymowicz W., Linko Y.Y., Linko P., 1992. The utilization of beet molasses in citric acid production with yeast. Sci. Aliments. 12 (3), 383–392.
- Klasson T.K., Clausen E.C., Gaddy J.L., 1989. Continuous fermentation for the production of citric acid from glucose. Appl. Biochem. Biotechnol. 20/21, 491–509.
- Marchal R., Chaude O., Metche M., 1977. Production of citric acid from n-paraffins by *Saccharomycopsis lipolytica*. Kinetics and balance of the fermentation. Europ. J. Appl. Microb. 4, 111–123.
- Moresi M., 1994. Effect of Glucose Concentration on citric acid production by *Yarrowia lipolytica*. J. Chem. Tech. Biotechnol. 60, 387–395.
- Moresi M., Spinosi M., Sebastiani E., Liuzzo G., Marinelli R., 1980. Kinetics of citric acid fermentation from n-paraffins by yeasts. J. Chem. Tech. Biotechnol. 30, 266–277.
- Pachauri N., He B., 2006. Value – added utilization of crude glycerol from biodiesel production: A survey of current research activities. American Society of Agricultural and Biological Engineers ASABE Paper No 066223, 2–15.
- Parente E., Ricciardi A., Mancino M., Moresi M., 1995. Produzione di acido citrico da *Yarrowia lipolytica* con riciclo di biomassa per centrifugazione a secca. Ann. Microbiol. Enzimol. 45, 97–107.
- Papanikolaou S., Aggelis G., 2003. Modelling aspects of the biotechnological valorization of raw glycerol: production of citric acid by *Yarrowia lipolytica* and 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum*. J. Chem. Technol. Biot. 78, 542–547.
- Papanikolaou S., Muniglia L., Chevalot I., Aggelis G., Marc I., 2002. *Yarrowia lipolytica* as a potential producer of citric acid from raw glycerol. J. Appl. Microbiol. 92, 737–744.
- Pazouki M., Panda T., 1998. Recovery of citric acid – a review. Bioprocess Engineering 19, 435–439.
- Rymowicz W., Rywińska A., Gładkowski W., 2008. Simultaneous production of citric acid and erythritol from crude glycerol by *Yarrowia lipolytica* Wratysłavia K1. Chem. Pap. w druku.
- Rymowicz W., Rywińska A., Żarowska B., Juszczak P., 2006. Citric acid production from raw glycerol by acetate mutants of *Yarrowia lipolytica*. Chem. Pap. 60, 391–394.
- Rywińska A., Wojtatowicz M., Rymowicz W., 2006. Citric acid biosynthesis by *Yarrowia lipolytica* A-101-1.31 under deficiency of various medium macrocomponents. Elektron. J. Polish Agricult. Univers. 9:1.
- Rywińska A., Rymowicz W., Żarowska B., Musiał I., 2004. Characteristics of physiology state of *Yarrowia lipolytica* mutants during continuous citric acid production in membrane reactor on glucose syrup (in polish). Acta Scient. Polon. Biotechnol. 3 (1–2), 85–95.
- Soccol C.R., Vandenberghe L.P.S., Rodrigues C., Pandey A., 2006. Citric acid production. Food Technol. Biotechnol. 44, 141–149.
- Stottmeister U., 1979. Kontinuierliche Zitronensäure-synthese mit in Polyacrylamidgel immobilisierten *C. lipolytica*. Zellen. Z. Allg. Microbiol. 19 (10), 763–765.

- Wojtatowicz M., Rymowicz W., 1991. Effect of inoculum on kinetics and yield of citric acids production on glucose by *Yarrowia lipolytica* A-101. Acta Aliment. Pol., XVII /XLI/ (2), 137–141.
- Wojtatowicz M., Rymowicz W., 1990. Kinetic of citric acid fermentation from glucose and glucose hydrol by *Y. lipolytica* in batch culture (in polish). Przem. Ferm. Owoc.-Warz. 5, 26–28.
- Wojtatowicz M., Rymowicz W., Kautola H., 1991. Comparison of different strains of the yeast *Yarrowia lipolytica* A-101 for citric acid production from glucose hydrol. Appl. Biochem. Biotechnol. 31, 165–174.
- Venter T., Kock J.L. F., Botes P.J., Smit M.S., Hugo A., Joseph M., 2004. Acetate enhances citric acid production by *Yarrowia lipolytica* when grown on sunflower oil. Syst. Appl. Microbiol. 27, 135–138.
- Żarowska B., Rymowicz W., Rywińska A., Musiał I., 2004. Characteristics of continuous citric acid biosynthesis by acetate mutants of *Yarrowia lipolytica* on fructose syrup (in polish). Acta Scient. Polon. Biotechnol. 3 (1–2), 85–95.

#### CHARACTERISTICS OF CITRIC ACID AND SOME POLYOLS BIOSYNTHESIS FROM GLYCEROL AND GLUCOSE BY *YARROWIA LIPOLYTICA* YEAST

**Abstract.** *Yarrowia lipolytica* Wratislavia K1 strain was grown in nitrogen-limited aerobic cultures on pure glycerol, raw glycerol, glucose and mixture of glycerol and glucose. Two mixtures were used: first with pure glycerol and second with raw glycerol. Kinetic parameters of growth and citric acid production were determined.

The highest biomass yield ( $Y_{X/S}=0.6 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) was obtained in the medium containing glucose as a carbon source. The highest citric acid concentration of  $37.5 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$  and citric acid yield of  $0.37 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$  were reached with a medium containing pure glycerol.

In all processes *Y. lipolytica* Wratislavia K1 strain produced sugar alcohols such as erythritol and mannitol. The highest concentration of these polyols (erythritol and mannitol) were determined in the culture containing pure glycerol,  $19.3 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$  and  $10.1 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ , respectively.

**Key words:** *Yarrowia lipolytica*, citric acid, erythritol, mannitol, glycerol, glucose

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 31.03.2008

Do cytowania – For citation: Rywińska A., Skrzypiński A., Juszczyk A., Boruckowski T., Rymowicz W., 2008. Charakterystyka procesu biosyntezy kwasu cytrynowego i polioli z glicerolu i glukozy przez drożdże *Yarrowia Lipolytica*. Acta Sci. Pol. Biotechnol. 7(1), 27-38.

## SPIS TREŚCI CONTENTS

### **Kamila Bokszczanin, Andrzej A. Przybyła**

Aktualny stan wiedzy z zakresu genetyki  
ważniejszych roślin sadowniczych i zastosowanie jej w praktyce ..... 3  
The present stage of knowledge on genetics  
of more important fruit plants and application  
of this knowledge in the practice

### **Anna Kancelista, Danuta Witkowska**

Biosynteza wybranych enzymów litycznych  
w podłożu zawierającym odpadki kukurydziane  
przez grzyby strzępkowe z rodzaju *Trichoderma*..... 17  
Biosynthesis of some lytic enzymes  
in medium containing waste corn cobs  
by filamentous fungi from *Trichoderma* genus

### **Anita Rywińska, Adam Skrzypiński, Piotr Juszczyk, Tomasz Boruckowski, Waldemar Rymowicz**

Charakterystyka procesu biosyntezy kwasu cytrynowego i polioli  
z glicerolu i glukozy przez drożdże *Yarrowia lipolytica*..... 27  
Characteristics of citric acid and some polyols biosynthesis  
from glycerol and glucose by *Yarrowia lipolytica* yeast