

ACTA SCIENTIARUM POLONORUM

Czasopismo naukowe założone w 2001 roku przez polskie uczelnie rolnicze

Biotechnologia

Biotechnologia

7(3) 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:

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 <http://www.up.wroc.pl>

Nakład 200 + 16 egz. Ark. druk. 2,75

Druk i oprawa: Wydawnictwo Tekst Sp. z o.o.
ul. Kossaka 72, 85-307 Bydgoszcz

OCENA ZDOLNOŚCI DROŹDŹY *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* DO FERMENTACJI MONOSACHARYDÓW POCHODNYCH LAKTOZY

Małgorzata Lewandowska, Agnieszka Piotrowicz-Cieślak

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Streszczenie. Przeprowadzono charakterystykę przemysłowych drożdży gorzelnicznych *Saccharomyces cerevisiae* pod względem zdolności do fermentacji monosacharydów, pochodnych laktozy. Oceniono ich naturalne predyspozycje do fermentacji podłoży z udziałem hydrolizatów laktozy (12%), jak również szybkość zużywania cukrów w testowym podłożu fermentacyjnym (6%glu+6%gal) w zależności od sposobu wstępnej propagacji drożdży: na typowym podłożu z glukozą lub na podłożach adaptacyjnych: z galaktozą albo mannozą.

Stwierdzono, że stężenie alkoholu w uzyskanych po fermentacji pochodnych laktozy z udziałem badanych drożdży nie przekroczyło 4% v:v. Dzięki przeprowadzonej analizie chromatograficznej sacharydów oceniono szybkość ich wykorzystania w fermentującej mieszaninie. Stwierdzono efekt opóźnienia wykorzystania galaktozy przez drożdże, wywołany zjawiskiem represji glukozy. Wstępna propagacja badanych drożdży na podłożach adaptacyjnych przed procesem fermentacji spowodowała przyspieszenie momentu asymilacji galaktozy, skutkując zwiększeniem końcowego stężenia alkoholu do 4,2–4,4% v:v.

Słowa kluczowe: drożdże gorzelniczne, laktoza, fermentacja, etanol, represja glukozy

WSTĘP

W ostatnich latach obserwuje się dążenie do rozwoju energetyki odnawialnej. Jest ono związane z ukierunkowaniem zainteresowań badawczych na wykorzystanie nadwyżki płodów rolnych czy też produktów ubocznych przemysłu spożywczego, jak również z intensywnym zmniejszaniem się zasobów kopalnych surowców energetycznych. Spośród biotechnologicznych metod służących pozyskiwaniu energii można wymienić fermentację alkoholową, której produkt – etanol może być dodatkiem do benzyn.

Głównym produktem ubocznym przemysłu mleczarskiego jest serwatka, stanowiąca bogate źródło laktozy – dwucukru wykorzystywanego w ograniczonym zakresie, ze względu na słabą rozpuszczalność, niską słodkość i nietolerancję przez niektóre organizmy [Szczerbak 2000].

Adres do korespondencji – Corresponding author: Małgorzata Lewandowska, Katedra Biotechnologii Żywności, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, ul. Heweliusza 1, 10-718 Olsztyn; e-mail: malgorzata.lewandowska@uwm.edu.pl

W wielu krajach rozwiniętych gospodarczo, np. Irlandii, USA, Nowej Zelandii serwatkę stosuje się jako surowiec do produkcji etanolu. Zainteresowanie otrzymaniem etanolu z tego produktu ubocznego jest uzasadnione względami takimi, jak możliwość zaoszczędzenia tradycyjnych surowców (melasa, ziemniaki), koniecznością ochrony środowiska (BZT₅ serwatki wynosi 30 g O₂·dm⁻³); dobrą jakością końcowego produktu – nie odbiegającego od jakości alkoholu otrzymanego z tradycyjnych surowców [Molska 1985]. Ze względu na coraz powszechniejsze wykorzystanie procesów membranowych w przetwórstwie mleka i serwatki spora ilość laktozy koniecznej do zagospodarowania pozostaje w permeacie, odcieku po ultrafiltracji [Gonzalez Siso 1996]. Pozbawiony białek, bogaty w laktozę permeat może być dobrym substratem do fermentacji alkoholowej. Ważną przeszkodą utrudniającą powszechne wykorzystanie wymienionych produktów odpadowych w gorzelnictwie jest mało atrakcyjna wydajność fermentacji etanolowej laktozy przez drożdże tzw. laktozowe, np. *Kluyveromyces fragilis* [Golubev i Golubev 2004]. Nie bez znaczenia jest również poziom stężenia wymienionego cukru w serwatce lub w permeacie decydujący o wydajności procesu fermentacyjnego. Zawartość innych składników, takich jak kwasy organiczne oraz związki azotowe i fosforowe – niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania drożdży, można odpowiednio modyfikować. Ze względów ekonomicznych celowe wydaje się więc wykorzystanie permeatu lub serwatki w formie 2–3-krotnie skoncentrowanej. Takie działanie prowadzi z kolei do nadmiernego wzrostu ciśnienia osmotycznego obniżającego aktywność drożdży. Niezbędne wydają się wówczas zabiegi powodujące częściowe odmineralizowanie koncentratu serwatki do zawartości co najwyżej 0,7–1,0% popiołu [Popko i in. 1992]. Wśród typowych drożdży gorzelnicznych występuje wiele szczepów o wysokiej osmotolerancji, jednak nie są one z kolei w stanie bezpośrednio fermentować laktozy ze względu na brak odpowiedniego aparatu enzymatycznego. Warunkiem ich wykorzystania w fermentacji laktozy jest jej wspomaganie enzymatyczną hydrolizą z udziałem β-galaktozydazy. Powstające w wyniku tego zabiegu cukry proste: glukoza i galaktoza nie podlegają jednak fermentacji w efektywny sposób: związane jest to z powszechnym zjawiskiem represji katabolicznej, które towarzyszy wszelkim reakcjom zachodzącym w środowisku zawierającym kilka konkurencyjnych źródeł węgla. Glukoza jako substrat najłatwiej przyswajalny wywiera inhibujący wpływ na ekspresję genów odpowiedzialnych za aktywację enzymów umożliwiających wykorzystanie konkurencyjnej galaktozy. Daje to efekt sekwencyjnego wykorzystywania dostępnych cukrów i skutkuje wydłużeniem procesu fermentacyjnego. Większość szczepów z gatunku *S. cerevisiae* charakteryzuje się właśnie takimi właściwościami. Zdarzają się jednak wyjątki, które w większym lub mniejszym stopniu są odporne na represję glukozy. Może to być spowodowane zarówno naturalnymi cechami danego szczepu, jak i przypadkowymi mutacjami [Keating 2004]. Doniesienia literaturowe dotyczące zakresu badań prowadzonych nad problemem represji katabolicznej wskazują, że nadal jest to problem nie rozwiązany. Stosowanie adaptacji drobnoustroju na odpowiednim podłożu w celu indukcji biosyntezy zakodowanych w jego genomie enzymów może prowadzić do wzrostu zdolności degradacyjnych określonego ksenobiotyku. Tego typu zabieg może być pośrednio przyczyną mutacji prowadzących do rozszerzenia szlaku metabolicznego (ekspansja horyzontalna) [Fiedurek 2007]. Techniki inżynierii genetycznej pozwalają na efektywne modyfikowanie pożądanых cech drobnoustrojów poprzez przenoszenie odpowiednich genów i ich amplifikację [Olsson i Nielsen 2000, Rodriguez i wsp. 2003, Beccerra i in. 2002, Sedlak i Ho 2004, Rubio-Teixeira 2005]. Badania prowadzone od szeregu lat

w tym kierunku wskazują na często spotykaną niestabilność mitotyczną konstruowanych szczepów bądź też osłabienie innych ważnych cech (np. szybkość wzrostu) [Rubio-Teixeira i in. 2000]. Niemniej jednak są to działania najbardziej obiecujące. Nieliczne literaturowe przykłady badań dotyczących poprawy zdolności fermentacyjnych drożdży *S. cerevisiae* bez ingerencji w DNA świadczą o tym, że nie jest to łatwe zadanie. Jednak skryning, adaptacja i mutacje naturalne są łatwiej akceptowane przez potencjalnych producentów, ze względu na panującą ogólnie niechęć do genetycznie modyfikowanych organizmów, a także z powodu skomplikowanych procedur legislacyjnych wymaganych do ich stosowania.

Celem pracy była charakterystyka naturalnych zdolności przemysłowych drożdży *Saccharomyces cerevisiae* do fermentacji pochodnych laktozy oraz ocena wpływu zabiegów wstępnej propagacji na dynamikę wykorzystania konkurencyjnych cukrów w podłożu fermentacyjnym.

MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Surowcami do badań były: zbożowy zacier gorzelniczy pochodzący z gorzelni w Bartężku k. Morąga, suszony permeat po ultrafiltracji serwatki pozyskany z Zakładu Mleczarskiego w Ostrowii Mazowieckiej oraz cukry – źródła węgla do podłoży fermentacyjnych pochodzenia handlowego: laktoza (POCh), glukoza (POCh), D+galaktoza (Fluka), D+mannoza (Fluka). W doświadczeniach wykorzystano ponadto handlowy preparat β -D-galaktozydazy z *A. oryzae* (SIGMA).

Materiał badawczy stanowiły dwa szczepy przemysłowych termofilnych drożdży gorzelniczych *Saccharomyces cerevisiae* AS4 oraz *Sccharomyces cerevisiae* D2 pozyskane z kolekcji SPG-IBPRS w Bydgoszczy.

Drożdże hodowano na skosach YPG w temp. 38°C, przeszczepiając co 30 dni na nowe podłoże. Skład podłoża YPG: 20 g glukozy, 20 g peptonu, 10 g ekstraktu drożdżowego, 20 g agaru rozpuszczono w 1 dm³ wody, ustalając kwasowość na poziomie pH 5,0 przy udziale 1M roztworu HCl. Inoculum do procesu fermentacyjnego przygotowano na płynnym podłożu YPG. Doświadczenia charakteryzujące zdolności fermentacyjne badanych szczepów drożdży prowadzono metodą okresową w warunkach bez-tlenowych, stosując następujące parametry: temp. 38°C, czas 72 h, dodatek inoculum – 10% (w postaci 24-h hodowli wstrząsanej na podłożu YPG), wykorzystując następujące podłoża fermentacyjne: zacier zbożowy 16°Blg (próby kontrolne), podłoże z permeatem (12% laktozy), podłoże z laktozą (12%), podłoże z glukozą i galaktozą (6%+6%). Każde z ww. podłoży uzupełniano źródłami azotu i fosforu (9g (NH₄)₃PO₄ i 3,75 g ekstraktu drożdżowego w 1 dm³), natomiast podłoża z permeatem lub z laktozą uzupełniano dodatkiem preparatu β -D-galaktozydazy w proporcji 1:100 (g:g) względem laktozy. W trakcie fermentacji (co 24 h) oznaczano kwasowość (pH), ekstrakt rzeczywisty (°Blg), zawartość alkoholu (% v:v) oraz ilość wydzielonego CO₂ (g).

Na podstawie zawartości alkoholu wyznaczono następujące wskaźniki biotechnologiczne fermentacji: wydajność procesu – wyrażoną ilością wytworzonego 100%-procentowego alkoholu ze 100 kg dostępnego cukru [dm³A₁₀₀·10⁻² kg skrobi, laktozy lub heksozy] oraz sprawność fermentacji – jako % wydajności teoretycznej ze 100 kg skrobi, laktozy lub heksozy [%]. Na podstawie wielkości emisji CO₂ w kolejnych dobach procesu – określano energię fermentacji, wyrażając ją w % względem całkowitej

ilości CO₂ wydzielonego w trakcie całej fermentacji (w tym wypadku: 72 godz.). [Sałek 1989].

Doświadczenia charakteryzujące zdolności badanych drożdży do fermentacji pochodnych laktozy prowadzono na podłożu testowym z glukozą i galaktozą (6%glu+6%gal) w warunkach jw., stosując inoculum w postaci 24-h hodowli wstrząsanej na podłożu YPG lub na podłożu adaptacyjnym, w którym glukozę zastąpiono odpowiednim cukrem: galaktozą (YPGal) albo mannozą (YPMan). Oznaczeń charakteryzujących zdolności fermentacyjne badanych drożdży dokonywano: w odstępach 2-godzinnych, oznaczając zawartość cukrów (glukozy i galaktozy) w fermentującym podłożu metodą chromatografii gazowej, oraz w odstępach 3-godzinnych, mierząc ilość wydzielonego CO₂ (wagowo) i na tej podstawie wyznaczając energię fermentacji. W tym celu przeprowadzono 2 serie równoległych doświadczeń zainicjowane z 12-godzinnym przesunięciem czasowym.

OMÓWIENIE I Dyskusja Wyników

Charakterystyka szczepów drożdży gorzelnicznych

Szczep *Saccharomyces cerevisiae* As4 otrzymano w wyniku hybrydyzacji płciowej. Cechuje go duża trwałość i łatwość aklimatyzacji w lokalnych warunkach gorzelni. W trakcie fermentacji drożdże tego szczepu mogą być stosowane przez wiele miesięcy pod warunkiem, że zachowana jest czystość mikrobiologiczna. Komórki drożdży As4 są odporne na wysokie stężenia alkoholu (do 12%) oraz na podwyższone ciśnienie osmotyczne środowiska fermentacji spowodowane zwiększonym stężeniem cukrów w podłożu.

Drożdże *Saccharomyces cerevisiae* D2 wyizolowano pod koniec lat osiemdziesiątych. Charakteryzują się odpornością na końcowe stężenie alkoholu do 12–14%. W gorzelniach stosowane są w postaci suszonej, co upraszcza proces technologiczny wytwarzania spirytusu, umożliwiając rozpoczęcie fermentacji w dowolnym czasie bez konieczności sporządzania *inoculum*. Oba szczepy charakteryzują się ponadto wysoką dynamiką tworzenia etanolu [Czupryński i in. 2004].

Przed rozpoczęciem właściwych doświadczeń przeprowadzono kontrolne fermentacje z udziałem badanych drożdży, wykorzystując do tego celu typowy zbożowy zacier gorzelniczny o gęstości 16^oBłg. Stwierdzono, że badane szczepy charakteryzowały się zbliżonymi zdolnościami fermentacyjnymi: wysoka energia fermentacji (74–79%) pozwoliła na uzyskanie 6,4–6,7% v:v alkoholu w zacierze już po 24 h. Końcowa zawartość alkoholu w zacierze wyniosła 7,88% (szczep D2) i 8,12% v:v (szczep As4), a całkowita sprawność procesu przekroczyła wartość 80% (tab. 1). Niewielkie różnice zaobserwowane pomiędzy 2 i 3 dobą fermentacji zarówno w wielkości emisji CO₂ (0,06–0,07g·10⁻² g podłoża), jak i w stężeniu uzyskanego alkoholu w zacierze (0,05–0,21% v:v) dowiodły, że proces dobiegł końca. Było to zgodne z charakterystyką opisową badanych szczepów wskazującą na ich predyspozycje do prowadzenia fermentacji 2–3-dobowych [Czupryński i in. 2004].

Tabela 1. Charakterystyka fermentacji zacieru zbożowego (16°Błg) przez przemysłowe szczepy drożdży gorzelniczych *Saccharomyces cerevisiae* As4 i D2Table 1. Characteristics of cereal mash (16°Błg) fermentation by industrial strains of distillery yeast *Saccharomyces cerevisiae* As4 and D2

Szczep drożdży Strain of yeast		<i>S. cerevisiae</i> As4			<i>S. cerevisiae</i> D2		
		24 h	48 h	72 h	24h	48 h	72 h
Czas fermentacji Time of fermentation		24 h	48 h	72 h	24h	48 h	72 h
Wydzielony CO ₂ CO ₂ emission	[g·10 ⁻² g podłoża] [g·10 ⁻² g medium]	4,46	5,97	6,03	4,85	5,99	6,06
Energia fermentacji Fermentation energy	[%]	74,05	98,97	100	79, 97	98,84	100
Kwasowość Acidity	[pH]	4,22	4,17	4,07	4,27	4,27	4,01
Ekstrakt rzeczywisty Real extract	[°Błg]	3,27	1,90	1,43	2,70	1,68	1,60
Zawartość alkoholu Alcohol concentration	[% v:v]	6,43	7,91	8,12	6,76	7,83	7,88
Wydajność Productivity	[dm ³ A ₁₀₀ ·10 ⁻² kg skrobi] [dm ³ A ₁₀₀ ·10 ⁻² kg starch]	46,37	57,07	58,61	48,77	56,49	56,88
Sprawność całkowita fermentacji Total fermentation efficiency	[%]	64,56	79,46	81,61	67,91	78,66	79,20

Ocena naturalnych zdolności drożdży *S. cerevisiae* do fermentacji monosacharydów pochodnych laktozy

W pierwszej części badań przeprowadzono fermentację podłoży zawierających laktozę lub jej pochodne. Doświadczenia, w których źródłem węgla była czysta laktoza albo jej koncentrat (permeat), wspomagano dodatkiem preparatu enzymatycznego β-D-galaktozydazy. Oba szczepy badanych drożdży wykazywały się ograniczonymi zdolnościami do fermentacji pochodnych laktozy, czego efektem był niski poziom alkoholu w podłożach po 72 h procesu: od 3,17 do 3,70% v:v, co odpowiadało 42–48% sprawności procesu (tab. 2). Nie stwierdzono istotnego wpływu rodzaju cukru w podłożu na przebieg procesu (rys. 1). Szczep drożdży D2 wykazywał się minimalnie korzystniejszymi zdolnościami do odfermentowania cukrów prostych: glukozy i galaktozy niż szczep As4. Fermentacja etanolowa podłoża z permeatem z udziałem tego ostatniego przebiegała również mniej wydajnie: zawartość alkoholu po 72 h procesu była o ok. 0,5% niższa niż w analogicznym doświadczeniu z udziałem drożdży D2.

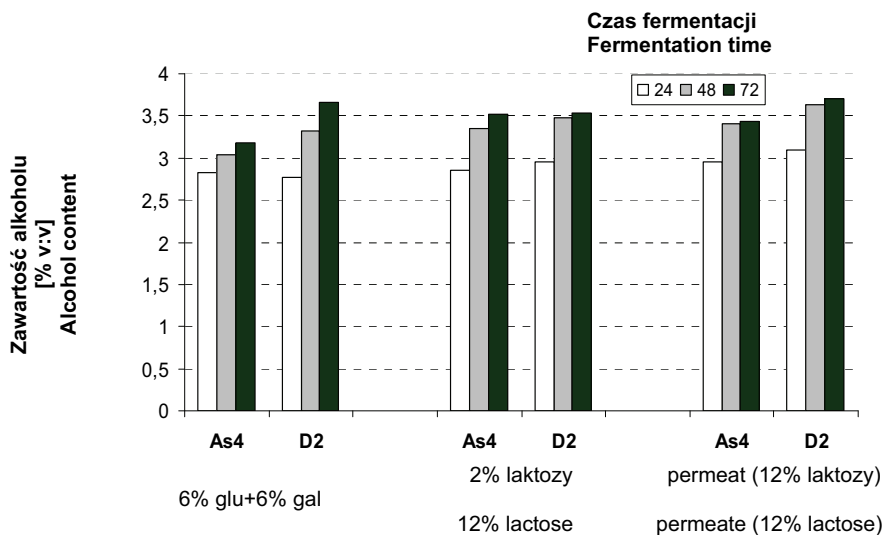
Wynikało to zapewne z faktu, że permeat oprócz laktozy zawierał frakcje niskocząsteczkowych białek oraz związki mineralne, które mogły utrudniać przebieg hydrolizy i fermentacji laktozy. Wydajność procesu mierzona ilością pozyskanego alkoholu (w przeliczeniu na EtOH 100-procentowy) ze 100 kg dostępnego cukru mieściła się w granicach 26,5–27,9 dm³ (szczep As4) oraz 29,5–30,5 dm³ (szczep D2) i w żadnym z doświadczeń nie przekroczyła 50% wydajności teoretycznej (tab. 2). Świadczyło to niewątpliwie o słabych zdolnościach badanych drożdży do fermentacji pochodnych laktozy – a w szczególności do wykorzystania galaktozy – cukru objętego problemem represji.

Podłoże 6%glu+6%gal wybrano do dalszych doświadczeń jako podłoże testowe do prześledzenia szybkości odfermentowywania każdego z zawartych w nim cukrów w zależności od zastosowanych zabiegów zmierzających do ograniczenia represji katabolicznej glukozy.

Tabela 2. Charakterystyka 72-h fermentacji podłoży zawierających pochodne laktozy z udziałem drożdży *Saccharomyces cerevisiae* As4 lub D2.

Table 2. Characteristics of 72-h fermentation of media containing lactose derivatives with yeast *Saccharomyces cerevisiae* As4 or D2

Szczep drożdży Strain of yeast	<i>S. cerevisiae</i> As4			<i>S. cerevisiae</i> D2		
	z permeatem (12% laktozy) with permeate (12% lactose)	12% laktozy 12% lactose	6% glu +6% gal	z permeatem (12% laktozy) with permeate (12% lactose)	12% laktozy 12 % lactose	6% glu +6% gal
Wydzielony CO ₂ [g·10 ⁻² g podłoża] CO ₂ emission [g·10 ⁻² g medium]	2,34	2,53	2,45	2,51	2,56	2,61
Energia fermentacji [%] Fermentation energy [%]	89,89	93,38	94,99	92,34	94,07	95,03
Kwasowość [pH] Acidity [pH]	4,6	4,07	3,95	4,54	4,11	3,87
Ekstrakt rzeczywisty [°B]g Real extract [°B]g]	7,30	6,47	6,45	7,73	6,40	6,55
Zawartość alkoholu [% v:v] Alcohol concentration [% v:v]	3,18	3,35	3,41	3,66	3,54	3,70
Wydajność [dm ³ A ₁₀₀ ·10 ⁻² kg laktozy lub heksozy] Productivity [dm ³ A ₁₀₀ ·10 ⁻² kg lactose or hexose]	26,53	27,92	26,99	30,50	29,50	29,28
Sprawność całkowita fermentacji [%] Total fermentation efficiency [%]	41,94	44,14	42,60	48,22	46,68	46,23



Rys. 1. Zmiany zawartości alkoholu w trakcie 72-h fermentacji podłoży z laktozą lub jej pochodnymi z udziałem drożdży *Saccharomyces cerevisiae* As4 lub D2

Fig. 1. Changes in alcohol content during 72-h fermentation of media containing lactose and its derivatives with yeast *Saccharomyces cerevisiae* As4 or D2

Wpływ adaptacji na szybkość wykorzystania monosacharydów pochodnych laktozy

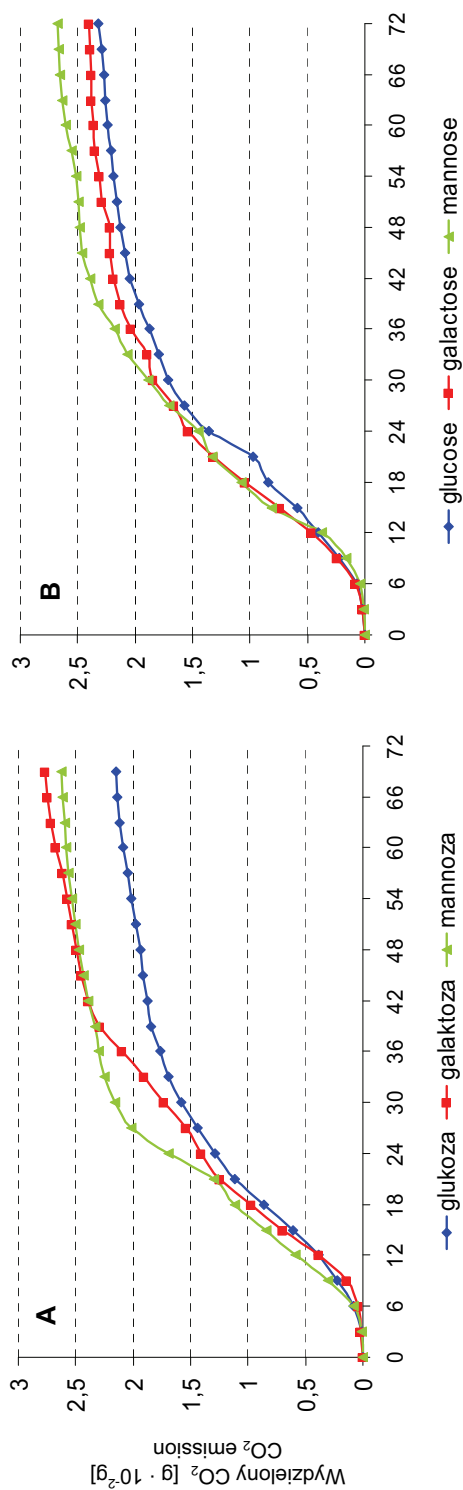
Postanowiono prześledzić cały zakres czasowy 72-h procesu fermentacyjnego, analizując jego przebieg na podstawie pomiarów energii fermentacji oraz szybkości wykorzystywania dwóch konkurencyjnych cukrów w podłożu. Drożdże przed fermentacją poddano wstępnej adaptacji na podłożach z dodatkiem galaktozy lub mannozy.

Celowość stosowania adaptacji drobnoustrojów do odpowiednich substratów przed właściwym procesem biotechnologicznym – została potwierdzona w wielu badaniach [Fiedurek 2004, Belinchón 2003, Ostergaard i in. 2001]. Indukcyjny wpływ substratu lub jego analoga wyzwała wcześniejszą sekrecję odpowiednich enzymów, powodując tym samym przyspieszenie procesu. W omawianych doświadczeniach badane szczepy inkubowano wstępnie na podłożu z glukozą (próba kontrolna: cukier-represor), galaktozą (cukier-induktor) oraz z mannozą (cukier neutralny). Neutralne oddziaływanie mannozy względem glukozy w procesie fermentacyjnym sygnalizowali w swoich badaniach Smith i in. [1999]. Wykazali, że mieszanina glukozy z mannozą była wykorzystywana przez badane drożdże w tempie nieomal identycznym, jak kontrolne podłoże z samą glukozą.

Dwutlenek węgla i alkohol stanowią główne produkty fermentacji etanolowej. Intensywność wydzielania CO₂ jest zatem adekwatna do szybkości tworzenia etanolu. W doświadczeniach, w których zastosowano drożdże *Saccharomyces cerevisiae* As4, wcześniej poddane adaptacji na podłożu z dodatkiem galaktozy lub mannozy, emisja CO₂ od 6 h fermentacji była większa niż w próbach kontrolnych. (rys. 2A). Zdecydowanie intensywniej przebiegała fermentacja z udziałem szczepu As4 adaptowanego na podłożu z mannozą – po pierwszej dobie procesu różnica w ilości wydzielonego CO₂ względem próby kontrolnej wyniosła ponad 0,5g·10⁻²g podłoża. Od 36 h procesu zwiększoną intensywność odfermentowania zaobserwowano w próbach, w których zastosowano drożdże po wstępnej adaptacji na galaktozie. Ostatecznie, właśnie w tym przypadku po 72 h procesu uzyskano największe różnice w ilości wytworzonego alkoholu: 4,21% (v:v) wobec 3,63% (adaptacja drożdży na mannozie) oraz 3,41% (brak adaptacji – podłoże standardowe YPG) (tab. 2 i 3).

Drożdże *S. cerevisiae* D2 okazały się mniej podatne na adaptację w wyżej wymienionych warunkach. Ilość CO₂ wydzielonego w trakcie fermentacji z ich udziałem była zbliżona we wszystkich trzech doświadczeniach. Zaobserwowano niewielki wpływ zabiegu adaptacji na podłożu z mannozą – w odniesieniu do próby kontrolnej emisja CO₂ od 33 h do końca fermentacji była wyższa o ok. 0,3 g·10⁻²g. Mogło to jednak wynikać z ich naturalnych, korzystniejszych niż u drożdży As4, predyspozycji do wykorzystywania obu konkurencyjnych cukrów, o czym świadczą wyniki prezentowane na rysunku 1.

Szybkość wykorzystania glukozy i galaktozy w podłożu testowym w trakcie 72 h fermentacji kontrolnej, z udziałem obu szczepów, oceniona na podstawie pomiarów chromatograficznych została zobrazowana na rysunku 3. Obydwa szczepy drożdży wykorzystały glukozę zawartą w podłożu przed 30 h fermentacji. Galaktoza w nieznanym stopniu została wykorzystana przez drożdże As4 już od 28 h procesu, natomiast w fermentacji z udziałem *S. cerevisiae* D2 zaobserwowano wyraźne zjawisko „diauksji”, charakteryzujące się przedłużonym okresem fazy spoczynkowej (do 52 h) potrzebnej zapewne drożdżom do zaindukowania syntezy enzymów galaktolitycznych. Podobne rezultaty odnotowali Rønnow i in. [1999], analizując zużycie glukozy i galaktozy w podłożu fermentowanym przez przemysłowe drożdże *S. cerevisiae* DGI342. Obserwowane stadium opóźnienia w wykorzystaniu galaktozy potwierdzili również zmniejszeniem przyrostu biomasy oraz zwolnieniem tempa wytwarzania etanolu.

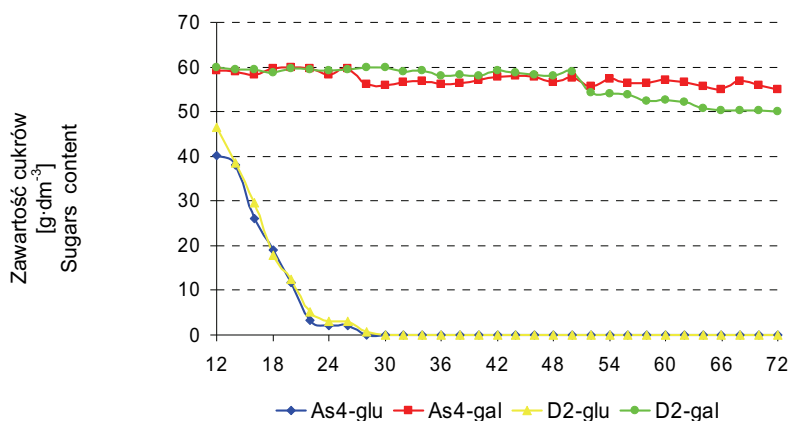


Rys. 2. Intensywność wydzielania CO₂ w trakcie fermentacji podłoża testowego (6%glu+6%gal) z udziałem drożdży *S. cerevisiae* As4 (A) lub D2 (B) wstępnie adaptowanych na podłożu z udziałem galaktozy lub mannozy (glukoza – próba kontrolna)

Intensity of CO₂ emission during fermentation of test medium (6%glu+6%gal) with yeast *S. cerevisiae* As4 (A) or D2 (B) subjected to preliminary adaptation on medium containing galactose or mannose (glucose – control sample)

Tabela 3. Charakterystyka 72-h fermentacji podłoża testowego (6%glu 6%gal) z udziałem drożdży *S. cerevisiae* As4 lub D2 poddanych wstępnej propagacji na podłożach adaptacyjnych
 Table 3. Characteristics of 72-h fermentation of test medium (6%glu 6%gal) with yeast *S. cerevisiae* As4 or D2 subjected to preliminary propagation on adaptive media

Szczep drożdży Strain of yeast		<i>S. cerevisiae</i> AS4		<i>S. cerevisiae</i> D2	
Rodzaj podłoża adaptacyjnego Kind of adaptive medium		z galaktozą with galactose	z mannozą with mannose	z galaktozą with galactose	z mannozą with mannose
Wydzielony CO ₂ CO ₂ emission	[g·10 ⁻² g podłoża] [g·10 ⁻² g medium]	2,78	2,64	2,61	2,68
Energia fermentacji po 48 h Fermentation energy after 48 h	[%]	89,57	93,56	93,56	91,88
Kwasowość Acidity	[pH]	3,91	3,92	3,53	3,78
Ekstrakt rzeczywisty Real extract	[°B]g]	5,5	7,1	6,8	5,06
Zawartość alkoholu Alcohol concentration	[% v:v]	4,21	3,63	3,87	4,37
Wydajność Productivity	[dm ³ A ₁₀₀ ·10 ⁻² kg heksozy] [dm ³ A ₁₀₀ ·10 ⁻² kg hexose]	33,32	28,73	30,63	34,58
Sprawność całkowita fermentacji Total fermentation efficiency	[%]	52,17	44,99	47,96	54,16



Rys. 3. Wykorzystanie glukozy i galaktozy w podłożu testowym (6%glu+6%gal) w trakcie 72-h fermentacji z udziałem drożdży *S. cerevisiae* D2 lub As4

Fig. 3. Utilization of glucose and galactose in test medium (6% Glu+6%Gal) during 72-h fermentation with yeast *S. cerevisiae* D2 or As4

Oceniając drożdże wstępnie adaptowane na podłożu z galaktozą, stwierdzono wyraźne różnice w szybkości wykorzystania cukrów podłoża testowego (rys. 4A). Szczep D2 jak poprzednio odfermentował glukozę ok. 26 h procesu, natomiast wykorzystywanie galaktozy rozpoczął już od 30 h a nie jak uprzednio po 52 h. Drożdże *S. cerevisiae* As4 po adaptacji na galaktozie zareagowały opóźnieniem wykorzystania glukozy o ok. 6 h,

jednocześnie rozpoczynając asymilację galaktozy od 32 h procesu (glukoza w tym czasie jeszcze była obecna w podłożu). Zarówno drożdże As4, jak i D2 w tym doświadczeniu wykazały się poprawionymi zdolnościami do wykorzystywania galaktozy – końcowa jej zawartość w podłożu po 72 h wyniosła odpowiednio: 42,7 oraz 47,5 g · dm⁻³ wobec 54,9 oraz 50,1 g · dm⁻³ odnotowanych w fermentacjach kontrolnych. Znalazło to odzworowanie w ilości wytworzonego alkoholu 4,21 wobec 3,41% v:v (szczep As4) oraz 3,87 wobec 3,70% v:v (szczep D2) (tab. 3).

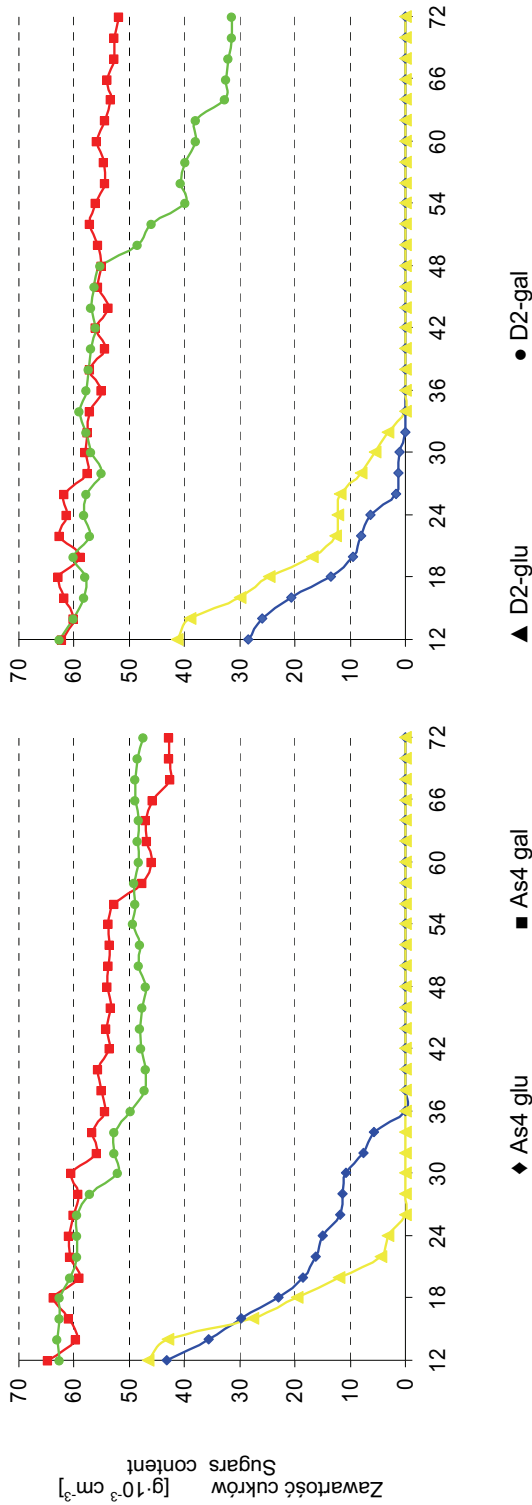
Odmienne rezultaty uzyskali Keating i in. [2004] podczas swoich badań nad szczepem *S. cerevisiae* Y 1528, wykazującym szczególne uzdolnienia do asymilacji galaktozy. Badane drożdże szybciej wykorzystywały oba dostępne cukry (3% glukozy+3% galaktozy) po zastosowaniu adaptacji na glukozie (6 h) niż po adaptacji na galaktozie (24 h).

Wstępna propagacja szczepów As4 i D2 na podłożu z mannozą spowodowała inną, niż w poprzedniej części doświadczenia, reakcję badanych drożdży (rys. 4B). *S. cerevisiae* As4 fermentował cukry w podłożu niemal w identyczny sposób, jak w doświadczeniu kontrolnym (niewielkie wykorzystanie galaktozy od momentu zużycia glukozy – tj. od 28–30 godziny fermentacji). Stężenie alkoholu w podłożu po 72 h procesu wyniosło 3,63% v:v, przy końcowej zawartości galaktozy: 51,8 g·dm⁻³ podłoża.

Odpowiedź drożdży *S. cerevisiae* D2 na zastosowane środowisko derepresyjne była zdecydowanie odmienna: zaobserwowano wprawdzie zjawisko diauksji, lecz okres ten trwał krócej, skutkując następnie znacznie intensywniejszym wykorzystaniem galaktozy – do końcowego poziomu 31,3 g·dm⁻³ podłoża. Dało to jednocześnie pozytywny efekt w postaci 4,37% v:v alkoholu w odfermentowanym podłożu (tab. 3). Mannozę w swoich doświadczeniach zastosowali również Dynessen i in. [1998], oceniając wpływ jej obecności w podłożu na represję inwertazy u drożdży *S. cerevisiae*. Wykazali, że obecność tego cukru obok sacharozy w środowisku fermentacyjnym nie wywołuje zjawiska represji katabolicznej (w przeciwieństwie do glukozy lub fruktozy). Prawdopodobnym wytłumaczeniem może być to, że mannoza w odróżnieniu od ww. cukrów nie jest fosforylowana przez heksokinazy PI i PII, lecz przez glukokinazę – enzym nie wywołujący represji katabolicznej [Rose i in. 1991, Winde i in. 1996].

Oceniając wskaźniki biotechnologiczne fermentacji, należy stwierdzić, że przeprowadzone zabiegi adaptacyjne wpłynęły w pewnym stopniu na poprawę zdolności badanych drożdży do fermentowania konkurencyjnych cukrów (wzrost wydajności o 6,33 dm³ A₁₀₀ · 10⁻² kg heksozy w trakcie fermentacji z udziałem szczepu As4 po adaptacji na galaktozie oraz o 5,3 dm³ A₁₀₀ · 10⁻² kg heksozy z wykorzystaniem D2 adaptowanego na mannozie). Znalazło to odzworowanie w prawie 10-procentowym wzroście sprawności całkowitej: 9,57% (As4) i 7,93% (D2). Można jednak również wnioskować o wysokiej stabilności metabolicznej ocenianych szczepów, dedykowanych głównie w kierunku fermentacji przemysłowej, w której wykorzystuje się typowe surowce gorzelnicze.

Verstrepen i in. [2004] analizując efekty represji katabolicznej w odniesieniu do drożdży przemysłowych wykazali, że szereg operacji wstępnych, np. długotrwała propagacja drożdży na podłożach bogatych w glukozę, może wywoływać długoterminową utratę ich zdolności do fermentacji alternatywnych cukrów. Przykładem mogą być dane uzyskane z szeregu browarów wskazujące na upośledzenie zdolności drożdży do fermentacji maltozy wskutek przedłużonego ich prowadzenia na podłożach bogatych w sacharozę. [Kuthan i in. 2003].



Rys. 4. Wykorzystanie glukozy i galaktozy w podłożu testowym (6%glu+6%gal) w trakcie 72-h fermentacji z udziałem drożdży *S. cerevisiae* D2 lub As4, wstępnie adaptowanych na podłożu z galaktozą (A) lub mannozą (B)
 Fig. 4. Utilization of glucose and galactose in test medium (6%glu+6%gal) during 72-h fermentation with yeast *S. cerevisiae* D2 or As4, subjected to preliminary adaptation on medium containing galactose (A) or mannose (B)

Wheals i in. [1999] wskazują, że wprowadzenie urozmaiconych źródeł węgla na etapie propagacji mikroorganizmów może przyczynić się do rozszerzenia gamy przyswajanych substratów, a co za tym idzie – zagospodarowania np. produktów odpadkowych. Teunissen i in. [2002] oraz Van Dijck i wsp. [2000] podkreślają wielką rolę inżynierii genetycznej do otrzymywania mikroorganizmów rekombinowanych, zwłaszcza w odniesieniu do białek heterogenicznych czy biofarmaceutyków, gdzie wykorzystanie GMO jest mniej kontrowersyjne. Nie dyskredytują jednak prostych i skutecznych metod opartych na selekcji i naturalnych mutacjach szczepów przemysłowych, które prowadzą do bardziej zrównoważonych osiągnięć.

PODSUMOWANIE

Doświadczenia przedstawione w niniejszej pracy wskazują na różne zachowania typowych drożdży gorzelniczych szczepów As4 i D2 w warunkach fermentacji kilku konkurencyjnych cukrów. Sugerują również, że wykorzystanie innych niż glukoza źródeł węgla do wstępnej propagacji przed właściwym procesem fermentacyjnym zwiększa możliwości wykorzystania galaktozy w podłożu fermentacyjnym. Zastąpienie łatwo przyswajalnego cukru substratem nie powodującym represji katabolicznej daje szansę poprawy wydajności procesu fermentacyjnego prowadzonego z wykorzystaniem węglowodanów niekonwencjonalnych.

PIŚMIENNICTWO

- Beccerra M., Diaz Prado S., Rodriguez-Belmonte E., Cerdán M.E., González Siso M.I., 2002. Metabolic engineering for direct lactose utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.* 24, 1391–1396.
- Belinchon M., Gancedo J.M., 2003. Xylose and some non-sugar carbon sources cause catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* 180, 293–297.
- Czupryński B., Wolska M., Kotarska K., Kłosowski G., 2004. Charakterystyka szczepów drożdży stosowanych w gorzelnictwie rolniczym. *Agro Przemysł.* 1, 32–34.
- Dynessen J., Smith H.P., Olsson L., Nielsen J., 1998. Carbon catabolite repression of invertase during batch cultivations of *Saccharomyces cerevisiae*: the role of glucose, fructose, and mannose. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50, 579–582.
- Fiedurek J., 2007. Podstawy biotechnologii przemysłowej, pr. zbior. pod red. W. Bednarskiego i J. Fiedurka. WNT, Warszawa.
- Golubev W.J., Golubev N.W., 2004. Selection and Study of Potent Lactose-Fermenting Yeasts – *Appl. Biochem. Microbiol.* 3, 280–284.
- Gonzales Siso M.I., 1996. The biotechnological utilization of cheese whey: a review. *Biores. Technol.* 57, 1–11.
- Keating J.D., Robinson J., Bothast R.J., Saddler J.N., Mansweld S.D., 2004. Characterization of a unique ethanologenic yeast capable of fermenting galactose. *Enzyme Microb. Technol.* 35, 242–253.
- Kuthan, M., Devaux F., Janderová B., Slaninová I., Jacq C., Palková Z., 2003. Domestication of wild *Saccharomyces cerevisiae* is accompanied by changes in gene expression and colony morphology. *Mol. Microbiol.* 47, 745–754.
- Molska I., 1985. Otrzymywanie etanolu z serwatki na skalę przemysłową. *Przem. Spoż.*, t. XXXV, 227–229.

- Olsson L., Nielsen J., 2000. The role of metabolic engineering in the improvement of *Saccharomyces cerevisiae*: utilization of industrial media. *Enzyme Microb. Technol.* 26, 785–792.
- Ostergaard S., Olsson L., Nielsen J., 2001. In Vivo Dynamics of Galactose Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: Metabolic Fluxes and Metabolite Levels. *Biotechnol. Bioeng.* 73, 5, 412–425.
- Popko R., Popko H., Hys L., 1992. Kierunki przemysłowego przetwórstwa serwatki: Przegl. Mlecz., 199 – 200
- Rodriguez C., Sanz P., Gancedo C., 2003. New mutations of *Saccharomyces cerevisiae* that partially relieve both glucose and galactose repression activate the protein kinase Snf1. *FEMS Yeast Res.* 3, 77–84.
- Rose M., Albig W., Entian K.D., 1991. Glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae* is directly associated with hexose phosphorylation by hexokinases PI and PII. *Eur J Biochem* 199, 511–518.
- Rønnow B., Olsson L., Nielsen J., Mikkelsen J.D., 1999. Derepression of galactose metabolism in melibiase producing bakers' and distillers' yeast. *J. Biotechnol.* 72, 213–228.
- Rubio-Teixeira M., Arevalo-Rodriguez M., Lequerica J.L., Polaina J., 2000. Lactose utilization by *Saccharomyces cerevisiae* strains expressing *Kluyveromyces lactis* LAC genes. *J. Biotechnol.* 84, 97–106.
- Rubio-Teixeira M., 2005. A comparative analysis of the GAL genetic switch between not-so-distant cousins: *Saccharomyces cerevisiae* versus *Kluyveromyces lactis*. *FEMS Yeast Res.* 5, 1115–1128.
- Sałek A., 1989. Studia nad amplifikacją cech technologicznych drożdży, Zesz. Nauk. ART w Olsztynie, 22.
- Sedlak M. Ho N., 2004. Production of Ethanol from Cellulosic Biomass Hydrolysates Using Genetically Engineered *Saccharomyces Yeast* Capable of Cofermenting Glucose and Xylose. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 114, 1–3, 403–416.
- Szczodrak J., 2000. Hydrolysis of lactose in whey permeate by immobilized β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis*. *J. Mol. Cat. B: Enzymatic*, 10, 631–637.
- Teunissen A., Dumortier F., Gorwa M.F., Bauer J., Tanghe A., Loïez A., Smet P., Van Dijck P., Johan M. Thevelein J.M., 2002. Isolation and characterization of a freeze-tolerant diploid derivative of an industrial baker's yeast strain and its use in frozen doughs. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 10, 4780–4787.
- Van Dijck P., Ma P., Versele M., Gorwa M.F., Colombo S., Lemaire K., Bossi D., Loïez A., Thevelein J.M., 2000. A baker's yeast mutant (fil1) with a specific, partially inactivating mutation in adenylate cyclase maintains a high stress resistance during active fermentation and growth. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2, 521–530.
- Verstrepen K.J., Iserentant D., Malcorps P., Derdelinckx G., van Dijck P., Winderickx J., Pretorius I.S., Thevelein J.M. and Delvaux F.R., 2004. Glucose and sucrose: hazardous fast-food for industrial yeast?. *Trends Biotechnol.* 22, 531–537.
- Wheals A.E., Basso L.C., Alves D.M, Amorim H.V., 1999. Fuel ethanol after 25 years. *Trends Biotechnol.* 17, 482–487.
- Winde J.H. de, Crauwels M., Hohmann S., Thevelein J.M., Winderickx J., 1996. Differential requirement of the yeast sugar kinases for sugar sensing in establishing the catabolite-repressed state. *Eur. J. Biochem* 24, 633–643.

EVALUATION OF *S. CEREVISIAE* YEAST CAPACITY FOR FERMENTATION OF MONOSACCHARIDE LACTOSE DERIVATIVES

Abstract. The industrial distillery yeast *Saccharomyces cerevisiae* was determined for its capacity to ferment monosaccharide lactose derivatives. Analyses were carried out to examine their natural predisposition for fermentation of media with lactose hydrolysates (12%) and in addition, the rate of saccharides utilization in the experimental fermentation medium (6% glu/6% gal) was monitored as affected by the method of preliminary propagation of yeast: on standard medium with glucose or on adaptive media with galactose or mannose. It was demonstrated that the level of lactose derivatives attenuation by the yeast examined did not exceed 4% v:v alcohol. A chromatographic analysis of the saccharides enabled determining the rate of their utilization in the fermenting mixture. The effect of delayed utilization of galactose by the yeast was found to be evoked by the phenomenon of glucose repression. The preliminary propagations of the analyzed yeast on adaptive media before the fermentation process caused the acceleration of galactose assimilation, resulting in increased alcohol content in fermented media to 4.2-4.4% v:v.

Key words: distillery yeast, lactose, fermentation, ethanol, glucose repression

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 29.09.2008

Do cytowania – For citation: Lewandowska M., Piotrowicz-Cieślak A., 2008. Ocena zdolności drożdży *Saccharomyces cerevisiae* do fermentacji monosacharydów pochodnych laktozy. *Acta Sci. Pol. Biotechnol.* 7(3), 3–16.

BIOSYNTETA KWASU CYTRYNOWEGO Z GLICEROLU PRZEZ DROŹDŹE *YARROWIA* *LIPOLYTICA* IMMOBILIZOWANE W CHITOZANIE I POLIWINYLOALKOHOLU*

Waldemar Rymowicz

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Streszczenie. Drożdże *Yarrowia lipolytica* Wratislavia AWG7 immobilizowano w różnych żelach chitozanowych oraz poliwiniloalkoholowych i stosowano do biosyntezy kwasu cytrynowego z glicerolu. W 7-dobowych hodowlach wstrząsanych immobilizowane komórki drożdży produkowały od 0 do 17,5 g l⁻¹ kwasu cytrynowego. Biokatalizator chitozanowy typu CH+TP+AG i poliwiniloalkoholowy typu PVA+A produkowały kwas cytrynowy z najwyższą szybkością i wydajnością odpowiednio; 2,5 g l⁻¹d⁻¹ i 0,54 gg⁻¹ oraz 2,5 g l⁻¹d⁻¹ i 0,52 gg⁻¹.

Słowa kluczowe: chitozan, alkohol poliwinylowy, pułapkowanie, kwas cytrynowy, *Yarrowia lipolytica*

WSTĘP

W przemysłowej produkcji kwasu cytrynowego na drodze mikrobiologicznej wykorzystywane są przede wszystkim grzyby strzępkowe z gatunku *Aspergillus niger* [Anastasiadis i in. 2008]. Wciąż rosnące zapotrzebowanie na kwas cytrynowy i jego sole (w roku 2007 światowa produkcja kwasu cytrynowego wynosiła 1,4 mln ton rocznie) powoduje konieczność poszukiwania nowych i tanich technologii jego produkcji [Kamzolova i in. 2005]. Zastosowanie różnych gatunków drożdży do biosyntezy kwasu cytrynowego, takich jak *Candida lipolytica*, *C. tropicalis*, *C. oleophila* czy *Yarrowia lipolytica*, może być jednym z alternatywnych rozwiązań technologicznych [Anastasiadis i in. 2008]. Przedmiotem wnikliwych badań z zakresu drożdżowej fermentacji cytrynowej były zagadnienia związane z wyjaśnieniem mechanizmów nadprodukcji

* Praca wykonana w ramach grantu 2P06T 044 30 finansowanego przez MNiSZW w latach 2006–2009.

tego kwasu przez drożdże, aktywności podstawowych enzymów cyklu Krebsa odpowiedzialnych za wydzielanie tego metabolitu do środowiska oraz charakterystyka systemów hodowlanych z zastosowaniem komórek wolnych i immobilizowanych [Rymowicz i in. 2005, Soccol i in. 2006]. Drożdże wykorzystywane w procesach biosyntezy kwasu cytrynowego przez immobilizowane komórki unieruchamiano w takich nośnikach jak: alginian, karagen, poliakryloamid czy wiórki drzewne, a głównym źródłem węgla w takich procesach była glukoza [Tisnadajaja i in. 1996, Maddox i Kingston 1983]. W ostatnich latach dostępnym i tanim surowcem stosowanym w różnych procesach biotechnologicznych jest gliceryna. Odpadowa gliceryna, generowana w procesie produkcji biodiesla, z powodzeniem została użyta w procesie biosyntezy kwasu cytrynowego przez drożdże *Yarrowia lipolytica* [Imandi i in. 2007, Papanikolaou i in. 2002, Rymowicz i in. 2006, 2008]. Gliceryna nie była natomiast stosowana w procesach biosyntezy kwasu cytrynowego przez immobilizowane komórki drożdży. Wykorzystanie unieruchomionych komórek drożdży w procesach półciągłej i ciągłej produkcji kwasu cytrynowego stwarza liczne problemy technologiczne. Stosowane proste nośniki, takie jak alginianowe czy karacenowe, ulegają w czasie procesu ścieraniu i rozplynnieniu w obecności jonów jednowartościowych czy związków chelatujących wapń. Powoduje to obniżenie produktywności procesu, co związane jest z uwalnianiem i przechodzeniem komórek z matrycy żelu do środowiska hodowlanego. Niekorzystny wpływ ma również zastosowanie nośników o dużej średnicy ziaren, gdyż powoduje to wystąpienie bariery dyfuzyjnej dla tlenu i substratów w wewnętrznych rejonach biokatalizatora. Natomiast nośniki syntetyczne, np. poliakryloamidowe, mogą wykazywać toksyczny wpływ na mikroorganizmy, a tym samym powodować znaczne obniżenie aktywności kwasotwórczej drożdży [Maddox i Kingston 1983, Rymowicz 1998, 2003, Rymowicz i in. 1993]. W ostatnich latach wiele uwagi poświęca się wykorzystaniu chitozanu lub alkoholi poliwinylowych (PVA) do immobilizacji całych komórek i enzymów. Użycie alkoholu poliwinylowego, jako nośnika do immobilizacji, zostało zainicjowane około 20 lat temu. Nośniki PVA charakteryzują się brakiem toksyczności w stosunku do mikroorganizmów, są trwałe, stabilne chemicznie i mechanicznie. Zaletą tych nośników jest również niska cena i powszechna dostępność [Chang i Tseng 1998, Yujian i in. 2006, Dave i Madamwar 2006]. Podobnymi cechami charakteryzują się także nośniki chitozanowe, które wykazują cenne właściwości, a mianowicie są biodegradowalne, biokompatybilne, nietoksyczne i podatne na modyfikacje chemiczne ze względu na obecność grup aminowych i hydroksylowych w strukturze chitozanu [Rinaudo 2006]. W procesach biotechnologicznych biokatalizatory chitozanowe wykorzystywano w kształcie kapsulek, włókien oraz membran [Huang i in. 2004, Krajewska 2004, Rinaudo 2006, Shepherd i in. 1997]. Ze względu na szereg zalet jakie wykazują nośniki chitozanowe i PVA, wydaje się celowe zbadanie przydatności takich nośników do pułapkowania drożdży i zastosowania ich w drożdżowej fermentacji cytrynowej.

Celem podjętych badań był dobór optymalnych warunków pułapkowania drożdży *Yarrowia lipolytica* w chitozanie i w alkoholu poliwinylowym, z przeznaczeniem do biosyntezy kwasu cytrynowego z glicerolu oraz ocena stabilności chemicznej i mechanicznej takich biokatalizatorów.

MATERIAŁY I METODY

Mikroorganizm. W badaniach wykorzystano mutant octanowego (oct⁻) drożdży *Yarrowia lipolytica* Wratislavia AWG7 pochodzącego z kolekcji własnej Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Szczep przechowywano na skosach YM pod parafiną w temperaturze 4°C.

Substrat. W eksperymentach zastosowano glicerynę techniczną jako substrat o stopniu czystości 98% (v/m) pochodzącą z POCH – Gliwice.

Podłoże hodowlane. W procesie pułapkowania wykorzystywano biomasę drożdży namnożoną w podłożu o składzie (g l⁻¹): glicerol – 100; KH₂PO₄ – 0,2; NH₄Cl – 4; MgSO₄ x 7 H₂O – 1; ekstrakt drożdżowy – 1; woda wodociągowa 1 litr. Komórki pobierano z fazy stacjonarnej. Biosyntezę kwasu cytrynowego przez wolne i immobilizowane komórki prowadzono w podłożu o składzie (g l⁻¹): glicerol 50; ekstrakt drożdżowy 0,2; woda wodociągowa 1 litr. Korektę pH na poziomie 5–6 prowadzono co 12 godzin, za pomocą 5 M NaOH.

Metody pułapkowania drożdży

Do pułapkowania drożdży wykorzystywano chitozan (CH) o masie cząsteczkowej 750000 i 2 000000 firmy Fluka. W procedurach otrzymywania żeli chitozanowych stosowano alginian sodu (*Macrocystis pyrifera* firmy Sigma), tripolifosforan sodu (TP), siarczan laurylu (SL), aldehyd glutarowy (AG) i chlorek wapnia.

Do pułapkowania drożdży wykorzystywano poliwinylalkohol (PVA) o masie cząsteczkowej 49000 firmy Fluka. W procedurach otrzymywania żeli PVA stosowano kwas borowy i azotan (V) wapnia.

Procedura unieruchamiania drożdży w różnych typach żeli chitozanowych

Typ CH+TP+AG. 15 g mokrej masy drożdży wprowadzano do 85 ml 2; 2,5; 3; 3,5% roztworu chitozanu o masie cząsteczkowej 2 000000, sporządzonego w 2% roztworze kwasu octowego. Po zmieszaniu zawiesiny drożdży w odpowiednim roztworze chitozanu całość wkraplano za pomocą igły o średnicy 0,5 mm do 2% roztworu tripolifosforanu sodu i przetrzymywano przez 3 godz., następnie przemywano sterylną wodą i wprowadzano na 2 min do 0,5 lub 0,75% roztworu aldehydu glutarowego w buforze fosforanowym o pH 7,6.

Typ CH(M)+SL i CH(H)+SL. 15 g mokrej masy drożdży wprowadzano do 85 ml 3% roztworu chitozanu sporządzonego w 2% roztworze kwasu octowego o masie cząsteczkowej 750000 (typ CH(M)+SL) lub 2 000000 (typ CH(H)+SL). Po zmieszaniu zawiesiny drożdży w odpowiednim roztworze chitozanu całość wkraplano do 2% roztworu siarczuanu laurylu. Kuleczki biokatalizatora o średnicy 2–3 mm przetrzymywano w roztworze siarczuanu laurylu przez 3 godz., celem utwardzenia biokatalizatora.

Typ CH+ALG i CH+ALG*. 15 g mokrej masy drożdży wprowadzano do 85 ml 2,5% roztworu alginianu sodu i wkraplano do 2% roztworu chlorku wapnia sporządzonego w 0,5% roztworze chitozanu o masie cząsteczkowej 2 000000 (typ CH+ALG) lub tylko do 2% roztworu chlorku wapnia (typ CH+ALG*) i przetrzymywano przez 4 godziny.

Typ ALG+CH+ALG. Homogenną mieszaninę alginianu sodu i drożdży uzyskaną jak w typie CH+ALG*, wkraplano do 2% roztworu chlorku wapnia i przetrzymywano przez 30 min, następnie biokatalizator wprowadzano do 0,5% roztworu chitozanu o masie

cząsteczkowej 2 000000. Po 30 min biokatalizator przenoszono do 0,15% roztworu alginianu sodu i przetrzymywano przez 1 godzinę.

Procedura unieruchamiania drożdży w różnych typach żeli PVA

Typ PVA+A. 15 g mokrej masy drożdży wprowadzano do 85 ml 12,5% roztworu alkoholu poliwinylowego o ciężarze cząsteczkowym 49000 sporządzonego w 2,5% roztworze alginianu sodowego. Po zmieszaniu homogeną zawiesinę wkraplano za pomocą igły o średnicy 0,5 mm do 3% roztworu azotanu (V) wapnia. Tak otrzymany biokatalizator w formie kuleczek przetrzymywano w ww. roztworze przez 1 godz., a następnie przemywano sterylną wodą i zamrażano. Biokatalizatory mrożono przez 24 godz. w temperaturze -20°C . Przed wprowadzeniem do podłoża produkcyjnego biokatalizatory rozmrażano przez 20 godz. w temperaturze $+4^{\circ}\text{C}$.

Typ PVA+KB. 15 g mokrej masy drożdży wprowadzano do 85 ml 12,5% roztworu alkoholu poliwinylowego o ciężarze cząsteczkowym 49000 sporządzonego w 2,5% roztworze alginianu sodowego. Po zmieszaniu homogeną zawiesinę wkraplano za pomocą igły o średnicy 0,5 mm do 5% roztworu kwasu borowego sporządzonego w 2% chlorku wapnia. Tak otrzymany biokatalizator w formie kuleczek przetrzymywano w ww. roztworze w temp. 4°C przez 24 godziny.

Typ PVA+KB/T. Homogeną mieszaninę alkoholu poliwinylowego i drożdży używaną w metodzie (typ **PVA+KB**) wkraplano do 5% roztworu kwasu borowego sporządzonego w 2% chlorku wapnia zawierającego 0,2% Tween 80. Tak otrzymany biokatalizator w formie kuleczek przetrzymywano ww. roztworze w temp. 4°C przez 24 godziny.

Wszystkie typy biokatalizatorów przed wprowadzeniem do podłoża produkcyjnego przemywano kilkakrotnie sterylną wodą.

Techniki prowadzenia hodowli

Hodowle okresowe. Biosyntezę kwasu cytrynowego z immobilizowanymi lub wolnymi komórkami drożdży przeprowadzono w kolbach Erlenmeyera o pojemności 250 ml zawierających 40 ml podłoża produkcyjnego i 15 g odpowiedniego typu biokatalizatora. Hodowle prowadzono na wstrząsarce typu Elpan, przy 160 obr min^{-1} przez 7 dni w temperaturze 30°C . Kontrolę stanowiły zawsze hodowle z wolnymi komórkami, których stężenie było takie samo jak w użytych biokatalizatorach.

WYNIKI

Ocena aktywności kwasotwórczej biokatalizatorów chitozanowych

W pierwszej części badań zbadano wpływ stężenia chitozanu i aldehydu glutarowego, stosowanego do modyfikacji struktury żelu, na proces biosyntezy kwasu cytrynowego z glicerolu przez badany szczep drożdży *Wratisslavia AWG7*. Stężenie chitozanu w biokatalizatorach było w zakresie od 2 do 3,5%. Do modyfikacji żeli stosowano aldehyd glutarowy o stężeniu 0,5 i 0,75%. Stężenie kwasu cytrynowego (KC) w hodowlach zawierających komórki unieruchomione w chitozanie było niskie i w zależności od rodzaju biokatalizatora kształtowało się na poziomie od 4 do $17,5\text{ g l}^{-1}$ (tab. 1). Dynamika produkcji oraz wydajność kwasu cytrynowego w hodowlach z użyciem biokatalizatorów typu CH+TP+AG zależała zarówno od stężenia chitozanu, w którym pułapkowano

komórki drożdży, jak i od stężenia aldehydu glutarowego (AG) zastosowanego do modyfikacji otrzymanych żeli. Jednocześnie ze wzrostem stężenia chitozanu w żelu oraz wzrostem stężenia aldehydu glutarowego do modyfikacji żelu obserwowano wzrost stężenia kwasu cytrynowego. Stężenie KC w hodowlach z udziałem biokatalizatorów sieciowanych 0,5% AG kształtowało się w granicach od 4,0 do 15,0 gl^{-1} , natomiast biokatalizatorów sieciowanych 0,75% AG w przedziale od 10,0 do 17,5 gl^{-1} . Objętościowa szybkość produkcji kwasu cytrynowego (Q_{KC}) była na poziomie od 1,4 do 3,5 $\text{gl}^{-1}\text{d}^{-1}$, natomiast wydajność kwasu cytrynowego (Y_{KC}) w zakresie od 0,3 do 0,54 gg^{-1} . W przypadku hodowli z wolnymi komórkami zaobserwowano prawie dwukrotnie niższą wartość objętościowej szybkości produkcji kwasu cytrynowego ($Q_{\text{KC}}=1,4 \text{ gl}^{-1}\text{d}^{-1}$) i trzykrotnie niższą wartość wydajności produkcji kwasu cytrynowego ($Y_{\text{KC}}=0,18 \text{ gg}^{-1}$), w porównaniu z najlepszym biokatalizatorem typu CH+TP+AG stabilizowanym 0,75% AG.

Tabela 1. Wpływ stężenia chitozanu i aldehydu glutarowego na produkcję i wydajność kwasu cytrynowego przez komórki *Yarrowia lipolytica* Wratislavia AWG7 immobilizowane w żelach chitozanowych typu CH+TP+AG

Table 1. Effect of chitosan and glutaraldehyde concentration on the production of citric acid and citric acid yield by *Yarrowia lipolytica* Wratislavia AWG7 cells immobilized in the chitosane gel type CH+TP+AG

Chitozan Chitosan (%)	Kwas cytrynowy Citric acid [gl^{-1}]	Q_{KC} [$\text{gl}^{-1}\text{d}^{-1}$]	Y_{KC} [gg^{-1}]
	0,5% aldehyd glutarowy – glutaraldehyde		
2,0	4,0	0,6	0,19
2,5	9,0	1,3	0,31
3,0	12,5	1,8	0,41
3,5	15,0	2,1	0,45
0,75% aldehyd glutarowy – glutaraldehyde			
2,0	10,0	1,4	0,32
2,5	12,5	1,8	0,42
3,0	17,3	2,5	0,48
3,5	17,5	2,5	0,52
Wolne komórki Free cells	9,5	1,4	0,18

Ze względu na niskie zawartości KC w hodowlach z biokatalizatorami typu CH+TP+AG – w kolejnej części pracy sprawdzono aktywność kwasotwórczą drożdży *Y. lipolytica* Wratislavia AWG7 pułapkowanych w żelach chitozanowych w obecności siarczianu laurylu. Przeprowadzono hodowle wstrząsane z użyciem biokatalizatorów typu CH(M)+SL oraz CH(H)+SL, zawierających dwa różne chitozany różniące się masą cząsteczkową. Użyty do modyfikacji 2% siarczian laurylu miał niekorzystne oddziaływanie na komórki drożdży i zahamował proces biosyntezy kwasu cytrynowego. Wszystkie biokatalizatory niezależnie od zastosowanego rodzaju chitozanu (chitozan o średniej i wysokiej masie cząsteczkowej) nie wykazały żadnej aktywności kwasotwórczej. Sugeruje to nieprzydatność takich biokatalizatorów w procesie biosyntezy kwasu cytrynowego przez drożdże. Należy zaznaczyć, że uzyskane w ten sposób żele chitozanowe były stabilne mechanicznie i chemicznie.

Wysokiej aktywności kwasotwórczej nie udało się również osiągnąć w hodowlach z komórkami drożdży pułapkowanymi w żelach chitozanowych, modyfikowanych

alginianem i chlorkiem wapnia. Do badań wykorzystano trzy typy biokatalizatorów: CH+ALG, CH+ALG* oraz ALG+CH+ALG. We wszystkich hodowlach odnotowano produkcję kwasu cytrynowego, jednak z różną dynamiką i wydajnością. Najniższą aktywność kwasotwórczą wykazały hodowle z biokatalizatorem typu CH+ALG*, natomiast najwyższą hodowlę z biokatalizatorem typu ALG+CH+ALG. Biokatalizatory te produkowały odpowiednio 12,5 oraz 16,3 gl^{-1} kwasu cytrynowego (tab. 2). Najwyższą dynamikę produkcji (2,3 $\text{gl}^{-1}\text{d}^{-1}$) oraz wydajność kwasu cytrynowego (0,33 gg^{-1}) uzyskano w procesie z udziałem biokatalizatora typu ALG+CH+ALG. Nieco gorszymi parametrami cechowały się procesy z użyciem pozostałych biokatalizatorów.

Ocena aktywności kwasotwórczej biokatalizatorów PVA

Drożdże *Y. lipolytica* Wratislavia AWG7 unieruchomiono w 3 typach żeli PVA: (PVA+KB, PVA+KB/T i PVA+A) i użyto w procesie biosyntezy kwasu cytrynowego z glicerolu w 7-dobowych hodowlach wstrząsanych. Stężenie KC w hodowlach zawierających pułapkowane komórki drożdży było niskie i w zależności od typu biokatalizatora kształtowało się w przedziale od 0,5 do 17,5 gl^{-1} (tab. 2). Komórki drożdży pułapkowane w żelach typu PVA+KB oraz PVA+KB/T, w których stosowano 3% kwas borowy i Tween 80, celem modyfikacji zewnętrznej membrany żelu PVA, nie były zdolne do biosyntezy dużych ilości kwasu cytrynowego. Stężenie kwasu cytrynowego nie przekraczało 2,1 gl^{-1} . Spośród badanych biokatalizatorów najlepsze efekty kwasotwórcze uzyskano z udziałem komórek drożdży szczepu Wratislavia AWG7 unieruchomionych w żelu typu PVA+A, stabilizowanym azotanem (V) wapnia, który produkował 17,5 gl^{-1} kwasu cytrynowego. Stwierdzono również, że produkcja kwasu cytrynowego z udziałem tego typu biokatalizatora przebiegała z najwyższą dynamiką ($Q_{\text{KC}}=2,5 \text{gl}^{-1}\text{d}^{-1}$) i wydajnością ($Y_{\text{KC}}=0,54 \text{gg}^{-1}$). Ponadto, uzyskane wartości tych parametrów technologicznych były znacznie wyższe w porównaniu do hodowli z wolnymi komórkami, gdzie wielkości te osiągnęły wartości odpowiednio ($Q_{\text{KC}}=1,3 \text{gl}^{-1}\text{d}^{-1}$) i ($Y_{\text{KC}}=0,17 \text{gg}^{-1}$).

Tabela 2. Charakterystyka procesu biosyntezy kwasu cytrynowego z glicerolu przez *Yarrowia lipolytica* Wratislavia AWG7 unieruchomione w różnych typach biokatalizatorów chitozanowych i poliwinylalcoholowych

Table 2. Characteristic of the citric acid biosynthesis from glycerol by *Yarrowia lipolytica* Wratislavia AWG7 immobilized in different kind of chitosane and polyvinylalcohol biocatalysts

Typ biokatalizatora Type of biocatalist	Kwas cytrynowy Citric acid [gl^{-1}]	Q_{KC} [$\text{gl}^{-1}\text{d}^{-1}$]	Y_{KC} [gg^{-1}]
CH+ALG	14,3	2,0	0,28
CH+ALG*	12,5	1,8	0,25
ALG+CH+ALG	16,3	2,3	0,33
CH(M)+SL	0	0	0
CH(H)+SL	0	0	0
PVA+KB	0,5	0,07	0,06
PVA+KB/T	2,1	0,3	0,1
PVA+A	17,5	2,5	0,54
Komórki wolne Free cells	9,0	1,3	0,17

DYSKUSJA WYNIKÓW

Badania nad procesami wykorzystującymi immobilizowane komórki zostały zapoczątkowane kilkadziesiąt lat temu i budzą zainteresowanie do dnia dzisiejszego. Według Kourkoutas i in. [2004] prace związane z immobilizacją całych komórek mają zwykle charakter czysto doświadczalny, co wynika z dużej ilości nośników, ich różnorodności pod względem struktury i właściwości, a także licznych procedur wiązania komórek z nośnikami. W tematycznej literaturze niewiele jest informacji o zastosowaniu immobilizowanych komórek drożdży w procesie drożdżowej fermentacji cytrynowej. Autorzy swoje badania ograniczyli przede wszystkim do wykorzystania matryc alginianowych lub karagenowych, ale żadne z nich nie zostały użyte na większą skalę [Tisnadajaja i in. 1996, Kautola i in. 1991]. Zapotrzebowanie na immobilizowane biokatalizatory nowej generacji jest jednak bardzo duże, co intensyfikuje badania nad aplikacją nowych, naturalnych czy syntetycznych materiałów matrycowych. W ramach tej pracy podjęto szereg prób pułapkowania drożdży w chitozanie i PVA. Zasadniczy cel stanowiło uzyskanie biokatalizatorów o możliwie wysokiej aktywności kwasotwórczej i dobrej wytrzymałości mechanicznej oraz chemicznej, co uznano za podstawowe kryteria doboru warunków immobilizacji. Powszechnie stosowaną metodą modyfikacji żeli jest użycie związków dwufunkcyjnych. W dyskutowanej pracy w celu stabilizacji biokatalizatorów chitozanowych stosowano aldehyd glutarowy. Rymowicz i in. [1993] stwierdzili, że optymalne stężenie aldehydu glutarowego do utwardzania żeli alginianowych i karagenowych nie powinno przekraczać 0,5%, gdyż wyższe stężenia AG powodują gwałtowne obniżenie aktywności kwasotwórczej drożdży *Y. lipolytica*. Z kolei Cheng i in. [2006] stosując 3% AG w celu zwiększenia stabilności biokatalizatorów PVA, uzyskali wysoką aktywność enzymów. W niniejszej pracy biokatalizatory chitozanowe traktowano 0,5 oraz 0,75% roztworem aldehydu glutarowego. Biokatalizatory, na które oddziaływał 0,75% AG, odznaczały się najlepszymi cechami mechanicznymi i były aktywne. Należy zwrócić uwagę, że uzyskanie biokatalizatorów o dobrych właściwościach mechanicznych i odpornych na czynniki chemiczne nie oznacza, że wykazują one także wysoką aktywność biologiczną. W prezentowanej pracy zaobserwowano, że biokatalizatory chitozanowe typu CH+SL oraz biokatalizatory poliwinylalkoholowe PVA+KB i PVA+KB/T, cechujące się najwyższą stabilnością spośród wszystkich przebadanych w niniejszej pracy, nie produkowały kwasu cytrynowego. Obniżenie zdolności drożdży *Y. lipolytica* do tworzenia KC może wiązać się z niekorzystnym oddziaływaniem tych związków na komórkę drożdżową lub jej metabolizm. Mogły też zaistnieć inne przyczyny obniżenia aktywności kwasotwórczej drożdży. Aktywność biokatalizatorów silnie zależy od szybkości dyfuzji substratów i produktów przez warstwę żelu tworzącego ścianę kapsułki [Antczak i in. 2000, Wang i in. 2005, Fujii i in. 1999]. Duża porowatość może powodować ograniczenie dyfuzji tlenu i substratów do wewnętrznych regionów żeli, co w konsekwencji może powodować częściową konsumpcję wytworzonego kwasu cytrynowego przez komórki drożdży. Według innych autorów właściwości fizjologiczne i metabolizm immobilizowanych komórek drożdży może znacznie się różnić od właściwości komórek wolnych [Kourkoutas i in. 2004].

W badaniach własnych zaobserwowano, że aktywność kwasotwórcza drożdży *Y. lipolytica* uzależniona jest od typu nośnika zastosowanego do pułapkowania oraz rodzaju związków stabilizujących strukturę żeli. Najlepsze efekty kwasotwórcze uzyskano w hodowlach prowadzonych z udziałem biokatalizatora chitozanowego typu

CH+TP+AG oraz biokatalizatora PVA+A, którego strukturę stabilizowano w 24-godzinnym procesie mrożenia. Produkcja kwasu cytrynowego przez drożdże *Y. lipolytica* AWG7 pułapkowane w ww. biokatalizatorach kształtowała się na poziomie 17,5–17,9 g l⁻¹. W przypadku hodowli z wolnymi komórkami, w której zastosowano równoważną biomasę do wyjściowej w badanych biokatalizatorach, zaobserwowano prawie dwukrotnie niższy poziom kwasu cytrynowego. Według Juszczyk i in. [2005] w hodowli wgłębnej szczep *Y. lipolytica* Wratislavia AWG7 wytwarzał również niewielkie ilości kwasu cytrynowego (11,0 g l⁻¹). Objętościowa szybkość produkcji kwasu cytrynowego przez immobilizowane komórki szczepu Wratislavia AWG7 była podobna do wartości uzyskanych przez innych autorów. W zależności od rodzaju podłoża, techniki immobilizacji i użytego szczepu drożdży wielkość tego parametru wynosiła od 0,006 do 1,16 g l⁻¹ h⁻¹ [Rymowicz i in. 1993, Kautola i in. 1991, Tisnadajaja i in. 1996].

Niewątpliwie, zakres przeprowadzonych doświadczeń nie wyczerpał wszystkich możliwości badawczych, które mogą mieć wpływ na proces biosyntezy kwasu cytrynowego z udziałem immobilizowanych komórek drożdży. Konieczne są dalsze szczegółowe badania, które pozwolą na udoskonalenie metody otrzymywania stabilnych chemicznie i aktywnych kwasotwórczo biokatalizatorów.

Reasumując, można stwierdzić, że aktywność kwasotwórcza drożdży pułapkowanych w żelach chitozanowych i poliwiniloalkoholowych w istotny sposób uzależniona jest od sposobu uzyskiwania powyższych biokatalizatorów oraz rodzaju stosowanej modyfikacji do wzmocnienia struktury biokatalizatora. Spośród badanych biokatalizatorów najlepsze efekty kwasotwórcze uzyskano w hodowlach z udziałem komórek drożdży *Y. lipolytica* Wratislavia AWG7 unieruchomionych w żelu chitozanowych typu CH+TP+AG, stabilizowanym dodatkowo 0,75% AG oraz w żelu poliwiniloalkoholowym typu PVA+A, stabilizowanym azotanem (V) wapnia. Przeprowadzenie procesu biosyntezy kwasu cytrynowego przez immobilizowane komórki drożdży w reaktorze barbotażowym lub typu air-lift może znacznie poprawić podstawowe parametry kinetyczne i wydajność procesu.

PIŚMIENNICTWO

- Anastassiadis S., Morgunov I.G., Kamzolova S.V., Finogenova T.V., 2008. Citric acid Patent Review. *Recent Patents on Biotechnology*, 2(2), 1–17.
- Antczak T., Bugla J., Mastalerz M., Niemiec A., Szeja W., Ślęk M., Galas E., 2000. Immobilizacja unieruchomionych *in situ* lipaz *Mucor* w mikroporowatych kapsułkach alginianowych. *Biotechnologia*, 4(51), 142–151.
- Chang C.C., Tseng S.K., 1998. Immobilization of *Alcaligenes eutrophus* using PVA crosslinked with sodium nitrate. *Biotechnology Techniques*, 12, 865–868.
- Cheng S., Wei D., Song Q., Zhao X., 2006. Immobilization of permeabilized whole cell penicillin G acylase from *Alcaligenes faecalis* using pore matrix crosslinked with glutaraldehyde. *Biotechnology Letters*, 28, 1129–1133.
- Dave R., Madamwar D., 2006. Esterification in organic solvents by lipase immobilized in polymer of PVA–alginate–boric acid. *Process Biochemistry*, 41, 951–955.
- Fujii N., Sakurai A., Onjoh K., Sakakibara M., 1999. Influence of surface characteristics of cellulose carriers on ethanol production by immobilized yeast cells. *Process Biochemistry*, 34, 147–152.

- Huang R., Du Y., Zheng L., Liu H., Fan L., 2004. A new approach to chemically modified chitosan sulfates and study of their influences on the inhibition of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* growth. *Reactive and Functional Polymers*, 59, 41–51.
- Imandi S.B., Bandaru V.R., Somalanka S.R., Garapati H.R., 2007. Optimization of medium constituents for the production of citric acid from byproduct glycerol using Doehlert experimental design. *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 1367–1372.
- Juszczyk P., Musiał I., Rymowicz W., 2005. Dobór szczepów drożdży do produkcji biomasy z glicerolu odpadowego. *Biotechnologia*, 4(1–2), 65–76.
- Kamzolova S.V., Finogenova T.V., Morgunov I.G., 2005. Microbiological production of citric and isocitric acids from sunflower oil. *Food Technology and Biotechnology*, 46(1), 51–59.
- Kautola H., Rymowicz W., Linko Y.-Y., Linko P., 1991. Production of citric acid with immobilized *Yarrowia lipolytica*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 35, 447–449.
- Kourkoutas Y., Bekatorou A., Banat I.M., Marchant R., Koutinas A.A., 2004. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: a review. *Food Microbiology*, 21, 377–397.
- Krajewska B., 2004. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. *Enzyme and Microbial Technology*, 35, 126–139.
- Maddox I.S., Kingston P.J., 1983. Use of immobilized cells of the yeast *Saccharomyces lipolytica* for the production of citric acid. *Biotechnology Letters*, 5(12) 795–798.
- Papanikolaou S., Muniglia L., Chevalot I., Aggelis G., Marc I., 2002. *Yarrowia lipolytica* as a potential producer of citric acid from raw glycerol. *Journal of Applied Microbiology*, 92, 737–744.
- Rinaudo M., 2006. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress Polymers Sciences*, 31, 603–632.
- Rymowicz W., Rywińska A., Gładkowski W., 2008. Simultaneous production of citric acid and erythritol from crude glycerol by *Yarrowia lipolytica* Wratislavia K1. *Chemical Papers*, 62(3), 239–246.
- Rymowicz W., Rywińska A., Żarowska B., Juszczyk P., 2006. Citric acid production from crude glycerol by acetate mutants of *Yarrowia lipolytica*. *Chemical Papers*, 60, 391–394.
- Rymowicz W., 1998. Biosynteza kwasu cytrynowego z glukozy przez wolne i immobilizowane komórki drożdży *Yarrowia lipolytica* w systemach ciągłych. *Zesz. Nauk. AR Wroc. Rozpr. Hab.*, 61, 329.
- Rymowicz W., 2003. Biosynteza kwasu cytrynowego z sacharozy przez unieruchomione w karaganie pojedyncze i mieszane kultury *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnologia*, 2(1–2), 31–40.
- Rymowicz W., Juszczyk P., Rywińska A., Żarowska B., Musiał I., 2005. Produkcja kwasu cytrynowego z odpadowego glicerolu przez drożdże *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnologia*, 2(2), 46–54.
- Rymowicz W., Wojtatowicz M., Robak M., Jurgielewicz W., 1993. The use of immobilized *Yarrowia lipolytica* cells in Ca-alginate for citric acid production. *Acta Microbiologica Polonica*, 42(2), 163–170.
- Shepherd R., Reader S., Falshaw A., 1997. Chitosan functional properties. *Glycoconjugate Journal*, 14, 535–542.
- Soccol C.R., Vandenberghe L.P.S., Rodrigues C., Pandey A., 2006. New Perspectives for Citric Acid Production and Application. *Food Technology and Biotechnology*, 44(2), 141–149.
- Tisnadajaja D., Gutierrez N.A., Maddox I.S., 1996. Citric acid production in a bubble-column reactor using cells of the *Candida guilliermondii* immobilized by adsorption onto sawdust. *Enzyme and Microbial Technology*, 19, 343–347.
- Wang G.J., Chu L.Y., Chen W.M., Zhou M.Y., 2005. A porous microcapsule membrane with straight pores for the immobilization of microbial cells. *Journal of Membrane Science*, 252, 279–284.

Yujian W., Xiaojuan Y., Hongyu L., Wei T., 2006. Immobilization of *Acidithiobacillus ferro-oxidans* with complex of PVA and sodium alginate. *Polymer Degradation and Stability*, 91, 2408–2414.

BIOSYNTHESIS OF CITRIC ACID FROM GLICEROL BY *YARROWIA LIPOLYTICA* IMMOBILIZED IN CHITOSANE AND POLIVINYLAŁCOHOL

Abstract. *Yarrowia lipolytica* Wratislavia AWG7 yeast strain was immobilized in different kind of chitosane and PVA gels and used for biosynthesis of citric acid from glycerol. The yeast strain produced citric acid in the range from 0 to 17,5 g l⁻¹ in 7-days shake flask. Chitosane biocatalyst type of CH+TP+AG and polivinylalcohol biocatalyst type PVA+A produced citric acid with the highest production rate and the yield; 2,5 g l⁻¹ d⁻¹, 0,54 g g⁻¹ and 2,5 g l⁻¹ d⁻¹, 0,52 g g⁻¹, respectively.

Key words: Chitosan, polivinylalcohol, immobilization, citric acid, *Yarrowia lipolytica*

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 29.09.2008

Do cytowania – For citation: Rymowicz W., 2008. Biosynteza kwasu cytrynowego z glicerolu przez drożdże *Yarrowia lipolytica* immobilizowane w chitozanie i poliwinylalokoholu. *Acta Sci. Pol. Biotechnol.* 7(3), 17–26.

ASYMILACJA NIETYPOWYCH ŹRÓDEŁ WĘGLA PRZEZ MIKROORGANIZMY O SPECYFICZNYCH UZDOLNIENIACH DO ŻYCIA W WYSOKO STRESOGENNYCH ŚRODOWISKACH*

Isaura Zaleska, Michał Piegza

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Streszczenie. Utylizacja oleistych odpadów przemysłu spożywczego i motoryzacyjnego stanowi jedno z istotniejszych i trudniejszych wyzwań dla ochrony środowiska. W niniejszej pracy podjęto próbę wyselekcjonowania mikroorganizmów zdolnych do biologicznej asymilacji nietypowych źródeł węgla. Rozwój ponadprzeciętnych uzdolnień enzymatycznych u takich mikroorganizmów może być indukowany przez stresogenne środowisko życia, a tym samym umożliwia utylizację szkodliwych dla środowiska odpadów.

Do izolacji mikroorganizmów wybrano niszę, w której były stosowane różne, silne detergenty inhibujące wzrost drobnoustrojów. W efekcie wieloetapowej izolacji otrzymano 22 szczepy, w tym 18 szczepów drożdży należących do rodzajów: *Candida*, *Trichosporon*, *Geotrichum*, *Pichia* oraz 4 szczepy bakterii.

Wszystkie badane drobnoustroje wykazały wysoką zdolność nie tylko wzrostu w obecności detergentów, ale i asymilacji odpadów pochodzenia oleistego. Przeprowadzono hodowle ze złożonymi źródłami węgla, takimi jak oleje z przemysłu spożywczego i motoryzacyjnego (benzyna bezołowiowa oraz paliwo lotnicze), uzyskując w wielu przypadkach wysoki przyrost biomasy w otrzymanych płynach pochodowlanych. Oceniono wybrane aktywności hydrolaz, wskazując na szerokie uzdolnienia enzymatyczne testowanych izolatów. Jako mikroorganizmy wzorcowe, z którymi porównano zdolności wzrostu na trudno degradowalnych związkach oleistych – jedynych źródłach węgla, wybrano drobnoustroje charakteryzujące się zdolnością do utylizacji ropopochodnych odpadów *Yarrowia lipolytica* oraz wysoko uzdolnione lipolitycznie *Geotrichum candidum*.

Słowa kluczowe: degradacja olejów, *Candida pelliculosa*, *Trichosporon cutaneum*, *Candida tropicalis*, lipazy, utylizacja ropopochodnych odpadów

* Praca zrealizowana w Studenckim Kole Naukowym Biotechnologów przy Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności w latach 2006–2007.

WSTĘP

Postęp urbanizacji przyczynia się do powstawania ogromnej ilości odpadów, w tym związków ropopochodnych, a rozwiązania przemysłowego zagospodarowania zdecydowanie nie nadążają za wszechstronnie pojętą utylizacją. Główny problem stanowią zanieczyszczenia, takie jak zużyte oleje czy smary, a ich utylizacja systematycznie wzrastającej masy odpadów stanowi duży problem w ochronie środowiska [Goncalves i in. 2007, Kasprzak i in. 2002].

Biotechnologia środowiska staje się jedną z najważniejszych dziedzin współczesnych nauk przyrodniczych. Technologiczne wykorzystanie organizmów żywych, zdolnych do utylizacji trudno degradowalnych odpadów organicznych [Alexieva i in. 2004, Ijah i in. 1998; Kaczorek i in. 2003, Kwapisz 2006, Latała i Wierzba 2004, Lisowska i Długoński 2003, Oh i in. 2000, Żogała i in. 2005], takich jak odpady ropopochodne, jest obecnie dobrym rozwiązaniem dla rekultywacji gleb i wód skażonych substancjami olejopodobnymi [Ijah i in. 1998, Kaczorek i in. 2003, Kwapisz i in. 2006, Latała i Wierzba 2004, Żogała i in. 2005].

Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA) pochodzące głównie z przeróbki ropy naftowej stanowią najszerszą grupę toksycznych związków. Są to ksenobiotyki, które z czasem stają się coraz bardziej odporne na rozkład – tym samym rosną ich mutagenne i toksyczne właściwości.

Asymilacja ropopochodnych odpadów zachodzić może na drodze chemicznej, a także z udziałem wyspecjalizowanych mikroorganizmów. Procesy chemiczne, to reakcje takie jak: arylowanie, alkilowanie, dealkilowanie, dehalogenacja, hydroliza estrów lub amidów, utlenianie, redukcja, hydroksylacja pierścienia aromatycznego, rozerwanie pierścienia aromatycznego, kondensacja i tworzenie koniugantów. Działanie drobnoustrojów ujawnia się przede wszystkim: utlenieniem cząsteczki węglowodoru, rozerwaniem wiązań C-C, atakiem na grupy funkcyjne zawierające np. metal oraz biokrakingiem węglowodorów cięższych [Kwapisz 2006]. Wykorzystywane do rozkładu odpadów organicznych mikroorganizmy muszą cechować się odpowiednim aparatem enzymatycznym, umożliwiającym utylizację odpadów na drodze reakcji metabolicznych w środowisku wodnym, ale także niewodnym. Spowodowało to rozwój nowej gałęzi biotechnologii nazwanej „biokatalizą w niekonwencjonalnych mediach” lub enzymologią niewodną [Antczak, Graczyk 2002].

Podmiotem przeprowadzonych badań były odpady pochodzenia oleistego, w których skład wchodziły liczne lipidy, a do ich skutecznej utylizacji poszukiwano charakteryzujących się wydajną biosyntezą lipaz.

Wyzolowane z wysoko stresogennego środowiska mikroorganizmy posiadają uzdolnienia hydrolityczne, które umożliwiają im nie tylko wzrost w niekorzystnych warunkach życia, ale również sprzyjają asymilacji trudno degradowalnych związków węglowych.

MATERIAŁY I METODY

Mikroorganizmy. Badane mikroorganizmy wyizolowano z odpływów zlewozmywaków wrocławskich punktów gastronomicznych.

Izolacje do czystych kultur prowadzono w kolejnych pasażach na podłożu bulion+agar, ponieważ wzrost uzyskanych drobnoustrojów na tym podłożu był wybitnie

obfity. Czyste kultury mikroorganizmów, w przeważającym stopniu drożdży, poddano identyfikacji testem API 32C, a 4 szczepy bakteryjne zidentyfikowano na podstawie obserwacji mikroskopowych i makroskopowych.

Testy dyfuzyjne. Aktywność amylolytyczną, proteolityczną i lipolityczną zbadano, wykonując testy dyfuzyjne na płytkach Petriego. Wielkość strefy przejaśnień wokół kolonii badanego drobnoustroju odpowiadała strefom dyfuzji enzymów degradujących odpowiedni substrat. Miarą aktywności był stosunek średnicy strefy rozjaśnienia podłoża (R) wyrażonej w [mm] do średnicy kolonii (r) wyrażonej w [mm]. Hodowle płytkowe prowadzono przez 7 dni w 30°C. Do oznaczenia poszczególnych aktywności enzymatycznych wykorzystano następujące podłoża ($\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$): **AA**, ekstrakt mięsny (3), pepton (5), skrobia rozpuszczalna (2), agar (20); **AP** ($\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$): pepton (5), NaCl (5), glukoza (1), agar (20), mleko odtłuszczone (50 ml); **AL** ($\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$): tributeryna (10), bactopecton (10), ekstrakt mięsny (10), glukoza (10), NaCl (5), agar (20). Aktywność amylolytyczną oznaczano na podłożu AA, proteolityczną na podłożu AP, a lipolityczną na podłożu AL.

Metody hodowlane. W celu oznaczenia aktywności zewnątrzkomórkowych proteaz i lipaz przeprowadzono 7-dobowe hodowle wstrząsane w 30°C badanych mikroorganizmów w podłożu AZP i AZL. **AZP** ($\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$): ekstrakt drożdżowy (0,5), $\text{MgSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ (1), KH_2PO_4 (0,1), $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0,01), CaCl_2 (0,1), pióra kurze (0,1) oraz dla zewnątrzkomórkowych lipaz **AZL** ($\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$): bulion (8), 0,5 ml oleju rzepakowego – na 50 ml pożywki w kolbach Erlenmeyera. Substratem dla proteaz były odtłuszczone pióra kurze, a dla indukcji lipaz – do podłoża dodano 1% oleju rzepakowego.

Metody analityczne. Aktywność proteolityczną oznaczano zmodyfikowaną metodą Ansona [Rodziejewicz i Łaba 2005]. Mieszaninę reakcyjną stanowiło 1 ml 2% substratu kazeinowego, 0,02 ml płynu pohodowlanego, 0,98 ml 0,1 M buforu boranowego. Po 20-minutowej inkubacji w 30°C reakcję enzymatyczną zatrzymano 2 ml 6% TCA, a następnie 15 min wirowano. Ekstynkcję próby właściwej wobec próby kontrolnej odczytano przy długości fali $\lambda = 280$ nm.

Oznaczenie aktywności lipolitycznej [Rywińska i in. 2005] przeprowadzono na substracie złożonym z 25 ml oliwy z oliwek, 5 ml 5% gumy arabskiej, 10 ml 0,075 M CaCl_2 , 10 ml 1 M NaCl (całość rozcieńczono pięciokrotnie w Tris-HCl). Do 1 ml substratu dodano 0,1 ml płynu pohodowlanego i mieszaninę inkubowano w 37°C przez 2 godziny. Reakcję przerwano, dodając 0,25 ml EtOH i miareczkowano 0,05 M NaOH w obecności fenoloftaleiny.

Przeprowadzono również hodowle wstrząsane na podłożu o składzie: 0,8% bulionu, 1% źródło węgla – zużyte oleje przekładniowy, silnikowy, rzepakowy oraz benzynę bezołowiową i paliwo lotnicze AV Gas 100LL. W otrzymanych płynach pohodowlanych zbadano aktywność lipolityczną i aktywność peroksydazy (w zależności od zastosowanego źródła węgla) [Kłyszajko-Stefanowicz 1999].

Ponadto w płynie pohodowlanym AZP oznaczono ilość białek metodą Bradford [Bradford 1976].

Mikrohodowle. Testowano szereg olejopochodnych substratów stanowiących jedyne źródło węgla (1%) w hodowli wstrząsanej w podłożu bulionowym (0,8 %). Mikrohodowle przeprowadzono w aparacie Bioscreen^C przez 90 godzin. Studzienki hodowlane uzupełniono 300 μl podłoża (8 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ bulionu), 30 μl zmywu z 72-godzinnej hodowli mikroorganizmu na skosie i 17,5 μl trudno degradowalnego odpadu olejowego. W każdej ze studzienek aparat mierzył zmiany zmętnienia odpowiadające przyrostowi biomasy. Wszystkie mikrohodowle zostały przygotowane w 3 powtórzeniach. Kontrolę do oceny

wzrostu stanowiła hodowla, gdzie źródłem węgla była 1% glukoza. Podczas hodowli mierzono zmiany zmętnienia odpowiadające przyrostowi biomasy, którą porównano z maksymalną szybkością wzrostu μ (h^{-1}).

W pierwszej części mikrohodowli, jako źródła węgla, zastosowano 5% dodatek detergentów. Podstawowe medium stanowił 0,8% bulion. Zbadano wpływ 3 płynów do mycia naczyń oznaczonych symbolami A, B i C oraz płyn D o reklamowanej 99% skutecznej dezynfekcji.

Drugą część mikrohodowli w aparacie Bioscreen^C – mikrohodowle z dodatkiem źródła węgla (1%) stanowiły trudno degradowalne olejopochodne odpady. Zastosowano zużyte oleje przekładniowy, silnikowy, rzepakowy oraz benzynę bezołowiową i paliwo lotnicze AV Gas 100LL.

OMÓWIENIE I Dyskusja Wyników

Wyizolowane drożdże zidentyfikowano przy użyciu testu API 32C i sklasyfikowano jako należące do rodzajów: *Candida pelliculosa*, *Trichosporon cutaneum*, *Candida sake*, *Candida melibiosica*, *Candida tropicalis*, *Pichia etchellsii*, *Geotrichum* sp. (tab. 1). Na podstawie obserwacji wśród 4 szczepów bakteryjnych zidentyfikowano dwa szczepy *Bacillus* sp. oraz dwa szczepy *Bacterium* sp.

Tabela 1. Wyniki identyfikacji wyizolowanych drożdży przy użyciu testu API 32 C
Table 1. Results of the identification of isolated yeasts by API 32C test

Szczep Strain	Zidentyfikowane drożdże Yeast identification (% trafności / accuracy)
ZP1	<i>Trichosporon cutaneum</i> (96,7%)
ZP2	<i>Trichosporon cutaneum</i> (97,7%)
ZP3	<i>Geotrichum</i> sp. (99,9%)
ZP5	<i>Candida melibiosica</i> (89%)
ZP6	<i>Candida pelliculosa</i> (99,9%)
ZP7	<i>Candida sake</i> (79%)
ZP8	<i>Trichosporon cutaneum</i> (98%)
ZP9	<i>Candida pelliculosa</i> (99,9%)
ZP10	<i>Candida pelliculosa</i> (99,9%)
ZP11	<i>Candida pelliculosa</i> (95%)
ZP12	<i>Trichosporon cutaneum</i> (98%)
ZP15	<i>Candida sake</i> (86%)
ZP16	<i>Candida tropicalis</i> (75,1%)
ZP17	<i>Pichia etchellsii</i> (79%)
ZP19	<i>Candida pelliculosa</i> (99,9%)
ZP20	<i>Candida pelliculosa</i> (99,9%)
ZP21	<i>Candida pelliculosa</i> (99,9%)
ZP22	<i>Candida pelliculosa</i> (99,9%)

Drożdże najchętniej zasiedlają ekosystemy wodne. Są to organizmy eukariotyczne, posiadające uzdolnienia do transformacji i degradacji różnych grup węglowodorów zarówno alifatycznych, jak i aromatycznych oraz trudno przyswajalnych związków acyklicznych [Kwapisz 2006].

Wyizolowane w niniejszej pracy szczepy drożdży należą do drobnoustrojów z rodzajów o potencjalnie wysokich zdolnościach enzymatycznych, pozwalających na utylizację ropopochodnych odpadów, co potwierdzają nieliczne doniesienia literaturowe. Drożdże z rodzaju *Candida* łatwo utylizują odpady po produkcji oleju z oliwek [Goncalves 2007]. *C. pelliculosa*, *C. tropicalis*, jak również *Pichia* sp. charakteryzują się wysokimi zdolnościami do produkcji lipaz, tym samym są potencjalnie zdolne do rozkładu olejopochodnych odpadów. Na szczególną uwagę zasługuje *C. tropicalis*, ponieważ nie wymaga obecności czynników wzrostowych, a jedynie związków mineralnych, dlatego nadaje się do efektywnej utylizacji różnego rodzaju odpadów przemysłowych [Sobczak 1993]. Wyizolowane z gleby drożdże *C. tropicalis* posiadają enzymatyczne zdolności degradacji m.in. ropy naftowej [Ijah 1998], podobnie jak *Trichosporon cutaneum* utylizują również odpady poprodukcyjne z przemysłu sałatkowego [Zheng i in. 2003]. Drożdże *T. cutaneum* charakteryzują się wysoką aktywnością lipolityczną i proteolityczną [Cobro 2001], ale jednocześnie są zdolne do asymilacji fenolopochodnych odpadów [Alexieva i in. 2004]. Jak donoszą dane literaturowe, także drożdże *Geotrichum* sp. (zwłaszcza *Geotrichum candidum*) zaliczane są do efektywnych producentów zarówno wewnątrz-, jak i zewnątrzkomórkowych lipaz, co predysponuje je do wykorzystania w utylizacji odpadów tłuszczowych [Rywińska i in. 2005, Rywińska i Witkowska 2006].

Wyniki testów dyfuzyjnych wykazały, że najlepsze uzdolnienia amylo-, proteo-, i lipolityczne posiadają *C. pelliculosa* ZP 20, *C. pelliculosa* ZP 10, *C. pelliculosa* ZP 11 (rys. 1, 2, 3).

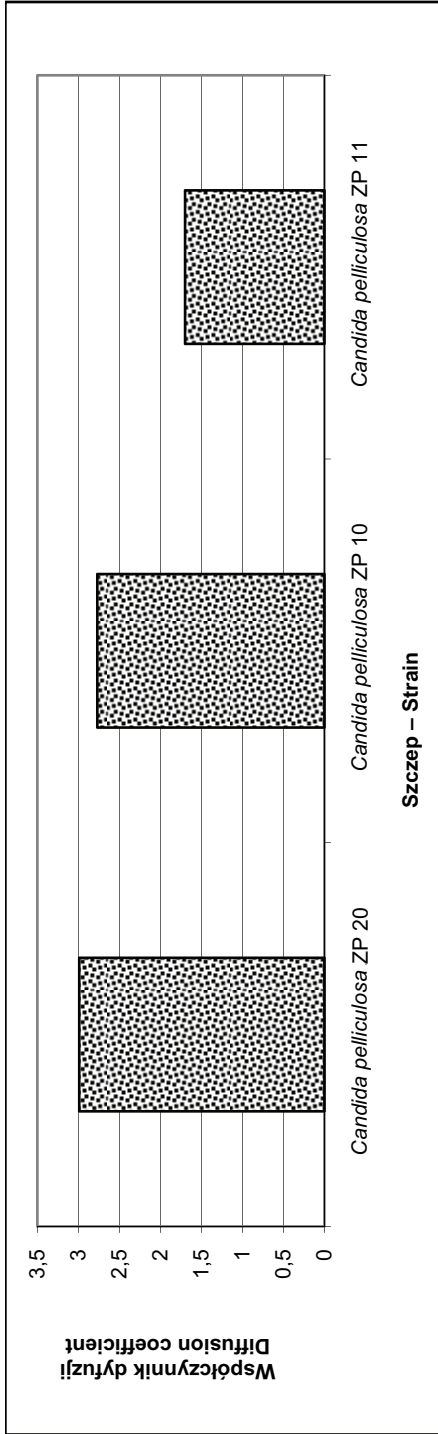
Najwyższą aktywność zewnątrzkomórkowych amylaz zaobserwowano u *C. pelliculosa* ZP 11. Ten sam szczep wykazał znaczną aktywność zewnątrzkomórkowych lipaz, – współczynnik dyfuzji wyniósł 1,45. Z kolei *C. pelliculosa* ZP 9 wykazał najwyższą aktywność proteolityczną, a *Geotrichum* sp. ZP 3 określono jako najefektywniejszy szczep w produkcji zewnątrzkomórkowych lipaz.

Szczegółową charakterystykę biochemiczną badanych mikroorganizmów rozpoczęto od oznaczenia poziomu białka (metodą Bradford). Szczepy bakteryjne ZP 4 i ZP 14 charakteryzowały się najwyższą produkcją zewnątrzkomórkowych białek ($575 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ *Bacillus* sp. ZP4, $494 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ *Bacillus* sp. ZP14); wśród drożdży dominował szczep *T. cutaneum* ZP1 $432 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (rys. 4).

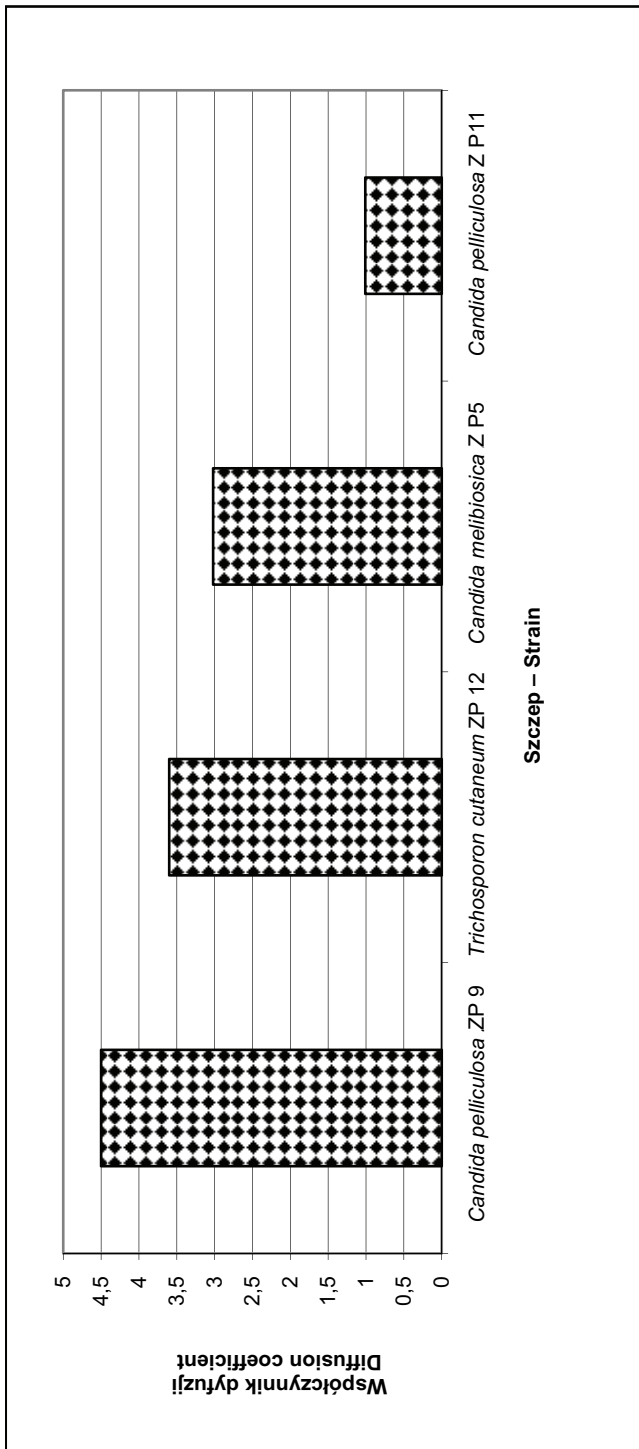
Aktywność proteolityczna oznaczana zmodyfikowaną metodą Ansona była największa u szczepów *Bacillus* sp. ZP 14 ($0,0245 \text{ J}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$), *Bacillus* sp. ZP 13 ($0,02 \text{ J}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$), *Geotrichum* sp. ZP 3 ($0,018 \text{ J}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) oraz *C. sake* ZP 15 ($0,017 \text{ J}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) (rys. 5).

Wysoką aktywnością zewnątrzkomórkowych lipaz wykazał się szczep *Bacillus* sp. P 13 ($1,5 \text{ J}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$), oraz wszystkie szczepy z gatunku *C. pelliculosa* ZP 9 ($1,25 \text{ J}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$), *C. pelliculosa* ZP 10 ($1,2 \text{ J}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$), ZP 11 ($1,45 \text{ J}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$), ZP 19 ($0,5 \text{ J}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$), ZP 20 ($0,7 \text{ J}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$), ZP 21 ($1,2 \text{ J}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$), ZP 22 ($1,3 \text{ J}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$) (rys. 6).

W niniejszej pracy podjęto również próbę oceny wpływu wysokiego stężenia (5%) 4 różnych detergentów na wzrost biomasy wyizolowanych mikroorganizmów. W przypadku płynów do mycia naczyń A, B, C zaobserwowano wzrost wszystkich mikroorganizmów, jedynie płyn D powodował inhibicję wzrostu. Wyniki przedstawiono w tabeli 2. Hodowle prowadzone w podłożach z dodatkiem trudno degradowalnych odpadów (1%) pochodzących z przemysłów motoryzacyjnego i spożywczego pozwoliły na wybór szczepów najlepiej przystosowanych do asymilacji olejopochodnych odpadów. Wyniki prowadzonych hodowli przedstawiono w tabeli 3.

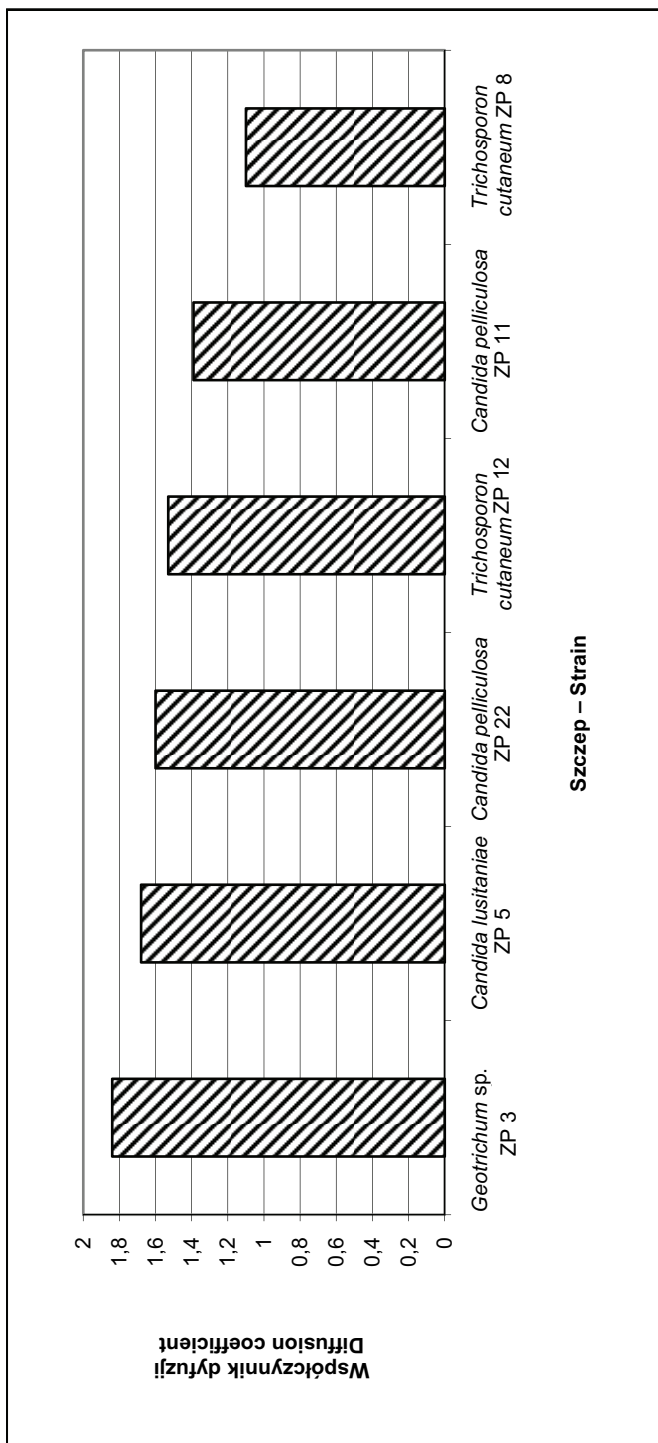


Rys. 1. Aktywność amylolityczna najefektywniejszych szczepów mierzona współczynnikiem dyfuzji w podłożu z 2% skrobią
Fig. 1. Amylolytic activity of the most effective strains measured by coefficient of diffusion on 2% starch medium



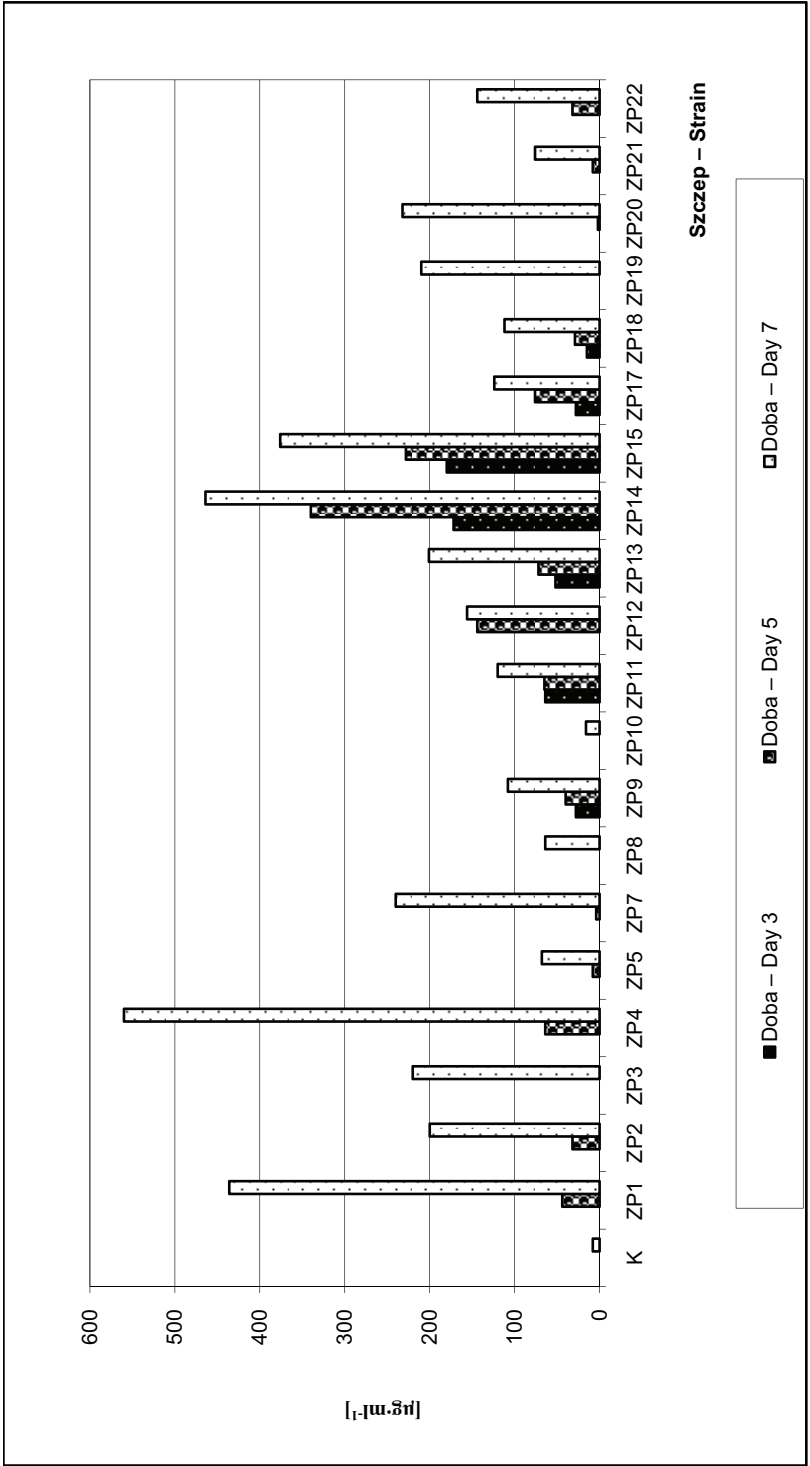
Rys. 2. Aktywność proteolityczna najefektywniejszych szczepów *C. pelliculosa* ZP 9, *T. cutaneum* ZP 13, *C. melibiosica* ZP 5, *C. pelliculosa* ZP 12, oznaczana współczynnikiem dyfuzji w podłożu z 5% mleka odtłuszczonego

Fig. 2. Proteolytic activity of the most effective strains *C. pelliculosa* ZP 9, *T. cutaneum* ZP 13, *C. melibiosica* ZP 5, *C. pelliculosa* ZP 12, measured by coefficient of diffusion on 5% skim-milk medium

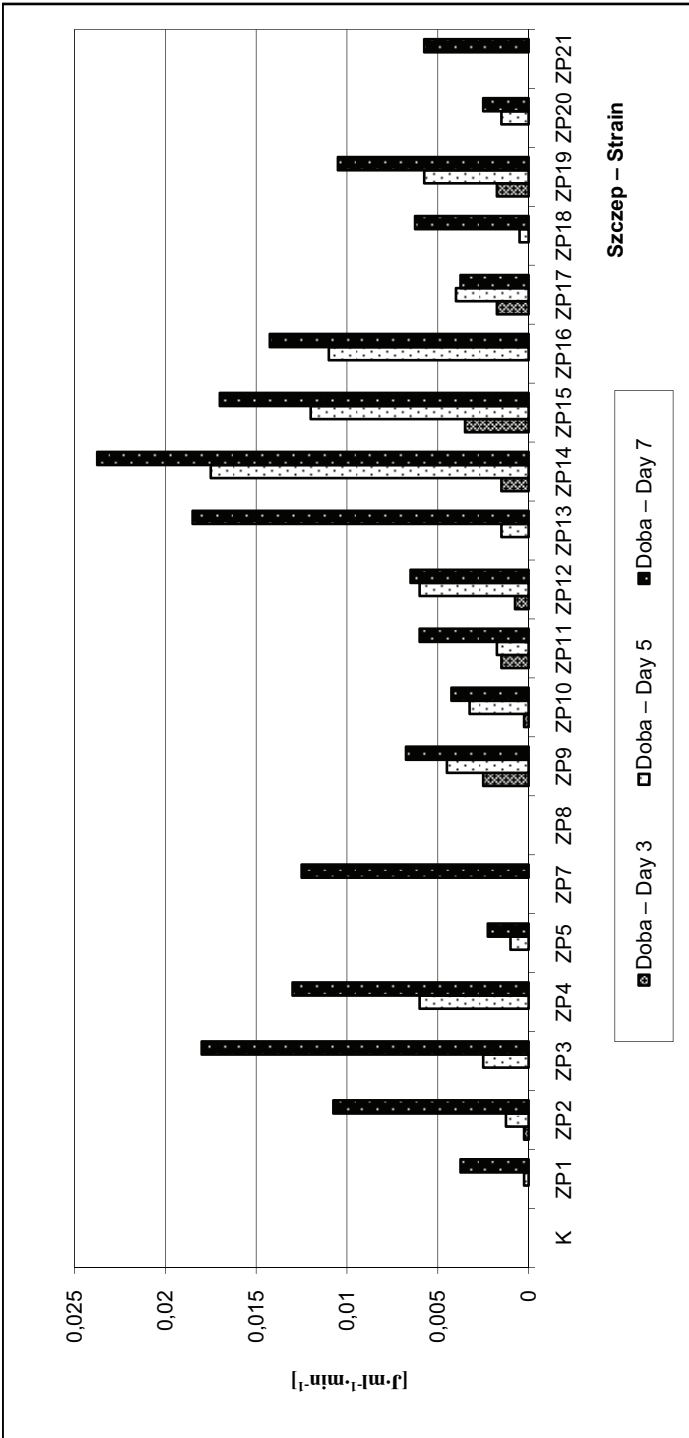


Rys. 3. Aktywność lipolityczna najefektywniejszych szczepów *Geotrichum* sp. ZP 3, *C. melibiosica* ZP 5, *C. pelliculosa* ZP 22, *T. cutaneum* ZP 12, *C. pelliculosa* ZP 11, *T. cutaneum* ZP 8, oznaczana współczynnikami dyfuzji w podłożu z 1% tributyrny

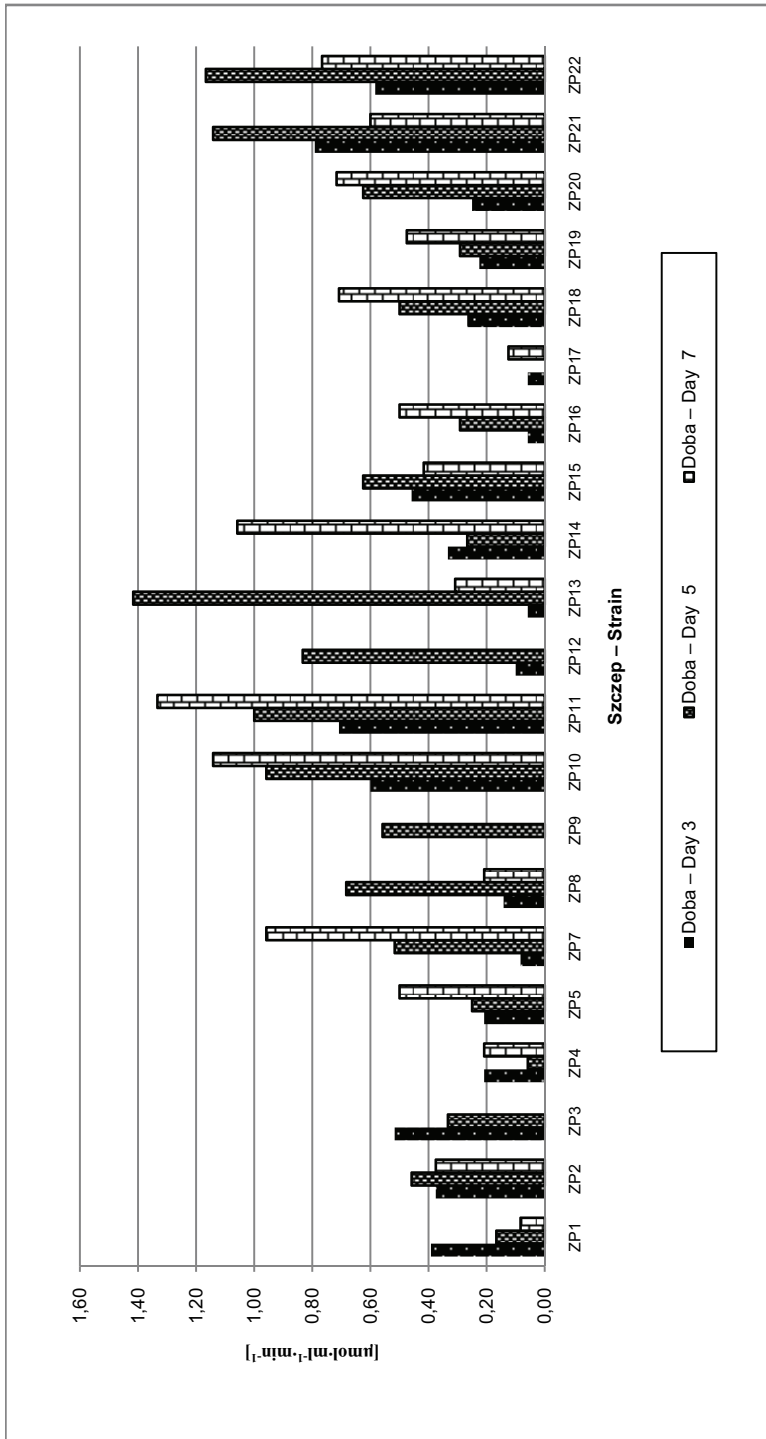
Fig. 3. Lipolytic activity of the most effective strains *Geotrichum* sp. ZP 3, *C. melibiosica* ZP 5, *C. pelliculosa* ZP 22, *T. cutaneum* ZP 12, *C. pelliculosa* ZP 11, *T. cutaneum* ZP measured by coefficient of diffusion in 1% tributyrine medium



Rys. 4. Zawartość białka w płynie pohodowlanym, w podłożu AZP
Fig. 4. Protein content in post-medium AZP



Rys. 5. Aktywność zewnątrzkomórkowych enzymów proteolitycznych oznaczona w płynie pohodowlanym, w podłożu AZP
 Fig. 5. Extracellular proteolytic enzymes activity measured in post-medium AZP



Rys. 6. Aktywność zewnętrznych enzymów lipolitycznych oznaczona w płynie po hodowlanym, w podłożu AZL
 Fig. 6. Extracellular lipolytic enzymes activity measured in post-medium AZL

Tabela 2. Maksymalna szybkość wzrostu mierzona w mikrohodowlach w obecności detergentów (5%) jako jedynych źródeł węgla

Table 2. Maximal velocity of the growth measured in microcultures with detergents (5%) as the only carbon source

5% Źródło węgla Carbon source	Maksymalna szybkość wzrostu Maximum growth speed		Najwyższy wzrost w hodowli w aparacie Bioscreen ^C Maximum growth in Bioscreen ^C	
	[h ⁻¹]	szczep strain	OD	szczep strain
Detergent A	0,004	<i>Trichosporon cutaneum</i> ZP12	1,21	<i>Trichosporon cutaneum</i> ZP12
	0,002	<i>Candida pelliculosa</i> ZP22	1,1	<i>Candida pelliculosa</i> ZP22
Detergent B	0,007	<i>Candida pelliculosa</i> ZP22	0,96	<i>Bacterium</i> sp. ZP18
	0,004	<i>Pichia etchellsii</i> ZP 17	1,35	<i>Candida pelliculosa</i> ZP22
	0,001	<i>Candida pelliculosa</i> ZP21	1,19	<i>Pichia etchellsii</i> ZP17
Detergent C	0,0034	<i>Bacillus</i> sp. ZP13	1,04	<i>Candida pelliculosa</i> ZP21
	0,0025	<i>Candida pelliculosa</i> ZP22	1,16	<i>Bacillus</i> sp. ZP13
	0,0009	<i>Candida pelliculosa</i> ZP19	1,12	<i>Candida pelliculosa</i> ZP22
Detergent D	Brak wzrostu No growth		0,11	<i>Trichosporon cutaneum</i> ZP2
			0,08	<i>Geotrichum</i> sp. ZP3
			0,06	<i>Trichosporon cutaneum</i> ZP8

Tabela 3. Maksymalna szybkość wzrostu mierzona w mikrohodowlach w obecności zróżnicowanych źródeł węgla

Table 3. Maximal velocity of the growth measured in microcultures with addition of diverse carbon source

1% Źródło węgla Carbon source	Maksymalna szybkość wzrostu Maximum growth speed		Najwyższy wzrost w hodowli w aparacie Bioscreen ^C Maximum growth in Bioscreen ^C	
	[h ⁻¹]	szczep – strain	OD	szczep – strain
Glukoza Glucose	0,0125	<i>Bacillus</i> sp. ZP14	1,76	<i>Bacillus</i> sp. ZP14
	0,0118	<i>Geotrichum candidum</i> D2	1,7	<i>Geotrichum candidum</i> D2
	0,099	<i>Geotrichum</i> sp. ZP3	1,56	<i>Candida sake</i> ZP15
Zużyty olej przekładniowy Gear oil waste	0,0141	<i>Geotrichum candidum</i> D2	1,89	<i>Geotrichum candidum</i> D2
	0,0085	<i>Candida sake</i> ZP15	1,46	<i>Candida sake</i> ZP15
Zużyty olej rzepakowy Rapeseed oil waste	0,0077	<i>Bacillus</i> sp. ZP14	1,41	<i>Bacillus</i> sp. ZP14
	0,0095	<i>Geotrichum candidum</i> D2	1,53	<i>Geotrichum candidum</i> D2
	0,007	<i>Geotrichum candidum</i> CCM	1,37	<i>Geotrichum candidum</i> CCM
Zużyty olej silnikowy Engine oil waste	0,006	<i>Geotrichum candidum</i> B1	1,31	<i>Geotrichum candidum</i> B1
	0,0312	<i>Geotrichum candidum</i> D2	4,07	<i>Geotrichum candidum</i> D2
	0,0277	<i>Geotrichum candidum</i> OL	3,49	<i>Geotrichum candidum</i> OL
Benzyna bezołowiowa Unleaded petrol	0,0248	<i>Yarrowia lipolytica</i> PII6c	3,05	<i>Yarrowia lipolytica</i> PII6c
	0,002	<i>Bacillus</i> sp. ZP13	1,19	<i>Geotrichum candidum</i> B1
Paliwo lotnicze Avgas 100LL	0,0092	<i>Bacterium</i> sp. ZP4	1,51	<i>Bacterium</i> sp. ZP4
	0,005	<i>Candida pelliculosa</i> ZP22	1,3	<i>Bacillus</i> sp. ZP13
	0,0059	<i>Bacillus</i> sp. ZP13	1,25	<i>Candida pelliculosa</i> ZP22

Analizując aktywności hydrolityczne otrzymane w wyniku hodowli na trudno przyswajalnych źródłach węgla, wybrano 9 szczepów charakteryzujących się największymi uzdolnieniami do asymilacji odpadów przemysłu motoryzacyjnego i spożywczego. Drobnostrój te wykorzystano w ostatnim etapie badań, który miał na celu zbadanie wpływu zastosowanego źródła węgla na zewnątrzkomórkową aktywność peroksydazy i lipaz.

Umiejętność rozkładu nadtlenu wodoru, który jest czynnikiem szkodliwym dla mikroorganizmów, wskazuje na zdolność do syntezy peroksydazy, tym samym potencjalnie klasyfikuje je jako uzdolnione do życia w wysoko stresogennych warunkach środowiska życia.

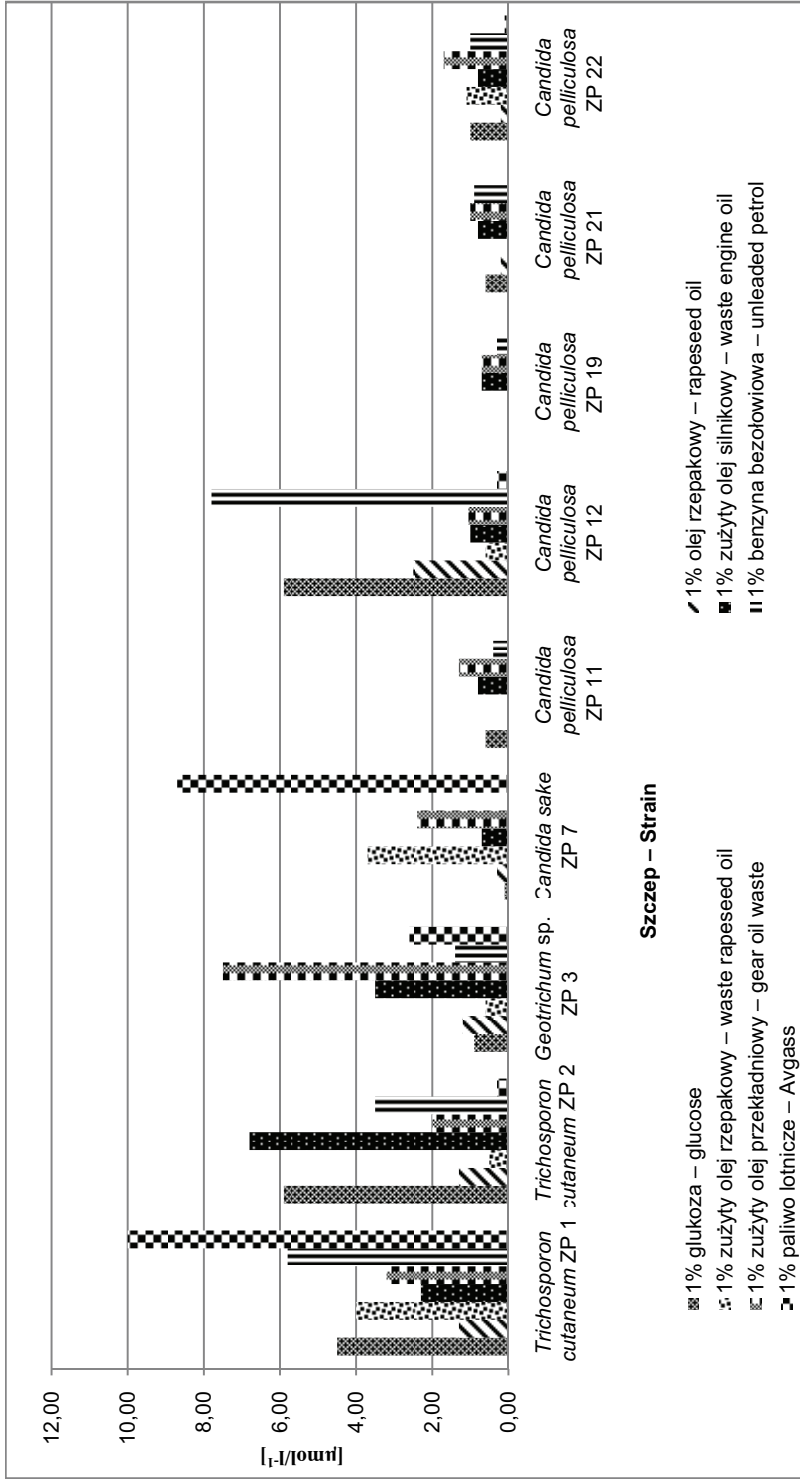
Drobnoustroje z gatunku *C. pelliculosa*, z wyjątkiem *C. pelliculosa* ZP 12 (0,7–10,5 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), wykazały się niską aktywnością zewnątrzkomórkowej peroksydazy, natomiast *Trichosporon cutaneum* ZP 1 (1,8–10,0 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) oraz *T. cutaneum* ZP 2 (7,0–10,5 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) na każdym z użytych źródeł węgla miały wysoką aktywność peroksydazy (rys. 7).

Większość badanych szczepów hodowana na nietypowych źródłach węgla wykazała aktywność lipolityczną porównywalną (a nawet wyższą) do aktywności oznaczonej w podłożu kontrolnym zawierającym glukozę, co sugeruje indukowany charakter aparatu enzymatycznego. W przypadku szczepu *C. pelliculosa* ZP 11 aktywność lipolityczna hodowli na zużytym oleju rzepakowym (1%) wyniosła 0,02 $\text{J}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$, podczas gdy zużyty olej przekładniowy (1%) stymulował produkcję lipaz na poziomie 11,88 $\text{J}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$. Wszystkie badane szczepy rosły na zużytym oleju silnikowym, benzynie bezołowiowej i paliwie lotniczym (rys. 8).

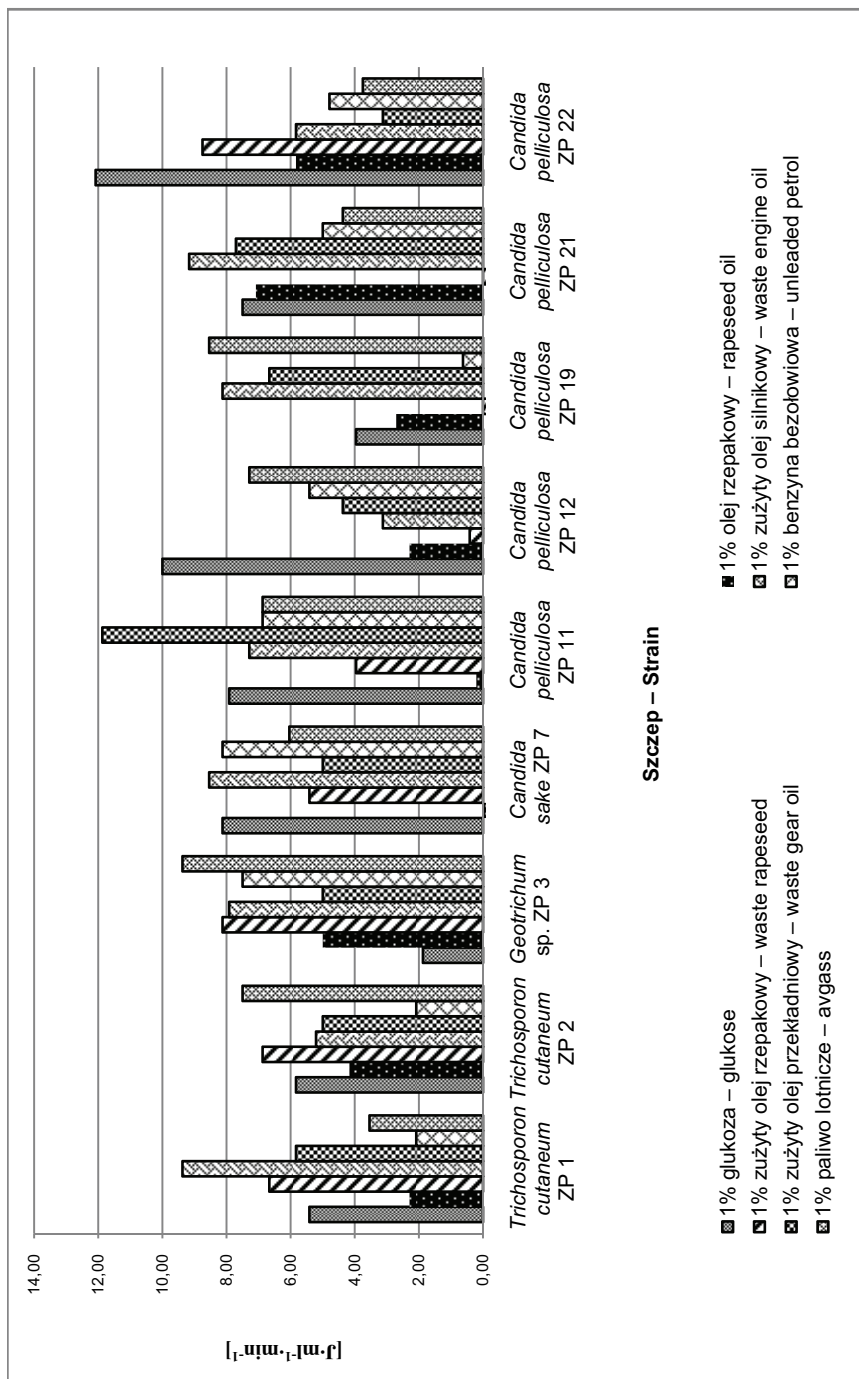
Porównując wyniki uzyskane przez Rywińską i in. [2005] z badaniami własnymi zauważono podobne wartości aktywności lipolitycznej badanych szczepów *C. pelliculosa* ZP 10, ZP 11, ZP 12, ZP 21, ZP 22 do aktywności wzorcowych szczepów *Geotrichum candidum* opisanych przez autorkę (hodowla 7-dobowa na 1% oleju rzepakowym). W badaniach własnych w wyniku 7-dobowej hodowli na 1% glukozie zaobserwowano, że zdecydowanie lepszą produkcją lipaz wykazały się szczepy ZP. W cytowanej pracy w przypadku *Geotrichum candidum* aktywność lipolityczną nie przekroczyła 2 $\text{J}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$, natomiast u szczepów *C. pelliculosa* ZP 11 i ZP 22 osiągnęła nawet 12 $\text{J}\cdot\text{ml}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$. Szczepy ZP, w odniesieniu do *G. candidum*, u którego zbadano asymilację szlamu jako źródła węgla i induktora aktywności lipolitycznej [Rywińska i Witkowska 2006], wykazały się lepszą aktywnością lipolityczną na trudno degradowalnych źródłach węgla.

W literaturze światowej można znaleźć liczne wzmianki na temat biosyntezy enzymów hydrolitycznych i asymilacji związków tłuszczowych przez rodzaj *Yarrowia lipolytica* [Czajgucka i in. 2006, Gdula i in. 2002, Żogała i in. 2005]. Badany w niniejszej pracy jako szczep wzorcowy *Yarrowia lipolytica* A-101 charakteryzował się dużo niższym wzrostem na ropopochodnych odpadach niż szczepy ZP. Inny, opisany w literaturze, szczep *Y. lipolytica* PII6a [Czajgucka i in. 2006], jako dobrze degradujący białka i tłuszcze, wykazał się niższą maksymalną szybkością wzrostu na nietypowych źródłach węgla niż szczepy ZP, wobec których był szczepem wzorcowym (tab. 3).

Porównując doniesienia literaturowe z badaniami własnymi, szczepy ZP można uznać za interesujące pod kątem mikrobiologicznej utylizacji ropopochodnych odpadów. Wyizolowane ze stresogennego środowiska mikroorganizmy scharakteryzowano jako wyposażone w wysoko wyspecjalizowany aparat enzymatyczny, umożliwiający im nie tylko przeżycie w niekorzystnych warunkach środowiskowych, ale również wykorzystanie trudno degradowalnych odpadów jako jedynych źródeł węgla. Umiejętność produkcji peroksydazy potencjalnie klasyfikuje drobnoustroje jako zdolne do wzrostu w innych stresogennych warunkach, co w połączeniu z wysoko rozwiniętymi uzdolnieniami lipolitycznymi oraz wydajnym namnażaniem biomasy na kseno-biotycznych źródłach węgla czyni badane mikroorganizmy dobrymi składnikami szczepionki do rekultywacji skażonych terenów.



Rys. 7. Produkcja zewnątrzkomórkowej peroksydazy w zależności od zastosowanego źródła węgla
 Fig. 7. Production of the extracellular peroxidase with various carbon source in culture



Rys. 8. Produkcja zewnętrznych lipaz w zależności od zastosowanego źródła węgla
 Fig. 8. Production of the extracellular lipases depending on the carbon source

WNIOSKI

1. Wysoko stresujące środowiska, jakie stanowią odpływy zlewozmywaków wrocławskich pubów i restauracji zasiedlają głównie drożdże, i to o wysokich uzdolnieniach enzymatycznych.

2. Zidentyfikowane mikroorganizmy charakteryzują się wysoko wyspecjalizowanym aparatem enzymatycznym, zwłaszcza lipolitycznym.

3. Wszystkie badane drobnoustroje posiadają zdolności asymilacji zróżnicowanych ropopochodnych odpadów. W odniesieniu do wzorcowych szczepów gatunków *Geotrichum candidum* i *Yarrowia lipolytica*, wyizolowane i zidentyfikowane szczepy zarówno drożdży, jak i bakterii wykazują porównywalne, a niekiedy korzystniejsze uzdolnienia enzymatyczne.

PIŚMIENNICTWO

- Alexieva Z., Greginova M., Zlateva P., Peneva N., 2004. Comparison of growth kinetics and phenol metabolizing enzymes of *Trichosporon cutaneum* R57 and mutants with modified degradation abilities, *Enzyme and Microbial Technology* 34, 242–247.
- Antczak T., Graczyk J., 2002. Lipazy: źródła, struktura i właściwości katalityczne, *Biotechnologia* 2(57), 130–145.
- Bradford M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein – dye binding, *Analitica Biochemica* 72: 248–254.
- Cobro M.R., Lanciotti R., Albenzio M., Singaglia M., 2001. Occurrence and characterization of Yeasts isolated from milks and dairy products of Apulia region, *International Journal of Food Microbiology* 69, 147–152.
- Czajgucka A., Chrzanowska J., Juszczyk P., Szołtysik M., Połomska X., Wojtatowicz M., 2006. Wzrost drożdży w modelowym serze i ich wpływ na degradację białek i tłuszczów, *Scientarum Polonorum Acta Biotechnologia* 5 (1–2) 2006, s. 95–103.
- Gdula A., Chrzanowska J., Szołtysik M., Kieźel X., Wojtatowicz M., 2002. Factors affecting hydrolytic enzymem production by *Yarrowia lipolytica* strains, *Scientarum Polonorum Acta Biotechnologia* 1 (1–2), s. 81–88.
- Goncalves C., Lopez M., Belo I., 2007. Use of olive Mill wastewater by lipolytic yeasts, *Journal of Biotechnology* 131S, S179.
- Ijah U.J.J., 1998. Studies on relative capabilities of bacterial and yeast isolates from tropical soil in degrading crude oil; *Waste Management* 18, 293–299.
- Kaczorek E., Pijanowska A., Olszanowski A., 2003. Wpływ surfunktantów na biodegradację węglowodorów przy udziale bakterii gram dodatnich i gram ujemnych, *Biotechnologia* 4(63), 228–238.
- Kasprzak K., 2002. Utylizacja odpadów organicznych, *Biotechnologia* 4(59), 90–104.
- Kłyszajko-Stefanowicz L., 1999, *Ćwiczenia z biochemii*, PWN, Warszawa, 522.
- Kwapisz E., 2006. Szlaki tlenowej biodegradacji węglowodorów ropy naftowej; *Biotechnologia* 2(73), 166–188.
- Latała A., Wierzba S., 2004. Ocena aktywności biodegradacyjnej wybranych szczepów bakterii lipolitycznych, *Biotechnologia* 3(66).
- Lisowska K., Długoński J., 2003. Biodegradacja związków ropopochodnych przez grzyby strzępkowe; *Biotechnologia* 4(63), 92–100.
- Oh Y.S., Maeng J., Kim S.J., 2000. Use of microorganism-immobilized polyurethane foams to absorb and degrade oil on water surface; *Applied Microbiology and Biotechnology* 54, 418–423.

- Rodziewicz A., Łaba W., 2005. Biological degradation of feather keratin by saprophytic bacteria. Polish Journal of Chemical Technology 2005, 7,2 46–49.
- Rywińska A., Witkowska D., 2006. Utylizacja odpadów tłuszczowych z udziałem wybranych szczepów *Geotrichum candidum*; Scientiarum Polonorum Acta Biotechnologia 5 (1–2), s. 27–38.
- Rywińska A., Piegza M., Witkowska D., 2005. Produkcja lipaz przez wybrane szczepy *Geotrichum candidum* w zależności od źródła węgla w pożywce; Scientiarum Polonorum Acta Biotechnologia 4 (1–2), s. 43–54.
- Sobczak E., 1993. Próba ustalenia optymalnych warunków hodowli drożdży spożywczych, Przemysł Spożywczy 2/93, 51–53.
- Zheng S., Yang M., Park Y.H., Liu F., 2003. Washout of a yeast population during continuous treatment of salad-oil-manufacturing wastewater, Bioresource Technology 86, 235–237.
- Żogała B., Robak M., Rymowicz W., Wziętek K., Rusin M., Maruszczak J., 2005. Geoelectrical Observation of *Yarrowia lipolytica* Bioremediation of Petrol-Contaminated Soil; Polish Journal of Environmental Studies Vol. 14, No 5, 665–669.

THE ASYMILATION OF ATYPICAL CARBON SOURCES BY MICROORGANISMS WITH A SPECIFIC APTITUDE FOR LIVING IN HIGH-STRESS ENVIRONMENT

Abstract: An utilization of the oily waste from the food and automotive industry is both one of the most important and hard challenge for the environment protection. In this work the attempt to select the microorganisms able to biological assimilation of atypical carbon source has been introduced. The development of prowess enzymatic abilities in these microorganisms can be induced by stressogenic environment of live and enables the utilization of harmful wastes.

To isolate the microorganisms a special niche was chosen, into which few different, strong detergents that inhibits the growth of microorganisms were applied. As a result of the multiphase isolation 22 strains were obtained, 18 yeasts from *Candida*, *Trichosporon*, *Geotrichum* and *Pichia* type, and 4 bacterias.

Every of the microorganisms surveyed had a high ability to the oily waste assimilation. A culture with a complex carbon source, like oils from the food and automotive industry, gasoline and air-fuel was made. In the result high biomass growth was observed. Selected activities of the hydrolase were evaluated and they showed high enzymatic abilities of the tested isolates.

As a model organisms, which the abilities of growth on the hard – degradation compounds were compared with, microorganisms with utilization of petroleum derivatives abilities were chosen : *Yarrowia lipolytica* and high-capable of lipid-degradation *Geotrichum candidum*.

Key words: utilization of the oily waste, *Candida pelliculosa*, *Trichosporon cutaneum*, *Candida tropicalis*, lipases, utilization of petroleum derivatives

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 29.09.2008

Do cytowania – For citation: Zaleska I., Piegza M., 2008. Asymilacja nietypowych źródeł węgla przez mikroorganizmy o specyficznych uzdolnieniach do życia w wysoko stresogennych środowiskach. Acta Sci. Pol. Biotechnol. 7(3), 27–43.

SPIS TREŚCI CONTENTS

Małgorzata Lewandowska, Agnieszka Piotrowicz-Cieślak

Ocena zdolności drożdży <i>Saccharomyces cerevisiae</i> do fermentacji monosacharydów pochodnych laktozy	3
Evaluation of <i>S. cerevisiae</i> yeast capacity for fermentation of monosaccharide lactose derivatives	

Waldemar Rymowicz

Biosynteza kwasu cytrynowego z glicerolu przez drożdże <i>Yarrowia lipolytica</i> immobilizowane w chitozanie i poliwinylalkoholu.....	17
Biosynthesis of citric acid from glycerol by <i>Yarrowia lipolytica</i> immobilized in chitosane and polivinylalcohol	

Isaura Zaleska, Michał Piegza

Asymilacja nietypowych źródeł węgla przez mikroorganizmy o specyficznych uzdolnieniach do życia w wysoko stresogennych środowiskach	27
The assimilation of atypical carbon sources by microorganisms with a specific aptitude for living in high-stress environment	