

ACTA SCIENTIARUM POLONORUM

Czasopismo naukowe założone w 2001 roku przez polskie uczelnie rolnicze

Biotechnologia

Biotechnologia

7(4) 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. wyd. 2,8. Ark. druk. 2,25
Druk i oprawa: Wydawnictwo Tekst Sp. z o.o.
ul. Kossaka 72, 85-307 Bydgoszcz

TRANSFORMACJE MIKROBIOLOGICZNE WYBRANYCH SUBSTRATÓW STEROIDOWYCH SZEREGU C₁₈: 19-NORTESTOSTERONU I JEGO 17 α -ALKILO- I ETINYLOPOCHODNYCH W KULTURZE *ABSIDIA COERULEA*

Ewa Brzezowska, Jadwiga Dmochowska-Gładysz

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Streszczenie. Badany był przebieg transformacji substratów steroidowych szeregu C₁₈: 19-nortestosteronu i jego 17 α -alkilo- i etinylo pochodnych w kulturze *Absidia coerulea* 93. Główną obserwowaną reakcją była hydroksylacja. Stwierdzono, że kierunek przebiegu reakcji uzależniony jest od struktury substratu. Nie podstawiony na atomie węgla C17 grupą alkilową lub etinyłową 19-nortestosteron transformowany był do 15 α -hydroksypochodnej. Z kolei w obecności grupy 17 α -alkilowej: metylowej lub etylowej obserwowano głównie tworzenie 7 α -hydroksypochodnych. W przypadku substratów steroidowych zawierających na atomie węgla C17 grupę 17 α -etinyłową reakcja w kulturze *Absidia coerulea* przebiega w znacznie mniejszym stopniu lub nie zachodzi. Obok reakcji hydroksylacji obserwowano reakcję wprowadzenia wiązania podwójnego C6-C7.

Słowa kluczowe: *Absidia coerulea*, hydroksylacja, steroidy, mikroorganizmy

WSTĘP

Mikroorganizmy ze względu na łatwość prowadzenia ich hodowli w warunkach laboratoryjnych oraz zdolność do katalizowania określonych reakcji stanowią dogodny materiał do prowadzenia biotransformacji. Grzyby z rodzaju *Absidia* znane są z prowadzenia różnego typu przekształceń substratów steroidowych [Zhang i in. 2004, Chen i in. 2007].

Wśród biotransformacji związków organicznych prowadzonych za pomocą organizmów żywych znaczną grupę stanowią transformacje steroidów, głównie ze względu na ich aktywność biologiczną i związane z tym praktyczne znaczenie w przemyśle farmaceutycznym [Fernandes i in. 2003]. Są one również dobrymi modelami cząsteczek z wieloma reaktywnymi grupami funkcyjnymi [Smith 1980]. Transformacje mikrobio-

logiczne steroidów mogą zachodzić zarówno w obrębie układu pierścieniowego, jak i w łańcuchu bocznym. Często wykorzystywaną praktycznie reakcją jest hydroksylacja, pozwalająca na funkcjonalizację nieaktywowanych atomów węgla o hybrydyzacji sp^3 . Polega na wprowadzeniu do cząsteczki funkcji tlenowej. Wyniki prac Sir Jonesa [Bell i in. 1972] przeprowadzonych na związkach steroidowych pokazują, że pozycja wprowadzanej grupy hydroksylowej do pierścienia steroidowego często zależy od oddziaływań przestrzennych, mających związek z miejscem położenia podstawnika.

W naszych wcześniejszych badaniach przeprowadziliśmy transformacje związków steroidowych: testosteronu i jego pochodnych w kulturze *Absidia coerulea* [Brzezowska i in. 1996]. Stwierdziliśmy, że kierunek przebiegu reakcji uzależniony był od struktury substratu. W celu zbadania wpływu podstawnika na atomie węgla C17, na przebieg transformacji substratów steroidowych, poddano działaniu kultury *A. coerulea* 19-nortestosteron oraz jego pochodne alkilowe i etynyłowe: 17 α -metylo-19-nortestosteron, 17 α -etylo-19-nortestosteron, 17 α -etynylo-19-nortestosteron oraz 17 α -etynylo-18-etylo-19-nortestosteron.

MATERIAŁY I METODY

Użyte do badań substraty: 19-nortestosteron, 17 α -metylo-19-nortestosteron, 17 α -etylo-19-nortestosteron, 17 α -etynylo-19-nortestosteron oraz 17 α -etynylo-18-etylo-19-nortestosteron pochodziły z firmy Steraloids INC.

Szczep *Absidia coerulea* 93 otrzymano z kolekcji Instytutu Biologii i Botaniki Akademii Medycznej we Wrocławiu. Mikroorganizm narastał w hodowli wstrząsanej przez okres około 4 dni w temperaturze 27°C. Następnie do narośniętej kultury dodawano substrat. Substraty rozpuszczano w acetonie (ok. 1 cm³) i dodawano w ilości 200 mg do 1 dm³ kultury. Transformacje prowadzono 14 dni w kolbach stożkowych o pojemności 250 cm³, zawierających 50 cm³ pożywki o składzie 3% glukozy i 1% peptonu. Do transformacji preparatywnych używano kolb o pojemności 2 dm³, zawierających 500 cm³ pożywki. Produkty transformacji ekstrahowano chlorkiem metylenu, a ekstrakty suszono bezwodnym siarczanem magnezu. Surową mieszaninę potransformacyjną badano przy użyciu chromatografii cienkowarstwowej (TLC) oraz chromatografii gazowej (GC). Rozdział produktów prowadzono za pomocą chromatografii kolumnowej pod ciśnieniem atmosferycznym oraz pod zwiększonym ciśnieniem (Flash Chromatography). Do chromatografii pod ciśnieniem atmosferycznym używano żelu krzemionkowego (firmy Merck) o granulacji 70–230 mesh, a do chromatografii pod zwiększonym ciśnieniem – żelu krzemionkowego (Merck) o granulacji 230–400 mesh. TLC wykonywano na płytkach z żelem krzemionkowym na podłożach: aluminiowym, plastikowym lub szklanym (firmy Merck). Chromatogramy rozwijano w różnych układach rozpuszczalników, najczęściej w:

- heksan-aceton 2:1,
- benzen-eter etylowy-metanol 30:10:0.8,
- cykloheksan-octan etylu-izopropanol 45:45:10,
- cykloheksan-octan etylu-aceton 45:45:10,
- benzen-metanol-octan etylu 7:1:0.8,
- chloroform-aceton 6:1.

Chromatogramy wywoływano przez spryskanie płytki roztworem stężonego kwasu siarkowego i etanolu w stosunku objętościowym 1:1.

Analizy GC wykonywano przy użyciu kapilarnego chromatografu gazowego firmy Hewlett Packard 5890 (FID, gaz nośny azot lub wodór) z następującymi wypełnieniami:

- Kolumna Chrompack WCOT Fused Silica, HP-5 (Crosslinked Ph Me Silicone); 30 m, średnica wewnętrzna 0.53 mm, grubość wypełnienia 0.88 μm .

Program: 200°/1min, narost 8°/1min do 300°/3 min; temp. dozownika 250°C, temp. detektora 300°C.

Kolumna Chrompack WCOT Fused Silica Ultra 1 (Crosslinked Methyl Silicone Gum); 25 m, średnica wewnętrzna 0.32 mm, grubość wypełnienia 0.17 μm .

Program: 220°/2 min, narost 5°/min do 300°/3 min; temp. dozownika 250°C, temp. detektora 300°C.

Pomiary spektralne wykonano następująco:

- widma w podczerwieni na aparacie Specord M-80 firmy Carl-Zeiss-Jena,
- widma $^1\text{H-NMR}$ na aparacie Bruker Avance DRX 300 MHz.

WYNIKI

W efekcie transformacji 19-nortestosteronu otrzymano skomplikowaną mieszaninę związków, z których wyizolowano wyłącznie produkt główny:

- **15 α -hydroksy-19-nortestosteron 21% izolowanej wydajności**

- IR (chloroform) [cm^{-1}]: 3450(OH), 2970(CH), 1690 i 1640(C=O)
- $^1\text{H-NMR}$ δ (ppm): 5.8(4-H), 4.1(15 β -H), 3.89(17 α -H), 0.8(18-H).

Transformacja 17 α -metylo-19-nortestosteronu dała mieszaninę produktów, które rozdzielono metodą chromatografii kolumnowej, izolując trzy główne produkty:

- **7 α -hydroksy-17 α -metylo-19-nortestosteron 30% izolowanej wydajności**

- IR (chloroform) [cm^{-1}]: 3430(OH), 2970(CH), 1680 i 1630(C=O)
- $^1\text{H-NMR}$ δ (ppm): 5.92(4-H), 4.03(7 β -H), 1.26(17 α -CH₃), 0.94(18-H).

- **15 α -hydroksy-17 α -metylo-19-nortestosteron 15% izolowanej wydajności**

- IR (chloroform) [cm^{-1}]: 3420(OH), 2950(CH), 1670 i 1620(C=O)
- $^1\text{H-NMR}$ δ (ppm): 5.83(4-H), 4.1(15 β -H), 1.36(17 α -CH₃), 0.93(18-H).

- **17 α -metylo-6-dehydro-19-nortestosteron 11% izolowanej wydajności**

- IR (chloroform) [cm^{-1}]: 3490(OH), 2970(CH), 1680 i 1630 (C=O, układ α,β nienasyconego ketonu)
- $^1\text{H-NMR}$ δ (ppm): 6.1(6-H), 5.67(4-H), 1.22(17 α -CH₃), 0.95(18-H).

Kolejną transformacją była transformacja 17 α -etylo-19-nortestosteronu, w wyniku której otrzymano również mieszaninę produktów, z której wyizolowano dwa główne produkty:

- **7 α -hydroksy-17 α -etylo-19-nortestosteron 52% izolowanej wydajności**

- IR (chloroform) [cm^{-1}]: 3460(OH), 2960(CH), 1680 i 1630(C=O)
- $^1\text{H-NMR}$: 5.92(4-H), 4.05(7 β -H), 1.4(17 α -CH₂CH₃), 0.92(18-H).

- **6-dehydro-17 α -etylo-19-nortestosteron 18% izolowanej wydajności**

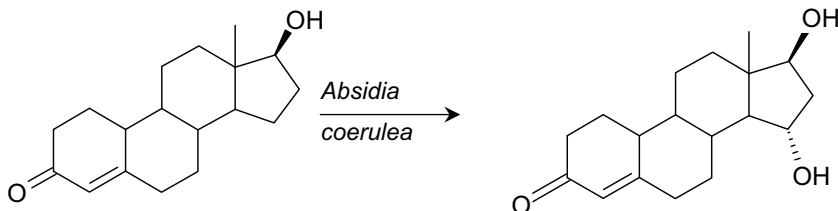
- IR (chloroform) [cm^{-1}]: 3460(OH), 2960(CH), 1680 i 1630(C=O)
- $^1\text{H-NMR}$ δ (ppm): 6.1(6-H), 5.79(4-H), 1.27(17 α -CH₂CH₃), 0.98(18-H).

Kolejnej transformacji poddano kolejno 17 α -etylo-19-nortestosteron oraz 17 α -etylo-18-etylo-19-nortestosteron. W obu przypadkach stwierdzono brak reakcji.

OMÓWIENIE I DYSKUSJA WYNIKÓW

Przeprowadzone wcześniej badania szeregu C_{19} – steroidów – testosteronu i jego pochodnych oraz progesteronu wykazały, że miejsce hydroksylacji w kulturze szczepu *A. coerulea* zależy między innymi od obecności podstawnika na atomie węgla C17 [Brzezowska i in. 1996]. Stwierdzono, że kierunek przebiegu reakcji uzależniony jest od struktury substratu. Nie podstawione na atomie węgla C17 grupą alkilową substraty steroidowe serii androstanu: testosteron i androstendion transformowane były głównie do 14α -hydroksypochodnych. Obecność grupy 17α -metylowej zmieniała miejsce hydroksylacji. Obserwowano regioselektywną hydroksylację 7α dla 17α -metylotestosteronu, a z substratu z dodatkowym wiązaniem podwójnym 17α -metylo-1-dehydrotestosteronu powstawała mieszanina 7α i 11β alkoholi. Obecnie działaniu kultury *A. coerulea* poddane zostały następujące substraty steroidowe: 19-nortestosteron, 17α -metylo-19-nortestosteron, 17α -etylo-19-nortestosteron, 17α -etinylo-19-nortestosteron, 17α -etinylo-18-etylo-19-nortestosteron. Związki te wykazują działanie anaboliczne lub gestagenne.

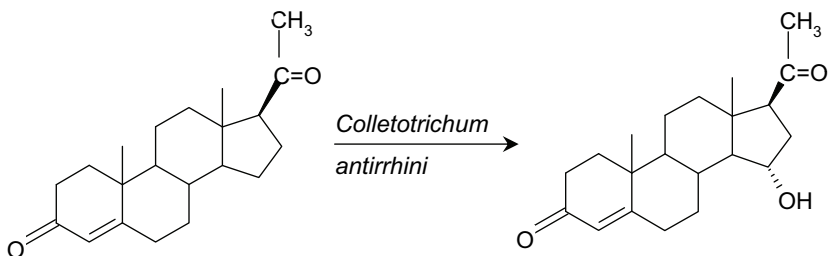
W wyniku transformacji 19-nortestosteronu (rys. 1) otrzymano 15α -hydroksy-19-nortestosteron.



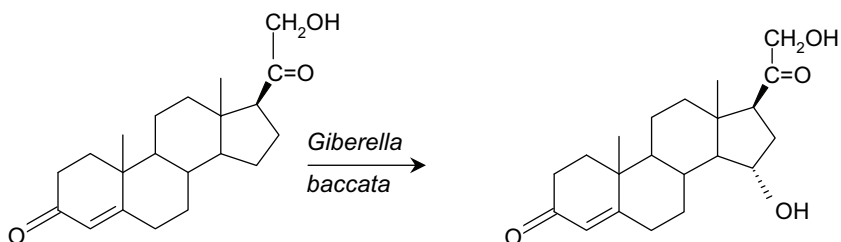
Rys. 1. Transformacja 19-nortestosteronu w kulturze *A. coerulea*
 Fig. 1. Transformation of 19-nortestosterone in *A. coerulea* culture

Strukturę otrzymanego związku zaproponowano na podstawie analizy widma 1H -NMR. Zawiera ono charakterystyczny multiplet CHOH w obszarze $\delta=4.1$ ppm, który może zostać przypisany protonowi 15β , co potwierdzają dane literaturowe dla quasi-aksjalnego protonu 15β [Kirk i in. 1990]. Z kolei triplet odpowiadający protonowi 17α jest przesunięty w kierunku słabszego pola o ok. 0.023 ppm ($\delta=3.89$ ppm) w porównaniu z substratem ($\delta=3.66$ ppm). Niewielkie przesunięcie angularnej grupy metylowej C-18 o ok. 0.001 ppm (w porównaniu z substratem) jest zgodne z danymi literaturowymi [Zürcher 1963].

Wprowadzenie grupy hydroksylowej w pozycję 15α po raz pierwszy zaobserwowano w wyniku transformacji progesteronu (rys. 2) w kulturze *Colletotrichum antirrhini* oraz korteksonu (rys. 3) przez szczep *Giberella baccata* [Charney i Herzog 1967].



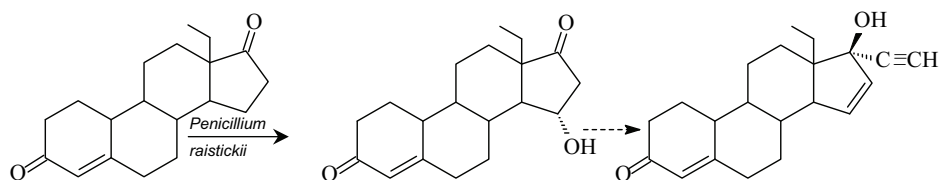
Rys. 2. Transformacja progesteronu w kulturze *Colletotrichum antirrhini*
 Fig. 2. Transformation of progesterone in a *Colletotrichum antirrhini* culture



Rys. 3. Transformacja korteksonu w kulturze *Gibberella baccata*
 Fig. 3. Transformation of cortexolone in a *Gibberella baccata* culture

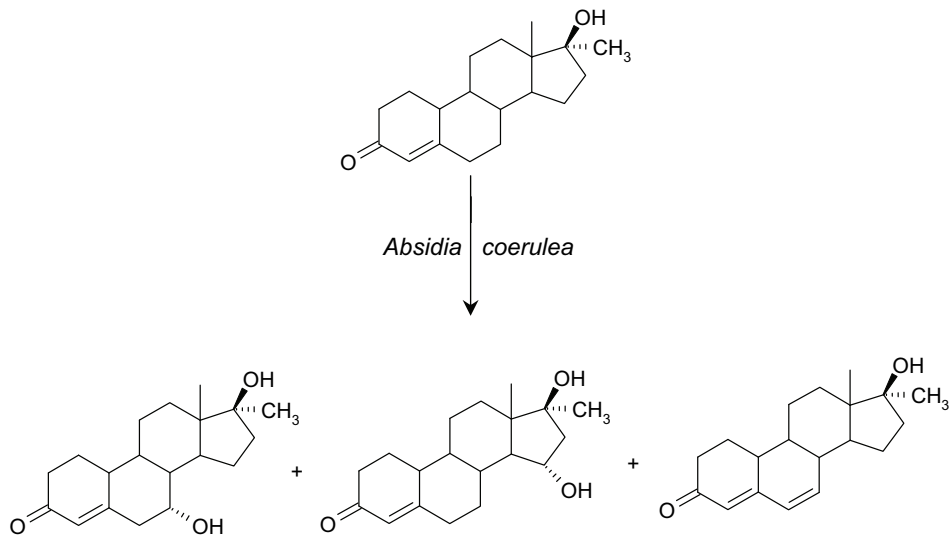
Znane są również mikrobiologiczne 15 α hydroksylacje C₁₈ oraz C₁₉ pochodnych steroidowych w kulturach szczepów z rodzaju *Fusarium* [Tamm i in. 1963, Kołek i Świzdor 1998, Wilson i in. 1999]. Hydroksylację pozycji 15 α zaobserwowano również w wyniku transformacji progesteronu w kulturze *Acremonium strictum* [Faramarzi i in. 2003].

Hydroksylacja pozycji 15 α posiada znaczenie praktyczne w syntezie związków wykazujących działanie gestagenne: np. z 18-etylo-19-norandrostendionu w kulturze *Penicillium raistikii* [Kieslich 1991] można otrzymać 15 α -hydroksypochodne. Reakcja ta stanowi etap pośredni dla wprowadzenia wiązania podwójnego 15,16-dienowego (rys. 4), które zwiększa aktywność gestagenną D-norgestrelu.



Rys. 4. Reakcja wprowadzenia grupy hydroksylowej w pozycję 15 α dla 18-etylo-19-norandrostendionu w kulturze *Penicillium raistikii*
 Fig. 4. Introduction of hydroxy group in 15 α position to 18-ethyl-19-norandrostenedione in a *Penicillium raistikii* culture

Z kolei, w wyniku transformacji 17α -metylo-19-nortestosteronu, pochodnej alkilowej 19-nortestosteronu, wyizolowano trzy główne produkty: 7α -hydroksy- 17α -metylo-19-nortestosteron, 15α -hydroksy- 17α -metylo-19-nortestosteron oraz 17α -metylo-6-dehydro-19-nortestosteron. Schemat zachodzących reakcji przedstawiono na rysunku 5.



Rys. 5. Transformacja 17α -metylo-19-nortestosteronu w kulturze *A. coerulea*

Fig. 5. Transformation of 17α -methyl-19-nortestosterone in *A. coerulea* culture

W widmie $^1\text{H-NMR}$ 7α -hydroksy- 17α -metylo-19-nortestosteronu obecny jest wąski sygnał przy $\delta=4.04$ ppm, charakterystyczny dla ekwatorialnego protonu, co wskazuje na obecność protonu 7β [Smith i in. 1989].

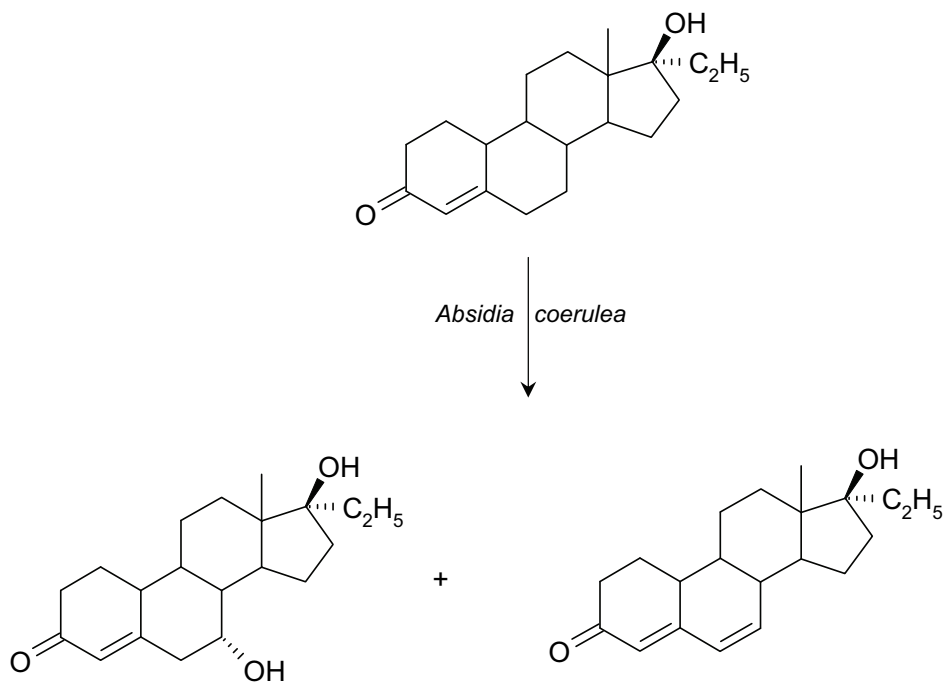
Reakcjami mającymi znaczenie biotechnologiczne są transformacje w pozycji C-7 związków steroidowych. Uważa się ją za jeden z pierwszych etapów trawienia przez żywy organizm [Clark i Hufford 1991]. Mikrobiologiczna hydroksylacja pozycji C7 steroidów o układzie 4-en-3-onu ma znaczenie przy produkcji aktywnych farmakologicznie związków. Przykładowo, 7α -hydroksyandrost-4-en-3,17-dion jest ważnym metabolitem stosowanym do wytwarzania diuretyków [Mahato i Majumdar 1993, Mahato i Garai 1997]. Niezależnie od syntezy chemicznej pochodnych steroidowych 7α i 7β , które można otrzymać w wieloetapowej syntezie i z małymi wydajnościami, bardziej korzystną wydaje się możliwość ich uzyskania w wyniku transformacji mikrobiologicznej. Znalazło to wyraz w pracach opublikowanych w ciągu ostatnich kilkunastu lat [Templeton i Kumar 1987, Smith i in. 1989, Cotillon i Morfin 1999, Huszcza i Dmochowska-Gładysz 2003].

Strukturę drugiego produktu transformacji 17α -metylo-19-nortestosteronu – 15α -hydroksy- 17α -metylo-19-nortestosteronu zaproponowano również na podstawie danych spektralnych. W widmie $^1\text{H-NMR}$ powyższego związku obecny jest charakterystyczny multiplet CHOH w obszarze $\delta=4.1$ ppm, odpowiadający protonowi 15β

[Kirk i in. 1990]. Przesunięcie chemiczne angularnej grupy metylowej C-18 (w stosunku do substratu) o ok. 0.05 ppm w kierunku słabszego pola jest zgodne z danymi literaturowymi [Zürcher 1963].

W widmie $^1\text{H-NMR}$ trzeciego produktu transformacji 17α -metylo-19-nortestosteronu – 17α -metylo-6-dehydro-19-nortestosteronu o obecności dodatkowego wiązania podwójnego wnioskuje się na podstawie obecności sygnału $\delta=6.2$ ppm. Przesunięcie chemiczne sygnału protonu winylowego przy atomie węgla C4 o ok. 0.05 ppm, w odniesieniu do substratu, potwierdzają dane literaturowe [Smith i in. 1989]. Podobne wprowadzenie wiązania podwójnego do pierścienia B z utworzeniem 6-dehydroproduktu obserwowaliśmy w wyniku transformacji, w kulturze tego mikroorganizmu, pochodnej testosteronu – 17α -metylotestosteronu [Brzezowska i in. 1996]. Wprowadzenie wiązania podwójnego C6-C7 zaobserwował również Smith [1989] w reakcji androstendionu w mieszanej kulturze *Absidia coerulea* i *Curvularia lunata*.

Transformacja 17α -etylo-19-nortestosteronu, kolejnej alkilowej pochodnej 19-nortestosteronu, dała dwa główne produkty: 7α -hydroksy- 17α -etylo-19-nortestosteron i 17α -etylo-6-dehydro-19-nortestosteron (rys. 6).



Rys. 6. Transformacja 17α -etylo-19-nortestosteronu w kulturze *A. coerulea*

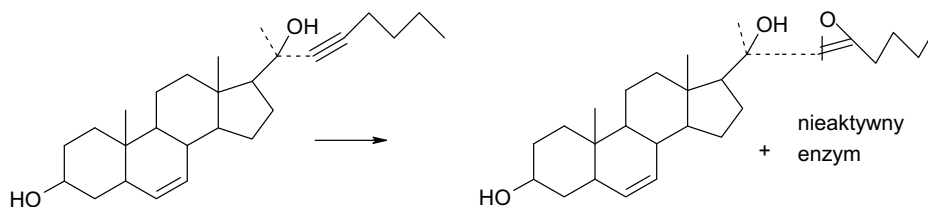
Fig. 6. Transformation of 17α -ethyl-19-nortestosterone in *A. coerulea* culture

Widmo $^1\text{H-NMR}$ 7α -hydroksy- 17α -etylo-19-nortestosteronu zawiera charakterystyczny dla ekwatorialnego protonu 7β , wąski jednoprotonowy sygnał przy $\delta=4.05$ ppm [Bloom i Schull 1955].

Z kolei w widmie $^1\text{H-NMR}$ 6-dehydroproduktu obecny jest dwuprotonowy sygnał przy $\delta=6.2$ ppm, świadczący o obecności dodatkowego wiązania podwójnego. Przesunięcie chemiczne sygnału protonu winylowego, dla układu 4,6-dieno-3-ketonu, przy atomie węgla C4 (o około 0.05 ppm w odniesieniu do substratu) potwierdzają dane literaturowe [Smith i in. 1989]. Podobne wprowadzenie wiązania podwójnego do pierścienia B z utworzeniem 6-dehydroproduktu obserwowano w kulturze *A. coerulea* w wyniku transformacji 17α -metylotestosteronu [Brzezowska i in. 1996] i 17α -metylo-19-nortestosteronu.

W dalszej kolejności przeprowadzono transformację substratów zawierających na atomie węgla C17 grupę 17α -etynylową: 17α -etynilo-19-nortestosteron i 17α -etynilo-18-etylo-19-nortestosteron. Stwierdzono, że wyżej wymienione substraty nie ulegają przekształceniu w kulturze *A. coerulea*.

Zahamowanie reakcji może być spowodowane tym, że steroidowe pochodne etynylowe mogą być nieodwracalnymi inhibitorami cytochromu P-450 [Zeelen 1990]. Taka etynylowa pochodna jest utleniana do reaktywnego oksirenu, który następnie reaguje z enzymem. W wyniku tej reakcji następuje inaktywacja enzymu (rys. 7).



Rys. 7. Przebieg nieodwracalnej inhibicji cytochromu P-450 w wyniku działania etynylowych pochodnych steroidowych.

Fig. 7. The course of irreversible inhibition of cytochrome P-450 as a result of the action of ethynyl steroid derivatives

Podobny hamujący wpływ grupy 17α -etynylowej na przebieg reakcji zaobserwowano w wyniku badań przeprowadzonych przez Žaklej-Marviča i in. [1986], podczas transformacji związków steroidowych w kulturze *Rhizopus nigricans*. Autorzy stwierdzili, że obecność na atomie węgla C17 grupy 17α -etynylowej wywołuje specyficzny wpływ na przebieg transformacji. Transformowane były związki steroidowe zawierające na atomie węgla C17 grupę 17β hydroksylovą lub 17α -metylovą oraz substraty z grupą 17α -etynylową. W przypadku steroidów z grupą 17β hydroksylovą lub 17α -metylovą otrzymywane były produkty reakcji hydroksylacji z dobrymi wydajnościami, natomiast związki zawierające na atomie węgla C17 grupę 17α -etynylową – przekształcane w mniejszym stopniu lub wcale. Również w wyniku badań przeprowadzonych przez Hansona i in. [1996], dotyczących transformacji testosteronu i jego alkilowych oraz etynylowych pochodnych w kulturze *Cephalosporium aphidicola*, stwierdzono, że obecność grupy 17α -etynylowej może być utrudnieniem transformacji 17α -etynylotestosteronu w kulturze tego mikroorganizmu.

WNIOSKI

1. Najbardziej typową reakcją prowadzoną przez system enzymatyczny *Absidia coerulea* jest reakcja wprowadzenia grupy hydroksylowej do szkieletu steroidowego.

2. Kierunek przebiegu reakcji uzależniony jest od struktury substratu. Nie podstawiony na atomie węgla C17 grupą alkilową 19-nortestosteron przekształcany był do 15 α -hydroksypochodnej, podczas gdy jego 17 α -alkilowe (metylowe i etylowe) pochodne ulegały transformacji, dając głównie 7 α -hydroksypochodne będące produktami hydroksylacji w pierścieniu B.

3. W przypadku związków steroidowych zawierających grupę 17 α -etynylową reakcja w kulturze szczepu *A. coerulea* przebiega w znacznie mniejszym stopniu lub nie zachodzi.

4. Obok reakcji hydroksylacji steroidów system enzymatyczny *A. coerulea* katalizuje rzadko prowadzone przez grzyby wprowadzenie wiązania podwójnego C6-C7.

PIŚMIENNICTWO

- Bell A.M., Cherry P.C., Clark J.M., Denny W.A., Sir Ewart Jones. R.H., Meakins G.D., Woodgate P.D., 1972. Microbiological hydroxylation of steroids. Part IV. The pattern of dihydroxylation of monooxygenated 5 α -androstanes with cultures of the fungus *Calonectria decora*. J. Chem. Soc. Perkin Trans. I. 2081–2095.
- Bloom B.M., Schull G.M., 1955. Epoxidation of unsaturated steroids by microorganisms. J. Am. Chem. Soc., 77, 5767–5768.
- Brzezowska E., Dmochowska-Gładysz J., Kołek T., 1996. Biotransformation XXXIX. Metabolism of Testosterone, Androstenedione, Progesterone and Testosterone Derivatives in *Absidia coerulea* Culture. J. Steroid Biochem. Molec. Biol., 57, 5/6, 357–362.
- Charney W., Herzog H.L., 1967. Microbial Transformation of Steroids. A Handbook, Academic Press, New York and London, 269.
- Chen K., Tong W.Y., Wei D.Z., Jiang W., 2007. The 11 β hydroxylation of 16,17 α -epoxyprogesterone and the purification of the 11 β -hydroxylase from *Absidia coerulea* IBL02. Enzyme and Microbial Technology. 41, 71–79.
- Clark M.A., Hufford D.J., 1991. The use of microorganisms for the study of drug metabolism: An update. Medicinal Research Reviews, 11, 5, 473–501.
- Cotillon A.C., Morfin R., 1999. Transformation of 3-hydroxy-steroids by *Fusarium moniliforme* 7 α -hydroxylase. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 68, 229–237.
- Faramarzi M.A., Yazdi M.T., Amini M., Zarrini G., Shafiee A., 2003. Microbial hydroxylation of progesterone with *Acremonium strictum*. FEMS Microbiology Letters, 222, 183–186.
- Fernandes P., Cruz A., Angelova B. Pinheiro H.M. i Cabral J. M. S., 2003. Enzyme and, Microbial conversion of steroid compounds: recent developments. Microbial Technology. 32, 688–70.
- Hanson J.R., Nasir H. i Parvez A., 1996. The hydroxylation of testosterone and some relatives by *Cephalosporium aphidicola*. Phytochemistry. 42, 411–415.
- Huszczka E., Dmochowska-Gładysz J., 2003. Transformation of testosterone and related steroids by *Botrytis cinerea*. Phytochemistry. 62, 155–158.
- Kieslich K., 1991. Biotransformations of industrial use. Acta Biotechnol., 11, 559–570.
- Kirk D.N., Toms H.C., Douglas Ch. i White K., 1990. A survey of the high – field ¹H-NMR spectra of the steroid hormones, their hydroxylated derivatives and related compounds. J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2, 1567–1594.

- Kołek T., Świzdor A., 1998. Biotransformation XLV. Transformations of 4-Eno-3-oxo Steroids in *Fusarium Culmorum* Culture. J. Steroid Biochem. Molec. Biol., 67, 63–69.
- Mahato S.B., Majumdar I., 1993. Current trends in microbial steroid biotransformation. Phytochemistry. 34, 883–898.
- Mahato S.B., Garai S., 1997. Advances in microbial steroid biotransformation. Steroids. 62, 4, 332–345.
- Smith L.L., 1980. Terpenoids and Steroids 4. Overton K.H. (Ed.).
- Smith K.E., Latif S. i Kirk D.N., 1989. Microbial transformations of steroids – V. Transformation of progesterone by whole cells and extracts of *Botryosphaeria obtusa*. J. Steroid Biochem., 33, 927–934.
- Tamm C., Gubler A., Juhas G., Weiss-Berg E. i Zurcher W., 1963. Über die substratspezifität der Hydroxylierung von Androstan und Pregnandenvaten durch *Fusarium lini*. Helv. Chim. Acta., 46, 889–906.
- Templeton J.F., Kumar V. P.S., 1987. New hydroxylation products of progesterone with *Mucor griseocyanus*. Journal of Natural Products. 50, 463–467.
- Wilson M.R., Gallimore W.A., Reese P.B., 1999. Steroid transformations with *Fusarium oxysporum* var. *cubense* and *Colletotrichum musae*. Steroids., 64, 834–843.
- Zeelen F. J., 1990. Medicinal Chemistry of Steroids. Timmerman H. (Ed.).
- Zhang B., Zhu H., Liu X., 2004. Effect of Supercritical Fluids on C11 β -hydroxylation activity of *Absidia coerulea*. Biotechnol. Prog. 20 (6), 1885–1887.
- Zürcher R.F., 1963. Protonenresonanzspektroskopie und Steroidstruktur II. Die lage der C-18 und C-19-Methylsignale in Abhängigkeit von den Substituenten am steroidgerüst. Helv. Chim. Acta., 46, 2054–2088.
- Žaklej-Mavrič M., Belič I. i Gottlieb H.E., 1986. The bioconversion of 17 α -ethynyl steroids with 11 α -hydroxylase of *Rhizopus nigricans*. FEMS., 33, 117–120.

MICROBIAL TRANSFORMATION OF C₁₈ STEROIDS: 19-NORTESTOSTERONE AND ITS 17 α -ALKYL AND ETHYNYL DERIVATIVES IN *ABSIDIA COERULEA* CULTURE

Abstract. The strain of *Absidia coerulea* 93 was used to investigate the transformations of C₁₈ steroids: 19-nortestosterone and its 17 α -alkyl and ethynyl derivatives. 19-nortestosterone and its 17 α -alkyl derivatives were transformed, forming hydroxylated products. It was found that the position of the introduced hydroxyl group depended on the structure of the substrate: 19-nortestosterone underwent hydroxylation at C15, whereas 19-nortestosterone 17 α -alkyl derivatives were predominantly hydroxylated at 7 α -position. Besides hydroxylation introduction of double bond C6-C7 was observed. It was noticed that 19-nortestosterone 17 α -ethynyl derivatives were not transformed in *Absidia coerulea* culture.

Key words: *Absidia coerulea*, hydroxylation, steroids, microorganisms

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 15.12.2008

Do cytowania – For citation: Brzezowska E., Dmochowska-Gładysz J., 2008. Transformacje mikrobiologiczne wybranych substratów steroidowych szeregu C₁₈: 19-nortestosteronu i jego 17 α -alkilo- i etinylo pochodnych w kulturze *Absidia coerulea*. Acta Sci. Pol. Biotechnol. 7(4), 3–12.

WYKORZYSTANIE GLICEROLU ODPADOWEGO DO BIOSYNTETY KWASU CYTRYNOWEGO PRZEZ *YARROWIA LIPOLYTICA* WRATISLAVIA AWG7*

Anita Rywińska

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Streszczenie. Odpadowy glicerol z produkcji biodiesla, zawierający $350 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ glicerolu, zastosowano jako substrat w procesie biosyntezy kwasu cytrynowego przez mutant octanowego *Y. lipolytica* Wratislavia AWG7 w hodowli fed-batch. W czasie 140 h procesu użyty w badaniach szczep produkował $133,4 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ kwasu cytrynowego i $2,7 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ kwasu izocytrynowego z szybkością produkcji i wydajnością kwasu cytrynowego, odpowiednio $0,95 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$ i $0,67 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$. Stężenie całkowite pozostałych kwasów organicznych: kwasu jabłkowego, α -ketoglutazarowego i fumarowego nie przekraczało $6 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$. Ponadto, w hodowli stwierdzono obecność polioli, takich jak erytrytol i mannitol, których stężenie na końcu procesu wynosiło odpowiednio 9,8 i $2,7 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$.

Słowa kluczowe: kwas cytrynowy, glicerol odpadowy, hodowla fed-batch, *Yarrowia lipolytica*

WSTĘP

Dyrektywa Unii Europejskiej 2003/30/EC z dnia 8 maja 2003 r. wprowadziła zapis stosowania dodatku biokomponentów (bioetanolu i biodiesla) do paliw konwencjonalnych przez kraje członkowskie Unii Europejskiej w ilości 5,75% do 2010 r. i 20% do 2020 roku. W związku z tym nakazem dynamicznie zaczęła rozwijać się produkcja estrów metylowych wyższych kwasów tłuszczowych FAME (fatty acid methyl esters), tzw. biodiesla. Do produkcji tego biokomponentu używane są oleje roślinne, np. rzepakowy, palmowy, słonecznikowy, sojowy lub tłuszcze zwierzęce [Fukuda i in. 2001, Marchetti i in. 2007]. W przyszłości duże nadzieje będą związane z wykorzystaniem do produkcji biodiesla tłuszczów pochodzenia mikrobiologicznego uzyskiwanego z hodowli alg i drożdży [Dunahay i in. 1996, Ratledge i Wynn 2002, Ratledge 2004,

* Badania realizowane w ramach grantu MNiSW 2P06T 044 30 w latach 2006–2009.

Guschina i Harwood 2006, Li i in. 2006]. Rodzaj zastosowanego oleju do produkcji biodiesla i stopień jego rafinacji ma duży wpływ na przebieg procesu transestryfikacji triacyloglicerydów i na jakość uzyskanego produktu [Altiparmak i in. 2007]. FAME mogą być stosowane jako paliwo do silników z zapłonem samoczynnym (Diesla) lub do systemów grzewczych [Hirschmann i in. 2005]. Produktem ubocznym w procesie otrzymywania estrów metylowych jest glicerol. Szacuje się, że w niedalekiej przyszłości w Europie będzie powstawało ok. 1 miliona ton surowego glicerolu rocznie. Zagospodarowanie tak dużej ilości taniego glicerolu wymaga poszukiwania nowych metod jego waloryzacji w cenniejsze produkty chemiczne. Jednym z interesujących rozwiązań jest wykorzystanie go jako źródła węgla i energii w procesach mikrobiologicznych. Glicerol był z powodzeniem wykorzystywany w procesach fermentacyjnych do biosyntezy 1,3-propanodiolu [Chen i in. 2003, Papanikolaou, Aggelis 2003], kwasu bursztynowego [Lee i in. 2001], wodoru i alkoholu etylowego [Ito i in. 2005], czy dihydroksyacetonu [Bories i in. 1991]. W procesach tlenowych glicerol jako substrat stosowano do produkcji Single-Cell-Oil [Papanikolaou i in. 2008], erytrytolu [Rymowicz i in. 2008], drożdży paszowych [Juszczak i in. 2005] i kwasu cytrynowego [Papanikolaou i in. 2002, Rymowicz i in. 2006]. Według badań Rymowicza i in. [2006] oraz Papanikolaou i in. [2002] proces biosyntezy kwasu cytrynowego z glicerolu przez drożdże *Yarrowia lipolytica* zachodzi z wydajnością ok. 60%, a stężenie końcowe kwasu w brzeczce jest w zakresie od 73 do 140 g·dm⁻³. Takie wyniki są na tyle korzystne, że proces drożdżowej fermentacji cytrynowej na glicerolu może być interesującym alternatywnym rozwiązaniem technologicznym do procesu pleśniowego z udziałem grzybów *Aspergillus niger*. W procesie biosyntezy kwasu cytrynowego stosowano zarówno glicerol o czystości technicznej, jak i glicerol odpadowy o różnym stopniu oczyszczenia i zawartości glicerolu [Levinson i in. 2007]. Glicerol odpadowy może zawierać także niewielkie ilości estrów, metanol oraz znaczne ilości soli [Papanikolaou i in. 2008]. Zanieczyszczenia te mogą mieć istotny wpływ na przebieg wzrostu drożdży i proces produkcji kwasu cytrynowego. Niewiele jest badań poświęconych wykorzystaniu surowców o niskiej zawartości glicerolu w takich procesach biosyntezy.

Celem pracy jest ocena przydatności odpadowego glicerolu pochodzącego z produkcji estrów metylowych o niskiej zawartości glicerolu do biosyntezy kwasu cytrynowego przez szczep *Y. lipolytica* Wratislavia AWG7 w hodowli fed-batch.

MATERIAŁY I METODY

Mikroorganizm. W badaniach stosowano szczep drożdży *Yarrowia lipolytica* Wratislavia AWG7 o gładkim fenotypie kolonii, otrzymany przez Rywińską i in. [2003]. Szczep jest mutantem octanowym (oct⁻), pochodzi z kolekcji własnej Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, a przechowywano go na skosach YM, w temp. 4° C.

Podłoża. Podłoże inokulacyjne miało skład (g·dm⁻³): glicerol – 50,0; ekstrakt drożdżowy – 3,0; ekstrakt słodowy – 3,0; bactopecton – 5,0; woda destylowana do 1 litra. Do podłoża produkcyjnego użyto następujących składników (g·dm⁻³): glicerol – 90,0; NH₄Cl – 3,0; MgSO₄ x 7H₂O – 1,0; KH₂PO₄ – 0,2; ekstrakt drożdżowy – 1,0; woda wodociągowa – do 1 litra. W czasie hodowli podłoże produkcyjne dwukrotnie (po 24 i 48 h) zasilono roztworem glicerolu odpadowego (po ok. 220 cm³), tak aby stężenie całkowite glicerolu wynosiło 200 g·dm⁻³ (przy objętości roboczej zbiornika 1,3 dm³).

Surowiec. W badaniach stosowano oczyszczony glicerol odpadowy pochodzący z produkcji estrów metylowych (biorafinaria SG BODDINS GmbH, Niemcy), zawierający $350 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ glicerolu i $0,65 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ NaCl.

Warunki prowadzenia hodowli. Hodowle inokulacyjne prowadzono na wstrząsarce rotacyjnej typu Elpan przy 160 rpm w 250 cm^3 kolbach stożkowych zawierających 25 cm^3 podłoża inokulacyjnego przez 72 godz. w temp. 30°C . Do zaszczepienia podłoża produkcyjnego w bioreaktorze używano 50 cm^3 zawiesiny komórek namnożonych w hodowli inokulacyjnej. Bezpośrednio po zaszczepieniu objętość podłoża produkcyjnego wynosiła ok. $0,85 \text{ dm}^3$. Proces biosyntezy kwasu cytrynowego był prowadzony w 3,5-litrowym bioreaktorze typu BIOFLO III (New Brunswick, USA), o objętości roboczej zwiększającej się od $0,85$ do $1,3 \text{ dm}^3$, przy szybkości przepływu powietrza $0,2 \text{ vvm}$, szybkości obrotowej mieszadła 600 rpm, w temp. 30°C . W czasie procesu pH utrzymywano automatycznie na poziomie 5,5 za pomocą 40% NaOH.

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

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

Spis użytych symboli

q_{KC} = szybkość właściwa produkcji kwasu cytrynowego – specific citric acid production rate ($\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)

Q_{KC} = szybkość produkcji kwasu cytrynowego – volumetric citric acid production rate ($\text{g} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$)

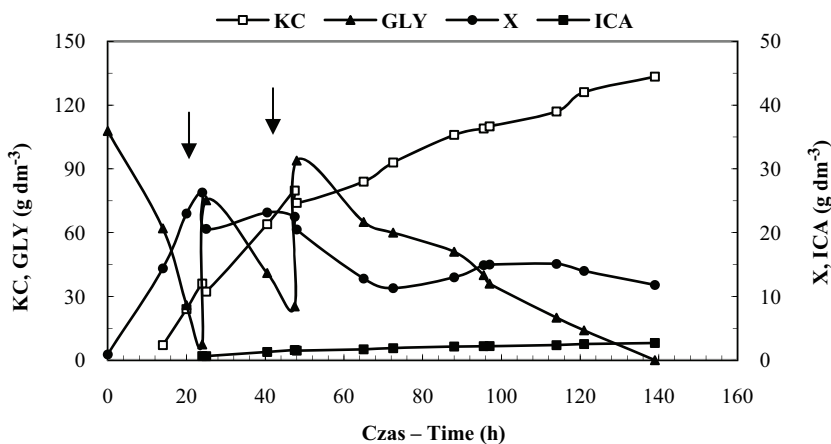
Y_{KC} = wydajność całkowita kwasu cytrynowego – total yield of citric acid ($\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)

OMÓWIENIE I DYSKUSJA WYNIKÓW

Szczegółowej analizie poddano przebieg procesu biosyntezy kwasu cytrynowego z glicerolu przez szczep *Yarrowia lipolytica* Wratislavia AWG7 w hodowli fed-batch. Stężenie całkowite glicerolu w tym procesie wynosiło $200 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Całkowite wyczerpanie glicerolu nastąpiło w 140 h hodowli (rys. 1). Zawartość biomasy w 24 h hodowli wynosiła $26 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$, jednak po każdym zasileniu podłoża hodowlanego roztworem glicerolu zwiększała się objętość robocza reaktora z $0,85$ do $1,3 \text{ dm}^3$, co spowodowało obniżenie zawartości biomasy do ok. $14,5 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ w 60 h hodowli. Czynnikiem limitującym wzrost drożdży *Y. lipolytica* Wratislavia AWG7 był NH_4Cl na poziomie $3 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$. W przypadku stosowania surowców odpadowych należy liczyć się z obecnością w nich różnych zanieczyszczeń, w tym dodatkowych źródeł azotu, które mogą zwiększyć stężenie biomasy, inne mogą ograniczać wzrost drożdży. W analogicznej hodowli tego szczepu poprowadzonej w podłożu z czystym glicerolem ilość biomasy była wyższa i wynosiła $19 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ [Rywińska i in. 2009]. Prawdopodobnie, wykorzystany w niniejszej pracy surowiec zawiera czynniki, które hamują wzrost drożdży. W 140 h procesu fed-batch uzyskano $133,4 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ kwasu cytrynowego z wydajnością $0,67 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ (tab. 1). Ten sam szczep produkował znacznie niższe ilości kwasu

cytrynowego ($88,1 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$) z wydajnością $0,44 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ (z $200 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ glicerolu) w hodowli periodycznej [Rymowicz, in. 2006]. Według wielu autorów system fed-batch, w którym substrat jest dodawany w kilku porcjach lub w sposób ciągły, jest lepszym rozwiązaniem hodowlanym w przypadku stosowania wysokich stężeń substratu [Levišauskas i in. 2006, Limtong i in. 1987]. Ponadto, wydajność produktu jest generalnie wyższa w porównaniu do procesów okresowych [Kim i in. 2007]. Wysokie końcowe stężenie kwasu cytrynowego w brzeczce oraz wydajność całkowita kwasu cytrynowego w przeprowadzonym procesie fed-batch przez szczep *Wratisslavia* AWG7 są porównywalne z wynikami uzyskanymi przez innych autorów [Levinson i in. 2007, Papanikolaou i Aggelis 2003, Papanikolaou i in. 2008]. Levinson i in. [2007] analizowali uzdolnienia do produkcji kwasu cytrynowego z czystego glicerolu dwudziestu siedmiu szczepów z gatunku *Y. lipolytica*, dwóch szczepów *Aciculoconidium aculeatum* oraz trzech szczepów *Candida* sp. Najwyższą koncentrację kwasu cytrynowego ($21,8 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$) oraz najwyższą wydajność ($0,545 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$), otrzymano w hodowli szczepu *Y. lipolytica* NRRL YB-423, przy początkowym stężeniu glicerolu $40 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$. Szczep *Y. lipolytica* ACA-DC 50109 zastosowany przez Papanikolaou i in. [2008] w podłożu zawierającym $164 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ surowego glicerolu produkował tylko $62,5 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ kwasu cytrynowego z wydajnością $0,56 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$, a więc niższą niż szczep *Wratisslavia* AWG7 użyty w niniejszej pracy, a po zakończeniu procesu w 600 h hodowli w podłożu wciąż znajdowało się $52,5 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ glicerolu. Natomiast wyższe wartości wydajności kwasu cytrynowego uzyskiwano w procesach z udziałem różnych szczepów *Y. lipolytica*, gdzie jako substrat stosowano etanol [Arzumanov i in. 2000], n-parafiny [Crolla i Kennedy 2001], olej rzepakowy [Kamzolova i in. 2005] lub sacharozę [Förster i in. 2007]. Według Anastassiadis i Rhem [2006] szczep *Candida oleophila* ATCC 20177 produkował kwas cytrynowy z glukozy z wydajnością $0,41\text{--}0,51 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$.



Rys. 1. Produkcja biomasy [X], kwasu cytrynowego (KC), kwasu izocytrynowego (ICA) oraz zużycie glicerolu [GLY] przez *Y. lipolytica* *Wratisslavia* AWG7 w hodowli fed-batch. Roztwór glicerolu ($350 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$) był wprowadzany do bioreaktora periodycznie w 24 i 48 h do całkowitego stężenia $200 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$, co pokazują strzałki

Fig. 1. Biomass (X), citric acid (KC) and isocitric acid (ICA) and uptake of glycerol (GLY) during fed-batch culture of *Y. lipolytica* *Wratisslavia* AWG7. Glycerol solution ($350 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$) was periodically fed into the fermentor at 24 and 48 h until the total concentration of $200 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ was reached after the initiation of the fed-batch mode indicated by an arrow

Tabela 1. Parametry kinetyczne wzrostu i biosyntezy kwasu cytrynowego z glicerolu odpadowego przez szczep *Y. lipolytica* Wratislavia AWG7Table 1. Kinetic parameters of growth and citric acid fermentation from crude glycerol by strain of *Y. lipolytica* Wratislavia AWG7 strain

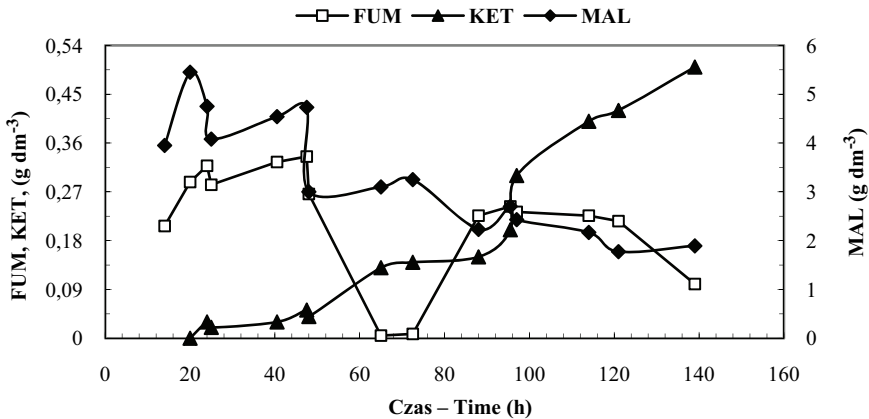
	Parametr Parameter	Glicerol odpadowy Crude glycerol
Czas – Time	(h)	140
Biomasa – Biomass	(g·dm ⁻³)	14,5
Kwas cytrynowy – Citric acid	(g·dm ⁻³)	133,4
Kwas izocytrynowy – Isocitric acid	(g·dm ⁻³)	2,7
Y_{KC}	(g·g ⁻¹)	0,67
Q_{KC}	(g·dm ⁻³ h ⁻¹)	0,95
q_{KC}	(g·g ⁻¹ h ⁻¹)	0,066

Podstawową wadą drożdżowej fermentacji cytrynowej jest nagromadzenie w środowisku hodowlanym produktu ubocznego, jakim jest kwas izocytrynowy. W zależności od użytego substratu kwas izocytrynowy stanowi nawet do 50% sumy kwasów cytrynowych. Według wcześniejszych badań stwierdzono, że mutanty oct⁻ cechują się niską produkcją kwasu izocytrynowego zarówno w hodowlach z glukozą, jak i z glicerolem [Rymowicz i in. 2005, 2006, Rywińska i in. 2006]. W przeprowadzonej hodowli fed-batch z udziałem szczepu Wratislavia AWG7 ilość tego produktu ubocznego była niska i wynosiła na końcu hodowli 2,7 g·dm⁻³, co wpływało na uzyskanie wysokiej czystości procesu (ok. 98%), a kwas izocytrynowy stanowił 2% sumy wytworzonych kwasów cytrynowych. W zależności od zastosowanego glicerolu (odpadowy lub czysty) i typu hodowli (okresowa wstrząsarkowa lub wglębna okresowa w bioreaktorze) stężenie kwasu izocytrynowego w hodowlach mutantów octanowych wynosiło od 0,3 do 5,8 g·dm⁻³ [Rymowicz i in. 2005, 2006]. Dla porównania, w hodowli z udziałem szczepu dzikiego typu, *Y. lipolytica* A-101, w podłożu z glicerolem odpadowym i z glicerolem czystym otrzymano 12,6 i 17,8 g·dm⁻³ kwasu izocytrynowego, co stanowiło odpowiednio 15,8 i 21,1% kwasu izocytrynowego w sumie kwasów (dane niepublikowane). W badaniach Levinson i in. [2007] spośród 27 szczepów wyselekcjonowanych do procesu produkcji kwasu cytrynowego z glicerolu tylko jeden produkował mniej niż 10% kwasu izocytrynowego.

Badano również obecność innych metabolitów pośrednich z cyklu Krebsa, takich jak: kwas jabłkowy, fumarowy i α -ketoglutazarowy w środowisku hodowlanym. Ich sumaryczna ilość nie przekraczała jednak 6 g·dm⁻³ (rys. 2). Uzyskane w tym zakresie wyniki trudno jest porównać z wynikami innych autorów, ponieważ w dostępnej literaturze brak danych na temat ubocznej produkcji pośredników cyklu Krebsa czy glikolizy.

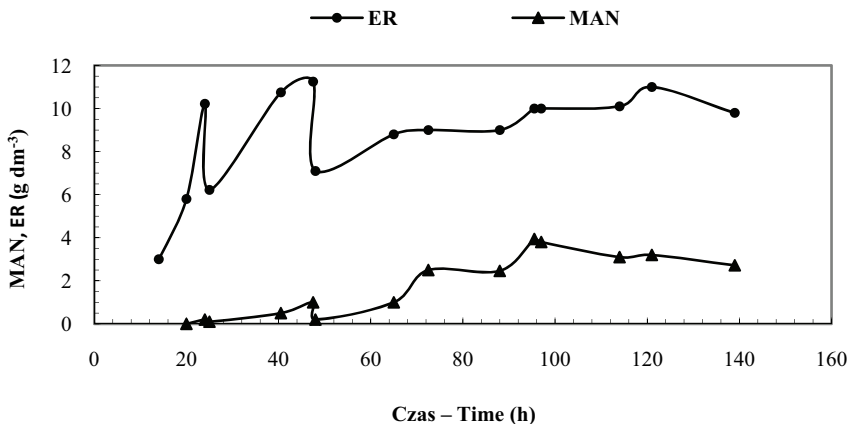
W omawianym w niniejszej pracy procesie, równoległe z nadprodukcją kwasu cytrynowego, tworzone były alkohole cukrowe, takie jak erytrytol i mannitol, których stężenia na końcu hodowli wynosiły odpowiednio 9,8 i 2,7 g·dm⁻³ (rys. 3). Zdolność drożdży *Y. lipolytica* do nadprodukcji polioli z glicerolu była obserwowana podczas procesu biosyntezy kwasu cytrynowego w hodowlach innego szczepu, również mutantu octanowego, *Y. lipolytica* Wratislavia K1 [Rymowicz i in. 2008, Rywińska i in. 2008]. Szczep ten w hodowlach fed-batch, w zależności od sposobu dozowania i początkowego stężenia glicerolu, produkował (z 200 g·dm⁻³ glicerolu) wyższe ilości erytrytolu, w zakresie od 41 do 81 g·dm⁻³ [Rymowicz i in. 2008]. Natomiast w procesach okresowych,

w których początkowe stężenie czystego glicerolu było dwukrotnie niższe i wynosiło $100 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$, stężenie erytrytolu i mannitolu na końcu hodowli wynosiło odpowiednio 19,3 i $10,2 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ [Rywińska i in. 2008]. Na uwagę zasługuje fakt, że podczas gdy szczep Wratislavia K1 nagromadza erytrytol przez cały czas trwania procesu, szczep Wratislavia AWG7 po obniżeniu stężenia glicerolu utylizuje wolno oba poliole, co może mieć wpływ na zwiększenie wydajności kwasu cytrynowego (rys. 3).



Rys. 2. Produkcja kwasu fumarowego (FUM), α -ketoglutazarowego (KET) i jabłkowego (MAL) podczas procesu biosyntezy kwasu cytrynowego z glicerolu odpadowego przez szczep *Y. lipolytica* Wratislavia AWG7 w hodowli fed-batch

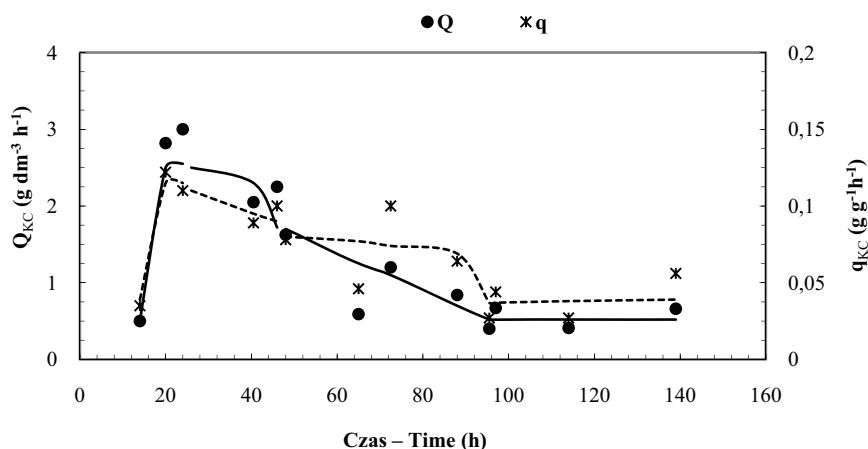
Fig. 2. Production of fumaric acid (FUM), α -ketoglutaric acid (KET) and malic acid (MAL) during fed-batch production of citric acid from crude glycerol by *Y. lipolytica* Wratislavia AWG7 strain



Rys. 3. Produkcja erytrytolu (ER) i mannitolu (MAN) przez *Y. lipolytica* Wratislavia AWG7 z glicerolu odpadowego w hodowli fed-batch

Fig. 3. Production of erythritol (ER) and mannitol (MAN) by *Y. lipolytica* Wratislavia AWG7 on glycerol medium in fed-batch cultivation system

Dynamika procesu biosyntezy kwasu cytrynowego w czasie hodowli była zróżnicowana. W fazie spowolnionego wzrostu, pomiędzy 20–46 h hodowli, objętościowa szybkość produkcji kwasu cytrynowego (Q_{KC}) kształtowała się w zakresie od 1,7 do 2,6 $\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$ (rys. 4). W kolejnych godzinach hodowli, kiedy komórki były w fazie stacjonarnej, szybkość produkcji kwasu cytrynowego obniżała się do ok. 0,52 $\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$ w 95 h hodowli i utrzymywała się na takim poziomie do końca procesu. Szybkość właściwa produkcji kwasu cytrynowego wynosiła w tym czasie około 0,038 $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ (rys. 4). Podobne obniżanie się dynamiki produkcji kwasu cytrynowego było obserwowane podczas biosyntezy kwasu cytrynowego z hydrolu glukozowego przez dziki szczep *Y. lipolytica* A-101 [Wojtatowicz i Rymowicz 1991] oraz z glukozy przez szczep *Candida olephila* ATCC 20177 [Anastassiadis i in. 2002]. Warto jednak podkreślić, że średnia szybkość objętościowa produkcji kwasu cytrynowego, liczona dla całego procesu, była wysoka i wynosiła $Q_{KC}=0,95 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$ (tab. 1), nieznacznie tylko niższa niż w hodowli z czystym glicerolem, 1,16 $\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$ [Rywińska i in. 2009].



Rys. 4. Objętościowa szybkość produkcji kwasu cytrynowego (Q_{KC}) i szybkość właściwa produkcji kwasu cytrynowego (q_{KC}) podczas procesu biosyntezy kwasu cytrynowego z glicerolu odpadowego przez szczep *Y. lipolytica* Wratislavia AWG7 w hodowli fed-batch

Fig. 4. Volumetric citric acid production rate (Q_{KC}) and specific citric acid production rate (q_{KC}) during citric acid biosynthesis from crude glycerol by *Y. lipolytica* Wratislavia AWG7 strain in fed-batch culture

Podsumowując wyniki badań, można stwierdzić, że glicerol odpadowy pochodzący z produkcji estrów metylowych o niskiej zawartości glicerolu ($350 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$) jest bardzo dobrym źródłem węgla do biosyntezy kwasu cytrynowego dla szczepu *Y. lipolytica* Wratislavia AWG7 w systemie fed-batch. Zanieczyszczenia obecne w surowcu pozostawały bez wpływu na dynamikę i wydajność procesu biosyntezy kwasu cytrynowego, które były wysokie i wynosiły odpowiednio $133,4 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ i $0,67 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$. Ponadto proces fermentacji charakteryzował się wysoką czystością z uwagi na niską zawartość kwasu izocytrynowego, metabolitów pośrednich cyklu Krebsa oraz polioli.

PIŚMIENNICTWO

- Altıparmak D., Keskin A., Koca A., Gürü M., 2007. Alternative fuel properties of tall oil fatty acid methyl esters-diesel fuel blends. *Bioresource Technol.* 98, 241–246.
- Anastassiadis S., Aivasidis A., Wandrey C., 2002. Citric acid production by *Candida* strains under intracellular nitrogen limitation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60, 81–87.
- Anastassiadis S., Rhem H.J., 2006. Citric acid production from glucose by yeast *Candida oleophila* ATCC 20177 under batch, continuous and repeated batch cultivation. *Electron. J. Biotechnol.* 9, 26–39.
- Arzumanov T.E., Shishkanova N.V., Finogenova T.V., 2000. Biosynthesis of citric acid by *Yarrowia lipolytica* repeat-batch on culture on ethanol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53(5), 525–529.
- Bories A.C., Claret C., Soucaille P., 1991. Kinetic study and optimisation of the production of dihydroxyacetone from glycerol using *Gluconobacter oxydans*. *Process Biochemistry* 26(4), 243–248.
- Chen X., Xiu Z., Wang J., Zhang D., Xu P., 2003. Stoichiometric analysis and experimental investigation of glycerol bioconversion to 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* under microaerobic conditions. *Enzyme Microb. Technol.* 33(4), 386–394.
- Crolla A., Kennedy K.J., 2001. Optimization of citric acid production from *Candida lipolytica* Y-1095 using n-paraffin. *J. Biotechnol.* 89, 27–40.
- Dunahay T.G., Jarvis E.E., Dais S.S., Roessler P.G., 1996. Manipulation of microalgal lipid production using genetic engineering. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 57–58, 223–231.
- Förster A., Aurich A., Mauersberger S., Barth G., 2007. Citric acid production from sucrose using a recombinant strain of the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75, 1409–1417.
- Fukuda H., Kondo A., Noda H., 2001. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *Journal of Bioscience and Bioengineering.* 92(5), 405–416.
- Goldberg D., Ellis G., 1983. Isocitrate dehydrogenase, [in:] Bergmeyer HU (ed). *Methods of enzymatic analysis.* Verlag Chemie, Weinheim, 3, 183–190.
- Guschina I.A., Harwood J.L., 2006. Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Prog. Lipid Res.* 45, 160–186.
- Hirschmann S., Baganz K., Koschik I., Vorlop K.D., 2005. Development of an integrated bioconversion process for the production of 1,3-propanediol from raw glycerol waters. *Landbauforschung Völkenrode* 55, 261–267.
- Ito T., Nakashimada Y., Senba K., Matsui T., Nishio N., 2005. Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 100(3), 260–265.
- Juszczak P., Musiał I., Rymowicz W., 2005. Dobór szczepów drożdży do produkcji biomasy z glicerolu odpadowego. *Acta Scient. Polon. Biotechnol.* 4(1–2), 65–76.
- Kamzolova S.V., Morgunov I.G., Aurich A., Perevoznikova O.A., Shishkanova N.V., Finogenova T.V., Stottmeister U., 2005. Lipase secretion and citric acid production in *Yarrowia lipolytica* yeast grown on animal and vegetable fat. *Food Technol. Biotechnol.* 43, 113–122.
- Kim Y.H., Kang S.W., Lee J.H., Chang H.I., Yun C.W., Paik H.D., Kang C.W., Kim S.W., 2007. High cell density fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* JUL3 in fed-batch culture for the production of β -glucan. *J. Ind. Eng. Chem.* 13(1), 153–158.
- Lee P.C., Lee W.G., Lee S.Y., Chang H.N., 2001. Succinic acid production with reduced by-product formation in the fermentation of *Anaerobiospirillum succiniciproducens* using glycerol as a carbon. *Biotechnology and Bioengineering* 72(1), 41–48.

- Levinson W.E., Kurtzman C.P., Kuo T.M., 2007. Characterization of *Yarrowia lipolytica* and related species for citric acid production from glycerol. *Enzyme Microb. Technol.* 41, 292–295.
- Levišauskas D., Galvanauskas V., Simutis R., Žilinskas A., Žilinskas J., 2006. Optimization of biomass production in fed-batch culture by feed and dilution control actions. *Information Technol. Control* 35(4), 383–390.
- Li Y.H., Liu B., Zhao Z.B., Bai F.W., 2006. Optimization of Culture Conditions for Lipid Production by *Rhodospiridium toruloides*. *Chin. J. Biotechnol.* 22(4), 650–656.
- Limtong S., Kishimoto M., Seki T., Yoshida T., Taguchi H., 1987. Simulation and optimization of fed-batch culture for ethanol production from molasses. *Bioprocess Eng.* 2, 141–147.
- Marchetti J.M., Miguel V.U., Errazu A.F., 2007. Possible methods for biodiesel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews.* 11, 1300–1311.
- Papanikolaou S., Aggelis G., 2003. Modelling aspects of the biotechnological valorization of crude glycerol: production of citric acid by *Yarrowia lipolytica* and 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum*. *J. Chem. Technol. Biotech.* 78(5), 542–547.
- Papanikolaou S., Fakas S., Fick M., Chevalot I., Galiotou-Panayotou M., 2008. Biotechnological valorisation of raw glycerol discharged after bio-diesel (fatty acid methyl esters) manufacturing process: Production of 1,3-propanediol, citric acid and single cell oil. *Biomass Bioen.* 32, 60–71.
- Papanikolaou S., Muniglia L., Chevalot I., Aggelis A., Marc I., 2002. *Yarrowia lipolytica* as a potential producer of citric acid from raw glycerol. *J. Appl. Microbiol.* 92, 737–744.
- Ratledge C., Wynn J.P., 2002. The biochemistry and molecular biology of lipid accumulation in oleaginous microorganisms. *Adv. Appl. Microbiol.* 51, 1–51.
- Ratledge C., 2004. Fatty acid biosynthesis in microorganisms being used for Single Cell Oil production. *Biochimie* 86 (11), 807–815.
- Rymowicz W., Juszczyk P., Rywińska A., Żarowska B., Musiał I., 2005. Produkcja kwasu cytrynowego z odpadowego glicerolu przez drożdże *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnologia monografie* 2 (2), 46–54.
- Rymowicz W., Rywińska A., Gładkowski W., 2008. Simultaneous production of citric acid and erythritol from crude glycerol by *Yarrowia lipolytica* Wratislavia K1. *Chem. Pap.* 62(3), 1–8.
- Rymowicz W., Rywińska A., Żarowska B., Juszczyk P., 2006. Citric acid production from crude glycerol by acetate mutants of *Yarrowia lipolytica*. *Chem. Pap.* 60(5), 391–394.
- Rywińska A., Skrzypiński A., Juszczyk P., Boruckowski T., Rymowicz W., 2008. Charakterystyka procesu biosyntezy kwasu cytrynowego i polioli z glicerolu i glukozy przez drożdże *Yarrowia lipolytica*. *Acta Scient. Polon. Biotechnol.* 7(1), 27–38.
- Rywińska A., Rymowicz W., Żarowska B., Wojtatowicz M., 2009. Biosynthesis of citric acid from glycerol by acetate mutants of *Yarrowia lipolytica* in fed-batch fermentation. *Food Technol. Biotechnol.* (w druku).
- Rywińska A., Wojtatowicz M., Wielebińska A., 2003. Otrzymywanie mutantów fil' drożdży *Yarrowia lipolytica* do produkcji kwasu cytrynowego. *Acta Scient. Polon. Biotechnol.* 2(1-2), 11–20.
- Wojtatowicz M., Rymowicz W., 1991. Effect of inoculum on kinetics and yield of citric acids production on glucose by *Yarrowia lipolytica* A-101. *Acta Aliment. Pol.*, XVII /XLI/ (2), 137–141.

THE USE OF CRUDE GLYCEROL FOR CITRIC ACID BIOSYNTHESIS BY *YARROWIA LIPOLYTICA* WRATISLAVIA AWG7

Abstract. Crude glycerol from biodiesel industry, containing $350 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ of glycerol, was used as a substrate for citric acid production by acetate negative mutant of *Yarrowia lipolytica* Wratislavia AWG7 in fed-batch experiment. This strain produced $133,4 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ of citric acid and $2,7 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ of isocitric acid, unwanted product in this process, in 140 h of cultivation. As a results the volumetric citric acid production rate and the citric acid yield reached $0,95 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$ and $0,67 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$, respectively. The total amount of other organic acids such as malic, fumaric and α -ketoglutaric acid produced by the Wratislavia AWG7 strain no exceed $6 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$. Polioles such as erythritol and as well as mannitol were produced in this process also. Concentration of these by-products at the and of process were 9,8 i $2,7 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$, respectively.

Key words: citric acid, raw glycerol, fed-batch system, *Yarrowia lipolytica* Wratislavia AWG7

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 15.12.2008

Do cytowania – For citation: Rywińska A., 2008. Wykorzystanie glicerolu odpadowego do biosyntezy kwasu cytrynowego przez *Yarrowia lipolytica* Wratislavia AWG7. Acta Sci. Pol. Biotechnol. 7(4), 13–22.

PRODUKCJA POZAKOMÓRKOWYCH HYDROLAZ PRZEZ SZCZEPY *YARROWIA LIPOLYTICA* POCHODZĄCE Z SERA*

Marek Szoltyśnik, Józefa Chrzanowska, Monika Żelazko,
Joanna Niedbalska, Xymena Połomska, Piotr Juszczyk,
Maria Wojtatowicz

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Streszczenie. Przedmiotem badań była ocena zdolności biosyntezy zewnątrzkomórkowych enzymów proteolitycznych i lipolitycznych przez pięć szczepów drożdży *Yarrowia lipolytica*: JIII1a, JIII1b, JIII1c, PII6a, PII6b wyizolowanych z polskich serów pleśniowych. Po 48 godzinach ich hodowli na podłożach zawierających różne źródła węgla i azotu oznaczano zarówno wzrost drożdży, jak i aktywność wytwarzanych przez nie proteaz wobec kazeiny w pH 7,5 i hemoglobiny w pH 3,0 oraz lipaz wobec tributyriny i oleju maślanego.

W zależności od zastosowanego w podłożu hodowlanym źródła węgla i azotu stwierdzono istotne zróżnicowanie w poziomie wzrostu badanych szczepów drożdży. Wszystkie szczepy *Y. lipolytica* w hodowlach na podłożu zawierającym glukozę i kazeinę, odpowiednio jako źródło węgla i azotu, osiągały wzrost w granicach $1,5-2,1 \cdot 10^8$ kom \cdot mL⁻¹. Wprowadzenie w miejsce glukozy olejów roślinnych spowodowało obniżenie liczby ich komórek w podłożu hodowlanym. Podobny efekt wywołała substytucja kazeiny prostszymi źródłami azotu oraz innymi białkami. Wyjątek stanowił szczep JIII1c, którego populacja niezależnie od wprowadzonego do medium źródła azotu wykazywała zbliżoną liczebność. Zmiana składu podłoża wpływała także na biosyntezę enzymów hydrolitycznych u drożdży. Dodatek glukozy sprzyjał zakwaszeniu środowiska, co stymulowało produkcję zewnątrzkomórkowej proteiny aspartylowej. Wyższy poziom biosyntezy tej proteiny obserwowano również w obecności białek serwatkowych w podłożu. Zastosowanie natomiast oliwy z oliwek prowadziło do alkalizacji podłoża hodowlanego i intensyfikacji syntezy proteiny serynowej. Oliwa z oliwek oraz pozostałe oleje roślinne dynamizowały także produkcję enzymów lipolitycznych.

Słowa kluczowe: *Yarrowia lipolytica*, proteiny, lipazy, biosynteza

* Praca wykonana w ramach projektu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego Nr 2 P06T 050 28.

Adres do korespondencji – Corresponding author: Marek Szoltyśnik, Katedra Technologii Surowców Zwierzęcych i Zarządzania Jakością, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, ul. C.K. Norwida 25/27 50-375 Wrocław, e-mail: marek.szoltyśnik@up.wroc.pl

WSTĘP

Hydrolazy, a wśród nich proteazy i lipazy stanowią ważną grupę enzymów wykorzystywanych w przemyśle żywnościowym. Prowadzone przy ich udziale modyfikacje białek i tłuszczu umożliwiają przebieg wielu operacji technologicznych, a także przyczyniają się do otrzymywania nowych produktów [Fox 1995, Vakhlu, Kour 2006]. Ważnym źródłem pozyskiwania enzymów stały się mikroorganizmy [Kumar i Talagi 1999, Nascimento i Martins 2004, 2006]. Szczególnie atrakcyjnym gatunkiem wykazującym zdolność do biosyntezy hydrolaz są drożdże *Yarrowia lipolytica*. Dotychczas ich zastosowanie w praktyce sprowadzało się jednak głównie do otrzymywania kwasu cytrynowego [Förster i in. 2007, Crolla, Kennedy 2004, Komzolova i in. 2003]. Wiele szczepów tych drożdży, izolowanych z produktów żywnościowych bogatych w białko i tłuszcz, może być źródłem pozakomórkowych enzymów hydrolizujących te składniki [van den Tempel, Jacobson 1998, Czajgucka 2003]. Wśród nich obecne są: proteinaza serynowa, aktywna w środowisku zasadowym i proteinaza aspartylowa, działająca w środowisku kwaśnym [Ogrydziak 1988, 1993, Gloger i in. 1997, Motaba i in. 1997], a u niektórych szczepów proteinaza aktywna w neutralnym pH [Ogrydziak 1993]. Obok enzymów proteolitycznych drożdże te syntezują także enzymy lipolityczne, hydrolizujące triacyloglicerole, głównie w środowisku zasadowym [Navotny i in. 1988, Corzo, Revah 1999, Destan i in. 1997, Aloulou i in. 2007, Yu i in. 2007a, b].

Obok warunków środowiskowych takich jak: pH, temperatura prowadzenia hodowli, obecność jonów metali czy stężenie tlenu rozpuszczalnego ważnym czynnikiem wpływającym na poziom biosyntezy pozakomórkowych enzymów u drożdży jest rodzaj i stężenie źródeł węgla i azotu w podłożu [Singaglia i in. 1994, Corzo, Revah 1999, Kumar, Talagi 1999, Guerzoni i in. 2001, Gdula i in. 2002, Fickers i in. 2004, Lopes i in. 2008]. Jak wykazano w licznych badaniach, dobór odpowiednich warunków hodowli drobnoustrojów umożliwia otrzymywanie nowych i tańszych preparatów enzymatycznych, które mogą znaleźć zastosowanie w wielu gałęziach przemysłu [Ikram-ul-Haq i in. 2003, Nescimento, Martins 2004, 2006].

Celem podjętych badań była ocena zdolności produkcji pozakomórkowych proteaz i lipaz, o zróżnicowanej swoistości wobec wybranych substratów, przez drożdże *Y. lipolytica* wyizolowane z polskich serów pleśniowych, co pozwoliłoby na wybór spośród nich najlepszego szczepu do otrzymywania preparatów enzymatycznych przydatnych w przemyśle żywnościowym, szczególnie mleczarskim.

MATERIAŁ I METODY

Przedmiotem badań było pięć szczepów drożdży *Yarrowia lipolytica*: JIII1a, JIII1b, JIII1c, PII6a, PII6b wyizolowanych z serów z przerostem pleśniowym Rokpol [Wojtatowicz i in. 2001], pochodzących z kolekcji Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu.

Hodowlę drożdży prowadzono na pożywkach przygotowanych poprzez wymianę jednego ze składników podłoża YCG o składzie (g L^{-1}): ekstrakt drożdżowy (YE) (1,7), kazeina (2,0), glukoza (10,0). W miejsce glukozy, jako źródło węgla, wprowadzono: oliwę z oliwek, olej słonecznikowy, olej kukurydziany, olej rzepakowy, olej maślany lub glicerol, a w miejsce kazeiny, stanowiącej źródło azotu, wprowadzono: bactopecton

(Oxoid, UK), soyton, tryptose, casamino acids (Difco, USA) i białka serwatkowe. Hodowlę prowadzoną w niemodyfikowanym podłożu YCG przyjęto jako standardową.

Jako inokulum zastosowano 24 h hodowlę drożdży prowadzoną w wytrząsarce, w podłożu YM (o składzie (g L⁻¹): ekstrakt drożdżowy (3,0), ekstrakt słodowy (3,0), bactopecton (5,0), glukoza (20,0), którą dodawano w ilości 2% do hodowli właściwej. Hodowlę właściwe drożdży prowadzono w 50 mL podłoża w kolbach o objętości 300 mL na wytrząsarce (160 rpm) przez 48 h, w temp. 28°C, a każdy wariant przygotowano w trzech powtórzeniach. Po zakończeniu okresu inkubacji w zawiesinach oznaczano poziom komórek drożdżowych poprzez ich zliczanie w komorze Thoma, a następnie hodowlę wirowano (7000 g, 15 min, temp. 4°C). W klarownym supernatancie oznaczano poziomy aktywności proteolitycznej i lipolitycznej.

Aktywność proteolityczną względem kazeiny oraz kwasowo denaturowanej hemoglobiny jako substratów, odpowiednio w pH 7,5 i 3,0, badano wg Chrzanowskiej i Kołaczekowskiej [1998]. Za jednostkę aktywności proteolitycznej (1 U) w warunkach eksperymentu przyjęto przyrost absorbancji $\Delta A = 0,01$, oznaczanej w spektrofotometrze Beckman DU 640.

Aktywność lipolityczną oznaczano testem dyfuzyjnym [Sztajer i in. 1988] wobec 1% tributyriny (Sigma) i 1% oleju maślanego z Victoria blue jako substratów, niosząc 100 μ l preparatu enzymatycznego do studzienek w podłożu agarowym z odpowiednim substratem i inkubowano w temp. 37°C. Po 72 godzinach dokonywano pomiaru strefy przejaśnień wokół studzienek. Poziom aktywności lipolitycznej określano w oparciu o krzywą standardową sporządzoną dla lipazy z *Candida cylindracea* (Sigma) o aktywności 5390 U mg⁻¹.

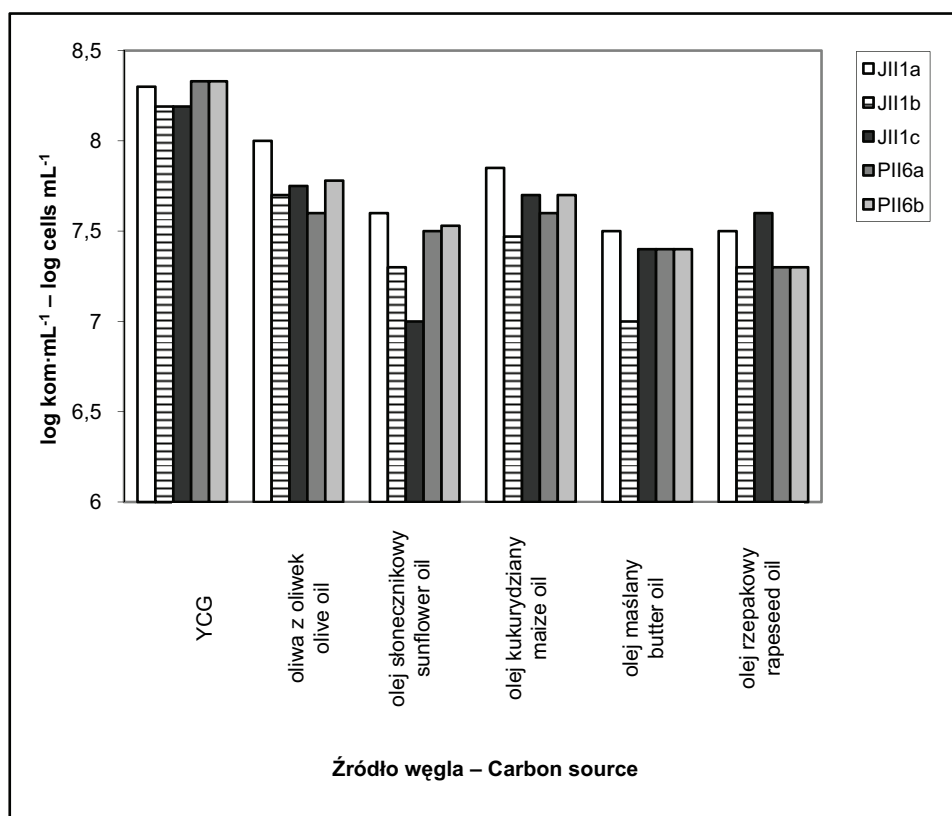
Pomiary aktywności przeprowadzono w trzech powtórzeniach, a prezentowane wyniki stanowią średnią z uzyskanych podczas pomiarów wartości.

OMÓWIENIE I DYSKUSJA WYNIKÓW

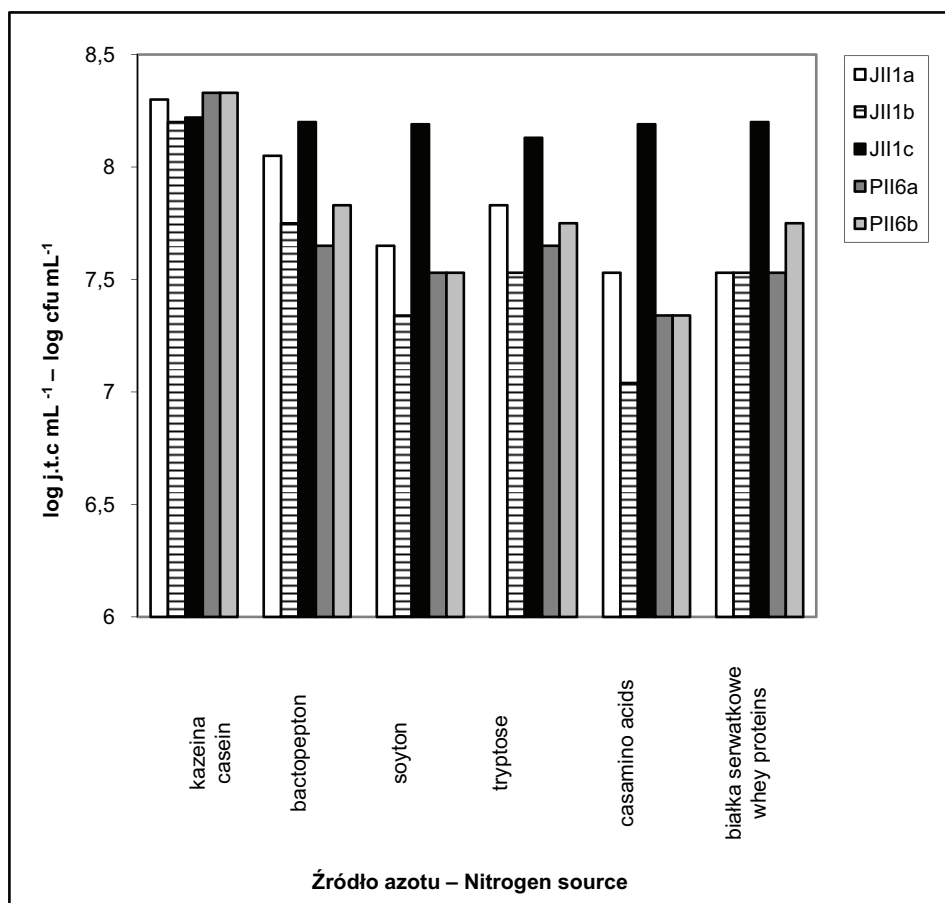
Gatunek *Y. lipolytica* należy do niekonwencjonalnych drożdży wykazujących zdolność wzrostu w środowisku bogatym w hydrofobowe związki takie jak alkany, kwasy tłuszczowe czy oleje [Spencer i in. 2002]. Izolowane są one m.in. z produktów żywnościowych bogatych w białko i tłuszcz, jak np. sery [Wojtatowicz i in. 2001]. Możliwość wykorzystywania różnych substratów wiąże się z dużą zdolnością tych drożdży do produkcji zewnątrzkomórkowych enzymów proteolitycznych i lipolitycznych, umożliwiających im pozyskiwanie niezbędnych składników odżywczych z różnych prekursorów obecnych w środowisku [Barth, Galibardin 1997, Fickers i in. 2003]. Poszczególne szczepy *Y. lipolytica* wykazują jednak duże zróżnicowanie w rodzaju i ilości syntetyzowanych enzymów, na co wpływ mają również warunki środowiska, w którym występują [Kumar, Talagi 1999, Fickers i in. 2003]. Właściwy dobór warunków hodowli oraz składników podłoża hodowlanego jest jednym z najtańszych i najwydajniejszych sposobów stymulacji produkcji enzymów przez mikroorganizmy [Kumar i Talagi 1999]. Potencjalne zastosowanie drożdży *Y. lipolytica* w biotechnologii, jako źródła enzymów hydrolitycznych, wymaga zatem dokładnego scharakteryzowania warunków ich hodowli, umożliwiającego optymalny wzrost oraz pozyskiwanie preparatów enzymatycznych o pożądanej swoistości.

Pochodzące z serów szczepy *Y. lipolytica* JII1a, JII1b, JII1c, PII6a i PII6b kultywowane na podłożu YCG (przyjętym jako standardowe) zawierającym glukozę i kazeinę,

jako źródło odpowiednio węgla i azotu, osiągały najwyższy wzrost na poziomie $1,5\text{--}2,1 \cdot 10^8 \text{ kom} \cdot \text{mL}^{-1}$ (rys. 1, 2). Wprowadzenie w miejsce glukozy olejów roślinnych spowodowało obniżenie poziomu wzrostu badanych szczepów (rys. 1). Jakkolwiek spadek ten był najmniejszy w obecności oliwy z oliwek. Populacja szczepu JII1a w obecności tego zamiennika glukozy osiągnęła liczebność rzędu $10^8 \text{ kom} \cdot \text{mL}^{-1}$, natomiast plon biomasy pozostałych badanych drożdży był niższy, w przedziale $5,6\text{--}6,02 \cdot 10^7 \text{ kom} \cdot \text{mL}^{-1}$. Dobre efekty przyniosło też wprowadzenie oleju kukurydzianego. W hodowli zawierającej ten substytut glukozy najlepiej rozwijał się szczep JII1a, osiągając liczebność $7,08 \cdot 10^7 \text{ kom} \cdot \text{mL}^{-1}$, naj słabiej natomiast szczep PII6a ($3,98 \cdot 10^7 \text{ kom} \cdot \text{mL}^{-1}$). Wprowadzenie do medium hodowlanego olejów: słonecznikowego, maślanego czy rzepakowego skutkowało znacząco słabszym wzrostem badanych drożdży w porównaniu z podłożem YCG. W obecności tych źródeł węgla największą liczebność $3,97 \cdot 10^7 \text{ kom} \cdot \text{mL}^{-1}$ odnotowano dla szczepów JII1a i JII1c w podłożu odpowiednio z olejem słonecznikowym i rzepakowym. Naj słabszy przyrost populacji osiągający poziom $1,07 \cdot 10^7 \text{ kom} \cdot \text{mL}^{-1}$ odnotowano natomiast dla szczepów JII1c i JII1b, rosnących na podłożach zawierających odpowiednio olej słonecznikowy i maślany.



Rys. 1. Wielkość populacji drożdży *Y. lipolytica* w hodowlach zawierających różne źródła węgla
Fig. 1. *Y. lipolytica* yeast population number in cultures containing different carbon source



Rys. 2. Wielkość populacji drożdży *Y. lipolytica* w hodowlach zawierających różne źródła azotu
 Fig. 2. *Y. lipolytica* yeast population number in cultures containing different nitrogen source

Wymiana kazeiny na inne źródło azotu takie jak bactopecton, soytton, tryptose, casamino acids czy białka serwatkowe wpływała na obniżenie poziomu wzrostu (rys. 2). Wyjątek stanowił szczep JII1c, który niezależnie od wprowadzonego źródła azotu osiągał liczebność rzędu 10^8 kom · mL⁻¹. W przypadku pozostałych szczepów zmiana źródła azotu w pożywce powodowała obniżenie namnożenia komórek. Stosunkowo najlepszym substytutem kazeiny okazał się bactopecton, w obecności którego poziom wzrostu szczepów JII1a i JII1c wynosił odpowiednio $1,12 \cdot 10^8$ i $1,58 \cdot 10^8$ kom · mL⁻¹. Poziom wzrostu pozostałych szczepów na tym podłożu był niższy średnio o jeden rząd logarytmiczny i zawierał się w granicach od $4,46 \cdot 10^7$ kom · mL⁻¹ dla szczepu PII6a do $7,07 \cdot 10^7$ kom · mL⁻¹ dla szczepu PII6b. W obecności pozostałych substytutów kazeiny szczepy JII1a, JII1b, PII6a i PII6b wykazywały znacząco niższy poziom wzrostu. Wśród tych hodowli najwyższe liczebności wynoszące $7,07 \cdot 10^7$ kom · mL⁻¹ i $5,6 \cdot 10^7$ kom · mL⁻¹ odnotowano odpowiednio dla szczepu JII1a rosnącego na podłożu zawierającym tryptose oraz dla szczepu PII6b rosnącego na podłożu zawierającym białka

serwatkowe. Najślabszy natomiast wzrost badane szczepu *Y. lipolytica* wykazywały na podłożu zawierającym casamino acids.

We wszystkich badanych hodowlach drożdży *Y. lipolytica* oceniono poziom zewnątrzkomórkowej aktywności proteolitycznej i lipolitycznej. Wykazano wyraźny wpływ składników podłoża hodowlanego na rodzaj i poziom generowanej aktywności proteolitycznej, podczas gdy różnicowanie pomiędzy poszczególnymi szczepami w danym podłożu często nie było znaczące. Aktywność enzymów proteolitycznych oznaczano w pH 3,0 i 7,5 (tab. 1, 2). W przypadku wszystkich badanych szczepów zmiana źródła węgla z glukozy na oleje roślinne, szczególnie oliwę z oliwek, stymulowała biosyntezę proteiny serynowej, aktywnej w pH 7,5, natomiast niekorzystnie wpływała na biosyntezę proteiny aspartylowej, działającej w pH 3,0 (tab. 1). Związane jest to prawdopodobnie z regulatorowym wpływem pH na ekspresję proteaz *Y. lipolytica* [Gloger i in. 1997]. Zastosowanie olejów roślinnych jako źródeł węgla prowadziło do wyraźnej alkalizacji środowiska (pH \geq 7,8), promując ekspresję proteiny serynowej (tab. 1). Podobną zależność pomiędzy poziomem syntezy alkalicznej proteiny przez mikroorganizmy, a stopniem alkalizacji medium hodowlanego obserwowano w wielu innych badaniach [Glazer i Nikaido 1995, Kumar, Talagi 1999]. Także w badaniach Gduli i in. [2002], prowadzonych na szczepach *Y. lipolytica* izolowanych z gleby i hodowanych na pożywkach zawierających różne stężenie glukozy, wykazano, że podwyższenie stężenia tego składnika prowadzi do obniżenia końcowego pH, co stymulowało produkcję proteiny aspartylowej, hamując jednocześnie produkcję proteiny serynowej.

Z kolei w hodowlach na podłożach o niskim pH wyraźnie dominowała aktywność proteolityczna w pH 3,0 (tab. 2). Najwyższy poziom proteiny aktywnej w środowisku kwaśnym odnotowano w hodowli prowadzonej z dodatkiem białek serwatkowych. Poziom aktywności tego enzymu oznaczony dla szczepu JIII1b, PII6a i PII6b przewyższał wartości odnotowane w hodowli prowadzonej na podłożu YCG i zamykał się w granicach 440–570 UmL⁻¹. Obecność w podłożu tryptose czy bactopectonu również stymulowała produkcję kwaśnej proteiny. Wprowadzenie białek innych niż kazeina powodowało znaczące obniżenie aktywności ujawniającej się w pH 7,5 bądź też jej całkowity zanik. Najniższy poziom sekrecji pozakomórkowych protein zarówno serynowej, jak i aspartylowej zaobserwowano w hodowlach, w których wykorzystano łatwo dostępne substraty peptonowe takie jak: soyton i casamino acids. Podobny, hamujący wpływ składników peptonowych podłoża na biosyntezę zewnątrzkomórkowych protein przez mikroorganizmy obserwowali także inni badacze [Kumar, Talagi 1999, Gdula i in. 2002].

W badanych hodowlach drożdży oceniono także poziom zewnątrzkomórkowej aktywności lipolitycznej. Podobnie jak w przypadku enzymów proteolitycznych zauważono wyraźny wpływ składników podłoża hodowlanego na poziom ich biosyntezy. Znaczenie wyraźnej natomiast widoczne były różnice pomiędzy szczepami *Y. lipolytica* w ich wrażliwości na składniki podłoża, zwłaszcza w przypadku źródeł węgla. Zaobserwowano także różnice w swoistości produkowanych lipaz, oznaczanych wobec dwóch substratów: oleju maślanego i tributyriny.

Stosunkowo najlepszym zamiennikiem glukozy, stymulującym aktywność lipolityczną, okazała się oliwa z oliwek (tab. 1). W hodowlach wszystkich szczepów, z wyjątkiem JIII1a, odnotowano od kilku do kilkudziesięciu razy wyższą niż w hodowli na podłożu standardowym aktywność lipolityczną wobec oleju maślanego. Szczególnie

wysoki poziom aktywności lipazy, wynoszący 389 UmL^{-1} , oznaczono dla szczepu PII6b, natomiast w hodowlach szczepów JIIIb i PII6a jej poziom wynosił odpowiednio 62 i 80 UmL^{-1} . Szczep PII6a, hodowany na podłożu zawierającym oliwę z oliwek, wykazywał natomiast najwyższą aktywność, wynoszącą 136 UmL^{-1} , wobec tributyriny jako substratu.. Wprowadzenie do podłoża hodowlanych innych olejów roślinnych bardzo różnie wpływało na poziom generowanej aktywności lipolitycznej przez poszczególne szczepy. Przykładowo, obecność oleju słonecznikowego w medium hodowlanym stymulowała biosyntezę zewnątrzkomórkowej lipazy przez szczepy PII6b i JIIIc. W tych hodowlach aktywność lipolityczna, oznaczana wobec oleju maślanego, wynosiła odpowiednio 108 UmL^{-1} i 73 UmL^{-1} . Zastosowanie oleju słonecznikowego jako źródła węgla nie powodowało natomiast wzmożonej syntezy lipazy zewnątrzkomórkowej przez inne szczepy (tab. 1). Wprowadzenie do medium hodowlanego oleju rzepakowego stymulowało sekrecję lipaz przez szczepy JIIIc i PII6a, w których hodowlach aktywność tego enzymu, oznaczana wobec oleju maślanego, osiągnęła wartość odpowiednio 86 i 59 UmL^{-1} . Z kolei zastosowanie jako źródła węgla oleju maślanego stymulowało aktywność lipolityczną szczepu PII6a, osiągającą w tej hodowli aktywność wynoszącą 63 UmL^{-1} . Znaczącego przyrostu aktywności lipolitycznej pod wpływem olejów: słonecznikowego, kukurydzianego, maślanego czy rzepakowego nie obserwowano jednak w oznaczeniach, w których stosowano jako substrat tributyrinę (tab. 1).

Otrzymane wyniki potwierdzają badania innych autorów [Nowotny i in. 1993, Destain i in. 1994, Corzo, Revah 1999, Gdula i in. 2002], którzy wykazali, że substraty tłuszczowe takie jak oleje roślinne, w tym oliwa z oliwek czy tripalmitynian i tristearnian [Janssen i in. 1994] są dobrymi induktorami syntezy enzymów lipolitycznych u drożdży *Y. lipolytica*. Z kolei glukoza, obecna w podłożu hodowlanym, uważana jest za czynnik obniżający biosyntezę lipaz przez te drożdże [Gdula i in. 2002, Fickers i in. 2003, 2004]. Oliwa z oliwek była dobrym stymulatorem produkcji lipaz także w przypadku innych gatunków drożdży izolowanych z serów, np. *Geotrichum candidum* [Jacobson i in. 1995].

Modyfikacja źródeł azotu w mniejszym stopniu wpływała na poziom generowanej aktywności lipolitycznej (tab. 2). W kilku przypadkach zaobserwowano znaczący wzrost tej aktywności w porównaniu z aktywnością w hodowli prowadzonej w podłożu standardowym z kazeiną. Szczep PII6a rosnący na podłożu zawierającym białka serwatkowe generował ponad 10-krotnie wyższą aktywność wobec tributyriny, wynoszącą 108 UmL^{-1} , niż podczas wzrostu na podłożu YCG (tab. 2). Najwyższy natomiast poziom (45 UmL^{-1}) aktywności oznaczanej wobec oleju maślanego odnotowano dla szczepu JIIIa rosnącego w medium zawierającym bactopecton. Wprowadzenie hydrolizatu białek sojowych (soyton) także powodowało kilkakrotny wzrost aktywności lipolitycznej, oznaczanej wobec tributyriny, u wszystkich badanych szczepów *Y. lipolytica*. Z kolei w hodowlach szczepów JIIIa i JIIIc zawierających casamino acids obserwowano kilkakrotny wzrost aktywności lipolitycznej oznaczanej wobec oleju maślanego. Podobnie Fickers i in. [2004] zaobserwowali najwyższy poziom produkcji zewnątrzkomórkowej lipazy przez szczep *Y. lipolytica* rosnący na podłożu zawierającym hydrolizat kazeiny. Składniki peptydowe stymulowały także produkcję zewnątrzkomórkowych enzymów lipolitycznych przez inne mikroorganizmy, np. *Geotrichum candidum* [Jacobson 1995] czy *Penicillium roqueforti* [Eitenmiller i in. 1970].

Tabela 1. Wpływ źródeł węgla na poziom aktywności zewnątrzkomórkowych enzymów hydrolytycznych u szczepów *Y. lipolytica* wyizolowanych z sera
 Table 1. The effect of the carbon sources on activity of extracellular hydrolytic enzymes of *Y. lipolytica* strains isolated from cheese

Źródło węgla Carbon source	Szczep Strain	pH	Aktywność proteolityczna [UmL ⁻¹] Proteolytic activity [UmL ⁻¹]		Aktywność lipolityczna [UmL ⁻¹] Lipolytic activity [UmL ⁻¹]	
			pH 3,0	pH 7,5	Olej maślany Butter oil	Tributyryna Tributyryn
Glukoza Glucose	JII1a	5,4	410	18	6	14
	JII1b	6,8	365	8	10	17
	JII1c	6,6	338	7	9	17
	PII6a	5,9	438	27	13	10
	PII6b	5,3	400	84	15	24
Oliwa z oliwek Olive oil	JII1a	7,8	60	273	9	16
	JII1b	7,9	45	315	62	11
	JII1c	7,9	35	304	22	82
	PII6a	8,0	60	248	80	136
	PII6b	8,0	20	251	389	6
Olej słonecznikowy Sunflower oli	JII1a	8,2	nd	223	7	12
	JII1b	8,3	nd	260	73	9
	JII1c	8,3	nd	253	10	12
	PII6a	8,3	nd	228	10	12
	PII6b	8,3	nd	227	108	4
Olej kukurydziany Maize oil	JII1a	8,2	42	240	37	7
	JII1b	8,2	40	270	25	13
	JII1c	8,1	50	202	17	14
	PII6a	8,3	65	230	25	9
	PII6b	8,3	50	243	12	10
Olej maślany Butter oil	JII1a	8,4	10	163	23	9
	JII1b	8,3	5	223	49	27
	JII1c	8,4	20	280	22	8
	PII6a	8,4	10	150	62	11
	PII6b	8,4	5	143	48	26
Olej rzepakowy Rapeseed oil	JII1a	8,3	20	165	19	15
	JII1b	8,2	10	200	19	15
	JII1c	8,3	10	308	86	15
	PII6a	8,3	0	180	59	7
	PII6b	8,3	15	237	16	8

Tabela 2. Wpływ źródeł azotu na poziom aktywności zewnątrzkomórkowych enzymów hydrolytycznych u szczepów *Y. lipolytica* wyizolowanych z seraTable 2. The effect of the nitrogen sources on activity of extracellular hydrolytic enzymes of *Y. lipolytica* strains isolated from cheese

Źródło azotu Nitrogen source	Szczep Strain	pH	Aktywność proteolityczna [UmL ⁻¹] Proteolytic activity [UmL ⁻¹]		Aktywność lipolityczna [UmL ⁻¹] Lipolytic activity [UmL ⁻¹]	
			pH 3,0	pH 7,5	Olej maślany Butter oil	Tributyryna Tributyryn
Kazeina Casein	JII1a	5,4	410	18	6	14
	JII1b	6,8	365	8	10	17
	JII1c	6,6	338	7	9	17
	PII6a	5,9	438	27	13	10
	PII6b	5,3	400	84	15	24
Bacto pepton	JII1a	6,0	260	13	45	12
	JII1b	6,7	100	10	5	13
	JII1c	6,6	100	0	13	21
	PII6a	5,8	280	27	14	53
	PII6b	5,9	140	17	10	56
Soyton	JII1a	6,3	125	33	21	78
	JII1b	6,4	20	7	19	47
	JII1c	6,5	30	5	24	19
	PII6a	6,5	38	nd	13	69
	PII6b	6,8	43	nd	14	35
Tryptose	JII1a	5,84	265	nd	9	0
	JII1b	6,6	190	nd	5	4
	JII1c	6,6	145	10	14	4
	PII6a	6,3	155	nd	20	11
	PII6b	6,2	150	nd	29	11
Casamino acids	JII1a	5,3	41	nd	33	24
	JII1b	6,1	39	nd	15	8
	JII1c	6,3	20	nd	22	12
	PII6a	6,1	15	nd	14	11
	PII6b	6,0	50	nd	15	18
Białka serwatkowe Whey proteins	JII1a	2,3	180	nd	25	11
	JII1b	2,0	460	nd	10	5
	JII1c	2,0	120	nd	16	62
	PII6a	2,1	440	nd	12	108
	PII6b	2,0	570	nd	12	6

nd – nie oznaczone

Podobnie jak w przypadku biosyntezy enzymów proteolitycznych tak i lipaz można zaobserwować związek pomiędzy pH podłoża hodowlanych a poziomem syntezy enzymów lipolitycznych. Alkalinizacja środowiska sprzyja produkcji enzymów lipolitycznych. Wyniki te są zgodne z doniesieniami innych autorów, którzy także obserwowali maksymalną aktywność lipolityczną różnych gatunków drożdży, w tym *Y. lipolytica*, w $\text{pH} \geq 6,5$ [Destain i in. 1997, Corzo, Revah 1999, Aloulou i in. 2007, Yu i in. 2007]. Guerzoni i in. [2001] również wykazali hamujący wpływ wysokiego stężenia kwasu mlekowego na tempo uwalniania kwasu oleinowego z triacylogliceroli tłuszczu mleka przez lipazy z *Y. lipolytica*.

PODSUMOWANIE

Zastosowanie w podłożu hodowlanym różnych źródeł węgla i azotu wpływało istotnie na poziom wzrostu badanych szczepów *Y. lipolytica* izolowanych z polskich serów pleśniowych, znacząco natomiast oddziaływało na poziom sekrecji zewnątrzkomórkowych enzymów hydrolitycznych. Zastosowanie jako źródeł węgla olejów roślinnych, a szczególnie oliwy z oliwek, wpływało pozytywnie na biosyntezę zasadowej proteiny oraz enzymów lipolitycznych, hamowało natomiast produkcję kwaśnej proteiny, której najwyższy poziom odnotowano w hodowli zawierającej glukozę jako źródło węgla. Produkcji tego enzymu sprzyjało także zastosowanie jako źródeł azotu kazeiny i białek serwatkowych.

PIŚMIENNICTWO

- Aloulou A., Rodrigues J.A., Puccinelli D., Mouz N., Leclaire J., Leblond Y., Carriere F., 2007. Purification and biochemical characterization of the LIP2 lipase from *Yarrowia lipolytica*. *Biochem. Biophys. Acta*, 1771, 228–237.
- Barth G., Gaillardin C., 1997. Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*, *FEMS Microbiol. Rev.*, 19, 219–327.
- Chrzanowska J., Kołaczkowska K., 1998. Production of extracellular proteolytic enzymes by *Beauveria bassiana*. *Acta. Mycol.* 33, 277–285.
- Corzo G., Revah S., 1999. Production and characteristics of the lipase from *Yarrowia lipolytica* 681, *Bioresour. Technol.* 70, 173–180.
- Crolla A., Kennedy K.J., 2004. Fed-batch production of citric acid by *Candida lipolytica* grown on n-paraffins. *J. Biotechnol.* 110, 73–84.
- Czajgucka A., Chrzanowska J., Juszczyk P., Szołtyśik M., Wojtatowicz M., 2003. Proteolytic activity of yeast strains originating from rokpól cheese. *Acta Sci. Pol. Biotechnologia*, 2, 73–82.
- Destain J., Roblain D., Thonart T., 1997. Improvement of lipase production from *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol. Letters*. 19, 105–107.
- Eitenmiller R.R., Vakil J.R., Shahani K.M., 1970. Production and properties of penicillium roqueforti lipase. *J. Food Sci.* 35, 130–133.
- Fickers P., Nicaud J.M., Destain J., Thonart P., 2003. Overproduction of lipase by *Yarrowia lipolytica*. *Curr. Genetics* 11, 369–375.
- Fickers P., Nicaud J.M., Gaillardin C., Destain J., Thonart P., 2004. Carbon and nitrogen sources modulate lipase production in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J. Appl. Microbiol.* 96, 742–749.

- Förster A., Jacobs K., Jurek T., Mauersberger S., Barth G., 2007. Overexpression of the ICL1 gene changes the product ratio of citric acid production by *Yarrowia lipolytica*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 77, 861–869.
- Fox P.F., Singh T.K., McSweeney P.L.H., 1995. Chemistry of Structure-Function Relationships in cheese, Ed. E.L. Malin and M.H. Tunick, Plenum Press, New York, 1995.
- Gdula A., Chrzanowska J., Szołtysik M., Kieźel X., Wojtatowicz M., 2002. Factors affecting hydrolytic enzymes production by *Yarrowia lipolytica* strains. Biotechnologia 1, 81–88.
- Glazer A.N., Nikado H., Principal mode of metabolism. [in:] Microbial Biotechnology New York 1995, W.H. Freeman & Co, New York, 55–60.
- Glover D.J., McEwen R.K., Thomas C.R., Young, T.W., 1997. pH-Regulated expression of the acid and alkaline extracellular proteases of *Yarrowia lipolytica*. Microbiol. 143, 3045–3054.
- Guerzoni M.E., Lanciotti R., Vannini L., Galgano F., Vavati F., Gardini F., Suzzi G., 2001. Variability in the lipolytic activity in *Yarrowia lipolytica* and its dependence of environmental conditions. Int. J. Food Microbiol., 69, 79–89.
- Ikram-ul-Haq, Mughtar H., Dudi S., Ali S., Quadeer M.A., 2003. Production of proteases by locally isolated mould culture under lab conditions. Biotechnology, 3, 30–36.
- Jacobsen T., Poulsen O.M., 1995. Comparison of lipases from different strains of the fungus *Geotrichum candidum*. Biochim. Letters, 12(2), 121–126.
- Kamzolova S.V., Shishkanova N.V., Morgunov I.G., Finogenova T.V. 2003. Oxygen requirements for growth and citric acid production of *Yarrowia lipolytica*. FEMS Yeast Res. 3, 217–222.
- Kumar C.G., Takagi H., 1999. Microbial alkaline proteases: From a bioindustrial viewpoint. Biotechnol. Adv. 17, 561–594.
- Lopes M., Gomes N., Gonçalves C., Coelho M.A.Z., Mota M., Belo I., 2007. *Yarrowia lipolytica* lipase production enhanced by increased air pressure. Lett. Appl. Microbiol. 46, 225–260.
- Matoba S., Morano K.A., Klionsky D.J., Kim K., Ogrzyziak D.M., 1997. Dipetidyl aminopeptidase processing and biosynthesis of alkaline extracellular protease from *Yarrowia lipolytica*. Microbiol. 143, 3263–3272.
- Nascimento W.C.A do, Martins M.L.L., 2004. Production and properties of an extracellular protease from thermophilic *Bacillus* sp. Brazil. J. Microbiol. 35, 91–96.
- Nascimento W.C.A do, Martins M.L.L., 2006. Studies on the stability of protease from *Bacillus* sp. And its compatibility with commercial detergent. Brazil. J. Microbiol. 37, 307–311.
- Novotny C., Dolezalova L., Musil P., Novak M., 1988. The production of lipases by some *Candida* and *Yarrowia* yeasts. J. Basic Microbiol. 28, 221–227.
- Ogrzyziak D.M., 1988. Production of alkaline extracellular protease by *Yarrowia lipolytica*. Crit. Rev. Biotechnol. 8, 177–187.
- Ogrzyziak D.M., 1993. Yeast extracellular protease. Crit. Rev. Biotechnol. 13, 1–55.
- Sinigaglia M., Lanciotti R., Guerzoni M.E., 1994. Biochemical and physiological characteristics of *Yarrowia lipolytica* strains in relation to isolation source. Can. J. Microbiol., 40, 54–59.
- Spencer J.F.T., Ragout A.I., Laluece C., 2002. Appl. Microbiol. Biotechnol. 58, 142–156.
- Sztajner H., Maliszewska I., Wiczorek J., 1988. Production of exogenous lipase by bacteria, fungus and actinomyces. Enzym. Microbiol. Technol. 10, 492–497.
- Vakhlu J., Kour A., 2006. Yeast lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. Electron. J. Biotechnol., 9, 69–85.
- van den Tempel T., Jakobsen M., 1998. Yeast associated with Danablu. Int. Dairy J. 8, 25–31.
- van den Tempel T., Jakobsen M., 2000. The technological characteristics of *Debaryomyces hansenii* and *Yarrowia lipolytica* and their potential as starter cultures for production of Danablu. Int. Dairy J. 10, 263–270.

- Wojtatowicz M., Chrzanowska J., Juszczak P., Skiba A., Gdula A., 2001. Identification and biochemical characteristic of yeast microflora of Rokpol cheese. *Int. J. Food Microbiol.*, 69, 135–140.
- Yu M., Qin S., Tan T., 2007a. Purification and characterization of extracellular lipase Lip2 from *Yarrowia lipolytica*. *Process Biochemistry*, 42, 384–391.
- Yu M., Lange S., Richter S., Tan T., Schmid R.D., 2007b. High-level expression of extracellular lipase Lip2 from *Yarrowia lipolytica* in *Pichia pastoris* and its purification and characterization. *Prot. Expr. Pur.*, 2007a, 53, 255–263.

PRODUCTION OF EXTRACELLULAR HYDROLASES BY THE STRAINS OF *YARROWIA LIPOLYTICA* ORIGINATED FROM CHEESE

Abstract. The purpose of this study was to evaluate the ability of five strains of yeasts *Yarrowia lipolytica* JII1a, JII1b, JII1c, PII6a, PII6b, isolated from Polish mould cheese, to secrete extracellular proteolytic and lipolytic enzymes. After their cultivation for 48 hours in media containing different carbon and nitrogen sources the level of population growth as well as the activities of proteolytic enzymes (at pH 3,0 and 7,5 against hemoglobin and casein, respectively) and lipolytic enzymes (against butter oil and tributyrine) were determined.

It was shown that investigated strains of *Y. lipolytica* exhibited different growth and enzyme biosynthesis pattern depending on the carbon and nitrogen source present in medium. Populations of all studied strains reached the level of $1,5-2,1 \cdot 10^8$ cells mL⁻¹ in medium containing glucose and casein as the carbon and nitrogen sources, respectively. Substitution of glucose by plant oils resulted in decrease of their growth. Similar effect was observed when casein was substituted by more simple nitrogen sources. The exception was strain JII1 c, which growth was not affected by nitrogen component replacement. The changes in composition of growth medium influenced on the biosynthesis level of hydrolytic enzymes. The presence of glucose stimulated the production of extracellular aspartic proteinase. Also whey proteins favoured the biosynthesis of this proteinase. Whereas applying of the olive oil enhanced biosynthesis of serine proteinase. The presence of plant oils, including olive oil, in growth medium promoted the secretion of lipolytic enzymes.

Key words: *Yarrowia lipolytica*, proteinases, lipases, biosynthesis

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 15.12.2008

Do cytowania – For citation: Szołtysik M., Chrzanowska J., Żelazko M., Niedbalska J., Połomska X., Juszczak P., Wojtatowicz M., 2008. Produkcja pozakomórkowych hydrolaz przez szczepy *Yarrowia lipolytica* pochodzące z sera. *Acta Sci. Pol. Biotechnol.* 7(4), 23–34.

SPIS TREŚCI CONTENTS

Ewa Brzezowska, Jadwiga Dmochowska-Gładysz

- Transformacje mikrobiologiczne wybranych substratów steroidowych szeregu C₁₈: 19-nortestosteronu i jego 17 α -alkilo- i etynylo pochodnych w kulturze *Absidia coerulea* 3
Microbial transformation of C₁₈ steroids: 19-nortestosterone and its 17 α -alkyl and ethynyl derivatives in *Absidia coerulea* culture

Anita Rywińska

- Wykorzystanie glicerolu odpadowego do biosyntezy kwasu cytrynowego przez *Yarrowia lipolytica* Wratislavia AWG7 13
The use of crude glycerol for citric acid biosynthesis by *Yarrowia lipolytica* Wratislavia AWG7

Marek Szoltysik, Józefa Chrzanowska, Monika Żelazko, Joanna Niedbalska, Xymena Połomska, Piotr Juszczyk, Maria Wojtatowicz

- Produkcja pozakomórkowych hydrolaz przez szczepy *Yarrowia lipolytica* pochodzące z sera 23
Production of extracellular hydrolases by the strains of *Yarrowia lipolytica* originated from cheese