

ACTA SCIENTIARUM POLONORUM

Czasopismo naukowe założone w 2001 roku przez polskie uczelnie rolnicze

Biotechnologia

Biotechnologia

Biotechnology

11 (1) 2012



Bydgoszcz Kraków Lublin Olsztyn
Poznań Siedlce Szczecin Warszawa Wrocław

Executive Board of *Acta Scientiarum Polonorum*

Jerzy Sobota (Wrocław) – chairman

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

Scientific Board of *Biotechnology*

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

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

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

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

Print edition is an original (reference) edition

Cover design
Daniel Morzyński

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

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

Printed: 150 + 16 copies Publishing sheets: 2,8 Printing sheets: 2,5

Druk i oprawa: EXPOL, P. Rybiński, J. Dąbek, Spółka Jawna
ul. Brzeska 4, 87-800 Włocławek

Szanowni Państwo,

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

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

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

Zespół Redakcyjny

Dear Readers,

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

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

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

Editorial Team

**WYKORZYSTANIE METODY AFLP DO PORÓWNANIA
ORAZ OCENY ZRÓŻNICOWANIA GENETYCZNEGO
WYBRANYCH ODMIAN I MIEJSCOWYCH POPULACJI
FASOLI ZWYCZAJNEJ (*PHASEOLUS VULGARIS* L.)
I FASOLI WIELOKWIATOWEJ
(*PHASEOLUS COCCINEUS* L.)**

Jarosław Nowosielski¹, Dorota Nowosielska², Magdalena Frąk³,
Urszula Jankiewicz³, Zofia Bulińska-Radomska⁴

¹Laboratorium Kontroli GMO, Zakład Biologii i Cytogenetyki Roślin, Instytut
Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Radzików

²Departament Hodowli i Ochrony Roślin, Wydział Zasobów Genowych i Roślin
Genetycznie Zmodyfikowanych, Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi

³Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

⁴Krajowe Centrum Roślinnych Zasobów Genowych, Instytut Hodowli
i Aklimatyzacji Roślin, Radzików

Streszczenie. Celem prezentowanych badań było określenie przydatności metody AFLP do oceny zróżnicowania genetycznego odmian i populacji miejscowych *Phaseolus vulgaris* (fasoli zwyczajnej) i fasoli wielokwiatowej (*Phaseolus coccineus* L., syn. *Phaseolus multiflorus* Wild.), zebranych podczas ekspedycji terenowych, a przechowywanych w Krajowym Centrum Roślinnych Zasobów Genowych. Doświadczenia wykonano z zastosowaniem 8 starterów *EcoRI* i 8 starterów *MseI*, co dało 64 przebadane kombinacje starterów. Pozwoliło to na wybranie 15 par starterów generujących największą liczbę polimorficznych prążków na żelach poliakrylamidowych. Otrzymane wyniki rozdziału fragmentów DNA posłużyły do określenia podobieństwa badanych obiektów metodą analizy skupień, opierając się na wartościach współczynnika podobieństwa Jaccarda. Uzyskane wyniki wykazały przydatność metody AFLP do odróżnienia poszczególnych populacji *Phaseolus vulgaris* L. i określenia ich zróżnicowania wewnątrzpopulacyjnego. W wydzielonych skupieniach, a szczególnie w przypadku fasoli wielokwiatowej, można wyodrębnić grupy złożone

Adres do korespondencji – Corresponding author: Jarosław Nowosielski, Laboratorium Kontroli
GMO, Zakład Biologii i Cytogenetyki Roślin, Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Radzików,
e-mail: j.nowosielski@ihar.edu.pl

z podobnych do siebie odmian i jednorodnych populacji miejscowych. Wyłonione grupy, w większości przypadków, charakteryzowało nie tylko podobieństwo DNA, ale również były one podobne pod względem cech morfologicznych nasion oraz pochodziły z jednego regionu.

Słowa kluczowe: AFLP, fasola zwyczajna, fasola wielokwiatowa, *Phaseolus vulgaris*, *Phaseolus coccineus*, populacje miejscowe, Nizina Południowopodlaska

WSTĘP

Fasola – (*Phaseolus* L.) jest rodzajem z rodziny bobowatych obejmującym około 200 gatunków roślin rocznych i wieloletnich, pnączy oraz półkrzewów o dużych liściach i białych, żółtych lub czerwonych kwiatach. Uprawiana powszechnie w wielu odmianach ze względu na jadalne strąki i nasiona, a czasem uprawiana jest też jako roślina ozdobna. Jako roślinę leczniczą fasolę znano już od najdawniejszych czasów. Proszkiem z wysuszonych, rozdrobnionych strąków posypywano chore miejsca skóry (świeże rany, oparzenia, egzemy, róża). Później odvary ze strąków fasoli podawano jako środek leczniczy przeciw cukrzycy. Purée z fasoli jest dietetycznym daniem przy stanach zapalnych żołądka z osłabioną działalnością wydzielniczą gruczołów i przy otyłości. W lecznictwie ludowym napar lub odwar ze strąków stosuje się w chorobach nerek i pęcherza moczowego, osłabieniu serca z obrzękami, nadciśnieniu, przewlekłym goścucu i podagrze. Odwar z suszonych kwiatów stosuje się przy kamicy moczowej [Ożarowski, Jaroniewski 1987, Winiarska i in. 2008].

Fasola należy do podstawowej grupy roślin zalecanych gospodarstwom ekologicznym. Jest to gatunek nie tylko plonotwórczy i ważny w płodozmianie, ale również cenny jako bogate źródło białka i istotnych dla zdrowia aminokwasów, np. lizyny, węglowodanów, witamin oraz błonnika. W Polsce południowo-wschodniej uprawiana na suche ziarno stanowi ważne źródło dochodów rolników. Jednocześnie swoimi walorami nie odbiega od innych roślin wysokobiałkowych, jak groch, bób i bobik oraz łubin słodki. Z rynkowego punktu widzenia uprawa fasoli jest bardziej dochodowa niż uprawa roślin zbożowych, a jej wartość w płodozmianie, z uwagi na korzystny wpływ poprzez wiązanie azotu z powietrza na żyzność gleby, jest wysoka w porównaniu z uprawą roślin zbożowych. Polska jest jednym z wiodących producentów fasoli w Europie obok Włoch, Hiszpanii, Portugalii i Grecji. Długa tradycja uprawy tego gatunku w naszym kraju pozwala na utrzymanie stabilnego arealu uprawy fasoli [Łabuda 2011].

Duże znaczenie gospodarcze tej rośliny powoduje, że znajduje się ona w centrum zainteresowania wielu hodowców. Dążą oni do uzyskania odmian charakteryzujących się wysokim plonem i korzystną jego strukturą, dużą wczesnością, równomiernością dojrzewania, odpornością na szereg groźnych patogenów i przydatnością do zbioru mechanicznego. Hodowcy powinni więc dysponować bogatym źródłem zmienności. W tym celu można wykorzystać populacje miejscowe uprawiane od wielu lat w różnych regionach Polski, zaś wypieranie ich przez nowoczesne, wyselekcjonowane odmiany prowadzi do ograniczania zmienności roślin wykorzystywanych przez człowieka. Systematyczne gromadzenie i przechowywanie zasobów genowych roślin użytkowych w kolekcjach banków genów jest jednym z najważniejszych sposobów ich zachowania na potrzeby hodowli i badań naukowych [Nowosielska, Podyma 1998, 2001, 2005, Nowosielska i in. 2005].

Zadanie to w Polsce realizowane jest między innymi poprzez organizowanie ekspedycji prowadzących zbiór istniejących jeszcze miejscowych populacji roślin uprawnych i gatunków spokrewnionych [Nowosielska, Podyma 1998, 2001]. Polska jest szczególnym przykładem kraju w Europie Środkowej, w którym dzięki rozdrobnionej gospodarce rolnej zachowały się do czasów współczesnych miejscowe formy roślin uprawnych [Podyma, Janik-Janiec 1995]. Od 1976 r. Krajowe Centrum Roślinnych Zasobów Genowych IHAR w Radzikowie (Polski Bank Genów) intensywnie prowadzi eksplorację na terenie Polski [Bulińska-Radomska, Góral 1991, Kulpa, Jastrzębski 1986, Kulpa, Górski 1986, Nowosielska, Podyma 1998, 2001, 2005, Nowosielska i in. 2005]. W rezultacie prowadzonych ekspedycji kolekcyjnych zostały zgromadzone w KCRZG unikalne materiały genetyczne ginących ekotypów roślin uprawnych w Polsce, w tym również fasoli. Obecnie w przechowalni długoterminowej Krajowego Centrum Roślinnych Zasobów Genowych zgromadzono ponad 3992 próbek z rodzaju *Phaseolus*, co stanowi ponad 6,037% przechowywanych wszystkich próbek roślinnych.

Fasola jest znaną od dawna rośliną uprawną tropikalnej Ameryki [Betz, Virginia 1999]. Jest przykładem gatunku, który został udomowiony wielokrotnie w więcej niż jednym miejscu około 10 tys. lat p.n.e. Udomowienie *Phaseolus vulgaris* niezależnie w Andach i Ameryce Środkowej doprowadziło do powstania dwóch pól genowych tego gatunku, charakteryzujących się wieloma dobrze opisanymi „rasami” o odmiennej morfologii roślin i różnych wymaganiach edaficznych oraz odpornością na stres biotyczny i abiotyczny.

Z hodowlanego punktu widzenia rośliny z puli Mezoamerykańskiej charakteryzują się korzystniejszymi cechami, jak np. odpornością na choroby wirusowe [Cattan-Toupance i in. 1998, Beebe i in. 2000, 2001, Papa, Gepts 2003, Torres i in. 2004, Amirul Islam i in. 2004, Chacon i in. 2005]. Celem prowadzonych badań było porównanie i ocena zróżnicowania genetycznego wybranych rodzimych odmian i populacji miejscowych fasoli zwyczajnej (*Phaseolus vulgaris* L.) i fasoli wielokwiatowej (*Phaseolus coccineus* L.) zgromadzonych w Krajowym Centrum Roślinnych Zasobów Genowych w Radzikowie przy wykorzystaniu metody AFLP.

MATERIAŁ I METODY

Materiał badawczy stanowiło 7 odmian i miejscowych populacji fasoli wielokwiatowej (*Phaseolus coccineus* L., syn. *Phaseolus multiflorus* Wild.) oraz 34 odmiany i populacje miejscowe fasoli zwyczajnej (*Phaseolus vulgaris* L.) (tab.1) zebrane podczas ekspedycji terenowych organizowanych przez dawny Zakład Krajowych Zasobów Genowych, a od 1997 r. – Krajowe Centrum Roślinnych Zasobów Genowych [Kulpa, Jastrzębski 1986, Kulpa, Górski 1986, Bulińska-Radomska, Góral 1991, Nowosielska, Podyma 1998, 2001, 2005, Nowosielska i in. 2005].

Do badań wysiano po 15 nasion z każdej odmiany i populacji miejscowej, w celu określenia zróżnicowania genetycznego. Izolacja całkowitego DNA z liści 6-tygodniowych pojedynczych roślin została przeprowadzona według metodyki Firmy QIAGEN zestawem DNeasy Plant Mini Kit. Rośliny, z których został pobrany materiał, pochodziły z wysiewu do szklarni KCRZG.

Tabela 1. Odmiany i populacje miejscowe fasoli wielokwiatowej (*Phaseolus coccineus* L.) i fasoli zwyczajnej (*Phaseolus vulgaris* L.) wykorzystane w badaniachTable 1. Varieties and landraces of bean (*Phaseolus coccineus* L.) and common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) used in the study

Nazwa	Pochodzenie	Gatunek
POL KIE99-35	Wyżyna Kielecko-Sandomierska	<i>Phaseolus coccineus</i> L.
BES 045	Bażanowice 16, Cieszyn	<i>Phaseolus coccineus</i> L.
BLANKA	odmiana hodowlana	<i>Phaseolus coccineus</i> L.
BES 003	Kocierz Moszczanicki, Żywiec	<i>Phaseolus coccineus</i> L.
P134	Piaski, Włodawa	
EUREKA	odmiana	<i>Phaseolus coccineus</i> L.
POLPOD98-55	Łózki 39 Nizina Południowopodlaska	<i>Phaseolus coccineus</i> L.
POLPOD98-75	Szustka 25 Nizina Południowopodlaska	<i>Phaseolus coccineus</i> L.
Florentynka	odmiana	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.
E 1478	populacja z miejscowości Bircza	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.
Augustynka	odmiana	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.
Bor	odmiana	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.
E 1004	populacja z miejscowości Kolonia Orzechów	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.
E 0952	populacja z miejscowości Różanka	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.
Aura	odmiana	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.
E 1452	populacja z miejscowości Jeziorna	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.
Igołomska	odmiana	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.
Justynka	odmiana	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.
E 1204	populacja z miejscowości Góra Grabowiec	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.
Słowianka	odmiana	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.
Wiejska	odmiana	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.
E 1172	populacja z miejscowości Wirkowice	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.
E 1683	populacja z okolic Lublina	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.
E 0956	populacja z miejscowości Różanka	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.
Biała wyborowa	odmiana	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.
Bomba	odmiana	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.
Michigan	odmiana	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.
Atut	odmiana	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.
Jubilatka	odmiana	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.
Wenta	odmiana	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.
Mela	odmiana	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.
Prosna	odmiana	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.
Polanka	odmiana	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.
Nida	odmiana	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.
Katarzynka	odmiana	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.
Longina	odmiana	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.
Małopolanka	odmiana	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.
PV 196	populacja z miejscowości Kajanka	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.
PV 95	populacja z miejscowości Włosienica	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.
PV 93	populacja z miejscowości Włosienica	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.
Krakowska	odmiana	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.
Perłówka	odmiana	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.

Analizy DNA przeprowadzono metodą AFLP (ang. Amplified Fragment Length Polymorphism) [Vos i in. 1995] według standardowego protokołu (AFLP Plant Mapping Protocol 1997), udostępnianego przez firmę Applied Biosystem, na aparacie ABI PRISM 377XL. Fragmentację i ligację DNA przeprowadzono w jednym układzie zawierającym w objętości 11 μ l : 0,5 μ g genomowego DNA, 1 μ l buforu do ligacji 10 x T4 zawierającego ATP, 1 μ l 0,5 M NaCl, 0,5 μ l 1,0 mg/ml BSA, 1 μ l adaptora EcoRI, 1 μ l adaptora MseI i 1 μ l mix-u składającego się z: 0,1 μ l buforu do ligacji 10 x T4 zawierającego ATP, 0,1 μ l 0,5 M NaCl, 0,05 μ l 1.0 mg/ml BSA, 1 jednostkę enzymu MseI, 5 jednostek enzymu EcoRI i 1 jednostkę T4 DNA Ligazy. Wstępne powielenie fragmentów DNA przeprowadzono w układzie zawierającym w objętości 20 μ l: 0,5 μ l preselektywnego startera AFLP EcoRI, 0,5 μ l preselektywnego startera AFLP MseI, 15 μ l AFLP Core Mix-u, 4 μ l rozcieńczonej w buforze 0,1 M TE w stosunku 1:17,2 zawiesiny zawierającej fragmenty DNA powstałe po fragmentacji i ligacji genomowego DNA.

Do uwidocznienia zróżnicowania genetycznego pomiędzy badanymi obiektami w reakcjach selektywnego powielenia fragmentów AFLP wykorzystano 12 par kombinacji starterów różnicujących EcoRI i MseI (tab. 2).

Tabela 2. Kombinacje starterów reakcji AFLP różnicujące badane odmiany i populacje *Phaseolus coccineus* i *Phaseolus vulgaris*

Table 2. Primer combinations of AFLP reaction differentiating studied varieties and landraces of *Phaseolus coccineus* and *Phaseolus vulgaris*

	<i>MseI</i> - CAA	<i>MseI</i> - CAC	<i>MseI</i> - CAG	<i>MseI</i> - CAT	<i>MseI</i> - CTA	<i>MseI</i> - CTC	<i>MseI</i> - CTG	<i>MseI</i> - CTT
<i>EcoR I</i> - ACT	X	X					X	X
<i>EcoR I</i> - ACA			X			X	X	
<i>EcoR I</i> - AAC								
<i>EcoR I</i> - ACC								
<i>EcoR I</i> - AGC								
<i>EcoR I</i> - AAG					X			X
<i>EcoR I</i> - AGG					X	X		
<i>EcoR I</i> - ACG	X		X	X				X

Selektywne powielenie fragmentów DNA przeprowadzono w układzie zawierającym w objętości 15 μ l: 10 μ l AFLP Core Mix, 1 μ l 5 μ M-MseI [Starter-Cxx], 1 μ l 1 μ M-EcoRI [Starter-Axx], 3 μ l produktu powstałego po wstępnej amplifikacji rozcieńczonego 0,1 M buforem TE w stosunku 1:19. Wszystkie reakcje zostały przeprowadzone na termocyklerze firmy Biometra przy prędkości zmian temperatury ustawionych na 1°C/1s. Wielkość analizowanych fragmentów DNA zawarta była w przedziale od 35 do 500 bp, i została określona na podstawie oprogramowania GENESCAN z dokładnością do 0,5 bp. Macierz podobieństwa badanych obiektów zbudowano, opierając się na oprogramowaniu GENOTYPER v. 2,5, przy założeniu istotności pików ≥ 50 hp nad linią bazową. W odniesieniu do wszystkich badanych obiektów wykonano analizę skupień na podstawie podobieństwa DNA. Do wydzielenia grup obiektów podobnych do siebie pod względem polimorfizmu DNA, określenia wzajemnego podobieństwa pomiędzy badany-

mi gatunkami, odmianami i populacjami wykorzystano dendrogramy otrzymane metodą średniej odległości pomiędzy skupieniami – UPGMA, opierając się na współczynniku podobieństwa Jaccarda, skonstruowane za pomocą oprogramowania SAS 9.1 oraz SPSS [Górniak, Wachnicki 2004].

$$Jc = a/(a+b+c)$$

gdzie:

a – suma prążków wspólnych,

b – suma prążków występujących u pierwszego porównywanego obiektu,

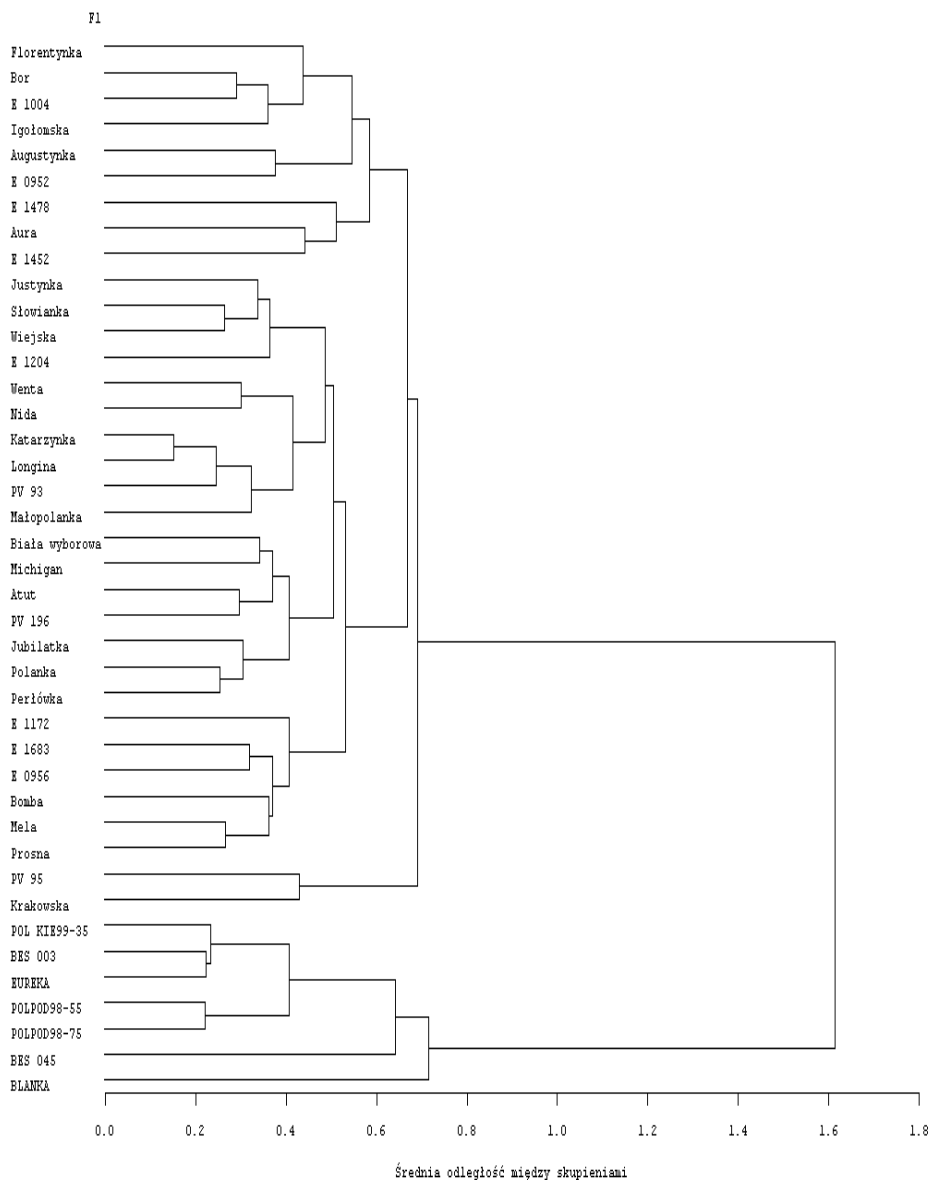
c – suma prążków występujących u drugiego porównywanego obiektu.

WYNIKI I DYSKUSJA

Metoda AFLP [Vos i in. 1995] jest jedną z dokładniejszych technik analizy DNA wykorzystywanych w genetyce populacji roślin, jak również w identyfikacji genów warunkujących odporność na choroby [Mukeshimana i in. 2005]. Łączy ona w sobie zalety takich technik jak RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism – polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych), [Grodzicker i in. 1974] oraz RAPD (Random Amplified Polimorphic DNA – polimorfizm DNA amplifikowanego losowo) [Williams i in. 1990, Russell i in. 1997]. Największymi zaletami tej metody są przede wszystkim: stosowanie tylko dwóch starterów w każdej kombinacji, dających w wysokim stopniu (blisko 100%) powtarzalne wyniki, możliwość stosowania jej do różnej wielkości genomów oraz brak konieczności znajomości sekwencji wybranych odcinków genomu przy mało inwazyjnym charakterze przyżyciowego pobierania prób [Reisch i in. 2003, Gaudeul i in. 2000, Jones i in. 1997, Robinson, Harris 1999].

Wcześniejsze badania polimorfizmu fasoli zwyczajnej wykonane w KCRZG metodą RAPD [Nowosielski, Podyma 2001, 2004, Nowosielski i in. 2002] okazały się w małym stopniu przydatne do oceny zróżnicowania genetycznego odmian hodowlanych i populacji miejscowych tych gatunków ze względu na niski poziom wykrywalnego polimorfizmu DNA. Z tego powodu posłużono się metodą AFLP jako metodą umożliwiającą wykrycie znacznie większej liczby polimorficznych pasm DNA niż RFLP. Metoda ta sprawdziła się w badaniach nad genetycznym rozróżnieniem *Phaseolus lunatus* od *Phaseolus vulgaris*, jak również do potwierdzenia istnienia dwóch pul genowych *Phaseolus lunatus* [Caicedo i in. 1999].

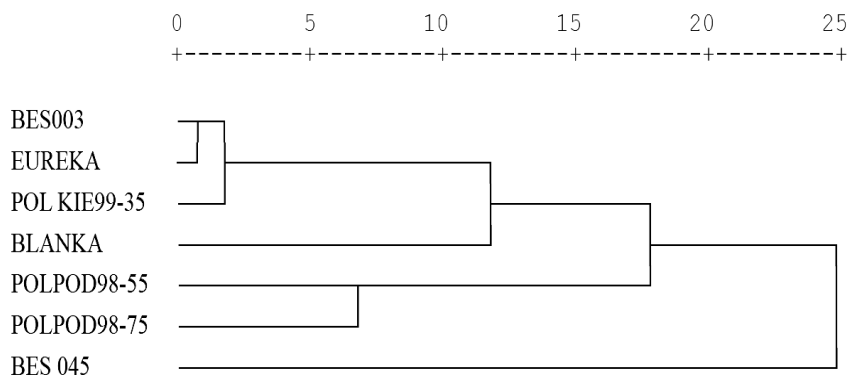
W prezentowanych badaniach DNA metodą AFLP zastosowano 12 kombinacji starterów (tab. 2), co umożliwiło scharakteryzowanie polimorfizmu badanych obiektów na podstawie analizy obecności ponad 900 różnicujących prążków DNA. Na ogół przyjmuje się, że już 250–300 polimorficznych prążków DNA jest wystarczającą liczbą do wiarygodnego określenia zróżnicowania badanych obiektów. Zastosowana analiza skupień, opierając się na wartościach współczynnika podobieństwa Jaccarda, pozwoliła na wyodrębnienie 2 skupień grupujących oddzielnie dwa gatunki fasoli *Phaseolus coccineus* i *Phaseolus vulgaris*. W skupieniach tych, a szczególnie w przypadku fasoli wielokwiatowej, można wyodrębnić grupy złożone z podobnych do siebie odmian i jednorodnych populacji miejscowych. Wyodrębnione grupy, w większości przypadków, charakteryzowało nie tylko podobieństwo DNA, ale również były one podobne pod względem cech morfologicznych nasion oraz miejsca zbioru (rys. 1).



Rys. 1. Dendrogram otrzymany metodą najbliższego sąsiedztwa na podstawie współczynnika podobieństwa Jaccarda, obrazujący zróżnicowanie genetyczne zarówno pomiędzy gatunkami, odmianami i badanymi populacjami gatunku *Phaseolus coccineus* L. i *Phaseolus vulgaris* L.

Fig. 1. Dendrogram obtained by the nearest-neighbor method based on Jaccard similarity coefficient, showing the genetic diversity both between species, varieties and landraces of the species *Phaseolus coccineus* L. and *Phaseolus vulgaris* L.

W obrębie skupienia obejmującego fasolę wielokwiatową zaobserwowano duże podobieństwo wszystkich badanych obiektów z wyjątkiem odmiany Blanka oraz populacji oznaczonej jako BES 045, którą cechuje również odmienna charakterystyka morfologiczna nasion. Nasiona tej populacji są bardziej wydłużone i lekko nerkowate, z dużą czerwoną plamą wokół znamienia i małymi plamkami na reszcie powierzchni. Stwierdzono też wysoki stopień podobieństwa genetycznego prób oznaczonych jako POLKIE99-35 i BES 003 do próby określonej jako odmiana Eureka. Znajduje to również odzwierciedlenie w obserwowanym podobieństwie morfologicznym nasion. Na tej podstawie można wyciągnąć wniosek, iż próby nr POLKIE99-35 i BES 003 są blisko spokrewnione lub też wręcz wywodzą się od odmiany Eureka (rys. 2).

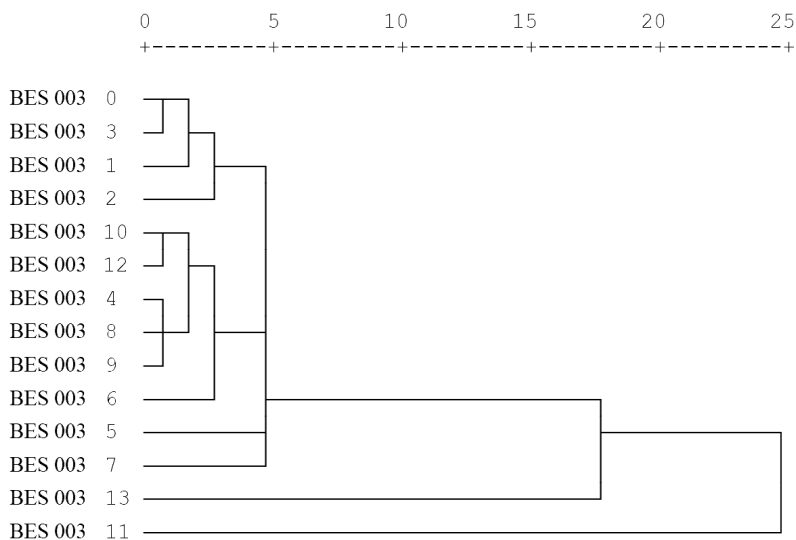


Rys. 2. Dendrogram otrzymany metodą najbliższego sąsiedztwa na podstawie współczynnika podobieństwa Jaccarda, obrazujący zróżnicowanie genetyczne pomiędzy odmianami i badanymi populacjami gatunku *Phaseolus coccineus* L.

Fig. 2. Dendrogram obtained by nearest-neighbor method based on the Jaccard similarity coefficient, showing the genetic variation among varieties and populations studied species *Phaseolus coccineus* L.

Fasola wielokwiatowa jest rośliną obcopolną. Najprawdopodobniej przepyleń w obrębie tego gatunku spowodowały, iż nastąpiło pewne ujednoczenie profili genetycznych, co można zaobserwować w postaci skupienia gromadzącego na dendrogramie próby pochodzące z jednego obszaru geograficznego jak np. populacje oznaczone POLPOD98-55 i POLPOD98-75. O występowaniu przepyleń w obrębie tego gatunku można wnioskować, analizując dendrogramy obrazujące zróżnicowanie występujące wewnątrz analizowanych populacji miejscowych. Przykładem tego mogą być pojedyncze rośliny tworzące oddzielne jednoobiektywne skupienia, pozostające w istotnej odległości od pozostałych obiektów (rys. 3, 4).

Skład grup tworzonych przez odmiany i populacje miejscowe fasoli zwyczajnej stanowi szerokie spektrum genetycznego zróżnicowania, którego nie można opierać tylko na morfologii nasion ani miejscach zbioru. Obserwowane zróżnicowanie genetyczne analizowanych populacji lokalnych może w dużej mierze wynikać z tego, iż w skład zebranych prób często wchodzi nasiona kilku odmian, które morfologicznie są bardzo podobne do siebie. Wynika to z tradycyjnego sposobu uprawy tej rośliny w małych gospodarstwach, gdzie fasola jest wysiewana z nasion ze zbioru uzyskanego w danym gospodarstwie, a braki uzupełniane poprzez zakup nowych odmian.

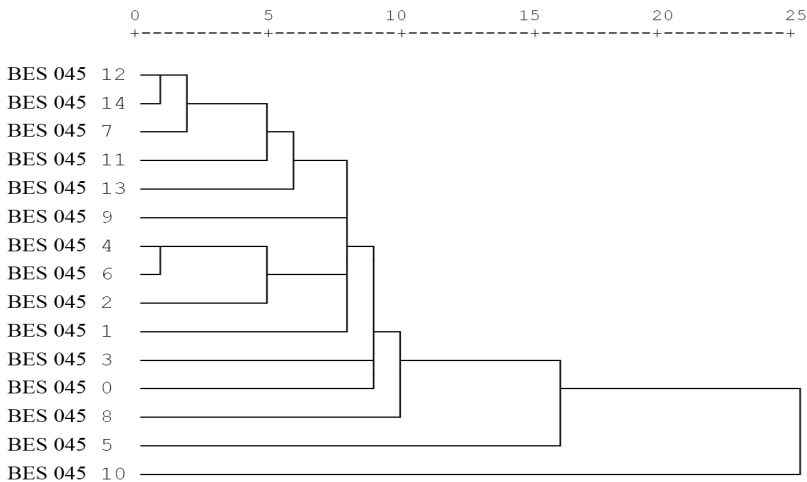


Rys. 3. Dendrogram otrzymany metodą najbliższego sąsiedztwa na podstawie współczynnika podobieństwa Jaccarda, obrazujący zróżnicowanie genetyczne w obrębie populacji określonej jako BES 003 (*Phaseolus coccineus* L.);

0–13 są kolejnymi próbkami wewnątrz badanej populacji

Fig. 3. Dendrogram obtained by nearest-neighbor method based on the Jaccard similarity coefficient, showing the genetic diversity within a landrace defined as BES 003 (*Phaseolus coccineus* L.)

0–13 are the subsequent specimens within studied population



Rys. 4. Dendrogram otrzymany metodą najbliższego sąsiedztwa na podstawie współczynnika podobieństwa Jaccarda, obrazujący zróżnicowanie genetyczne w obrębie populacji określonej jako BES 045 (*Phaseolus vulgaris* L.);

numery 0–14 są kolejnymi próbkami wewnątrz populacji

Fig. 4. Dendrogram obtained by nearest-neighbor method based on the Jaccard similarity coefficient, showing the genetic diversity within a population defined as BES 045th (*Phaseolus vulgaris* L.)

0–14 are the subsequent specimens within studied population

Zebrane nasiona są przechowywane razem, a jedynym zwykle zastosowanym podziałem jest podział ze względu na sposób użytkowania i uprawy.

Uzyskane wyniki wykazały, iż wykorzystanie techniki AFLP pozwala na odróżnienie poszczególnych odmian i populacji *Phaseolus coccineus* oraz *Phaseolus vulgaris*, a także określenie ich polimorfizmu DNA. Badania potwierdziły, że te dwa gatunki tworzą wyraźnie dwa oddzielne skupienia, co pozwala na rozróżnienie populacji tych gatunków występujących w Polsce. Dendrogramy zbudowane na podstawie wyników uzyskanych metodą AFLP pozwalają na identyfikację zbliżonych genetycznie genotypów, a metoda AFLP może być pomocna w selekcji genotypów najbardziej oddalonych od siebie na potrzeby programów hodowlanych.

PIŚMIENNICTWO

- AFLP Plant Mapping Protocol., 1997. Perkin – Elmer Corporation.
- Amirul Islam F.M., Beebe S., Muoz M., Tohme J., Redden R. J., Basford K.E., 2004. Using molecular markers to assess the effect of introgression on quantitative attributes of common bean in the Andean gene pool. *Theor. Appl. Genet.*, 108, 243–252.
- Beebe S., Skroch W.P., Tohme J., Duque C.M., Pedraza F., Nienhuis J., 2000. Structure of genetic diversity among common bean landraces of Middle American origin based on correspondence analysis of AFLP. *Crop Science.*, 40, 264–273.
- Beebe S., Rengifo J., Gaitan E., Duque C. M., Tohme J., 2001. Diversity and origin of Andean landraces of common bean. *Crop Science*, 41, 854–862.
- Betz M., Virginia M., 1999. Plant cultivation in prehistoric Mesoamerica *Athena review*, 2, 1 24–31.
- Bulińska-Radomska Z., Góral S., 1991. Current Status of Genetic Resources Activities in Poland. *Genet. Pol.*, 32,1–2, 27–35.
- Chacon I.M., Pickersgill B., Debouck G.D., 2005. Domestication patterns in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and the origin of the Mesoamerican and Andean cultivated races. *Theor Appl. Genet.*, 110, 432–444.
- Caicedo A.L., Gaitan E., Duque M.C., Toro Chica O., Debouck D.G., Tohme J., 1999. AFLP fingerprinting of *Phaseolus lunatus* L. and related wild species from South America. *Crop Science*. Vol. 39, 1497–1507.
- Cattan-Toupance I., Michalakis Y., Neema C., 1998. Genetic structure of wild bean populations in their South-Andean centre of origin. *TAG*, 96, 844–851.
- Gaudeul M., Taberlet P., Till-Bottraud I., 2000. Genetic diversity in an endangered alpine plant, *Eryngium alpinum* L. (*Apiaceae*), inferred from amplified fragment length polymorphism markers. *Molecular Ecology*, 9, 1625–1637.
- Górniak J., Wachnicki J., 2004. Pierwsze kroki w analizie danych. SPSS for Windows. SPSS Polska, Kraków.
- Grodzicker T., Williams J., Sharp P., Sambrook J., 1974. Physical mapping of temperature – sensitive mutations of adenoviruses. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 39, 439–446.
- Jones C.J., Edwards K.J., Castiglione S., Winfield M.O., Sala F., Van de Wiel C., Bredemeijer G., Vosman B., Matthes M., Daly A., Brettschneider R., Bettini P., Buiatti M., Maestri E., Malcevschi A., Marmioli N., Aert R., Volkaert G., Rueda J., Linacero R., Vazquez A., Karp A., 1997. Reproducibility testing of RAPD, AFLP, and SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Mol. Breed.*, 3, 381–390.

- Kulpa W., Górski M., 1986. Zasoby miejscowych form roślin uprawnych. Cz. II. Wyniki eksploatacji zasobów północno-wschodniej części Polski w latach 1997 i 1979. Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, 160, 47–55.
- Kulpa W., Jastrzębski A., 1986. Zasoby miejscowych form roślin uprawnych. Cz. I. Wyniki eksploatacji Płaskowyżu Kolbuszowskiego, Pogórza Karpackiego i Beskidów w latach 1976 i 1978. Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, 27–45.
- Mukeshimana G., Paneda A., Rodriguez-Suarez C., Ferreira J.J., Giraldez R., Kelly J., 2005. Markers linked to the bc-3 gene conditioning resistance to bean common mosaic potyviruses in common bean. *Euphytica*, 144, 291–299.
- Łabuda H., Uprawa fasoli na suche nasiona, *Hasło Ogrodnicze*, 12.2011.
- Nowosielska D., Podyma W., 1998. Ekspedycje Centrum Roślinnych Zasobów Genowych. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.*, z. 463, 145–154.
- Nowosielska D., Podyma W., 2001. Expeditions of the National Centre for Plant Genetic Resources conducted on the territory of Poland during 1998–99. Materials from EUCARPIA Section Genetic Resources May 1620, 2001, Poznań, Poland, s. 30.
- Nowosielska D., Podyma W., Nowosielski J., Dostatny D., 2005. Ekspedycje Krajowego Centrum Roślinnych Zasobów Genowych przeprowadzone na terenie Polski w latach 2000–2004. Materiały z konferencji Hodnotenie Genetycznych Zdrojow Rastlin. Piestany 25–26 maj 2005, 195–198.
- Nowosielska D., Podyma W., 2005. Collecting Missions in Poland in 1999. *Plant Breeding and Seed Science*, Vol. 52, 67–69.
- Nowosielski J., Podyma W., 2001. Molecular research of the genetic diversity of Polish varieties and landraces of *Phaseolus*. Broad Variation and Precise Characterization – Limitation for the Future. Eucarpia Section Genetic Resources Workshop, May 16–20, 2001, Poznań, 247–252.
- Nowosielski J., Podyma W., Nowosielska D., 2002. Molecular Research on the Genetic Diversity of Polish varieties and landraces of *Phaseolus coccineus* L. and *Phaseolus vulgaris* L. Using the RAPD and AFLP Methods. *Cellular & Molecular Biology Letters*, Vol.7, 2B, 753–762.
- Nowosielski J., Podyma W., 2004. Wykorzystanie kombinacji starterów w metodzie AFLP do identyfikacji wybranych populacji roślin użytkowych. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.*, 497, 467–475.
- Ożarowski A., Jaroniewski W., 1987. Rośliny lecznicze i ich praktyczne zastosowanie. Instytut Wydawniczy Związków Zawodowych.
- Papa R., Gepts P., 2003. Asymmetry of gene flow and differential geographical structure of molecular diversity in wild and domesticated common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) from Mesoamerica. *Theor. Appl. Genet.*, 1006, 239–250.
- Podyma W., Janik-Janiec B., 1995. Country Report. Poland. Int. Conf. And Programme for Plant Genetic Resources (ICPPGR), Radzików, 21.
- Reisch C., Poschold P., Wingender R., 2003. Genetic variation of *Saxifraga paniculata* Mill. (Saxifragaceae): molecular evidence for glacial relictendemism in central Europe. *Biological Journal of the Linnean Society* 80, 11–21.
- Robinson J.P., Harris S.A., 1999. Amplified fragment length polymorphisms and acrosatellites: A phylogenetic perspective. <http://webdoc.sub.gwdg.de/ebook/y/1999/whichmarker/m12/Chap12.htm>.
- Russell J.R., Fuller J.D., Macaulay M., Hatz B.G., Jahoor A., Powel W., Waugh R., 1997. Direct comparison of levels of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs. *Theor Appl. Genet.*, 95, 714–722.
- Torres G.I.R., Villalobos A.R., Solis G.E., Debouck G.D., 2004. Wild common bean in the central valley of Costa Rica: ecological distribution and molecular characterization. *Agronomia Mesoamericana*, 15(2), 145–153.

- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de Lee L., Hornes M., Frijters A., Pot J., Pelman J., Kuiper M., Zabeau M., 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23, 4407–4414.
- Williams J.G.K., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S.V., 1990. DNA polymorphisms amplified by primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18(22), 6531–6535.
- Winiarska H., Dworacka M., Mrozikiewicz P., Mścisz A., Borowska M., Abramczyk M., Bobkiewicz-Kozłowska T., Gorecki P., 2008. *Przegląd Kardiologiczny*, 3, 4, 274–279.

USING AFLP METHOD TO COMPARE AND EVALUATE OF GENETIC DIVERSITY OF SELECTED VARIETIES AND LANDRACES OF COMMON BEAN (*PHASEOLUS VULGARIS* L.) AND BEAN (*PHASEOLUS COCCINEUS* L.)

Summary: The aim of the study was to determine the usefulness of AFLP method to assess genetic diversity of varieties and landraces of *Phaseolus vulgaris* and *Phaseolus coccineus* L., syn. *Phaseolus multiflorus* Wild. collected during field expeditions, and stored in the National Centre for Plant Genetic Resources. Experiments were performed using 8 primers with EcoRI and MseI primer 8, which gave the 64 tested combinations of primers. This allowed to select 15 pairs of primers that generate the highest number of polymorphic bands on polyacrylamide gels. The obtained results of separation of DNA fragments were used to determine the similarity of the studied objects by cluster analysis based on Jaccard similarity coefficient. The results showed the usefulness of the AFLP method to distinguish different populations of *Phaseolus vulgaris* L. and determination of their diversity within the populations. In the framework of the isolated clusters, especially in the case of *Phaseolus coccineus* L., the groups consisting of a varieties similar to each other and homogeneous landraces, can be extracted. In most cases consisted of groups were characterized not only by the similarity of DNA, but they were also similar in terms of morphological characteristics of seeds and place where they were collected.

Key words: AFLP, common bean, bean, *Phaseolus vulgaris*, *Phaseolus coccineus*, landraces, Południowopodlaska Plain

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 30.03.2012

Do cytowania – For citation: Nowosielski J., Nowosielska D., Frąk M., Jankiewicz U., Bulińska-Radomska Z., 2012. Wykorzystanie metody AFLP do porównania oraz oceny zróżnicowania genetycznego wybranych odmian i miejscowych populacji fasoli zwyczajnej (*Phaseolus vulgaris* L.) i fasoli wielokwiatowej (*Phaseolus coccineus* L.). *Acta Sci. Pol. Biotechnol.*, 11(1), 5–16.

DIHYDROKSYACETON – CHARAKTERYSTYKA, ZASTOSOWANIE, OTRZYMYWANIE

Lidia Stasiak-Różańska, Stanisław Błażejczak

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Streszczenie. Dihydroksyaceton (DHA) jest ketotriozą o właściwościach redukujących. Znajduje zastosowanie głównie w przemyśle spożywczym (substancja słodząca, suplement diety, emulgator, plastyfikator), kosmetycznym (aktywny składnik kremów samoopalających) oraz w medycynie (leczenie bielactwa skóry, komponent biomateriałów tamujących krwotoki). Obecnie dihydroksyaceton wytwarzany jest biotechnologicznie na drodze niecałkowitego utleniania glicerolu przez bakterie octowe z gatunku *Gluconobacter oxydans* ATCC 621. Enzymem katalizującym tę reakcję jest zależna od PQQ dehydrogenaza glicerolowa (GlyDH). W pracy przedstawiono charakterystykę fizyczną, chemiczną oraz zastosowanie DHA. Opisano również metody produkcji tego związku, które opracowywano i doskonalono na przestrzeni wielu lat.

Słowa kluczowe: bakterie octowe, utlenianie glicerolu, dihydroksyaceton

WŁAŚCIWOŚCI CHEMICZNE I FIZYCZNE DIHYDROKSYACETONU

Dihydroksyaceton (DHA) jest jednym z podstawowych produktów pośrednich metabolizmu glicerolu w komórkach prokariotów i eukariotów [Tkáč i in. 2001]. Pełna nazwa chemiczna tego związku, nadana przez IUPAC, to 1,3-dihydrokso-2-propanon. W literaturze [Lewis 2001] DHA określanym jest również jako: dihydroksypropanon, chromelin, oxantin, vicolor. Według klasyfikacji chemicznej związek ten jest trójwęglowym monosacharydem o właściwościach redukujących. Naturalnym miejscem jego występowania są buraki cukrowe i trzcina cukrowa [Lewis 2001].

Masa molowa DHA ($C_3H_6O_3$) wynosi $90,07794 \text{ g} \times \text{mol}^{-1}$ [Lide, Milne 1994], a temperatura topnienia $75\text{--}80^\circ\text{C}$ [O'Neil 2001]. W wyniku krystalizacji DHA przyjmuje postać białego, higroskopijnego proszku charakteryzującego się słodkim, orzeźwiającym smakiem [Lewis 2001, O'Neil 2001]. Podgrzany do temperatury wrzenia (188°C) wydziela silnie drażniące opary [Lewis 2004]. Dihydroksyaceton nie posiada centrum chiralnego, dlatego nie wykazuje aktywności optycznej. Związek ten występuje w dwóch odmianach:

Adres do korespondencji – Corresponding author: Stanisław Błażejczak, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, e-mail: stanislaw_blazejczak@sggw.pl

mono- oraz dimerycznej [Ferroni i in. 1999]. Forma dimeryczna jest dobrze rozpuszczalna w etanolu, eterze etylowym i acetonie, słabiej w wodzie. Monomer łatwo ulega rozpuszczeniu w wodzie, alkoholu, eterze oraz acetonie. W roztworach wodnych, oprócz DHA, występuje jego izomer – aldehyd glicerynowy, który ulega rozkładowi do formaldehydu i kwasu mrówkowego [O'Neil 2001, Lide, Milne 1994].

Dihydroksyaceton występuje w stałym stanie skupienia jako dimer. Podczas krystalizacji z roztworów wodnych uzyskuje się dwie różne formy krystaliczne dimerów DHA α trójskośnych i β jednoskośnych. Liofilizacja zamrożonego roztworu przemysłowego DHA pozwala otrzymać kryształy o strukturze γ jednoskośnej. Trzy formy monomeryczne DHA są izomerami *trans* i mają pierścień 1,4-dioksanowy w konformacji krzesłowej, a także grupy hydroksylowe i hydroksymetylowe w pozycji aksialnej oraz ekwatorialnej [Ślepekura, Lis 2004].

W badaniach przeprowadzonych przez Akina i Marlowe [1984] nie wykazano toksyczności ani kanцерogenności DHA. Wiedza na temat właściwości mutagennych DHA jest stosunkowo niewielka. W roku 1982 Yamaguchi zaprezentował wyniki badań, w których stwierdził, że DHA indukuje mutacje w genomie *Salmonella typhimurium* TA 100 [Yamaguchi 1982]. Podobny efekt zaobserwowano w odniesieniu do bakterii z gatunku *Bacillus subtilis* [Utesch, Splittgerber 1996, Mersch-Sundermann i in. 1994, Pham i in. 1980]. Nowsze doniesienia [Petersen i in. 2004] sugerują, że DHA może uszkadzać kwas nukleinowy w sposób bezpośredni poprzez glikozylację DNA lub za pośrednictwem produktów powstających w reakcji Maillarda [Shipar 2006]. Wykazano również, że DHA blokuje cykl komórkowy i wywołuje apoptozę [Petersen i in. 2004]. Istnieją przypuszczenia [Petersen i in. 2004], że modyfikacje funkcji i struktury białek, zachodzące w wyniku reakcji Maillarda, mogą być przyczyną patofizjologii u ludzi starzejących się i cierpiących na cukrzycę. Wykazano również, że inkubacja DHA z ludzkimi keranocytami w hodowli *in vitro* powoduje kondensację chromatyny, spadek wzrostu i przeżywalności komórek oraz zmniejszenie ich zdolności do regeneracji. Zjawisko to tłumaczy się wpływem powstających reaktywnych form tlenu (z ang. reactive oxygen species, ROS) na keratynocyty. Intensywność uszkodzeń komórek przez ROS ma bezpośredni związek z zawartością DHA i czasem kontaktu tego związku z komórkami skóry [Petersen i in. 2004].

ZASTOSOWANIE DIHYDROKSYACETONU

W latach dwudziestych ubiegłego wieku dihydroksyaceton był stosowany jako środek zastępujący glukozę w leczeniu cukrzycy [Mason, Hill 1926]. Trzydzieści lat później, podczas badań nad zastosowaniem DHA jako środka wspomagającego leczenie dziecięcych zaburzeń magazynowania glikogenu, przypadkowo zaobserwowano, że związek ten tworzył brązowe plamy na skórze [Fu i in. 2004]. Spostrzeżenie to wskazało nowe możliwości aplikacyjne dihydroksyacetonu jako środka imitującego naturalną opaleniznę. Za takie brązowienie skóry odpowiada reakcja Maillarda, która polega na nieenzymatycznym oddziaływaniu wolnych grup karbonylowych cukrów redukujących z wolnymi grupami aminowymi aminokwasów występujących w naskórku. Wszystkie aminokwasy obecne w warstwie rogowej naskórka reagują z DHA. Jednak najbardziej reaktywna jest arginina, ponieważ w połączeniu z DHA powoduje brązowienie skóry już po 30 minutach. W reakcjach barwnych z grupami aminowymi bierze udział forma monomeryczna DHA [Ślepekura,

kura, Lis 2004]. W roku 1970 DHA został wpisany przez FDA (Food and Drug Administration) na listę składników kosmetycznych. Obecnie jest najczęściej stosowanym i często jedynym dopuszczonym do użytku środkiem brązującym skórę, wykorzystywanym w produkcji preparatów samoopalających [Schmid i in. 2007, Green i in. 2004]. W kosmetykach brązujących skórę stosuje się 3–5% alkoholowe lub wodno-alkoholowe roztwory DHA o odczynie kwaśnym. Zwiększając stężenie DHA w tego rodzaju preparatach, można uzyskać barwy skóry od żółtej do brązowej [Draelos, Zoe 2002]. Efekt opalenizny pojawia się po około jednej godzinie od aplikacji kosmetyku i utrwała przez kolejne 24 godziny. Zanika po 5–7 dniach wraz z regeneracją naskórka [Yourick i in. 2004]. Melanoidy, które powstają w wyniku tego procesu, wykazują działanie ochronne w stosunku do promieniowania UVA. Nie chronią natomiast przed promieniowaniem UVB [Choquet i in. 2009]. Z tego powodu do kremów samoopalających dodaje się komponenty filtrów, zapewniające barierę przeciwsłoneczną [Nguyen, Kochevar 2003a,b]. Proces tworzenia barwników z DHA zależy w dużej mierze od stopnia nawilżenia naskórka, a szybkość ich powstawania zderminowana jest przez wartość pH [Nguyen, Kochevar 2003a,b]. Znanych jest kilka substancji o działaniu podobnym do dihydroksyacetonu. Nie mogą one jednak zastąpić tego związku ze względu na ich podrażniający i niekiedy toksyczny wpływ na skórę. Istnieją natomiast substancje, które można stosować w połączeniu z dihydroksyacetonem. Należy do nich erytruloza, której dodatek do preparatów kosmetycznych pozwala na obniżenie stężenia DHA [Durand 1995].

Właściwości pigmentacyjne DHA wykorzystano również w medycynie jako terapię w leczeniu nabytego bielactwa skóry, tzw. choroby vitiligo [Choquet i in. 2009, Rogers 2005]. Schorzenie to należy do częstych idiopatycznych zaburzeń pigmentacji, spowodowanych uszkodzeniem lub zniszczeniem melanocytów naskórkowych, co w rezultacie zmniejsza wytwarzanie melaniny. Objawem choroby jest pojawienie się plam jaśniejszych od naturalnego koloru skóry. Większość dotychczasowych metod leczenia schorzenia vitiligo to procesy długotrwałe i niegwarantujące całkowitego ustąpienia objawów. Dlatego trwają poszukiwania nowych, przebadanych i akceptowanych sposobów walki z tą chorobą. Badania przeprowadzone w grupie osób cierpiących na bielactwo wykazały, że preparat zawierający DHA wpływa na złagodzenie skutków choroby u 80% pacjentów [Misterska i in. 2009, Fesq i in. 2001]. Jak podają Taylor i in. [1999], dihydroksyaceton stosowany powierzchniowo może wspomagać fotochemioterapeutyczne metody leczenia łuszczycy.

Udowodniono [Obeid i in. 2006], że DHA jest łatwo przyswajalny przez organizm człowieka. Stosowany jest jako substancja słodząca i suplement diety, zwykle w połączeniu z pirogronianem wapnia, sodu lub potasu. Doustne albo dożylnie podanie takiej mieszaniny wywołuje silny efekt metaboliczny, zmniejsza łaknienie, obniża masę ciała i tkanki tłuszczowej [Ivy 1998, Stanko, Arch 1996]. Przyjmowanie preparatów, które zawierają w swoim składzie DHA, wspomaga wzrost tkanki mięśniowej u osób uprawiających sporty siłowe. Dodatkowo suplementacja diety mieszaniną DHA i soli pirogronianu w stosunku wagowym 3:1 opóźnia zmęczenie podczas wysiłku fizycznego [Omar i in. 2005, Stanko i in. 1993].

Dihydroksyaceton wykazuje działanie antagonistyczne przy zatruciu cyjankami [Cummings 2004]. Kwas cyjanowodorowy (HCN) i jego sole są silnymi truciznami. W organizmie człowieka powodują zablokowanie oksydazy cytochromowej, enzymu odpowiedzialnego za aktywację tlenu w łańcuchu oddechowym. Dihydroksyaceton, wiążąc się odwracalnie z jonami CN^- , przeciwdziała skutkom zatrucia. Tworzy cyjanohydrynę,

która przeciwdziała blokowaniu przez aniony CN^- oksydazy cytochromowej i innych hemoprotein. Dihydroksyaceton przywraca zahamowaną aktywność mitochondriów, dodatkowo wspomaga odbudowanie poziomu ATP zaniżonego przez cyjanki [Niknahad, Ghelichkhani 2002].

Dihydroksyaceton może być również wykorzystywany jako substrat podczas syntezy biodegradowalnych związków pośrednich, stosowanych do wytwarzania farmaceutyków, a także jako emulgator i plastyfikator w produkcji żywności i kosmetyków [Weiser i in. 2011, Mishra i in. 2008, Lewis 2001]. Pełni funkcję związku pośredniego w syntezie metotreksatu, leku popularnego i skutecznego w terapii chorób nowotworowych [Gätgens i in. 2007]. Związek ten jest prekursorem w produkcji glikolu propylenowego, stosowanego w przemyśle kosmetycznym, głównie do wyrobu past do zębów, antyperspirantów w sztyfcie oraz środków higieny rąk [Bicker i in. 2005, Enders i in. 2005, Hekmat i in. 2003].

W ostatnich latach przeprowadzono badania [Djuranovic i in. 2006] nad przeciwpasożytniczymi właściwościami DHA. Należący do pierwotniaków zarodziec sierpowaty (*Plasmodium falciparum*) wywołuje najcięższą odmianę malarii u ludzi. Następstwem tej choroby są ciężkie powikłania, a nawet śmierć. Przeprowadzone badania dostarczyły dowodów, że 2,5 mM roztwór DHA hamuje aktywność dehydrogenazy gliceraldehydu 3-fosforanowego oraz cykl glikolizy u tych pierwotniaków w ciągu zaledwie 6 godzin od zastosowania dawki. Podobny efekt zaobserwowano w stosunku do pasożyta krwi *Trypanosoma brucei* (świdrowiec nagany), wywołującego chorobę nagany. Pasożytuje on w osoczu krwi, chłonce oraz płynie mózgowo-rdzeniowym i jest przenoszony przez muchę tse-tse. Roztwór zawierający 2 mM DHA powoduje zatrzymanie cyklu u 70% tego pierwotniaka. Takie działanie dihydroksyacetonu nie zostało do końca wyjaśnione. Wiadomo jedynie, że jest związane z pojawieniem się pęcherzykowatych struktur w cytoplazmie komórek *T. brucei* oraz zmianami strukturalnymi w obrębie mitochondriów [Uzategui i in. 2007].

Najnowsze badania [Henderson i in. 2010] wykazały, że dihydroksyaceton może być znakomitym komponentem biomateriałów tamujących krwotoki. Kowalencyjne związanie DHA z glikolem polietylenowym (tzw. pegylacja) umożliwia otrzymanie specyficznego biomateriału (MPEG-pDHA), który w kontakcie z przeciętą tkanką powoduje gwałtowne zahamowanie krwawienia. Dzięki temu możliwe jest skrócenie procesu gojenia ran pooperacyjnych. Badania *in vivo* przeprowadzone na szczurach sugerują, że MPEG-pDHA może znaleźć zastosowanie w szerokim zakresie zabiegów chirurgicznych [Henderson i in. 2010].

OTRZYMYWANIE DIHYDROKSYACETONU

Istnieją dwie główne metody otrzymywania dihydroksyacetonu: chemiczna oraz biotechnologiczna [Hekmat i in. 2003].

Synteza chemiczna może przebiegać na drodze katalitycznego utleniania glicerolu albo jego kondensacji z węglanem wapnia. Chemiczne utlenianie glicerolu może być w sposób kontrolowany ukierunkowane na wytwarzanie dihydroksyacetonu lub alkoholi pierwszorzędowych [Painter i in. 2010]. Efektywnie działającym katalizatorem tej reakcji jest bismut z domieszką platyny [Hu i in. 2010a, Bianchi i in. 2005, Dimitratos i in. 2005]. Elek-

trokatalityczne utlenianie glicerolu można uzyskać przy zastosowaniu elektrody srebra i chlorku srebra o potencjale elektrycznym 1,1 V, umieszczonych w roztworze glicerolu o pH 9,1. Wydajność reakcji jest niska (25%), a prowadzenie procesu powyżej 20 godzin powoduje nadoksydację DHA [Ciriminna i in. 2006]. Wytwarzanie DHA na drodze kondensacji formaldehydu jest związane z powstawaniem mieszaniny rozgałęzionych i nierozgałęzionych aldehydów oraz ketonów [Gehrer i in. 1955]. Wydajność reakcji jest znaczna (82%), jednak oczyszczenie produktu z mieszaniny dodatkowych związków jest kosztowne i sprawia, że metoda jest ekonomicznie nieopłacalna [Ciriminna i in. 2006].

Dużą konkurencją dla chemicznej syntezy DHA stanowi metoda biotechnologiczna. Polega ona na utlenianiu glicerolu do DHA przez drobnoustroje, głównie bakterie octowe, które charakteryzują się wysoką aktywnością dehydrogenazy glicerolowej [Xu i in. 2009, Claret i in. 1992].

Pierwszą mikrobiologiczną biotransformację glicerolu do dihydroksyacetonu przeprowadzono w 1896 r. Wykorzystano wówczas gatunek bakterii octowych *Acetobacter xylinum* [Gillis i in. 1983]. W kolejnych latach prowadzono prace nad optymalizacją tego procesu. Wyniki badań Virtanena i Nordlunda [1933] sugerowały, że optymalne stężenie substratu węglowego w podłożu produkcyjnym powinno wynosić 6–8%. Kluyver [1931] wykazał, że napowietrzanie hodowli komórek bakterii wyraźnie skracało czas utlenienia glicerolu do DHA, a wydajność reakcji w tym przypadku wynosiła 95%. Przeprowadzone w połowie lat 50. prace badawcze [Hauge i in. 1955], w których do produkcji DHA wykorzystano *Acetobacter suboxydans*, doprowadziły do stwierdzenia, że wydajność procesu była tym mniejsza, im większa była początkowa zawartość substratu w podłożu. Dowiedziono również, że optymalne pH tej przemiany powinno być zawarte w przedziale 5,0–5,5. Jednocześnie wykazano, że tylko komórki bakterii znajdujące się w końcowym okresie fazy stacjonarnej zdolne były do szybkiej i wydajnej oksydacji glicerolu. W opatentowanej w roku 1978 biotechnologicznej przemianie glicerolu do DHA wykorzystano również bakterie *A. suboxydans* [Charney, Montclair 1978]. Pomysłodawca gwarantował wysoką wydajność metody przy zachowaniu odpowiednich warunków hodowli i składu podłoża (9–12% glicerolu oraz 0,5% hydrolizatu drożdżowego lub rybnego). Reakcja trwała 30 godzin, produkt izolowano z podłoża na drodze filtracji. W kolejnych etapach usuwano jony nieorganiczne, zagęszczano roztwór i krystalizowano DHA. Rok później przeprowadzono selekcję szczepów bakterii octowych, pod kątem produktywności dihydroksyacetonu. Wykazano, że najwyższą aktywnością dehydrogenazy glicerolowej (warunkującej utlenianie glicerolu do DHA) wyróżniały się bakterie octowe z gatunków *Gluconacetobacter xylinus* oraz *Gluconobacter oxydans* ATCC 621. W przypadku tych szczepów aktywność enzymatyczna GlyDH wynosiła odpowiednio 7,95 oraz 6,20 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{cm}^{-3}$ preparatu enzymatycznego. Aktywność specyficzna GlyDH była jednakowa i wynosiła 1,02 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ białka zawartego w preparacie [Nabe i in. 1979].

Pomimo wyselekcjonowania odpowiednich szczepów, ustalenia optymalnych parametrów prowadzenia reakcji utleniania glicerolu do DHA oraz działania dehydrogenazy glicerolowej problem odzyskania produktu z mieszaniny pochodzącej poważnie komplikuje pomyślnie zakończenie procesu. Zanim nastąpi właściwa krystalizacja DHA, należy przeprowadzić wielokrotną filtrację, ewaporację oraz inkubację roztworu poprodukcyjnego [Charney, Montclair 1978]. Fakley i Lindsay [1988] uważali, że poddanie DHA typowej reakcji destylacji, powodowało częściową dehydratację tego związku, a wraz z DHA wytrącaniu ulegały inne cukry obecne w podłożu. Opracowali zatem me-

toję opartą na cienkowarstwowej ewaporacji, która miała wyeliminować problem zanieczyszczenia końcowego produktu przez inne sacharydy. Inna koncepcja przemysłowej produkcji DHA dotyczyła powtórnego wykorzystania namnożonej wcześniej biomasy bakterii octowych z rodzajów *Gluconobacter* lub *Acetobacter* [Ohrem, Haftung 1998]. Po upływie kilkudziesięciu godzin hodowli wzrost tych drobnoustrojów ulegał zahamowaniu. Nie oznaczało to jednak utraty aktywności GlyDH. Komórki bakterii niezdolne do dalszych podziałów wykorzystywano w całości lub w części w kolejnych cyklach produkcyjnych. Takie działania pozwoliły na obniżenie nakładów finansowych produkcji DHA [Ohrem, Haftung 1998]. Dzięki rozwojowi automatyki przemysłowa produkcja DHA odbywa się obecnie w bioreaktorach. Takie rozwiązanie umożliwia precyzyjną kontrolę parametrów biotransformacji. Niestety, nie eliminuje problemów związanych z niedostatecznym napowietrzeniem mieszaniny reakcyjnej [Boontawan, Stuckey 2006, Bauer i in. 2005, Klein i in. 2002, Maier, Buchs 2001]. Obecnie dihydroksyaceton wytwarzany jest biotechnologicznie na drodze niecałkowitego utleniania glicerolu przez bakterie octowe z gatunku *Gluconobacter oxydans* ATCC 621 [Dubin i in. 2007].

Metody zmierzające do intensyfikacji biotransformacji glicerolu w DHA obejmują m.in. modyfikacje genetyczne bakterii octowych oraz immobilizację komórek tych bakterii. Wykorzystanie mikroorganizmów zrekombinowanych genetycznie wydaje się być skutecznym krokiem umożliwiającym wydajną produkcję DHA. Najczęściej doświadczenia takie polegają na klonowaniu genów (warunkujących utlenianie glicerolu lub syntezę DHA), w wektorach do nadekspresji i nadprodukcji białek zaangażowanych w te procesy. Jedne z pierwszych prób zastosowania inżynierii genetycznej w usprawnieniu tej reakcji obejmowały konstrukcję szczepu *G. oxydans* DSM 2343, zdolnego do nadprodukcji dehydrogenazy glicerolowej [Gätgens i in. 2007]. Przy początkowym stężeniu glicerolu w podłożu na poziomie 550 mM mutant DSM 2343 wytworzył 350 mM dihydroksyacetonu, natomiast szczep dziki 280 mM DHA. Inna mutacja [Li i in. 2010a,b] polegała na wprowadzeniu do komórek szczepu *G. oxydans*, plazmidu, który zawierał gen kodujący hemoglobinę (vgb). Taka modyfikacja pozwoliła na obniżenie zapotrzebowania na tlen podczas hodowli zmutowanych bakterii. Stężenie DHA otrzymane w wyniku biotransformacji prowadzonej z udziałem szczepu poddanego mutacji wynosiło ok. 7 g·L⁻¹. Szczep dziki wytworzył w tym czasie ok. 5 g DHA·L⁻¹ podłoża, w którym początkowe stężenie glicerolu wynosiło 80 g·L⁻¹, a temperatura oraz kwasowość czynna środowiska reakcji – odpowiednio 30°C i pH 6,0 [Li i in. 2010 a, b]. Genom bakterii można także modyfikować za pomocą związków chemicznych o właściwościach mutagennych lub drogą fizyczną z wykorzystaniem promieniowania UV [Hu i in. 2010b, Gätgens i in. 2007]. Rozwiązania takie są jednak obciążone ryzykiem związanym z powrotem zrekombinowanych szczepów do postaci sprzed mutacji, dalszymi spontanicznymi mutacjami bądź też zahamowaniem rozmnażania cennego mutantu [Ma i in. 2010]. Może to skutkować utratą nadanej mutantowi cechy, która umożliwiała zwiększoną produkcję DHA.

PODSUMOWANIE

Szacunkowa roczna produkcja dihydroksyacetonu wynosi 2000 ton w skali światowej [Pagliaro i in. 2007]. W roku 2005 wartość sprzedanych kosmetyków samoopalających w Polsce osiągnęła kwotę 12 mln PLN [Raport ACNielsen 2006]. Warto podkreślić, że

sprzedaż kosmetyków słonecznych w Polsce jest średnio 7-krotnie mniejsza niż w krajach zachodnioeuropejskich. Porównanie naszego rynku kosmetyków z rynkami zachodnimi pozwala przewidzieć, że zapotrzebowanie na preparaty przyspieszające proces opalania będzie dynamicznie rosło w najbliższych latach [Raport ACNielsen 2006]. Wiadomo jednak, że zastosowanie DHA nie ogranicza się jedynie do przemysłu kosmetycznego. Związek ten doceniono w przemyśle spożywczym, farmacji oraz medycynie. W ostatnich latach podejmowano badania nad przeciwpasożytniczym zastosowaniem DHA oraz konstruowano biomateriały o dużym znaczeniu w chirurgii, w których dihydroksyaceton stanowił niezbędny komponent. Na tej podstawie przewiduje się dynamiczny wzrost zapotrzebowania na DHA w najbliższej przyszłości. Naukowcy, a także potentaci przemysłowi zauważyli przewagę mikrobiologicznej metody produkcji DHA nad chemiczną. Świadomość zagrożeń ekologicznych związanych z chemiczną syntezą DHA przyczyniła się do wypierania takiej metody pozyskiwania dihydroksyacetonu. Biotechnologiczne utlenianie glicerolu do DHA przez bakterie octowe jest obecnie jedyną dopuszczoną metodą. W Zakładzie Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności SGGW w Warszawie oraz w innych placówkach naukowych nadal trwają badania nad optymalizacją biotechnologicznej metody otrzymywania DHA [Błazejak i in. 2011, Stasiak-Różańska i in. 2011]. Prace takie obejmują często ustalenie optymalnych parametrów procesu (pH, stężenie składników podłoża, wybór źródła węgla, napowietrzanie, czas reakcji), zastąpienie glicerolu innym, tańszym substratem (np. produktem odpadowym z innego procesu), zastosowanie immobilizowanych komórek lub preparatów komórkowych o aktywności GlyDH.

LITERATURA

- Akin F. J., Marlowe E., 1984. Non-carcinogenicity of dihydroxyacetone by skin painting. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.*, 5, 349–351.
- Bauer R., Katsikis N., Varga S., Hekmat D., 2005. Study of the inhibitory effect of the product dihydroxyacetone on *Gluconobacter oxydans* in a semi-continuous two-stage repeated-fed-batch process. *Bioprocess. Biosyst. Eng.*, 5, 37–43.
- Bianchi C. L., Canton P., Dimitratos N., Porta F., Prati L., 2005. Selective oxidation of glycerol with oxygen using mono and bimetallic catalysts based on Au, Pd and Pt metals. *Catal. Today*, 102, 203–212.
- Bicker M., Endres S., Ott L., Vogel H., 2005. Catalytical conversion of carbohydrates in subcritical water: a new chemical process for lactic acid production. *J. Mol. Catal. A Chem.*, 239, 151–157.
- Błazejak S., Stasiak-Różańska L., Markowski K., Lipińska E., 2011. Zwiększenie zdolności biosyntezy dihydroksyacetonu przez bakterie *Gluconacetobacter xylinus* za pomocą mutagenizacji promieniowaniem UV. *Acta Sci. Pol. Biotechnol.*, 10, 17–24.
- Boontawan A., Stuckey D., 2006. A membrane bioreactor for the biotransformation of alpha-pinene oxide to isovalal by *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11671. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 69, 643–649.
- Charney W., Montclair N. J., 1978. Process for the production of dihydroxyacetone. USA, Patent nr 4076589.
- Choquet B., Couteau C., Papis E., Coiffard L. J. M., 2009. Foundations and self-tanning products: Do they provide any protection from the sun? *J. Dermatol.*, 36, 587–591.

- Ciriminna R., Palmisano G., Pina C.D., Rossi M., Pagliaro M., 2006. One-pot electrocatalytic oxidation of glycerol to DHA. *Tetrahedron. Lett.*, 47, 6993–6695.
- Claret C., Bories A., Soucaille P., 1992. Glycerol inhibition of growth and dihydroxyacetone production by *Gluconobacter oxydans*. *Current Microbiol.*, 25, 149–155.
- Cummings T.F., 2004. The treatment of cyanide poisoning. *Occup. Med.*, 54, 82–85.
- Dimitratos N., Francesca P., Prati L., 2005. Au, Pd (mono and bimetallic) catalysts supported on graphite using the immobilisation method synthesis and catalytic testing for liquid phase oxidation of glycerol. *Appl. Catal. A Gen.*, 291, 210–214.
- Djuranovic S.P., Kun J.F. J., Schultz J.E., Beitz E., 2006. Dihydroxyacetone and methylglyoxal as permeants of the *Plasmodium aquaglyceropori* inhibit parasite proliferation. *Biochim. Biophys. Act.* 1758, 1012–1017.
- Draelos M.D., Zoe D., 2002. Self-Tanning Lotions: Are they a healthy way to achieve a tan? *Am. J. Clin. Dermatol.*, 3, 317–318.
- Dubin A., Anioł A., Bielecki S., Borowicz P., Czarnik M., Kur J. W., Kuźmierkiewicz W., Pietrucha T., Sławeta R., Świtoński M., Torbicz W., Wiczorek M., 2007. Stan i kierunek i rozwoju biogospodarki. MNiSW, Warszawa, 100–108.
- Durand M., 1995. Method for the protection of dihydroxyacetone, a dihydroxyacetone protected by this method and cosmetic product containing such a protected dihydroxyacetone. USA, Patent nr 5458872.
- Enders D., Voith M., Lenzen A., 2005. The dihydroxyacetone unit—a versatile C3 building block in organic synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 44, 1304–1325.
- Fakley M.E., Lindsay R.J., 1988. Isolation process. USA, Patent nr 4775448.
- Ferroni E. L., Di Tella V., Jeske R., 1999. Structures of dihydroxyacetone. *J. Org. Chem.*, 64, 4943–4945.
- Fesq H., Brockow K., Strom K., Mempel M., Ring J., Abeck D., 2001. Dihydroxyacetone in a New Formulation – A Powerful Therapeutic Option in Vitiligo. *Dermatol.*, 203, 241–243.
- Fu J.M., Dusza S.W., Halpern A.C., 2004. Sunless tanning. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 50, 706–713.
- Gätgens C., Degner U., Bringer-Meyer S., Herrmann U., 2007. Biotransformation of glycerol to dihydroxyacetone by recombinant *Gluconobacter oxydans* DSM 2343. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 76, 553–559.
- Gehrer E., Harder W., Vogel H., Knuth B., Ebel K., Groening C., 1995. Preparation of dihydroxyacetone. USA, Patent nr 5410089.
- Gillis M., Kersters K., Goselle F., Swings J., De Ley A., MacKenezie A.R., Bousfield I.J., 1983. Rediscovery of Bertrand's Sorbose Bacterium (*Acetobacter aceti* subsp. *xylinum*): Proposal to Designate NCIB 11664 in Place of NCIB 4112 (ATCC 23767) as the Type Strain of *Acetobacter aceti* subsp. *xylinum*. *Int. J. Syst. Ter.*, 33, 122–124.
- Green S.R., Whalen E.A., Molokie E., 2004. Dihydroxyacetone: Production and uses. *J. Biochem. Microbiol. Technol.*, 3, 351–355.
- Hauge J., King T., Cheldelin V., 1955. Alternate conversions of glycerol to dihydroxyacetone in *Acetobacter suboxydans*. *J. Biol. Chem.*, 214, 1–9.
- Hekmat D., Bauer R., Fricke J., 2003. Optimization of the microbial synthesis of dihydroxyacetone from glycerol with *Gluconobacter oxydans*. *Bioproc. Biosyst. Eng.*, 26, 109–113.
- Henderson P. W., Kadouch D. J., Singh S. P., Zawaneh P. N., Weiser J., Yazdi S., Weinstein A., Krotscheck U., Wechsler B., Putnam D., Spector J. A. J., 2010. A rapidly resorbable hemostatic biomaterial based on dihydroxyacetone. *Biomed. Mater. Res. A.*, 93, 776–782.
- Hu W., Knight D., Lowry B., Varma A., 2010a. Selective Oxidation of Glycerol to Dihydroxyacetone over Pt–Bi/C Catalyst: Optimization of Catalyst and Reaction Conditions. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 49, 10876–10882.
- Hu Z.C., Liu Z.Q., Zheng Y.G., Shen Y.C., 2010b. Production of 1,3-Dihydroxyacetone from Glycerol by *Gluconobacter oxydans* ZJB09112. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 20, 340–345.

- Ivy J.L., 1998. Effect of pyruvate and dihydroxyacetone on metabolism and aerobic endurance capacity. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 30, 837–843.
- Klein J., Rosenberg M., Markos J., Dolgos O., Krosiak M., Kristofikova L., 2002. Biotransformation of glucose to gluconic acid by *Aspergillus niger*: Study of mass transfer in an airlift bioreactor. *Biochem. Eng. J.*, 10, 197–205.
- Kluyver A.J., 1931. Process for the preparation of organic compounds by means of bacterial oxidation. USA, Patent nr 1833716.
- Lewis R.J. Sr., 2001. *Hawley's Condensed Chemical Dictionary* 14th Edition. John Wiley & Sons, Inc. New York, 383–390.
- Lewis R.J. Sr., 2004. *Sax's Dangerous Properties of Industrial Materials*. Wiley & Sons, Inc. Hoboken, New York, 2792.
- Li M.H., Wu J., Liu X., Lin J.P., Wei D.Z., Chen H., 2010a. Enhanced production of dihydroxyacetone from glycerol by overexpression of glycerol dehydrogenase in an alcohol dehydrogenase-deficient mutant of *Gluconobacter oxydans*. *Bioresour. Technol.*, 101, 8294–8299.
- Li M., Wu J., Lin J., Wei D., 2010b. Expression of *Vitreoscilla* Hemoglobin Enhances Cell Growth and Dihydroxyacetone Production in *Gluconobacter oxydans*. *Curr. Microbiol.*, 61, 370–375.
- Lide D.R., Milne G. W.A., 1994. *Handbook of Data on Organic Compounds*. vol.1, CRC Press, Inc. Boca Raton, 4475–4480.
- Ma L., Lu W., Xia Z., Wen J., 2010. Enhancement of dihydroxyacetone production by a mutant of *Gluconobacter oxydans*. *Biochem. Eng. J.*, 49, 61–67.
- Maier U., Buchs J., 2001. Characterisation of the gas-liquid mass transfer in shaking bioreactors. *Biochem. Eng. J.*, 7, 99–106.
- Mason E. H., Hill E., 1926. Dihydroxyacetone Studies I. Its Respiratory and Carbohydrate Metabolism in Normal Men. *J. Clin. Invest.*, 2, 521–532.
- Mersch-Sundermann V., Schneider U., Klopman G., Rosencrantz H. S., 1994. SOS induction in *Escherichia coli* and *Salmonella* mutagenicity: a comparison using 330 compounds. *Mutagen.*, 9, 205–224.
- Mishra R., Jain S.R., Kumar A., 2008. Microbial production of dihydroxyacetone. *Biotechnol. Adv.*, 26, 293–303.
- Misterska M., Szulczyńska-Gabor J., Żaba R., 2009. Etiopatogeneza, obraz kliniczny i leczenie bielactwa. *Post. Dermatol. Alergol.*, 4, 212–223.
- Nabe K., Izuo N., Yamada S., Chibata I., 1979. Conversion of Glycerol to Dihydroxyacetone by Immobilized whole cells of *Acetobacter xylinum*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 38, 1056–1060.
- Nguyen B.C., Kochevar I.E., 2003a. Factors influencing sunless tanning with dihydroxyacetone. *Br. J. Dermatol.*, 149, 332–340.
- Nguyen B.C., Kochevar I.E., 2003b. Influence of hydration on dihydroxyacetone-induced pigmentation of stratum corneum. *J. Invest. Dermatol.*, 120, 655–661.
- Niknahad H., Ghelichkhani E., 2002. Antagonism of cyanide poisoning by dihydroxyacetone. *Toxicol Lett.*, 132, 95–100.
- Obeid O.A., Jamal Z.M., Hwalla N., Emery P.W., 2006. The effect of glutamine and dihydroxyacetone supplementation on food intake, weight gain, and postprandial glycogen synthesis in female Zucker rats. *Nutr.*, 22, 794–801.
- Ohrem H.L., Haftung B., 1998. Microbial process for the preparation of dihydroxyacetone with recycling of biomass. USA, Patent nr 5770411.
- Omar A., Bittar S., Hwalla N., 2005. Effect of diet supplementation with glutamine, dihydroxyacetone, and leucine on food intake, weight gain, and postprandial glycogen metabolism of rats. *Nutr.*, 21, 224–229.
- O'Neil M.J., 2001. *The Merck Index – An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals*. Whitehouse Station, New York, 560.
- Pagliari M., Ciriminna R., Kimura H., Rossi M., Pina C. D., 2007. From Glycerol to Value-Added Products. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 46, 4434–4440.

- Painter R.M., Pearson D.M., Waymonth R.M., 2010. Selective catalytic oxidation of glycerol to dihydroxyacetone. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 49, 9456–9459.
- Petersen A.B., Wulf H.C., Gniadecki R., Gajkowska B., 2004. Dihydroxyacetone, the active browning ingredient in sunless tanning lotions, induces DNA damage, cell-cycle block and apoptosis in cultured HaCaT keratinocytes. *Mutat. Res.*, 560, 173–186.
- Pham H.N., De Marini D.M., Brockmann H.E., 1980. Mutagenicity of skin tanning lotions. *J. Environ. Pathol. Toxicol.*, 3, 227–231.
- Raport ACNielsen, 2006. Rynek kosmetyków w Polsce, www.acnielsen.pl
- Rogers C.J., 2005. Spray-on tanning. *Aesth. Surg. J.*, 25, 413–415.
- Schmid D., Belser E., Zulli F., 2007. Self-tanning based on stimulation of melanin biosynthesis. *Cosm. Toilet.*, 6, 55–60.
- Shipar A.H., 2006. Formation of the Heyns rearrangement products in dihydroxyacetone and glycine Maillard reaction: A computational study. *Food Chem.* 97, 231–243.
- Ślepokura K., Lis T., 2004. Crystal structures of dihydroxyacetone and derivatives. *Carbo. Res.*, 339, 1995–2000.
- Stasiak-Róžańska L., Błażejczak S., Miklaszewska A., 2011. Application of immobilized cell preparation obtained from biomass of *Gluconacetobacter xylinus* bacteria in biotransformation of glycerol to dihydroxyacetone, *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.*, 10, 35–49.
- Stanko R.T., Arch J.E., 1996. Inhibition of regain in body weight and fat with addition of 3-carbon compounds to the diet with hyperenergetic refeeding after weight reduction. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.*, 20, 925–930.
- Stanko R.T., Diven W.F., Robertson R.J., Spina R.J., Galbreath R.W., Reilly J.J., Goss F.L., 1993. Amino acid arterial concentration and muscle exchange during submaximal arm and leg exercise: the effect of dihydroxyacetone and pyruvate. *J. Sports Sci.*, 11, 17–23.
- Taylor C.R., Kwangstith C., Wimberly J., Kollias N., Anderson R. R., 1999. Turbo-PUVA: dihydroxyacetone-enhanced photochemotherapy for psoriasis: a pilot study. *Arch. Dermatol.*, 135, 540–544.
- Tkáč J., Navrátil M., Šturdík E., Gemeiner P., 2001. Monitoring of dihydroxyacetone production during oxidation of glycerol by immobilized *Gluconobacter oxydans* cells with an enzyme biosensor. *Enz. Microbiol. Technol.*, 28, 383–388.
- Utesch D., Splittgerber J., 1996. Bacterial photomutagenicity testing: distinction between direct, enzyme-mediated and light-induced events. *Mutat. Res.*, 361, 41–48.
- Uzcategui N.L., Carmona-Gutierrez D., Denninger V., Schoenfeld C., Lang F., Figarella K., Duszenko M., 2007. Antiproliferative effect of dihydroxyacetone on *Trypanosoma brucei* bloodstream forms: cell cycle progression, subcellular alterations, and cell death. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 51, 3960–3968.
- Virtanen A.I., Nordlund M., 1933. An improved method for the preparation of dihydroxyacetone. *Biochem. J.*, 27, 1060–1064.
- Weiser J. R., Zawaneh P. N., Putnam D., 2011. Poly(carbonate-ester)s of Dihydroxy-acetone and Lactic Acid as Potential Biomaterials. *Biomacromolec.*, 12, 977–986.
- Xu X., Chen X., Jin M., Wu X., Wang X., 2009. Advance in dihydroxyacetone production by microbial fermentation. *Chin. J. Biotechnol.*, 25, 903–908.
- Yamaguchi T., 1982. Mutagenicity of trioses and methyl glyoxal on *Salmonella typhimurium*. *Agric. Biol. Chem.*, 46, 849–851.
- Yourick J.J., Koenig M.L., Yourick D.L., Bronaugh R.L., 2004. Fate of chemicals in skin after dermal application: does the in vitro skin reservoir affect the estimate of systemic absorption? *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 195, 309–320.

DIHYDROXYACETONE – CHARACTERISTICS, APPLICATION AND RECEIVE – A REVIEW

Abstract. Dihydroxyacetone (DHA) is ketotriose with reducing properties. It is used mainly in food industry (a sweetener, a dietary supplement, emulsifier, plasticizer), cosmetics (the active ingredient in self-tanning creams) and medicine (treatment of vitiligo disease, a component of biomaterials stopped bleeding). Currently, dihydroxyacetone is produced biotechnologically by incomplete oxidation of glycerol with acetic bacteria using *Gluconobacter oxydans* ATCC 621 strain. The enzyme catalyzing this reaction is PQQ – dependent glycerol dehydrogenase (GlyDH). The paper presents the physical and chemical characteristic of DHA, its application and receive. It also describes methods for improving the production of this compound, which have been developed over many years.

Key words: acetic bacteria, oxidation of glycerol, dihydroxyacetone

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 30.03.2012

Do cytowania – For citation: Stasiak-Róžańska L., Błazejak S., 2012. Dihydroksyacetone – charakterystyka, zastosowanie, otrzymywanie. *Acta Sci. Pol. Biotechnol.*, 11(1), 17–28.

SELEKCJA NISKOPROTEAZOWYCH MUTANTÓW *TRICHODERMA REESEI M-7* DO PRODUKCJI ENZYMÓW ZEWNĄTRZKOMÓRKOWYCH

Marta Wesołowska-Trojanowska, Zdzisław Targoński

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Streszczenie. Dokonano selekcji 9 niskoproteazowych mutantów *Trichoderma reesei M-7* do produkcji enzymów zewnątrzkomórkowych na podłożu z nierozcieńczoną serwatką wzbogaconą w sole mineralne. Hodowle fermentorowe prowadzono metodą ciągłą w bioreaktorze Bioflo III firmy New Brunswick Scientific Co. Inc. o pojemności roboczej 5 dm³. Stwierdzono odwrotnie proporcjonalne zależności pomiędzy produkcją celulazy i ksylanazy a proteazą w hodowlach niskoproteazowych mutantów *Trichoderma reesei M-7 (M-7.6, M-7.8, M-7.10)*.

Słowa kluczowe: celulazy, ksylanazy, proteazy, niskoproteazowe mutanty *Trichoderma reesei M-7*, serwatka, hodowla ciągła

WSTĘP

Grzyby z rodzaju *Trichoderma* badane były w odniesieniu do różnych cech i zastosowań oraz znane są jako znakomici kolonizatorzy, którzy skutecznie walczą ze swoimi konkurentami. Ustalono, że wyzwalają one potencjalnie niszczyielskie mechanizmy rozkładu często niejednorodnego podłoża. Stąd rozkład, filogeneza, mechanizmy obronne, korzystne, jak i szkodliwe oddziaływania z gospodarzem, produkcja enzymów oraz ich wydzielanie, rozwój płciowy i odpowiedź na warunki środowiskowe (składniki odżywcze, światło) badano dosyć szczegółowo wśród wielu gatunków tego rodzaju. Stwierdzono, iż *Trichoderma* jest jednym z najlepiej przebadanych grzybów. Wydajne szczepy tego gatunku są ulepszane, a ich bronią są metabolity wtórne z potencjalnym zastosowaniem jako nowy rodzaj antybiotyków. Inżynieria genetyczna doprowadziła nie tylko do znaczącego usprawnienia procesów przemysłowych, ale także jest obecnie uzupełniona o dostępność cykli płciowych u *Trichoderma reesei/Hypocrea jecorinia*, co istotnie

Adres do korespondencji – Corresponding author: Marta Wesołowska-Trojanowska, Katedra Biotechnologii, Żywności Człowieka i Towaroznawstwa Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, ul. Skromna 8, 20-704 Lublin, e-mail: marta.wesolowska-trojanowska@up.lublin.pl

ułatwia zarówno badania przemysłowe, jak i podstawowe. Celulazy wytwarzane przez *Trichoderma reesei* – biotechnologiczny koń pociągowy rodzaju – to ważne produkty przemysłowe, zwłaszcza w kontekście wytwarzania biopaliw drugiej generacji z odpadów celulozowych [Schuster, Schmoll 2010].

Laktoza jako niedrogi, rozpuszczalny substrat, zapewnia dobrą indukcję wytwarzania celulaz przez *Trichoderma reesei*. Grzyb ten nie pobiera bezpośrednio laktozy, lecz jest ona hydrolizowana do zewnątrzkomórkowej glukozy i galaktozy, które są następnie wchłaniane [Chi-Ming i in. 2010]. Ze względu na wysoką zawartość tego cukru, a także kwasu mlekowego, witamin oraz mikroelementów w serwatce, można ją z powodzeniem wykorzystać do tego celu. Poważnym problemem podczas hodowli *Trichoderma reesei* zarówno w obecności czystej laktozy, jak i serwatki są proteazy obecne w filtratach pochodzących z grzyba, które powodują posekrecyjne modyfikacje celulaz, obniżając ich aktywność. Poprzez odpowiedni dobór warunków hodowli, tzn. pH podłoża hodowlanego, rodzaju i stężenia źródła azotu oraz węgla, a także rodzaju hodowli można otrzymywać filtry o niskich aktywnościach proteaz [Janas i in. 2003].

W niniejszej pracy przeprowadzono selekcję tzw. niskoproteazowych mutantów *Trichoderma reesei* M-7 w celu oceny tych szczepów do produkcji enzymów zewnątrzkomórkowych.

MATERIAŁ I METODY

Material biologiczny: mutanty *Trichoderma reesei*

W badaniach wykorzystano 9 niskoproteazowych mutantów *Trichoderma reesei* M-7, pochodzących z Katedry Mikrobiologii Przemysłowej Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej w Lublinie. Jako materiał do doświadczeń wykorzystano ciecze pochodzące otrzymane w wyniku hodowli wyżej wymienionych mutantów. Mutanty przechowywano na skosach brzezkowych w temperaturze 2°C i okresowo przeszczepiano.

Podłoża hodowlane

Do hodowli *Trichoderma reesei* wykorzystano pożywkę, będącą mieszaniną pięciu części podłoża Mandels-Weber [1969] z dodatkiem 0,7% laktozy i jednej części nierozcieńczonej serwatki. Skład podłoża wg Mandels-Weber [1969] ($\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$) przedstawia się następująco: KH_2PO_4 (2000), MgSO_4 (300), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1400), CaCl_2 (300), Tween 80 (1000), ekstrakt drożdżowy (1000), roztwór mikroelementów ($0,5 \text{ cm}^3 \cdot \text{dm}^{-3}$) zawierający: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($5000 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$), $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ($1960 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$), ZnCl_2 ($1660 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$), CaCl_2 ($2000 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$). Końcową wartość pH pożywki po sterylizacji ustalono na poziomie 5,0.

Wstępne przygotowanie serwatki

Serwatkę pobierano bezpośrednio z linii produkcyjnej serów twarogowych i podpuszczkowych w OSM Lublin. Następnie poddawano ją sterylizacji w autoklawie w temperaturze 110°C przez 30 minut. Po ostudzeniu całość sączono przez sączek z wielokrotnie złożonej chusty nylonowej, w celu usunięcia części frakcji białkowych, a następnie wykorzystywano jako podłoże hodowlane wzbogacone w sole mineralne $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ i $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ w stężeniu $1000 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$, dla każdej soli. Końcową wartość pH pożywki po sterylizacji ustalono na poziomie 4,5.

Hodowle niskoproteazowych mutantów *Trichoderma reesei* M-7

Przygotowanie inoculum do hodowli

Hodowle 9 niskoproteazowych mutantów *Trichoderma reesei* M-7 prowadzono w kolbach Erlenmayera o pojemności 0,5 dm³, zawierających 0,1 dm³ pożywki wg Mandels-Weber [1969]. Jako źródło węgla stosowano laktozę w stężeniu 4000 mg · dm⁻³. Kolby zamykano korkami, będącymi jednocześnie filtrami mikrobiologicznymi i sterylizowano w autoklawie w temperaturze 110°C przez 30 minut. Po ochłodzeniu pożywki szczepiono grzybnią *Trichoderma reesei* M-7, zawartą na kawałkach skosu brzezczkowego o powierzchni 1 cm². Następnie umieszczano je w pokoju termostatowym na wstrząsarce rotacyjnej (220 obr./min) i inkubowano w temperaturze 27°C, aż do całkowitego wykorzystania źródła węgla (4–6 dob).

Hodowle ciągłe w bioreaktorze

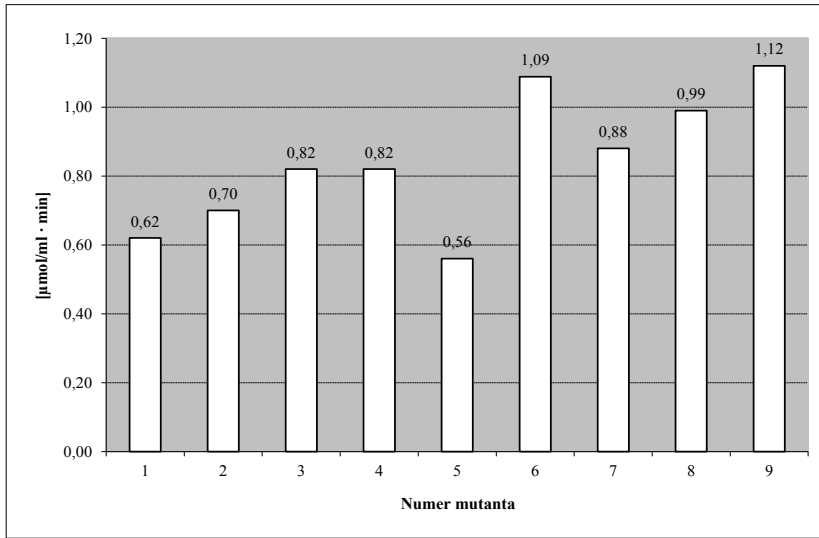
Hodowle ciągłe ww. szczepów prowadzono w bioreaktorze Bioflo III firmy New Brunswick Scientific Co. Inc. o pojemności roboczej 5 dm³. Bioreaktor napełniono pożywką, w wyżej wymienionej ilości, którą stanowiła nierozcieńczona serwatka wzbogacona w sole mineralne (NH₄)₂SO₄ i MgSO₄ · 7H₂O w stężeniu 10 g/dm³, sterylizowano w autoklawie w temperaturze 110°C przez 30 minut i szczepiono wcześniej przygotowanym inoculum w ilości 0,2 dm³. Po wyczerpaniu laktozy w podłożu bioreaktor zasilano w sposób ciągły nierozcieńczoną serwatką, dostosowując szybkość zasilania do poszczególnych mutantów, wymieniając od 700 do 1000 ml pożywki na dobę. Co 24 godziny nadmiar płynu hodowlanego odbierano tak, by zachować wyjściową ilość podłoża hodowlanego. Pobrane próbki płynu pohodowlanego wirowano w wirówce firmy Sigma Laboratory Centrifuge 4K15 przy prędkości 9000 obr./min przez 10 min, celem oddzielenia biomasy od roztworu, a w otrzymanym filtracie oznaczano aktywności enzymatyczne i zawartość cukrów redukujących. Parametry pracy bioreaktora podczas hodowli były następujące: temperatura 27°C, pH 4,0, prędkość obrotowa mieszadła 300 obr./min, napowietrzanie 0,8 dm³/min · dm³ podłoża.

Metody analityczne

W filtracie pohodowlanym oznaczano zawartości cukrów redukujących metodą Miller [1959] z użyciem kwasu 3,5-dinitrosalicylowego, zawartości białka obliczano wg metody Lowry i in. [1951] oraz określano następujące aktywności enzymów: ogólną aktywność celulolityczną wobec bibuły filtracyjnej jako substratu wg metody opisanej przez Ghose [1987] i wyrażono w jednostkach FPU, aktywności ksylanolityczne wg metody Biely i wsp. [1980], aktywności proteolityczne wg metody podanej przez Lovrien i wsp. [1985].

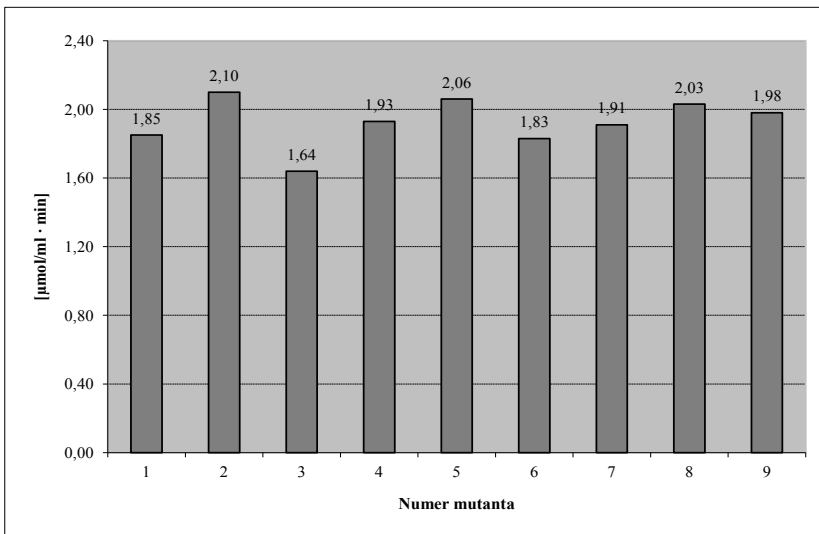
WYNIKI I Dyskusja

W wyniku hodowli wytrząsarkowych 9 mutantów otrzymano filtry pohodowlane, w których oznaczono aktywności celulaz, ksylanaz, proteaz i zawartości białka. Filtry charakteryzowały się różną aktywnością enzymatyczną, co przedstawiono na rysunkach 1–4. Do dalszych badań wybrano trzy mutanty, tj. *Trichoderma reesei* M-7.6 i *Trichoderma reesei* M-7.10, których filtry wykazywały niską aktywność proteolityczną i w celu zróżnicowania – *Trichoderma reesei* M-7.8 o najwyższej aktywności proteolitycznej. Jest rzeczą interesującą, iż badane mutanty wykazywały nie tylko zróżnicowany stosunek aktywności celulaz do proteaz, ale także celulaz do ksylanaz, co może być przedmiotem dalszych badań wykraczających poza obszar niniejszej pracy.



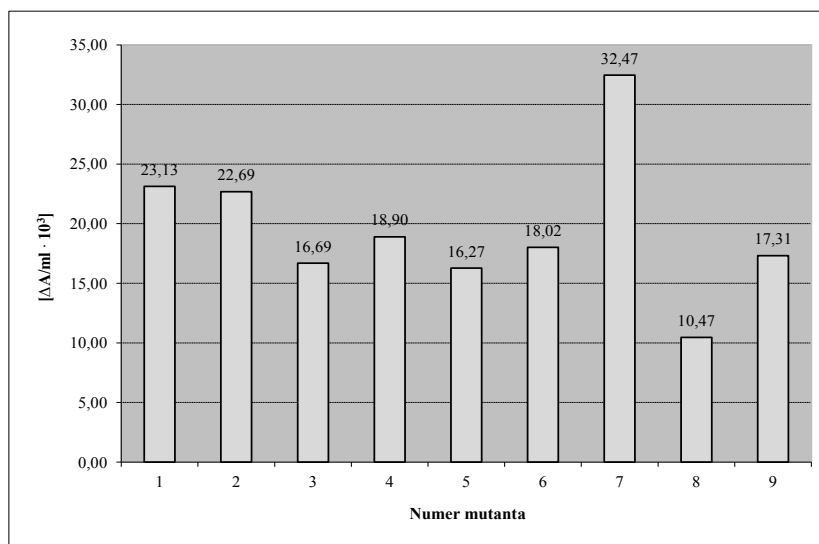
Rys. 1. Aktywności celulaz FPU filtratów pochodzących uzyskanych w wyniku hodowli wstrząsanej mutantów *Trichoderma reesei*

Fig. 1. FPU cellulase activities of culture filtrates obtained from the shake culture of *Trichoderma reesei* mutants



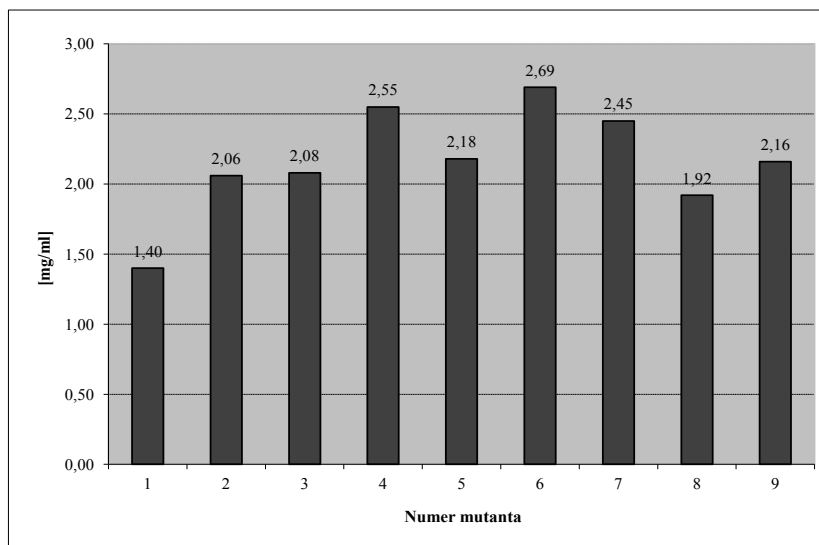
Rys. 2. Aktywności ksylanaz filtratów pochodzących uzyskanych w wyniku hodowli wstrząsanej mutantów *Trichoderma reesei*

Fig. 2. Xylanase activities of culture filtrates obtained from the shake culture of *Trichoderma reesei* mutants



Rys. 3. Aktywności proteaz filtratów pochodzących uzyskanych w wyniku hodowli wstrząsanej mutantów *Trichoderma reesei*

Fig. 3. Protease activities of culture filtrates obtained from the shake culture of *Trichoderma reesei* mutants



Rys. 4. Zawartości białka filtratów pochodzących uzyskanych w wyniku hodowli wstrząsanej mutantów *Trichoderma reesei*

Fig. 4. Protein contents of culture filtrates obtained from the shake culture of *Trichoderma reesei* mutants

Hodowlę niskoproteazowego mutantu *Trichoderma reesei* M-7.6 prowadzono metodą ciągłą na nierozcieńczonej serwatce, wzbogaconej w $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ i $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Czas trwania hodowli wynosił 22 doby. Z uwagi na zbyt niskie pH wyjściowe podłoża hodowlanego – w pierwszych dniach hodowli obserwowano minimalne namnożenie grzybnicy *Trichoderma reesei*. Zgodnie z tabelą 1 aktywności celulaz FPU wykazują wzrost od 6. doby hodowli (0,24 $\mu\text{mol/ml} \cdot \text{min}$ FPU), osiągając w 9. dobie 0,42 j. FPU. Od 10. do 14. doby aktywności te wykazywały podobne wartości, osiągając 0,49–0,51 j. FPU. Po tym czasie ponownie wzrosły do wartości 0,7 j. FPU w 17. dobie. Od 18. doby zanotowano spadek aktywności FPU. Aktywności ksylianolityczne filtratów pohodowlanych rosły od 5. doby hodowli (0,39 $\mu\text{mol/ml} \cdot \text{min}$), osiągając wartość maksymalną w 11. dniu hodowli (2,94 $\mu\text{mol/ml} \cdot \text{min}$), zaś aktywności proteolityczne utrzymywały się w granicach 17,26–18,76 jednostek, osiągając wartość maksymalną w 16. dobie (19,88 jednostek). Zawartości białka utrzymywały się na podobnym poziomie (ok. 2 mg/ml) przez cały czas trwania hodowli.

Tabela 1. Aktywności enzymatyczne filtratów pohodowlanych otrzymanych w wyniku hodowli ciągłej mutantu *Trichoderma reesei* M-7.6

Table 1. Enzymatic activities of culture filtrates obtained from the continuous culture *Trichoderma reesei* M-7.6

Czas hodowli [doby]	Zawartość cukrów redukujących [mg/ml]	Aktywności FPU [$\mu\text{mol/ml} \cdot \text{min}$]	Aktywności proteaz [$\Delta\text{A/ml} \cdot 10^3$]	Zawartości białka [mg/ml]	Aktywności ksylianaz [$\mu\text{mol/ml} \cdot \text{min}$]
1	28,00	0,00	12,96	2,049	0,00
2	24,20	0,00	11,95	1,994	0,00
3	24,20	0,00	14,96	1,570	0,00
4	24,03	0,00	13,58	–	0,00
5	18,97	0,00	16,22	1,725	0,00
6	18,56	0,24	17,48	1,994	0,39
7	15,96	0,30	18,76	1,985	1,59
8	15,35	0,35	18,47	2,151	1,21
9	11,42	0,42	17,26	2,061	2,02
10	8,72	0,50	17,80	2,089	2,06
11	4,63	0,51	18,25	1,996	2,54
12	2,12	0,50	18,17	2,266	2,94
13	1,93	0,49	18,44	2,256	2,19
14	1,78	0,64	–	1,949	2,79
15	1,56	0,68	18,67	2,208	2,06
16	1,77	0,66	17,43	2,368	1,79
17	1,64	0,70	19,88	2,120	1,82
18	1,96	0,55	16,20	2,132	1,78
19	1,92	0,54	17,55	2,163	1,41
20	1,80	0,61	17,58	2,089	1,46
21	2,09	–	–	–	–
22	2,34	–	–	–	–

Hodowlę ciągłą mutantu *Trichoderma reesei* M-7.8 prowadzono w bioreaktorze na podłożu z serwatką wzbogaconą w sole mineralne przez 20 dób.

Tabela 2. Aktywności enzymatyczne filtratów pochodzących otrzymanych z hodowli ciągłej mutantu *Trichoderma reesei* M-7.8.

Table 2. Enzymatic activities of culture filtrates obtained from the continuous culture of *Trichoderma reesei* M-7.8.

Czas hodowli [doby]	Zawartość cukrów redukujących [mg/ml]	Aktywności FPU [$\mu\text{mol/ml} \cdot \text{min}$]	Aktywności proteaz [$\Delta\text{A/ml} \cdot 10^3$]	Zawartości białka [mg/ml]	Aktywności ksyłanaz [$\mu\text{mol/ml} \cdot \text{min}$]
5	19,10	0,000	14,29	7,750	0,00
6	15,13	0,000	12,79	4,875	0,00
7	12,12	0,000	12,52	4,875	0,00
8	9,61	0,162	12,85	4,875	0,25
9	7,15	0,233	13,94	5,750	0,71
10	5,59	0,233	11,88	4,875	1,91
11	3,31	0,307	12,47	4,875	1,59
12	1,43	0,366	11,21	3,960	2,28
13	1,77	0,419	12,72	3,960	2,24
14	1,48	0,481	8,39	4,735	1,74
15	2,26	0,356	10,05	3,790	1,77
16	1,48	0,358	9,78	3,790	2,08
17	0,89	0,344	9,83	3,305	1,88
18	1,17	0,292	9,63	3,405	2,02
19	1,79	0,333	9,78	3,270	1,46
20	1,42	0,337	–	3,370	–

W początkowym okresie hodowli ciągłej nie obserwowano znaczącego namnażania grzybni, jak również filtraty pochodzące nie wykazywały aktywności celulołitycznych i ksyłanolitycznych. Jak wynika z danych w tabeli 2, aktywności celulaz FPU mutantu M-7.8 w kolejnych dobach hodowli rosły, uzyskując wartość maksymalną w 14. dobie (0,481 j. FPU). Po tym czasie aktywności celulołityczne utrzymywały się na podobnym poziomie i oscylowały w granicach 0,292–0,358 j. FPU, natomiast aktywności ksyłanaz osiągnęły wartość maksymalną w 12. dobie hodowli (2,28 $\mu\text{mol/ml} \cdot \text{min}$). Następnie zanotowano niewielki spadek tych aktywności, który w 19. dobie osiągnął wartość minimalną 1,46 $\mu\text{mol/ml} \cdot \text{min}$. Do 9. dnia hodowli aktywności proteolityczne były wysokie i wynosiły 12,52–14,29 jednostek. Po tym czasie nastąpił znaczny spadek ich wartości i aktywności proteaz osiągnęły minimum w 14. dobie (8,39 jednostek). Od 15. doby aktywności proteolityczne nieznacznie wzrosły i utrzymywały się na podobnym poziomie do końca hodowli (9,63–10,05 jednostek). Zawartości białka osiągnęły wartość maksymalną w 5. i 9. dobie (5,75 mg/ml). Od 10. doby zawartości te zaczęły obniżać się, osiągając wartość minimalną 3,27 mg/ml w 19. dobie hodowli.

Hodowlę ciągłą niskoproteazowego mutantu *Trichoderma reesei* M-7.10 prowadzono w fermentorze w warunkach jak dla poprzednich mutantów. Czas trwania hodowli wynosił 22 doby.

Z tabeli 3 wynika, że aktywności celulaz FPU mutantu M-7.10 rosły, osiągając wartość maksymalną 0,983 j. FPU w 17. dobie. Po tym czasie aktywności były nieco niższe i kształtowały się na poziomie 0,731 j. FPU w 21. dobie hodowli. Do 9. doby hodowli nie zanotowano aktywności ksylanolitycznych w filtratach pohodowlanych, lecz aktywności te osiągnęły wartość maksymalną 2,656 $\mu\text{mol/ml} \cdot \text{min.}$ w 13. dobie hodowli. Po tym czasie zaobserwowano spadek aktywności ksylanaz do wartości 1,864 $\mu\text{mol/ml} \cdot \text{min.}$ w 21. dobie hodowli. Aktywności proteolityczne do 12. doby oscylowały w granicach 9,65–13,7 jednostek, osiągając wartość maksymalną w 20. dniu hodowli (35,18 jednostek). Wzrost aktywności proteolitycznych był negatywnie skorelowany z aktywnością celulaz filtratów pohodowlanych, a mógł być spowodowany zmianą warunków hodowli, będących wynikiem zakłócenia pracy bioreaktora. Stężenia białka kształtowały się na poziomie 1,504–1,966 j. do 11. dnia hodowli. Po tym czasie zawartości białka systematycznie rosły, osiągając wartość maksymalną 2,787 mg/ml w 21. dobie hodowli (tab. 3).

Podsumowując ten etap selekcji niskoproteazowych szczepów celem intensyfikacji produkcji celulaz, należy stwierdzić, iż przyjęte założenia okazały się słuszne. W teście selekcyjnym (rys. 3) mutant *Trichoderma reesei* M-7.10 charakteryzował się najniższą zdolnością do produkcji proteaz, a z kolei podczas hodowli ciągłej na serwatce nierozcieńczonej filtraty pohodowlane tego szczepu po hodowli ciągłej wykazywały najwyższe aktywności celulolityczne FPU. Natomiast szczep *Trichoderma reesei* M-7.8, który w teście selekcyjnym wykazywał najwyższe zdolności do syntezy proteaz w hodowli ciągłej na nierozcieńczonej serwatce, okazał się najsłabszym producentem celulaz pomimo tego, iż w filtratach stwierdzono stosunkowo niskie aktywności proteaz.

Należy więc przypuszczać, iż optymalizacja produkcji celulaz na nierozcieńczonej serwatce z użyciem mutantu *Trichoderma reesei* M-7.10 pozwoliłaby na zbliżenie się do wydajności celulaz, jakie Wesołowska-Trojanowska i in. [2005] uzyskali na podłożu Mandels-Weber [1969] po hodowli *Trichoderma reesei* M-7 na 4% laktozie. Jednak tych badań na tym etapie nie podjęto.

Jedną z przyczyn niskiej aktywności celulolitycznej i ksylanolitycznej w filtratach, otrzymanych po hodowli *Trichoderma reesei* M-7 na serwatce, mogła być nadmierna produkcja proteaz, które mogły powodować degradację celulaz i ksylanaz. W związku z powyższym, przeprowadzono selekcję tzw. niskoproteazowych mutantów *Trichoderma reesei* M-7. Wstępnej oceny tych mutantów dokonano w wyniku hodowli na pożywce serwatko-mineralnej. Spośród 11 mutantów do dalszych badań wybrano trzy, tj. *Trichoderma reesei* M-7-6 i *Trichoderma reesei* M-7.10, których filtraty wykazywały niską aktywność proteolityczną i dla zróżnicowania *Trichoderma reesei* M-7-8 o najwyższej aktywności proteolitycznej. Hodowle wszystkich ww. mutantów prowadzono metodą ciągłą.

Podsumowując ten etap pracy, należy stwierdzić, że zgodnie z wcześniejszymi założeniami mutant *Trichoderma reesei* M-7.10 charakteryzował się najniższą zdolnością do produkcji proteaz, zaś podczas hodowli ciągłej na nierozcieńczonej serwatce w filtratach pohodowlanych tego szczepu zanotowano najwyższe aktywności FPU. Drugi z kolei szczep – *Trichoderma reesei* M-7.8 w teście selekcyjnym odznaczał się największą zdolnością do syntezy proteaz, natomiast w czasie hodowli ciągłej na nierozcieńczonej serwatce okazał się najsłabszym producentem celulaz.

Tabela. 3. Aktywności enzymatyczne filtratów pochodzących otrzymanych w wyniku hodowli ciągłej mutantu *Trichoderma reesei* M-7.10Table. 3. Enzymatic activities of culture filtrates obtained from the continuous culture of *Trichoderma reesei* M-7.10

Czas hodowli [doby]	Zawartość cukrów redukujących [mg/ml]	Aktywności FPU [$\mu\text{mol/ml} \cdot \text{min}$]	Aktywności proteaz [$\Delta\text{A/ml} \cdot 10^3$]	Zawartości białka [mg/ml]	Aktywności ksylanaz [$\mu\text{mol/ml} \cdot \text{min}$]
1	23,40	0,096	9,16	1,966	0,000
2	24,20	0,003	9,83	1,923	0,000
3	24,20	0,000	9,65	1,939	0,000
4	24,03	0,000	10,05	1,870	0,000
5	18,97	0,000	12,67	1,573	0,000
6	18,56	0,000	13,88	1,625	0,000
7	15,96	0,000	14,05	1,504	0,000
8	15,35	0,000	14,34	1,808	0,000
9	11,42	0,110	13,97	1,678	0,000
10	8,72	0,132	14,47	1,711	0,000
11	4,63	0,344	12,86	1,656	0,948
12	2,12	0,492	14,86	2,030	1,681
13	1,93	0,635	13,70	2,220	2,081
14	1,78	0,723	15,92	2,304	2,656
15	1,56	0,711	17,85	2,208	2,213
16	1,77	0,759	17,70	2,463	2,133
17	1,64	0,983	18,69	2,547	1,896
18	1,96	0,914	18,07	2,620	1,975
19	1,92	0,804	26,00	2,716	2,350
20	1,80	0,921	26,44	2,828	2,156
21	2,09	0,821	35,18	2,787	2,292
22	2,34	0,731	–	–	1,864

Fiedurek i in. [1998] przeprowadzili indukcję mutantów przez naświetlanie zawiesiny konidiów mutantu *T. reesei* M-7 promieniami UV oraz poddali je działaniu 0,01% roztworu nitrozoguanidyny. Selekcji mutantów o osłabionej syntezie proteaz dokonali na podłożu agarowym z dodatkiem żelatyny. Spośród 960 przetestowanych mutantów wybrali 10, których zdolności do syntezy enzymów celolitycznych i proteolitycznych sprawdzili podczas hodowli prowadzonych w kolbach Erlenmayera o pojemności 500 cm³ na podłożu wg Mandels-Weber z dodatkiem 1% laktozy oraz na serwatce. Aktywności proteolityczne oznaczane po hodowli 9 mutantów *Trichoderma reesei* w obecności laktozy jako źródła węgla były od 25 do 75% niższe od szczepu wyjściowego. Jedynie u mutantu oznaczonego symbolem M-7-8 aktywność ta była zbliżona i wynosiła 7,34 U/cm³ · 10³. Aktywności celolityczne filtratów wszystkich mutantów były znacznie niższe

(od 40 do 90%) od *Trichoderma reesei* M-7. Natomiast aktywności uzyskane po hodowli mutantu M-7 na serwatce były ponad 2,5-krotnie wyższe od oznaczonych po hodowli w obecności 1% laktozy przy jednoczesnym obniżeniu aktywności celulolitycznej o ok. 19% (0,872 FPU/cm³). Osiem otrzymanych niskoproteazowych mutantów charakteryzowało się niższymi (31–57,5%) od mutantu wyjściowego aktywnościami proteolitycznymi cieczy pohodowlanych. Mutant M-7.1 syntetyzował proteazy o zbliżonych aktywnościach, natomiast w filtracie pohodowlanym M-7.8 stwierdzono o 27% wyższe aktywności proteolityczne od M-7. Dwa spośród mutantów (M-7.5 i M-7.10) o niższych od wyjściowego aktywnościach proteolitycznych charakteryzowały się nieznacznie wyższymi aktywnościami celulolitycznymi filtratów. U pozostałych mutantów aktywności te były od 7,4 do 92,6% niższe od otrzymanych podczas hodowli mutantu wyjściowego na serwatce. Dane te potwierdzają, iż rodzime proteazy odgrywają ważną rolę w nagromadzeniu celulaz i ksylanaz w filtratach pohodowlanych mutantów *Trichoderma reesei*.

WNIOSKI

1. Stwierdzono odwrotnie proporcjonalne zależności pomiędzy produkcją celulaz i ksylanaz a proteaz w hodowlach tzw. niskoproteazowych mutantów *Trichoderma reesei* M-7 (M-7.6, M-7.8 i M-7.10).

2. Hodowla ciągła niskoproteazowego mutantu *Trichoderma reesei* M-7.10 na nierozcieńczonej serwatce wzbogaconej w (NH₄)₂SO₄ i MgSO₄ · 7H₂O odznaczała się największą aktywnością celulolityczną (0,983 j. FPU) w 17. dobie, natomiast aktywnością ksylanolityczną 2,081 μmol/ml · min. w 13 dobie.

PIŚMIENNICTWO

- Biely P., Vrsanska M., Kratky Z., 1980. Xylan degrading enzymes of the yeast *Cryptococcus albidus*. Eur. J. Biochem., 108, 313 – 321.
- Chi- Ming L., Qin Z., Nicolas V.C., Lu-Kwang J., 2010. Roles of extracellular lactose hydrolysis in cellulase production by *Trichoderma reesei* RUT-C30 using lactose as inducing substrate. Process Biochemistry, 45, 1494-1503.
- Fiedurek J., Janas P., Targoński Z., 1998. Produkcja celulaz i proteaz przez niskoproteazowe mutanty *Trichoderma reesei*. XXXIV Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego. Streszczenia, s. 230.
- Ghose T.K., 1987. Measurement of cellulase activities. Pure and Appl. Chem., 59, 257–268.
- Janas P., Fiedurek J., Targoński Z., Mleko S., 2003. Izolacja i wstępna charakterystyka niskoproteazowych mutantów *Trichoderma reesei*. Żywność, 2, 35, 17–26.
- Lovrien R.E., Gusek T., Hart B., 1985. Cellulase and protease specific activities of commercially available cellulase preparations. J. Appl. Biochem., 7, 258–272.
- Lowry O.H., Rosenbourh N.J., Farr R.L., Rendel R.J., 1951. Protein measurements with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265–275.
- Mandels M., Weber J., 1969. The production of cellulase [in:] Cellulase and their application. Adv. Chem. Ser., G. J. Hajny, E.T. Reese, (eds), 95, 391–413.
- Miller G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. Anal. Chem. 31, 426–428.

Schuster A., Schmoll M., 2010. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 87, 787–799.

Wesołowska-Trojanowska M., Targoński Z., Udeh K., 2005. Porównanie hodowli okresowych *Trichoderma reesei* M-7 na podłożu z czystą laktozą i serwatką. Acta Scientiarum Polonorum, Biotechnologia. 4,1–2, 21–32.

SELECTION OF LOW-PROTEASE MUTANTS OF *TRICHODERMA REESEI* M-7 FOR THE PRODUCTION OF EXTRACELLULAR ENZYMES

Abstract. An evaluation was made of the ability of 9 low-protease mutants of *Trichoderma reesei* M-7 to produce extracellular enzymes on a medium with whey enriched with mineral salts. Cultures were carried out using batch and continuous culture methods. Inversely proportional relationships between the activity of cellulases and xylanases as well as the activity of proteases in filtrates obtained from cultures of low-protease mutants of *Trichoderma reesei* M-7 were not found unambiguously in batch cultures. In continuous cultures, in turn, the highest activities were shown by filtrates of mutants of *Trichoderma reesei* M-7 which exhibited the lowest ability to produce extracellular proteases in batch cultures.

Key words: cellulases, xylanases, proteases, low-protease mutants of *Trichoderma reesei* M-7, whey, continuous culture

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 30.03.2012

Do cytowania – For citation: Wesołowska-Trojanowska M., Targoński Z., 2012. Selekcja niskoproteazowych mutantów *Trichoderma reesei* M-7 do produkcji enzymów zewnątrzkomórkowych. Acta Sci. Pol. Biotechnol., 11(1), 29–40.

SPIS TREŚCI CONTENTS

Jarosław Nowosielski, Dorota Nowosielska, Magdalena Frąk, Urszula Jankiewicz, Zofia Bulińska-Radomska

Wykorzystanie metody AFLP do porównania oraz oceny zróżnicowania genetycznego wybranych odmian i miejscowych populacji fasoli zwyczajnej (*Phaseolus vulgaris* L.) i fasoli wielokwiatowej (*Phaseolus coccineus* L.) 5
Using AFLP method to compare and evaluate of genetic diversity of selected varieties and landraces of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) and bean (*Phaseolus coccineus* L.)

Lidia Stasiak-Różańska, Stanisław Błażej

Dihydroksyaceton – charakterystyka, zastosowanie, otrzymywanie 17
Dihydroxyacetone – characteristics, application and receive – a review

Marta Wesółowska-Trojanowska, Zdzisław Targoński

Selekcja niskoproteazowych mutantów *Trichoderma reesei* M-7 do produkcji enzymów zewnątrzkomórkowych 29
Selection of low-protease mutants of *Trichoderma reesei* M-7 for the production of extracellular enzymes