

ACTA SCIENTIARUM POLONORUM

Czasopismo naukowe założone w 2001 roku przez polskie uczelnie rolnicze

Biotechnologia

Biotechnologia

Biotechnology

11 (4) 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: 2,7 Printing sheets: 2,6

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 at: www.media.pl.

Editorial Team

OCENA WYDAJNOŚCI IZOLACJI DNA Z KRWI PTASIEJ ŚWIEŻEJ I PRZECHOWYWANEJ ZA POMOCĄ DWÓCH KOMERCYJNYCH ZESTAWÓW

Magdalena Gryzińska, Aneta Strachecka

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Streszczenie. Określenie stężenia i jakości DNA w badanych preparatach jest pierwszą i podstawową czynnością w badaniach z materiałem genetycznym i ma istotne znaczenie w jego dalszej analizie. Uzyskany wynik ma decydujący wpływ na podjęcie późniejszych badań. Celem pracy było porównanie ilości i jakości (czystość pod względem zanieczyszczenia białkami, odczynnikami do izolacji oraz zanieczyszczenia drobinami komórkowymi) DNA izolowanego ze świeżej i przechowywanej krwi kurzej za pomocą dwóch kitów komercyjnych. Stwierdzono statystycznie istotne różnice w stężeniu DNA izolowanego różnymi zestawami do izolacji oraz dla krwi świeżej i przechowywanej. Lepszym zestawem do izolacji DNA z krwi kurzej był kit Genomic Midi AX w porównaniu z zestawem QIAamp DNA Blood Mini Kit, natomiast większe stężenie DNA uzyskano z krwi świeżej.

Słowa kluczowe: krew, DNA, izolacja

WSTĘP

Izolowanie kwasów nukleinowych jest wstępnym i podstawowym etapem w wielu procedurach z zakresu biologii molekularnej, diagnostyki, a także medycyny sądowej mającym krytyczne znaczenie w ich dalszym przebiegu. Głównym celem tego etapu jest uzyskanie wysokiej jakości i czystości DNA, niezależnie od źródła jego pochodzenia [Prośniak i in. 2006]. W przypadku przyżyciowego pozyskiwania materiału do izolacji DNA „najwygodniejszą” i najczęściej pobieraną tkanką jest krew obwodowa. Pobrana krew może być przechowywana w odpowiednich warunkach przez wiele lat i może służyć jako źródło DNA. Warto zaznaczyć, że krew ptasia zawiera jądrzaste erytrocyty i izolacja DNA za pomocą gotowych zestawów odczynników z krwi ptasiej wymaga pewnych modyfikacji.

© Copyright by Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Adres do korespondencji – Corresponding author: Magdalena Gryzińska, Katedra Biologicznych Podstaw Produkcji Zwierzęcej, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, ul. Akademicka 13, 20-950 Lublin, Poland, e-mail: magdalena.gryzinska@up.lublin.pl

W sprzedaży brak jest komercyjnych kitów przeznaczonych do izolacji DNA z krwi ptasiej.

Obecnie do izolacji DNA można wykorzystać liczne i zróżnicowane metody, od złożonych, wieloetapowych procedur, wykorzystujących rozpuszczalniki organiczne, np. fenol-chloroform [Khosravinia i in. 2007] do szybszych, prostszych i bezpieczniejszych, np. przy użyciu gotowych zestawów do izolacji [Scherczinger i in. 1997]. Wybór odpowiedniej metody izolacji DNA zależy od rodzaju, jaki chcemy uzyskać – genomowe, mitochondrialne, plazmidowe, rodzaju materiału, z jakiego przeprowadzamy izolację, oczekiwanych rezultatów (czystość, jakość, czas izolacji itd.) oraz przeznaczenia do dalszej analizy. Jakość i czystość DNA są czynnikami silnie wpływającymi na wynik reakcji PCR [Małodobra i in. 2011]. Aby ograniczyć obecność inhibitorów reakcji PCR, należy zastosować odpowiednią metodę izolacji oraz doczyszczanie DNA. Inhibitorami reakcji PCR mogą być związki używane do izolacji, takie jak: SDS, fenol, etanol, izopropanol, octan sodu, chlorek sodu, EDTA, hemoglobina, heparyna, mocznik, mieszanina reakcyjna [Somma 2005]. Znanych jest wiele procedur izolacji DNA, w wyniku których otrzymuje się DNA biologicznie aktywny, chemicznie stabilny oraz wolny od RNA i białek. Jednakże ze względu na wielkość i wrażliwość chromosomalnego DNA praktycznie niemożliwa jest jego izolacja w formie niezmienionej. Część DNA ulega mechanicznym uszkodzeniom. Wartość współczynnika A260/A280 między 1,8 a 2,0 [Słomski 2008], a nawet wartość w zakresie 1,7–2,0 oznacza, że preparaty DNA są wystarczająco oczyszczone z białek i mogą być traktowane za „czyste” DNA. Wartość współczynnika mniejsza niż 1,7 wskazuje na zanieczyszczenia białkami, natomiast powyżej 2,0 na zanieczyszczenie RNA [Khosravinia i in. 2007]. Drugim parametrem służącym do określenia czystości DNA jest stosunek absorbancji 260–230 nm, który określa zanieczyszczenie DNA odczynnikami do izolacji. Kwas DNA uważany jest za czysty, jeżeli wartość wynosi powyżej 1,8, zaś absorbancja przy 320 nm powinna wynosić około zera.

Celem pracy było porównanie ilości i jakości DNA izolowanego ze świeżej i przechowywanej krwi kurzej za pomocą dwóch kitów komercyjnych. Ponadto określono parametry wyizolowanego DNA, takie jak: czystość DNA pod względem zanieczyszczenia białkami, odczynnikami do izolacji oraz zanieczyszczenia drobinami komórkowymi.

MATERIAŁ I METODY

Materiał badawczy stanowiła krew pobrana z żyły odłokciowej (*v. basilica*), świeża oraz przechowywana przez 24 miesiące (mrożona) w temp. -20°C. Krew świeża i przechowywana pochodziła od 10 osobników kur rasy Polbar. Krew przechowywana pochodziła od 10 innych osobników tej samej rasy.

Izolacja DNA z krwi

Krew pobrana została do sterylnych probówek Vacuette o pojemności 4 ml firmy Medlab Products. Zawierały one antykoagulant EDTA-K₂ w proporcjach 1,8 g EDTA na 1 ml krwi. Izolacja DNA została przeprowadzona na podstawie dwóch różnych zestawów do izolacji DNA genomowego: Genomic Midi AX firmy A&A Biotechnology (w dalszej części określane jako zestaw AX) oraz QIAamp DNA Blood Mini Kit (nazywany później zestaw Q). Obecnie, brak jest na rynku gotowych zestawów do izolacji DNA z krwi ptaków,

która różni się od krwi ssaczej posiadaniem jąder we wszystkich elementach morfotycznych. Zestaw odczynników AX był około dwa razy tańszy w porównaniu z zestawem Q. W przypadku izolacji DNA z krwi ptasiej do protokołów wprowadzono następujące modyfikacje:

- dla zestawu QIAamp DNA Blood Mini Kit (zestaw Q) w pierwszym etapie do próbki Eppendorfa wprowadzono 20 μ l proteazy K, a następnie dodano 50 μ l krwi. Całość uzupełniono 350 μ l roztworu AL. Modyfikacja polegała na czterokrotnym zmniejszeniu objętości krwi oraz uzupełnieniu próbki o bufor AL oraz na wielokrotnym przepipetowaniu próbki pipetą z uciętą końcówką, aż do powstania pianki koloru kakaowego.
- dla zestawu Genomic Midi AX firmy A&A Biotechnology (zestaw AX) w pierwszym etapie po dodaniu 100 μ l krwi i zalecanych odczynników próbkę przepipetowano. Do wymieszania użyto pipety z uciętą końcówką, próba była pipetowana aż do powstania pianki koloru kakaowego.

Wprowadzenie powyższych modyfikacji (tzn. czterokrotnie zmniejszenie ilości krwi oraz wielokrotne przepipetowywanie pipetą z uciętą końcówką) miało na celu rozbicie jądrzastych erytrocytów, a tym samym umożliwienie dalszych etapów izolacji, w tym zawirywania kolumnienek z mieszaniną.

Ilościowe oznaczenie stężenia białka w badanych próbkach metodą Lowry'ego zmodyfikowaną przez Schacterle-Pollack'a [Schacterle i Pollack 1973].

Metoda wykorzystuje czułą reakcję, jaką dają wiązania peptydowe i aminokwasy aromatyczne z odczynnikiem Folina-Ciocalteu'a.

Ocena spektrofotometryczna

Pomiary zostały przeprowadzone metodą spektroskopii UV-Vis, za pomocą Biofotometru firmy Eppendorf przy długościach fali: A 230 nm, A 260 nm, A 280 nm oraz A 320 nm. Dodatkowo urządzenie automatycznie obliczało stężenie [μ g/ml], a także proporcje A260/A280 nm i A260/A230 nm, pozwalające określić czystość wyizolowanego DNA.

Ocena elektroforetyczna

Ocenę elektroforetyczną przeprowadzano na 1% żelu agarozowym przy napięciu 70 V przez 30 minut. Do archiwizacji wykorzystano system CCD. Do obróbki zdjęć użyto programu Scion Image.

Metody statystyczne

Uzyskane izobaty DNA podzielono na grupy w zależności od czasu przechowywania krwi i zestawu użytego do izolacji DNA. W tak zestawionych grupach porównywano średnie wartości cech testem t-studenta.

WYNIKI

DNA wyizolowano za pomocą komercyjnych zestawów do izolacji DNA z krwi. Zestawy te są przeznaczone przede wszystkim do krwi ssaczej, której erytrocyty nie zawierają jąder, co ułatwia izolację. Bardzo duży zakres wartości wyizolowanego DNA między dwoma użytymi kitami może wynikać z braku gotowych zestawów do izolacji DNA z krwi ptasiej.

Na podstawie przeprowadzonej analizy DNA wyizolowanego z krwi świeżej i przechowywanej uzyskano wyniki przedstawione w tabeli 1.

Tabela 1. Parametry DNA izolowanego kitem AX i Q z krwi świeżej i mrożonej
Table 1. Parameters of DNA isolated kit AX and Q from fresh and stored blood

Krew – Blood	Świeża – Fresh		Przechowywana – Frozen	
I	Koncentracja DNA [$\mu\text{g/ml}$] – Concentration DNA			
Kit	\bar{X}	SD	\bar{X}	SD
Commercial kit				
AX	364,50 ^{AC}	81,546	227,91 ^{BC}	48,639
Q	113,61 ^D	55,930	110,52 ^D	66,645
Razem – Together	239,06	128,64	169,22	82,77
II	Czystość DNA pod względem zanieczyszczenia białkami (A260/A280) Clean the DNA in terms of protein contamination			
Kit	\bar{X}	SD	\bar{X}	SD
Commercial kit				
AX	1,87 ^A	0,008	1,70 ^{BC}	0,216
Q	1,85	0,017	1,85 ^D	0,024
Razem – Together	1,86	0,02	1,775	0,17
III	Stężenia białka oznaczone metodą Lowry'ego [mg/ml] Protein concentrations determined by the Lowry method			
Kit	\bar{X}	SD	\bar{X}	SD
Commercial kit				
AX	0,0082	0,0065	0,0114	0,0069
Q	0,0074	0,0073	0,0105	0,0075
Razem – Together	0,0078	0,0067	0,0109	0,0070
IV	Czystość DNA pod względem zanieczyszczenia odczynnikami do izolacji (A260/A230) Clean the DNA in terms of pollution reagents for the isolation			
Kit	\bar{X}	SD	\bar{X}	SD
Commercial kit				
AX	2,23 ^{ac}	0,164	1,90 ^b	0,187
Q	1,65 ^D	0,601	1,85	0,366
Razem – Together	1,94	0,52	1,875	0,28
V	Czystość DNA pod względem zanieczyszczenia drobinami komórkowymi (A320) Clean the DNA in terms of pollution particles cell			
Kit	\bar{X}	SD	\bar{X}	SD
Commercial kit				
AX	0,038	0,031	0,043	0,034
Q	0,026	0,020	0,041	0,052
Razem – Together	0,032	0,026	0,042	0,043

Oznaczenia dotyczą oddzielnie poszczególnych modułów:

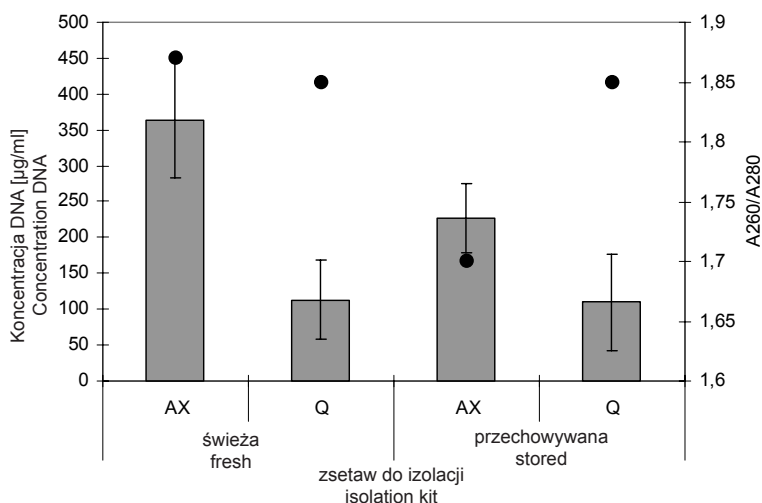
- a, b – statystycznie istotnie różnice przy $P \leq 0,05$ (w wierszach)
- A, B – statystycznie istotnie różnice przy $P \leq 0,01$ (w wierszach)
- c, d – statystycznie istotnie różnice przy $P \leq 0,05$ (w kolumnach)
- C, D – statystycznie istotnie różnice przy $P \leq 0,01$ (w kolumnach)

Markings on each module separately:

- a, b – significant differences at $P \leq 0.05$ (in verse)
- A, B – significant differences at $P \leq 0.01$ (in verse)
- c, d – significant differences at $P \leq 0.05$ (in column)
- C, D – significant differences at $P \leq 0.01$ (in column)

Istotne różnice w stężeniu DNA zaobserwowano pomiędzy izolatami z krwi świeżej i przechowywanej oraz pomiędzy użytym zestawem do izolacji. Większą koncentrację DNA uzyskano, przeprowadzając izolację kitem Genomic Midi AX.

Czystość DNA pod względem zanieczyszczenia białkami była zbliżona zarówno w przypadku próbek uzyskanych w wyniku izolacji krwi kitem AX oraz Q, jak i krwi świeżej i przechowywanej. Istotne różnice w czystości DNA zaobserwowano w przypadku izolacji kitem Genomic Midi AX pomiędzy krwią świeżą i przechowywaną (ryc. 1).



Ryc. 1. Koncentracja (i SD) oraz czystość DNA izolowanego z krwi świeżej i przechowywanej
Fig. 1. Concentration (and SD) and purity of DNA isolated from fresh and stored blood

Stosując chemiczną metodę Lowry'ego, wyższe stężenie białka uzyskano we krwi przechowywanej. W izolatach z krwi świeżej jak i przechowywanej zaobserwowano wyższe stężenie białka po zastosowaniu zestawu Genomic Midi AX.

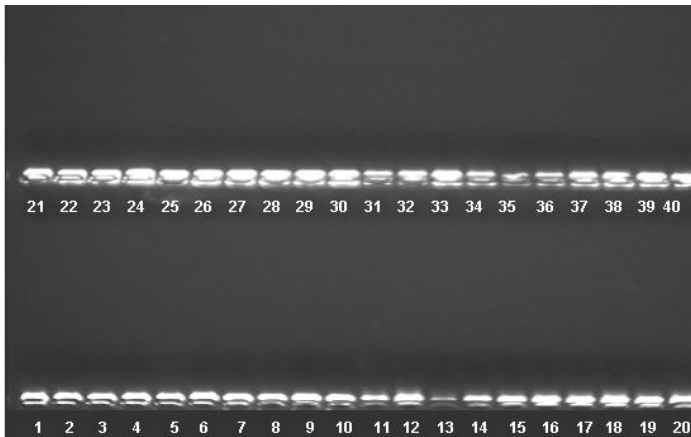
Odczynniki używane podczas izolacji DNA (np. EDTA, etanol) absorbują przy długości fali 230 nm. Czystość DNA pod względem zanieczyszczenia odczynnikami do izolacji była zróżnicowana, pomiędzy krwią oraz użytym zestawem do izolacji. Istotne różnice zaobserwowano pomiędzy izolatami z krwi świeżej i mrożonej izolowanymi kitem AX oraz izolatami z krwi świeżej.

Pewną część zanieczyszczeń izolatu DNA mogą stanowić drobinny komórkowe oraz nierozpuszczalne związki absorbujące przy długości fali A320. Czystość DNA pod względem zanieczyszczenia drobinami komórkowymi była zróżnicowana w badanych próbkach. Najmniej drobin komórkowych zaobserwowano w preparacie izolowanym z krwi świeżej zestawem QIAamp DNA Blood Mini Kit.

Analiza elektroforegramu

Wyizolowane DNA z krwi zostało poddane elektroforezie (ryc. 2). Materiał genetyczny z wszystkich prób został pomyślnie zobrazowany na elektroforegramie. Wszystkie próby były widoczne w stopniu korelującym z wynikami uzyskanymi podczas oceny spektrofotometrycznej (tab. 1). Prążki DNA zwizualizowane w promieniach UV pochodzące

z krwi świeżej i przechowywanej izolowanej dwoma zestawami do izolacji oceniono jako dobre i bardzo dobre. Na podstawie elektroforezy w uzyskanych izolatach nie stwierdzono degradacji DNA. Prążki były zwarte i jasne.



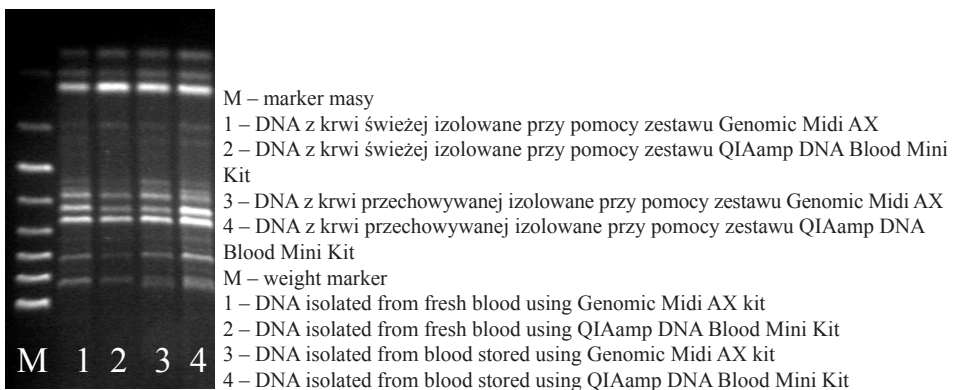
1–10 DNA z krwi świeżej izolowane przy pomocy zestawu Genomic Midi AX
 11–20 DNA z krwi świeżej izolowane przy pomocy zestawu QIAamp DNA Blood Mini Kit
 21–30 DNA z krwi przechowywanej izolowane przy pomocy zestawu Genomic Midi AX
 31–40 DNA z krwi przechowywanej izolowane przy pomocy zestawu QIAamp DNA Blood Mini Kit
 1–10 DNA isolated from fresh blood using Genomic Midi AX kit
 11–20 DNA isolated from fresh blood using QIAamp DNA Blood Mini Kit
 21–30 DNA isolated from blood stored using Genomic Midi AX kit
 31–40 DNA isolated from blood stored using QIAamp DNA Blood Mini Kit

Ryc. 2. Elektroforegram – DNA wyizolowanego z krwi

Fig. 2. Electropherogram – DNA isolated from blood

Przydatność izolatów

DNA wyizolowane kitem AX i Q z krwi świeżej i przechowywanej poddano reakcji RAPD-PCR. Elektroforegram (ryc. 3.) potwierdza skuteczność izolacji zarówno użytych zestawów odczynników, jak i rodzaju przechowywania tkanki.



Ryc. 3. Elektroforegram wzorów prążkowych DNA metodą RAPD-PCR

Fig. 3. Electropherogram fringe patterns of DNA by RAPD-PCR

WNIOSKI

Koncentracja DNA w izolatach

Seutin i in. izolowali DNA z krwi ptasiej przechowywanej w różnych warunkach [1991]. Krew była przechowywana ponad 3 lata w temperaturze -20°C , a do porównania użyto krwi świeżej. Nie znaleziono powiązania między ilością uzyskanego DNA a techniką przechowywania, jak też pomiędzy krwią świeżą i przechowywaną.

W badaniach wydajności izolacji DNA z różnych materiałów biologicznych różnymi metodami izolacji uzyskano zróżnicowane wyniki. Wyniki zaprezentowane w pracy stanowią potwierdzenie tych, które zostały uzyskane przez inne zespoły badawcze, również porównujące różne zestawy do izolacji DNA z krwi świeżej i mrożonej [Kozioł i in. 1998, Ołdak i in. 2001]. W przypadku izolacji DNA z krwi ptasiej niezbędne jest wprowadzenie modyfikacji mającej na celu rozbicie erytrocytów posiadających jądro komórkowe. Brak rozbicia powoduje zatykanie kolumnienek podczas wirowania.

Najwyższe stężenie DNA z krwi przechowywanej przez miesiąc otrzymano, stosując metodę solną i fenolową. Podobne efekty uzyskano, wykorzystując metodę Sherlock DNA. Za pomocą metody Qia DNeasy (Qiagen) otrzymano średnią ilość DNA wynoszącą 90 ng z krwi przechowywanej przez miesiąc. Z krwi przechowywanej przez rok dzięki tej metodzie otrzymano średnią ilość DNA wynoszącą 11,25 ng [Prośniak i in. 2006].

Ocena czystości preparatów DNA

Większość danych pochodzących z piśmiennictwa prezentuje rutynowo dwa parametry dotyczące izolatów DNA, a mianowicie jego stężenie oraz zanieczyszczenie białkami. Bardzo ważnym parametrem, często pomijanym w doniesieniach naukowych, jest zanieczyszczenie próbek DNA odczynnikami do izolacji. Do odczynników tych należą m.in. EDTA i etanol, a główne pasmo absorbancji dla tych substancji wynosi 230 nm. Najczęściej kolejnym etapem analiz genetycznych są badania oparte na PCR. Wpływ na wydajność metody amplifikacji ma obecność w próbce inhibitorów reakcji PCR. Inhibitory mogą być obecne w oryginalnej próbce, takiej jak krew czy tkanka, lub mogą zostać wprowadzone do próby podczas pobierania materiału biologicznego (EDTA) bądź procesu izolacji (etanol). Inhibitory można usunąć podczas procedury oczyszczania DNA. Inhibitory mogą zmniejszać dostępność kofaktorów (np. Mg^{+2}) lub zakłócać działanie polimerazy DNA, w wyniku czego PCR jest hamowany, oraz obniżać wydajność albo nawet uniemożliwiać działanie enzymów restrykcyjnych [Słowski 2008].

Jądrowe DNA organizmów eukariotycznych jest związane z białkami histonowymi i niehistonowymi. Białka te charakteryzują się tym, że zawierają domenę specyficzną rozpoznającą daną sekwencję lub wiążącą się niespecyficznie, np. białka pistonowe. Niedostateczne doczyszczanie preparatu DNA może spowodować inhibicję białkową.

Podobne parametry czystości DNA do zaprezentowanych w niniejszej pracy uzyskały inne zespoły badawcze dla A260/A280 wartość od 1,8 do 2,0 i A260/A230 wartość 1,8–2,1 [Boujtitia 2008] oraz dla A260/A280 wartość 1,85 zaś dla A260/A230 wartość 2,2 [De Jimenez 1974].

PODSUMOWANIE

Stwierdzono statystycznie istotne różnice w stężeniu DNA izolowanego różnymi zestawami do izolacji w krwi świeżej i przechowywanej. Prażki uzyskane podczas elektroforezy korelowały z wynikami uzyskanymi podczas oceny spektrofotometrycznej. Lepszym zestawem do izolacji DNA z krwi kurzej był kit Genomic Midi AX, większe stężenie DNA uzyskano z krwi świeżej.

PIŚMIENNICTWO

- Boujtita N., 2008. Isolating Genomic DNA from Whole Blood. Thermo Fisher Scientific.
- De Jiménez E., González J., Dominguez J., Saloma E.S., 1974. Characterization of DNA from Differentiated Cells. *Eur. J. Biochem.* 45, 25–29.
- Khosravinia H., Narasimha Murthy H., Thertha Parasad D., Pirany N., 2007. Optimizing factors influencing DNA extraction from fresh whole avian blood. *Afr. J. Biotech.* 6, 481–486.
- Kozioł P., Czerski T., Mądry R., 1998. Porównanie trzech metod izolacji DNA z krwi przechowywanej w różnych warunkach. *Post. Med. Sąd. i Krym.* 4, 191–199.
- Małodobra M., Jonkisz A., Kowalczyk E., Lebioda A., Bartnik B., Świątek B., 2011. Efficiency of three commercial kits dedicated to DNA and RNA isolation from various clinical and forensic materials using the Janus automated Workstation. *Arch. Med. Sąd. Kryminol.* LXI, 51–57.
- Oldak T., Kruszewski M., Machaj E., Gajkowska A., Klos M., Kuczyńska-Sicińska J., Szczecina R., Kruszewska H., Pojda Z., 2001. Porównanie dwóch metod izolacji DNA z krwi pepowinowej. *Diagn. Lab.* 37, 191–195.
- Prośniak A., Gloc E., Berent J., Bąbol-Pokora K., Jacewicz R., Szram S., 2006. Ocena wydajności różnych metod izolacji DNA w plamach nasienia, krwi i śliny metoda QuantiBlot. *Arch. Med. Sąd. Kryminol.* LVI, 19–23.
- Schacterle G.R., Pollack R.L., 1973. A simplified method for the quantitative assay of small amounts of protein in biological material. *Anal. Biochem.* 51, 654–655.
- Scherzinger C., Bourke M., Ladd C., Lee H., 1997. DNA extraction from liquid blood using QIAamp. *J. Forensic Sci.* 42, 893–896.
- Seutin G., White B., Boag P., 1991. Preservation of avian blood and tissue samples for DNA analyses. *Can. J. Zool.* 69, 82–89.
- Słomski R., 2008. Analiza DNA. Przykłady analiz DNA. Teoria i praktyka. Wyd. UP, Poznań.
- Somma M., 2005. Badanie próbek żywności na obecność Genetycznie Zmodyfikowanych Organizmów. Izolacja i oczyszczanie DNA.

ESTIMATING THE EFFICIENCY OF DNA ISOLATION OF FRESH AND STORED OF AVIAN BLOOD, WITH TWO COMMERCIAL KITS

Abstract. Determination of the concentration and quality of DNA in the examined preparations is the first and fundamental act in studies of genetic material and is important in the further analysis. The result obtained has a decisive influence on the taking of further research. The aim of this study was to compare the quantity and quality (purity in terms of protein contamination, reagents for the isolation of cell particles and pollution) of DNA isolated from fresh chicken blood and kept using two commercial kits. The research material was the blood drawn from a vein v. basilica, fresh and stored for 24 months (frozen) at -20°C. Fresh and stored blood came from 10 individuals Polbar breed chickens. Stored

blood came from 10 other individuals of the same race. Isolation of DNA was carried out based on two different sets of genomic DNA isolation: Genomic Midi AX, A & A Biotechnology and QIAamp DNA Blood Mini Kit. A statistically significant difference in concentration of different sets of DNA isolated isolation in fresh and kept blood. A better kit for isolation of DNA from chicken blood was putty Genomic Midi AX, a higher concentration of DNA obtained from fresh blood.

Key words: blood, DNA, isolation

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 27.12.2012

Do cytowania – For citation: Gryzińska M., Stracheck A. Ocena wydajności izolacji DNA z krwi ptasiej świeżej i przechowywanej za pomocą dwóch komercyjnych zestawów. *Acta Sci. Pol. Biotechnol.*, 11 (4), 5–14.

SELECTED CELLULAR MECHANISMS DETERMINING *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* BIOFILM FORMATION UNDER STARVATION CONDITIONS

Kamila Myszka, Katarzyna Czaczyk

Poznań University of Life Sciences

Abstract. The bacterial colonization of solid material is a multi-step process. To define the rate of biofilm formation process on abiotic material under starvation, both morphology and extracellular polysaccharide (EPS) production must be accounted for. The aim of this study was to define the influence of limited nutrients availability in the medium on the morphological changes, the cell surface hydrophobicity and the synthesis of EPS by *Pseudomonas aeruginosa*. The relationship between the morphology of cells, the cell surface hydrophobicity, the EPS production and the *P. aeruginosa* biofilm development process on stainless steel surfaces (304L) was also examined. The cell surface area of *P. aeruginosa* was changed upon long-term starvation due to the decreasing the cell length. The change of *P. aeruginosa* morphology promoted the beginning stages of biofilm formation on the surface of stainless steel. The lower cell surface hydrophobicity indicated the extensive production of hydrophilic polysaccharides by examined bacteria under starvation. The synthesis of exopolysaccharide composed of glucose promoted more advanced stages of *P. aeruginosa* biofilm formation on the surface of stainless steel.

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, biofilm, morphology, hydrophobicity, exopolysaccharide (EPS), starvation

INTRODUCTION

Pseudomonas aeruginosa biofilm formed on abiotic surface is an important area of research because of wide range of possible affections and the resistance of the cells to disinfectants. Biofilm-growing *P. aeruginosa* cells have been described as etiological agents in urinary and pulmonary tract infections [Drenkard 2003]. *P. aeruginosa* biofilm expansion process on solid material is due to morphological changes of cells and to extracel-

© Copyright by Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Corresponding author – Adres do korespondencji: Kamila Myszka, Department of Biotechnology and Food Microbiology, Poznań University of Life Sciences, ul. Wojska Polskiego 48, 60-627 Poznań, Poland, e-mail: kmyszka@up.poznan.pl

lular polysaccharide (EPS) production [Wai et al. 1999, Jun et al. 2010]. Changes in the physical dimensions of cells improve initial adhesion process to solid materials [Dunne 2002]. Pores and crevices at the abiotic materials increase the cell surface area available for cell contact [Shau-Yan et al. 2009]. The production of extracellular polysaccharides is responsible for adhesion and cohesion interactions and plays significant function in maintaining structural integrity of mature biofilms [Sutherland 2001].

The problem of transmission *P. aeruginosa* cells from contaminated surfaces to human body has not been solved yet [Drenkard 2003]. Most researches have focused so far on the mechanisms determining the cells attachment process under optimal nutrients availability in the culture medium. These cultivation conditions do not correspond to natural environment, where *Pseudomonas* spp. is widespread. Limited nutrients availability in the medium changed the manner of biofilm formation process on solid materials [Sanin et al. 2003]. Moreover there is limited data available on *P. aeruginosa* properties involved in the attachment of cells to stainless steel surface which is commonly used in medicine. The study the mechanisms determining the biofilm formation process on stainless steel surface under starvation is crucial for eradication of the attached bacteria [Neu 1996, Simões et al. 2010].

The aim of this study was to define the influence of limited nutrients availability in the medium on the morphological changes, the cell surface hydrophobicity and the synthesis of extracellular polysaccharides by *P. aeruginosa*. The relationship between the morphology of cells, the cell surface hydrophobicity, the EPS production and the *P. aeruginosa* biofilm development process on stainless steel surfaces (304L) was also examined.

MATERIAL AND METHODS

Bacterial strains and growth conditions

P. aeruginosa ATCC 10145 was obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA). During the investigations, the microorganisms were passaged three times after every 48 h on the ABPG medium according to Schubert [1989]. The ABPG medium contained: 17.0 g/l of peptone from casein, 3.0 g/l of peptone from soymeal, 0.5 g/l of glucose, 5.0 g/l of sodium chloride, 10.0 g/l of L-arginine-monohydrochloride, 0.015 g/l of bromothymol blue, 0.02 g/l of cresol red, and 0.0038 g/l of brilliant green. From each passage 10 ml of inoculum of *P. aeruginosa* was added to 100 ml of the fresh medium. The cultures were incubated at 35°C on the ABPG medium with optimal and reduced by 90% (w/v) of optimal nutrients availability. The pH value of the culture medium at the beginning of incubation was 7. The incubation lasted for a total of 145 h.

Cell dimensions analysis

Microscopic preparations were carried out after 1, 24, 72, 120 and 144 h of each experiment. The simple stain method with crystal violet was used in the study. To avoid distortion of *P. aeruginosa* cells, heat fixing process was not conducted. Images were captured using a Carl-Zeiss Axiovert 200 inverted microscope with a digital camera Carl-Zeiss AxioCam attached to a computer. Photographs were prepared from randomly selected microscopic fields from each sample and examined using KS-300, Carl-Zeiss Soft. The

image analysis steps included: image acquisition, image segmentation and measurement of detected objects. Image acquisition enabled to create a 100 x 100 pixel numerical image; each pixel being coded into 250 gray levels. Image segmentation improved selection the objects of interest from the background. Measurements of the detected cells included: cell surface area, cells length, cells width and width to length ratio.

Cell surface hydrophobicity analysis

P. aeruginosa cell surface hydrophobicity was determined using the bacteria adhesion to hydrocarbons (BATH) test after 1, 24, 72, 120 and 144 h of each experiment [Jordan et al. 1994]. The bacteria were harvested by centrifugation at 3000 g for 10 min and resuspended in phosphate buffer (pH 7.2) to OD₅₄₀ approximately equal to 1 x 10⁷ CFU/ml. An aliquot of 3 ml of bacterial cells suspension were mixed with 1 ml of octane by vortexing. After separation phase (approximately 30 min), the OD₅₄₀ of the aqueous phase was determined. Results were expressed as a percentage of adherence to octane.

Isolation of bacterial extracellular polysaccharides

Isolation of EPS was based on the method employed by Forde and Fitzgerald [1999]. The cells were harvested by centrifugation at 3000 g for 20 min at the room temperature after 1, 24, 72, 120 and 144 of experiment. The cells were resuspended in 1.5 ml of 30% (w/v) NaOH. Samples were boiled for 15 min, centrifuged at 15000 g for 15 min and the supernatant were added dropwise to 60% (w/v) ethanol.

Quantification of exopolysaccharides

The total EPS (expressed as µg/CFU) was carried out using the acid hydrolysis method of Parkar et al. [2001]. The isolated EPS was collected by centrifugation (15 000 g 20 min) and was resuspended in 1 ml of sterile water. The samples were mixed with 7 ml of 77% (w/v) H₂SO₄ and cooled for 10 min in an ice-bath. 1 ml of 1% (w/v) of cold tryptophan was added and the samples were heated in a boiling bath for 20 min to increase hydrolysis. The acid hydrolysis of EPS produced a furan which condenses with the tryptophan and forms a colored product. This was evaluated after cooling the samples by measuring OD₅₀₀. Calibration curves were prepared against standard dextran (Mp. 40 000) solutions (Sigma, USA).

Determination of the EPS monomer composition

The method employed by Forde and Fitzgerald [1999] was used for the preparation of EPS for chromatographic analyses. 1 ml of the sample was hydrolysed with an equivalent volume of 10% (w/v) H₂SO₄ for 60 min at 100°C. After cooling, trichloroacetic acid (TCA) was added to a final concentration of 5% (w/v) to precipitate proteins, followed by centrifugation at 15000 g for 20 min at 4°C. The samples were passed through 0.22 µm Millex-GS filters (Milipore, USA). Determination of EPS components (glucose, fructose, galactose, arabinose) was carried out using HPLC technique, on MERCK-HITACHI system with autosampler (model L-7490), pump (model L-7100) and refractive index detector (model L-7490). Analyses were performed isocratically at a flow rate of 0.6 ml/min (0.005M H₂SO₄), at 35°C, on column Aminex HPX-87H, 300 x 7.8 mm (Bio-Rad, USA). Standards were used to identify peaks in chromatograms. Peak areas were used for computer integration (Chromatography Data Station Software, MERCK-HITACHI)

operated in the mode of external standard. Standard calibration solutions for examined sugars were prepared within the range 0.1–0.01 mg/ml.

Stainless steel surface preparation

Stainless steel plates (type 304L) sized 1 cm x 6.5 cm x 1mm was treated with 50% solution of HNO₃ for 10 min at 70°C. After soaking under distilled water the plates were put into glass containers and sterilized at 121°C for 15 min [Parkar et al. 2001].

Bacterial adhesion analysis

P. aeruginosa adhesion analysis was started after 144 h of experiments. The stainless steel plates were put into *P. aeruginosa* cultures. After completed 1 h the plates were removed from the glass containers and washed with PBS solutions (pH 7.2) in order to remove unattached cells from the surfaces. The plates were stained with 0.01% solution of acridine orange (2 min at room temperature). For observation of bacteria adhering to the stainless steel surface a inverted microscope was used (Carl-Zeiss, Axiovert 200). To evaluate the level of *P. aeruginosa* adhesion to the surface of stainless steel the method proposed by Le Thi et al. [2001] was used. This method is based on the estimation of randomly selected 50 visual fields according to a 9-degrees scale:

1st degree: from 0 to 5 bacteria in visual field.

2nd degree: from 5 to 50 bacteria in visual field.

3rd degree: only single bacteria (above 50 bacteria cells in visual field); no microcolonies.

4th degree: single bacteria cells + small microcolonies.

5th degree: large but not confluent microcolonies + single bacteria cells.

6th degree: confluent microcolonies + single bacteria cells.

7th degree: ¼ visual field covered by the biofilm.

8th degree: ½ visual field covered by the biofilm.

9th degree: visual field totally covered by the biofilm.

The classification procedure excluded bacteria situated on the edge of each visual field.

Statistical analysis

Presented results are the average of three independent experiments. Effects of different nutrients availability in the medium on the morphological changes, cell surface hydrophobicity and the synthesis of extracellular polysaccharides by *P. aeruginosa* were analyzed using one-way ANOVA with *post-hoc* comparison (Tukey's test; program Statistica version 3.0).

RESULTS AND DISCUSSION

The bacteria adhesion to solid material is a multi-step process. To predict the rate of biofilm development process on abiotic surfaces upon starvation conditions, both morphology and EPS synthesis by bacteria must be accounted for. In the study we aimed to define the influence of starvation conditions on the morphological changes of *P. aeruginosa* cells. According to Shau-Yan et al. [2009], changing of physical dimension of cells

is favored by nutrient-deprivation. However, in the literature very little information is available on this starvation-induced mechanism.

P. aeruginosa cell dimensions under different nutrients availability in the medium is summarized in Table 1. Starvation conditions decreased the cell surface area of *P. aeruginosa*. From 24 h of cultivation the cell surface area significantly decreased from 0.52 to 0.29 μm^2 . The effect of change in *P. aeruginosa* surface area upon starvation depended on shortening of the cell length from 1.36 to 0.80 μm . The swollen cells were observed upon starvation conditions. In contrast, favorable conditions induced a non-detectable or a small change in *P. aeruginosa* morphology. During the cultivation process, mean values of cell surface area, cell width and cells length equaled: 0.54 μm^2 , 0.60 μm and 1.24 μm respectively. Haznedaroglu et al. [2008] noticed similar effects during examination of *Escherichia coli* morphology upon starvation. According to this study, altering of *E. coli* surface area was effected by the decreasing value of the cell length [Haznedaroglu et al. 2008].

Table 1. Evaluation of the morphology of *P. aeruginosa* growing on the medium with different nutrients availability

Tabela 1. Ocena właściwości morfologicznych *P. aeruginosa* hodowanych na podłożach o różnej dostępności składników odżywczych

Time of incubation [h] Czas inkubacji	Nutrients availability in the culture medium Dostępność składników odżywczych w podłożu hodowlanym							
	optimal optymalna				reduced zredukowana			
	Observed and calculated average dimensions of cells Obserwowane i obliczone wartości średnie wymiarów komórek							
	Area [μm^2] Powierzchnia	Width [μm] Szerokość	Length [μm] Długość	Width to length ratio stosunek szerokości do długości	Area [μm^2] Powierzchnia	Width [μm] Szerokość	Length [μm] Długość	Width to length ratio stosunek szerokości do długości
1	0.53 ^a ±0.01	0.53 ^a ±0.06	1.32 ^a ±0.02	0.40 ^a ±0.06	0.52 ^a ±0.01	0.52 ^a ±0.07	1.36 ^a ±0.03	0.38 ^a ±0.07
24	0.50 ^b ±0.01	0.58 ^a ±0.07	1.18 ^b ±0.02	0.49 ^b ±0.02	0.29 ^b ±0.07	0.51 ^a ±0.05	0.80 ^b ±0.03	0.64 ^b ±0.01
72	0.60 ^c ±0.02	0.63 ^a ±0.05	1.30 ^a ±0.02	0.48 ^b ±0.08	0.42 ^c ±0.01	0.63 ^a ±0.06	0.94 ^c ±0.01	0.68 ^b ±0.09
120	0.56 ^d ±0.01	0.63 ^a ±0.05	1.23 ^c ±0.01	0.51 ^b ±0.08	0.38 ^d ±0.01	0.62 ^a ±0.05	0.89 ^d ±0.01	0.70 ^b ±0.09
144	0.52 ^{ab} ±0.01	0.61 ^a ±0.05	1.19 ^b ±0.02	0.51 ^b ±0.08	0.38 ^d ±0.01	0.61 ^a ±0.06	0.88 ^d ±0.01	0.70 ^b ±0.01

Average values ± standard deviations

Values followed by different letters in columns differ significantly at the $P < 0.05$ level

Wartości średnie ± odchylenie standardowe

Wartości oznaczone różnymi literami w poszczególnych kolumnach istotnie różnią się na poziomie $P < 0,05$

Under starvation conditions the physiological activity of the planktonic microorganisms relates mainly to changes in their extracellular molecules production [Siegele, Kolter 1992]. In this work, hydrophobicity analysis of *P. aeruginosa* cells enabled the preliminary estimation of the cell surface properties that reflected extracellular compounds biosynthesis. Table 2 presents the influence of nutrients availability in the medium on the surface hydrophobicity of *P. aeruginosa* cells. The hydrophobicity of examined bacteria incubated upon stress conditions equaled between 54 and 42%. In 144 h of cultivation the hydrophobicity of *P. aeruginosa* cells decreased to the value of 32%. This might be an effect of extensive production of hydrophilic molecules by examined bacteria upon starvation. Under nutritionally favorable conditions *P. aeruginosa* cells were more hydrophobic with the percentage of cells adherence to octane phase higher than 45%.

Table 2. Surface hydrophobicity of *P. aeruginosa* cells determined by adherence to hydrocarbons (BATH)

Tabela 2. Hydrofobowość powierzchni komórek *P. aeruginosa* określona jako powinowactwo z węglowodorami (BATH)

Time of incubation [h] Czas inkubacji	Nutrient availability in the culture medium Dostępność składników odżywczych w podłożu hodowlanym	
	optimal optymalna	reduced zredukowana
1	48.2 ^a (±4.2)	54.0 ^a (±5.23)
24	45.57 ^a (±6.14)	56.23 ^a (±5.12)
72	52.14 ^b (±6.27)	45.97 ^a (±6.25)
120	45.7 ^a (±4.09)	42.49 ^a (±5.3)
144	52.52 ^b (±4.03)	32.06 ^b (±3.49)

In our study the relationship between the surface hydrophobicity value and the exopolysaccharides production by *P. aeruginosa* cells was also investigated. The EPS production capacity of examined bacteria at different nutrients availability in the medium is presented in Table 3. In our work, EPS synthesis was affected by the increasing cultivation period. At 120 h of incubation the EPS production was significantly increased from 0.47 to 18 µg/10⁹CFU. From this point of the experiment the EPS secretion by *P. aeruginosa* cells remained relatively constant. Upon favorable conditions the highest EPS synthesis (17.62 µg/ 10⁹CFU) was noticed in 72 h of the process. After 72 h the EPS synthesis was significantly decreased to the value of 1.53 µg/10⁹CFU in 120 h and 0.47 µg/10⁹CFU in 144 h. Also Kiliç and Dönmez [2008] observed that long-term starvation promoted higher productivity of EPS by bacteria. The maximum production of extracellular polysaccharides by marine bacteria was observed after incubation of 96 h.

In this work, monosaccharide compositions of EPS synthesis by *P. aeruginosa* upon starvation were also investigated. In the literature the qualitative data on the composition of EPS produced by *P. aeruginosa* under starvation is lacking. Table 3 presents the influence of nutrients availability in the medium on the monosaccharide composition of EPS produced by *P. aeruginosa*. Our results indicated that glucose dominated in the EPS material produced by examined bacteria under starvation. From 120 h of cultivation process, the content of glucose in EPS material increased to the value of 41%. At 144 h of

the experiment, only glucose was detected in the EPS material. Moreover the percentage of fructose, galactose and arabinose in extracellular materials was not higher than 4%. Under favorable conditions, *P. aeruginosa* produced the EPS composed of glucose, fructose, galactose and arabinose. The content of sugars in the EPS material equaled between 3 and 7%. At 144 h of cultivation upon nutrient-rich conditions, the content of glucose in the EPS materials increased to the level of 26%. Our results differ from those performing by Hung et al. [2005]. According to this data galactose, mannose and arabinose were the main compositions of EPS produced by *Pseudomonas fluorescens* Biovar II. The content of glucose in EPS material synthesized by examined bacteria was not higher than 5% [Hung et al. 2005].

Table 3. EPS biosynthesis by *P. aeruginosa* growing on the medium with different nutrients availability

Tabela 3. Biosynteza EPS przez komórki *P. aeruginosa* hodowanych na podłożach o różnej dostępności składników odżywczych

Time of incubation [h] Czas inkubacji	Nutrient availability in the culture medium Dostępność składników odżywczych w podłożu hodowlanym	
	optimal optymalna	reduced zredukowana
	1	13.69 ^a (±3.2)
24	10.17 ^a (±2.53)	1.48 ^b (±0.05)
72	17.62 ^a (±5.23)	5.07 ^c (±0.01)
120	1.53 ^b (±0.23)	18.36 ^d (±2.34)
144	0.47 ^b (±0.02)	18.5 ^d (±0.5)

Average values ± standard deviations

Values followed by different letters in columns differ significantly at the P < 0.05 level

Wartości średnie ± odchylenie standardowe

Wartości oznaczone różnymi literami w poszczególnych kolumnach istotnie różnią się na poziomie P < 0,05

In the work adhesion analysis started when *P. aeruginosa* change their morphology and produced the high amount of EPS composed of glucose under starvation conditions. Approximately 10^7 – 10^8 CFU/ml *P. aeruginosa* cells were present in the culture medium during the experiments. In this study, under starvation conditions the adhesion of *P. aeruginosa* to stainless steel surface was more extensive. Starvation conditions induced more advanced stages of examined bacteria biofilm formation process on the surface of stainless steel (6th and 8th adhesion degree). *P. aeruginosa* grown under nutrient-rich conditions colonized the stainless steel material at the 2nd and 4th adhesion degree and no developed stages of adhesion (6th–9th degrees) was observed in this work.

CONCLUSION

Our data support the notion that cellular factors influencing *P. aeruginosa* adhesion process to abiotic materials should be examined under conditions in which aquatic bacteria are widespread. In response to starvation the surface area of *P. aeruginosa* cells was changed. Altering of physical dimension of bacteria was effected by the decreasing value

of the cell length. This feature is required for the beginning stages of biofilm formation process. The morphological changes of cells affect microbial penetration in porous surfaces. In this work extensive production of EPS molecules by *P. aeruginosa* upon starvation has greater importance in advanced stages of cells attachment process on examined materials. Further studies will investigate the molecular mechanisms determining *P. aeruginosa* biofilm formation under starvation conditions.

REFERENCES

- Allison D.A., Sutherland I.W., 1987. The role of exopolysaccharides in adhesion of freshwater bacteria. *J. Gen. Microbiol.*, 133, 1319–1327.
- Drenkard E., 2003. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbes Infect.*, 5, 1213–1219.
- Dunne W.M., 2002. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin. Microbiol. Rev.*, 15, 155–166.
- Forde A., Fitzgerald G.F., 1999. Analysis of exopolysaccharide (EPS) production mediated by the bacteriophage adsorption blocking plasmid, pCI658, isolated from *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* HO2. *Int. Dairy J.*, 9, 465–472.
- Haznedaroglu B.Z., Bolster C., Walker S.L., 2008. The role of starvation on *Escherichia coli* adhesion and transport in saturated porous. *Water Res.*, 42, 1547–1554.
- Hung C.C., Santschi P.H., Gillow J.B., 2005. Isolation and characterization of extracellular polysaccharides produced by *Pseudomonas fluorescens* Biovar II. *Carbohydr. Polym.*, 61, 141–147.
- Jordan F., Guicherd P., Urbain V., Manem J., Block J.C., 1994. Hydrophobicity of activated sludge flocs and laboratory-grown bacteria. *Water Sci. Technol.*, 30, 211–218.
- Jun W., Kim M.S., Cho B.-K., Miller P. D., Chao K., Chan D.E. 2010. Microbial biofilm detection on food contact surfaces by macro-scale fluorescence imaging. *J. Food. Eng.*, 99, 314–322.
- Kiliç N.K., Dönmez G., 2008. Environmental conditions affecting exopolysaccharide production by *Pseudomonas aeruginosa*, *Micrococcus* sp. and *Ochrobacterium* sp. *J. Hazard. Mater.*, 154, 1019–1024.
- Le Thi T.T., Prigent-Combaret C., Dorel C., Lejeune P., 2001. First stages of biofilm formation: characterization and quantification of bacterial functions involved in colonization process. *Meth. Enzymol.*, 336, 152–159.
- Neu T.R., 1996. Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces. *Microbiol. Rev.*, 60, 151–166.
- Parkar S.G., Flint S.H., Palmer J.S., Brooks J.D., 2001. Factors influencing attachment of thermophilic bacilli to stainless steel. *J. Appl. Microbiol.*, 11, 675–685.
- Sanin S.L., Sanin F.D., Bryers J.D., 2003. Effect of starvation on the adhesive properties of xenobiotic degrading bacteria. *Process Biochem.*, 38, 909–914.
- Schubert R., 1989. The use of arginine brilliantgreen glucose peptone broth (ABGP medium) as a primary culture medium for *Pseudomonas aeruginosa*. *Zbl. Bakt. Mik. Hyg.*, 187, 166–168.
- Shau-Yan C., Wann-Neng J., Yi-Shin C., Hin-Chung W., 2009. Morphological changes of *Vibrio parahaemolyticus* under cold and starvation stresses. *Int. J. Food Microbiol.*, 129, 157–165.
- Siegele D.A., Kolter R., 1992. Life after log. *J. Bacteriol.*, 174, 345–348.
- Simões M., Simões L.C., Vieira M.J. 2010. A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT. Food Sci. Technol.*, 43, 573–583.
- Sutherland I.W., 2001. The biofilm matrix-an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol.*, 9, 222–227.
- Wai S.N., Mizunoe Y., Yoshida S., 1999. How *Vibrio cholerae* survive during starvation. *FEMS Microbiol. Lett.*, 180, 123–131.

WYBRANE MECHANIZMY KOMÓRKOWE WARUNKUJĄCE TWORZENIE SIĘ BIOFILMÓW *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* W WARUNKACH GŁODOWYCH

Streszczenie. Proces bakteryjnej kolonizacji powierzchni stałych jest zjawiskiem wieloetapowym. W celu określenia dynamiki tworzenia się biofilmów na materiałach abiotycznych w warunkach głodowych powinny być uwzględnione zarówno właściwości morfologiczne, jak i zdolność syntezy zewnątrzkomórkowych polisacharydów (EPS). W pracy oceniono wpływ warunków głodowych środowiska na zmiany morfologiczne, hydrofobowość powierzchni komórek oraz syntezę EPS przez *Pseudomonas aeruginosa*. Zbadano również zależność pomiędzy morfologią komórek, hydrofobowością powierzchni drobnoustrojów i biosyntezą EPS na proces tworzenia się biofilmu *P. aeruginosa* na powierzchni stali nierdzewnej (304L). Powierzchnia komórek *P. aeruginosa* zmieniała się w warunkach długotrwałego stresu głodowego w zależności od zmieniającej się długości komórek. Zmiany morfologiczne *P. aeruginosa* promowały początkowe etapy tworzenia się biofilmu na powierzchni stali nierdzewnej. W niniejszej pracy niskie wartości hydrofobowości komórek w warunkach głodowych korelowały ze wzmożoną syntezą hydrofilowych cząsteczek przez *P. aeruginosa*. Biosynteza egzopolisacharydów złożonych z cząsteczek glukozy promowała bardziej zaawansowane etapy tworzenia się biofilmu *P. aeruginosa* na powierzchni stali nierdzewnej.

Słowa kluczowe: *Pseudomonas aeruginosa*, biofilm, morfologia, hydrofobowość, egzopolisacharydy (EPS), warunki głodowe

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 27.12.2012

Do cytowania – For citation: Myszka K., Czaczyk K., 2012. Selected cellular mechanisms determining *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation under starvation conditions. Acta Sci. Pol. Biotechnol., 11(4), 15–24.

DROŹDŹE *YARROWIA LIPOLYTICA* I ICH UZDOLNIENIA DO SYNTEZY ENZYMÓW HYDROLITYCZNYCH

Joanna Niedbalska, Marek Szoltyśnik, Anna Dąbrowska,
Józefa Chrzanowska

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Streszczenie. Drożdże *Yarrowia lipolytica* to niekonwencjonalne mikroorganizmy wykazujące uzdolnienia do asymilacji związków organicznych jednoczesnej ekspresji enzymów zewnątrzkomórkowych. Głównymi kierunkami ich wykorzystania są procesy biokonwersji metabolitów wtórnych (głównie kwasu cytrynowego) i związków aromatycznych (γ -lakton), a także otrzymywanie komórek olejowych stosowanych w produkcji pasz. Cechą wyróżniającą te drożdżki jest zdolność do syntezy i wydzielania proteaz zewnątrzkomórkowych: serynowej (AEP) i aspartylowej (AXP) oraz lipaz (LIP1, LIP2 i LIP3) o wysokiej aktywności litycznej. Najważniejszym czynnikiem regulującym ekspresję tych enzymów jest pH środowiska. Istotna jest również faza wzrostu oraz rodzaj i dostępność w podłożu źródła węgla, azotu, a także siarki. Wyniki badań prowadzonych w ostatnich latach wskazują na szereg możliwości wykorzystania tych enzymów, a tani i łatwy sposób hodowli, również z produktów odpadowych (głównie przemysłu żywnościowego), decyduje o ich atrakcyjności i konkurencyjności w porównaniu z powszechnie wykorzystywanymi preparatami enzymatycznymi.

Słowa kluczowe: drożdże, *Yarrowia lipolytica*, proteazy, lipazy

CHARAKTERYSTYKA DROŹDŹY *YARROWIA LIPOLYTICA*

Gatunek *Yarrowia lipolytica* należy do grupy drożdży niekonwencjonalnych i wyróżnia się wyjątkowymi cechami fizjologicznymi obejmującymi zdolność do asymilacji związków organicznych i jednoczesnej ekspresji enzymów zewnątrzkomórkowych. Drożdże te zaliczają się do rodziny *Saccharomycetaceae* i podrodziny *Saccharomycetoideae*.

Praca powstała w ramach projektu badawczego przyznanego przez Narodowe Centrum Nauki, nr projektu: 2011/01/B/NZ9/04297.

© Copyright by Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Adres do korespondencji – Corresponding author: Marek Szoltyśnik, Katedra Technologii Surowców Zwierzęcych i Zarządzania Jakością, Wydział Nauk o Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, e-mail: marek.szoltyśnik@up.wroc.pl

Początkowo gatunek ten uważano za niedoskonałą formę *Candida lipolytica*, w 1970 r. został przypisany [Wickerham i in. 1970] do *Encomycopsis lipolytica*, a ostatecznie w latach 80. ubiegłego wieku drożdże te zaklasyfikowano jako *Yarrowia lipolytica* ze względu na unikalny kształt askospor i obecność koenzymu Q-9 [van der Walt, von Arx 1980].

Yarrowia lipolytica należą do grzybów dimorficznych i, w zależności od szczepu oraz warunków środowiskowych, mogą przyjmować formy komórek drożdżowych, strzępek i pseudostrzępek [Hurtado, Rachubinski 2002, Dominguez i in. 2000]. Większość komórek drożdży *Y. lipolytica* wyizolowanych w produktach naturalnych jest haploidalna, rzadziej diploidalna. W warunkach laboratoryjnych komórki diploidalne mają tendencję do utraty chromosomów w trakcie podziałów mitotycznych, w wyniku których wytwarzane są dwa typy haploidów: MatA i MatB pozbawione kaset wyciszających w genomie [Butler i in. 2004]. W określonych warunkach *Yarrowia lipolytica* są w stanie wytwarzać półksiężycowate spory [Barth, Gillardin 1996, Thevenieau i in. 2009]. Drożdże *Y. lipolytica* są bezwzględnie tlenowcami i nie są zdolne do wzrostu w temperaturze wyższej niż 34°C. Są one organizmami niepatogennymi [Nel i in. 2009]. Ich naturalnym środowiskiem występowania jest żywność, głównie produkty mleczarskie jak sery, jogurty i kefir, a także kielbasy, sałatki krewetkowe oraz sosy sojowe. Występują one również w innych ekosystemach [Guerzoni i in. 1993]. Zsekwencjonowanie genomu *Y. lipolytica* pozwoliło na lepsze zrozumienie zmian metabolicznych i morfologicznych prowadzących do zasiedlenia przez te drożdże środowisk bogatych w substraty białkowe lub hydrofobowe (alkany, lipidy) [Dujon i in. 2004, Barth, Gaillardin 1996]. *Yarrowia lipolytica* wykorzystują jako materiał budulcowy glukozę, alkohole, kwas octowy i substraty hydrofobowe, jak np. kwasy tłuszczowe lub alkany, natomiast słabo fermentują wielocukry [Dominguez i in. 2000]. Tempel i Jacobsen [2000] stwierdzili, że *Yarrowia lipolytica* nie asymilują laktozy ani galaktozy. Drożdże te charakteryzują się dużą specyficznością w stosunku do kwasów tłuszczowych, spośród których kwasy: C12:0, C14:0 oraz C16:0 są najefektywniej wykorzystywane jako źródło węgla, natomiast kwas C18:0 jest przyswajany w mniejszym stopniu i gromadzony w formie materiału zapasowego [Papanikolaou i in. 2002].

W ostatnim dziesięcioleciu zsekwencjonowano kompletny genom (20,5 Mb) haploidalnego szczepu E150 [Dujon i in. 2004]. Jest on rozdzielony na 6 chromosomów i zawiera 49% par zasad G+C. Zidentyfikowano również centromery i miejsca początku replikacji, które nie wykazują podobieństw między sobą ani w odniesieniu do analogicznych elementów genomu w *S. cerevisiae* [Vernis i in. 2001]. Szacuje się, że genom mieści 6,703 sekwencji kodujących, co stanowi 45,8% kodu, w przeciwieństwie do drożdży *S. cerevisiae*, których 70% genomu obejmuje sekwencje kodujące. Sekwencje powtórzone zawierają różne grupy subtelomerowego rDNA (w sekwencjonowanym szczepie wykryto 6 polimorficznych struktur), przynajmniej dwa retrotranspozony należące do rodziny Ty3, liniowy element Yili oraz element podobny do MULE (ang. *Mutator*-like transposable element) [Casaregola i in. 2002]. Około 13% genów zawiera jeden, dwa lub kilka intronów różnej wielkości [Bon i in. 2003]. Szczepy dzikie wykazują różnice w genomie takie jak wielkość chromosomów, liczbę powtórzeń rDNA oraz obecność retrotranspozonu Ylt1 lub jego brak. Genom obejmuje rodziny genów kodujące tRNA, składniki translacyjne, lipazy, enzymy zaangażowane w degradację substratów hydrofobowych oraz proteazy. Duża liczba genów tRNA (510) jest typowa dla komórek eukariotycznych i nie występuje u pozostałych przedstawicieli *Ascomycetes* [Marek i in. 2006]. Duplikacja genów występuje tu z taką samą częstotliwością jak w przypadku innych

drożdży. Zdolność *Y. lipolytica* do degradacji substratów hydrofobowych jest skorelowana ze zwiększoną w porównaniu z innymi drożdżami liczbą genów kodujących białka odpowiednich szlaków. Rodzina genów oksydazy acetylo-CoA zawiera geny POX2 i POX3, które kodują oksydazy acetylo-CoA specyficzne odpowiednio wobec długich i krótkich łańcuchów. Analogicznie rodzina genów lipaz: LIP2, LIP7 i LIP8 (GLR1254) koduje białka specyficzne wobec kwasów tłuszczowych, odpowiednio: C18, C6 i C10. Natomiast w rodzinie genów cytochromu P450 (GLR.3196) produkty genów ALK1 i ALK2 są odpowiedzialne za hydroksylację alkanów o długości łańcucha węglowego odpowiednio C10 i C16, natomiast geny ALK3, ALK5 i ALK7 kodują enzymy katalizujące reakcje hydroksylacji kwasu laurynowego [Thevenieau i in. 2009]. Poza genomem jądrowym w ostatnich latach zsekwencjonowano również genom mitochondrialny (47,9 kb) [Kerscher i in. 2001].

Obecnie głównymi kierunkami wykorzystania *Yarrowia lipolytica* są procesy biokonwersji metabolitów wtórnych (kwas cytrynowy) i związków aromatycznych (γ -laktone), wykorzystanie enzymów proteolitycznych i lipolitycznych oraz produkcja komórek olejowych (ang. Single Cell Oils (SCO) wykorzystywanych w produkcji pasz [Thevenieau i in. 2009].

Komórki *Y. lipolytica* mają zdolność do wykorzystania jako źródeł węgla n-alkanów i 1-alkenów, polimetylowanych alkanów oraz alkanów z przyłączonym chlorem, a także kwasów tłuszczowych i triglicerydów. Proces asymilacji hydrofobowych substratów jest złożony i zawiera wiele szlaków metabolicznych zachodzących w różnych kompartmentach komórki. Pierwszy etap asymilacji obejmuje emulsyfikację na powierzchni komórki i formowanie małych kropelek, które mogą być przeniesione do jej wnętrza. Emulsyfikatorem zewnątrzkomórkowym wytwarzanym przez *Yarrowia lipolytica* rosnące na podłożu zawierającym n-alkany jest liposan, 27 kDa glikoproteina zawierająca 88% węglowodanów i 12% białka [Amaral i in. 2006]. W przypadku triacylogliceroli proces asymilacji poprzedza ich hydroliza z udziałem lipaz ekspresjonowanych w komórkach gospodarza i wydzielanych do medium. Po przejściu do komórki n-alkany są metabolizowane przez system monooksygenazy cytochromu P-450 w reticulum endoplazmatycznym. Dodatkowo następują procesy utleniania prowadzące do powstania kwasów dikarboksylowych. Kwasy tłuszczowe ulegają aktywacji przez przyłączenie CoA, a następnie β -oksydacji lub bezpośredniemu włączeniu w struktury lipidowe komórki. W zależności od środowiska komórki drożdżowe mogą gromadzić wolne kwasy tłuszczowe w ciałkach tłuszczowych [Fickers i in. 2005].

Yarrowia lipolytica nie mają zdolności syntezy etanolu, ale są w stanie wykorzystywać go jako źródło węgla, gdy stanowi on do 3% składu pożywki. Wyższe stężenia są toksyczne dla komórek *Y. lipolytica*. W komórkach tych drożdży obserwuje się kilka różnych dehydrogenaz alkoholowych zależnych od NAD^{2+} i NADP^{2+} . Przypuszczalnie istnieją dwie dehydrogenazy alkoholowe zależne od NAD^{2+} różniące się specyficznością. Obecność glukozy w pożywce represjonuje syntezę obu enzymów, natomiast etanol indukuje ich ekspresję. Z kolei produkcja trzech dehydrogenaz alkoholowych zależnych od NADP^{2+} o różnej specyficzności substratowej zależy od fazy wzrostu komórek oraz rodzaju źródła węgla w podłożu [Barth, Gaillardin 1996].

Większość szczepów *Y. lipolytica* wzrasta bardzo wydajnie na pożywce zawierającej octan jako jedyne źródło węgla. Dobrze tolerowane jest stężenie do 0,4% octanu sodu, wyższe stężenia zmniejszają szybkość wzrostu, natomiast powyżej 1% zupełnie

go hamują. Cykl Krebsa, który jest niezbędny w procesie utylizacji alkanów, kwasów tłuszczowych, alkoholi i octanu, jest regulowany przez gen GPR1. Mutacje w tym genie uwrażliwiają komórki na niskie stężenia octanu lub etanolu, nawet przy jednoczesnej obecności glukozy [Barth, Galiardin 1997].

Drożdże *Y. lipolytica* cechuje zdolność do produkcji cennych związków w procesach biokonwersji substratów hydrofobowych. Stosowanie w podłożu hodowlanym różnych składników odżywczych i limitujących wzrost drożdży powoduje wydzielanie do medium intermediatów cyklu kwasów trikarboksylowych. Niedobór źródeł azotu w pożywce prowadzi do wydzielania kwasów cytrynowego i izocytrynowego. Szczepy dzikie produkują jednocześnie oba wymienione kwasy, jednak ich wzajemny stosunek zależy od składników odżywczych, np. w hodowli z użyciem glukozy, glicerolu lub etanolu udział cytrynianu osiąga 90%, natomiast zastosowanie hydrofobowych substratów zmniejsza ją do 60%. Wydajność procesu można zwiększyć na kilka sposobów: dodanie do pożywki kwasu octowego (wzrost wydajności do 80%), zastosowanie wyselekcjonowanych szczepów charakteryzujących się wysoką zdolnością produkcji cytrynianu, lub stosowanie mutantów genetycznych nadespresjonujących liazę izocytrynianu (wzrost wydajności do 95%) [Thevenieau i in. 2009]. Prowadzono również badania nad koprodukcją cytrynianu i lipazy zewnątrzkomórkowej [Kamazolova i in. 2005]. Hodowla *Yarrowia lipolytica* na podłożu z limitowaną tiaminą, która jest niezbędna do aktywacji dehydrogenazy 2-ketoglutazarowej, prowadzi do produkcji kwasu 2-ketoglutazarowego. Maksymalna szybkość produkcji tego związku osiąga wartość 1,4 g⁻¹·h⁻¹ [Chernyavskaya i in. 2000]. Ponadto wyselekcjonowane szczepy haploidalne z mutacjami w szlaku biosyntezy metioniny wydzielają duże ilości kwasów organicznych w trakcie wzrostu na glukozie [Barth, Gaillardin 1997].

ENZYMY PROTEOLITYCZNE

Proteazy zewnątrzkomórkowe

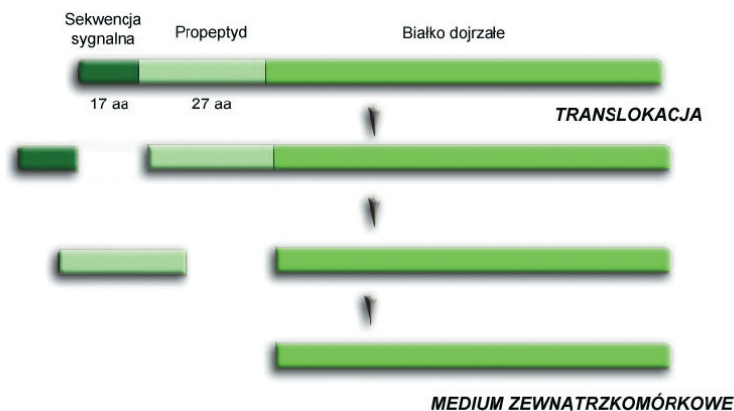
Drożdże *Y. lipolytica* wyróżniają się wysoką aktywnością proteolityczną. Organizmy te są zdolne do syntezy i wydzielania proteaz zewnątrzkomórkowych: serynowej i aspartylowej. Ekspresja obu enzymów jest indukowana podobnymi warunkami w wykładniczej fazie wzrostu i zależy od źródła węgla, azotu oraz siarki dostępnego w podłożu [Ogrydziak 1977]. Jednakże głównym czynnikiem regulującym ekspresję genów kodujących proteazę kwaśną (gen AXP1) i zasadową (gen XPR2) jest pH środowiska zewnętrznego. Wykazano, że regulacja ta ma miejsce już na poziomie mRNA. Kwaśna proteinaza jest syntetyzowana w pH o wartości niższej niż 5,5; natomiast ekspresję proteazy zasadowej indukuje się, prowadząc hodowlę w pH powyżej 7,5 [Glover i in. 1997]. Geny obu białek nie mają wspólnych elementów prócz sekwencji potencjalnie wiążącej białko YIRim101p, które jest składową szlaku przekazywania sygnału pH [Gonzalez-Lopez i in. 2002]. Mechanizmy odpowiedzi na pH środowiska są, od lat 60. ubiegłego wieku [Dorn 1965], intensywnie analizowane w *Aspergillus nidulans* [Penalva, Arst 2002]. W pH alkalicznym kaskada sześciu genów Pal (grzyby strzępkowe) lub Rim (drożdże) aktywuje aktywator transkrypcyjny PacC/Rim101p. Białko to występuje w dwóch formach w zależności od pH środowiska zewnętrznego. W kwaśnym medium PacCp jest zlokalizowane w cytopla-

zmie komórki i przyjmuje formę długą, natomiast w pH alkalicznym białko to przechodzi do jądra komórkowego, a jego C-koniec ulega odcięciu, uwalniając aktywator transkrypcyjny [Espeso, Arest 2000]. Gen YIRim101, będący w 35% identyczny z genem białka PacC opisanego dla *Aspergillus nidulans*, koduje białko zbudowane z 585 aminokwasów, zawierające kanoniczną domenę typu palca cynkowego Cys₂His₂ zlokalizowaną w pobliżu N-końca [Penalva, Arst 2002]. Genom *Yarrowia lipolytica* zawiera kod dla białek homologicznych do pozostałych składników szlaku przekazywania sygnału pH w *Aspergillus nidulans*, prócz genu dla białka palC. Według modelu opracowanego dla *Aspergillus nidulans* szlak odpowiedzi na pH środowiska jest zorganizowany w dwóch kompleksach; jednym związanym z błoną komórkową kompleksu białek: Rim21p/PalH, Rim9p/PalI i Rim8p/PalF oraz z drugim związanym z błoną endosomalną, w skład którego wchodzi: Rim20p/PalA, Snf7/Vps 32p oraz Rim13p/PalB [Lambert i in. 1997, Gonzalez-Lopez i in. 2002]. W komórkach *Yarrowia lipolytica* szlak Rim/Pal w pH zasadowym odpowiada bezpośrednio za aktywację ekspresji zewnątrzkomórkowej proteazy serynowej, natomiast w kwaśnym jest pośrednio odpowiedzialny za ekspresję proteazy aspartylowej [Gonzalez-Lopez i in. 2002, Blanchin-Roland i in. 2008].

Alkaliczna proteaza produkowana przez *Yarrowia lipolytica* jest jednym z lepiej poznanych enzymów wyizolowanych z tego gatunku drożdży i wydzielanym w największej ilości (1–2 g/l). Białko to jest proteazą serynową i należy do rodziny subtylizyn. Jak dotąd, ustalono sekwencję genu XPR2 kodującego zasadową proteazę oraz poszczególne etapy dojrzewania i sekrecji tego białka. Gen XPR2 koduje 454 aminokwasowy (55 kDa) pre-proenzym. Począwszy od N-końca, białko to zawiera 22 aminokwasową sekwencję sygnałną, następnie odcinek dziewięciu dipeptydów X-Ala, X-Pro, które zostają odcięte przez dipeptydyloaminopeptydazę. W dalszej części cząsteczka białka obejmuje 124 aminokwasowy proregion, który zawiera jedno miejsce N-glikozylowane. Wzdłuż proregionu znajdują się dwa dipeptydy Lys-Arg, które są potencjalnymi substratami do cięcia dla dipeptydyloaminopeptydazy – keksyny kodowanej przez gen XPR6. Jednakże tylko drugi dipeptyd (Lys₁₅₆ Arg₁₅₇) ulega przecięciu, zwalniając dojrzałe białko [Beckerich i in. 1998; Matoba i in. 1988]. W obrębie proregionu znajduje się sekwencja podobna do inhibitora proteaz I9, który jest odpowiedzialny zarówno za hamowanie aktywności proteazowej, jak i za prawidłowe fałdowanie dojrzałej cząsteczki [Li i in. 1995, Kojima i in. 1997]. Dojrzałe białko jest wydzielane poza komórkę w pęcherzykach sekrecyjnych. Schemat procesu dojrzewania i budowę tego enzymu przedstawiono na rysunkach 1 i 2. Proteaza alkaliczna jest białkiem o masie cząsteczkowej ok. 30,559 kDa. Dojrzała proteaza składa się z 297 aminokwasów. Centrum aktywne tworzą reszty Asp200, His231 i Ser397, natomiast reszta Asn292 i Asn330 są potencjalnymi miejscami N-glikozylacji cząsteczki [Davidow i in. 1987, bazy danych: MEROPS i UniProtKB/Swiss-Prot].

Proteaza alkaliczna *Y. lipolytica* wykazuje aktywność kazeinolityczną oraz esterazową wobec syntetycznych substratów zawierających argininę, lizynę lub tyrozynę. Optymalnymi warunkami do jej aktywności kazeinolitycznej są pH 9 i temperatura 40°C, natomiast do aktywności esterazowej pH 8 oraz identyczna temperatura. Najlepszą stabilność enzym ten wykazywał w zakresie pH od 5 do 9 i w obecności jonów wapniowych. Proteazę inaktywuje diizopropylodifluorofosforamina (DFP), ale syntetyczne inhibitory tripsyny, na przykład tosyl L-metyloketonon (TLCK), nie zmieniają jej aktywności podobnie jak benzoesan p-chlorortęciowy (PCMB) – inhibitor proteaz sulfhydrylowych, inhibitory tripsyny, a także inhibitory proteaz serynowych pochodzenia mikrobiologicz-

nego. Sugeruje to, że musi się ona różnić od innych proteaz serynowych wyizolowanych z mikroorganizmów [Ogrydziak 1988].



Rys. 1. Proces dojrzewania alkalicznej proteazy (AEP)

Fig. 1. Maturation process of alkaline protease (AEP)



Rys. 2. Schemat budowy proteaz serynowej (AEP) (Merops)

Fig. 2. Structure of serine protease (AEP) (Merops)

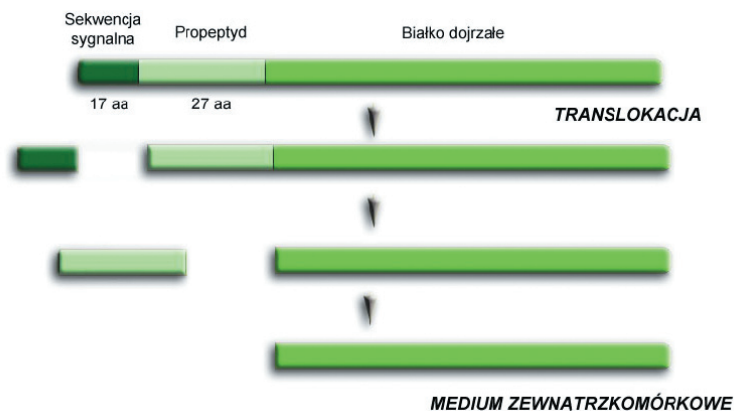
Oprócz serynowej proteazy alkalicznej *Yarrowia lipolytica* mają zdolność do syntezy proteazy zewnątrzkomórkowej w środowisku kwaśnym. Początkowo opisano trzy proteazy kwaśne będące glikoproteinami różniącymi się masą molekularną: 28, 32 i 36 kDa, pI, optimum pH oraz udziałem reszt cukrowych (odpowiednio 25,12 i 1,2%). Optimum pH i temperatury w przypadku aspartylowej kwaśnej proteiny zewnątrzkomórkowej wynoszą odpowiednio 3,5–4,0 i 35–45°C [Yamada, Ogrydziak 1983, Czajgucka 2006]. Późniejsze badania wskazywały, iż *Yarrowia lipolytica* syntetyzuje tylko jedną proteazę kwaśną, która może ulegać częściowej hydrolizie proteolitycznej [Young i in. 1996]. Ustalono sekwencję nukleotydową genu *axp* kodującego kwaśną proteazę. Jest ona produkowana jako pre-propeptyd składający się z 353 aminokwasów o masie cząsteczkowej 37 427 Da (rys. 3).



Rys. 3. Schemat budowy proteazy aspartylowej (AXP) (Merops)

Fig. 3. Structure of aspartyl protease (AXP) (Merops)

Począwszy od N-końca cząsteczka polipeptydu zawiera 17 aminokwasowy fragment hydrofobowy pełniący rolę sekwencji sygnałnej oraz 27 aminokwasowy propeptyd, w którym nie obserwuje się występowania potencjalnego miejsca N-glikozylacji. Dojrzałe białko zostaje uwolnione od propeptydu w momencie hydrolizy wiązania peptydowego między Phe₄₄ i Ala₄₅. Proteaza kwaśna jest wydzielana do medium w prostszy sposób niż proteaza alkaliczna AEP, a jej aktywacja zachodzi już poza komórką poprzez autokatalityczne odcięcie propeptydu w niskim pH środowiska (rys. 4).



Rys. 4. Proces dojrzewania proteazy aspartylowej (AXP)

Fig. 4. Maturation process of aspartyl protease (AXP)

Kwaśna proteaza należy do hydrolaz aspartylowych. Analiza porównawcza białek pozwoliła ustalić najbardziej prawdopodobne miejsca N-glikozylacji, są to reszty Asn88, Asn310 i Asn314. Z kolei reszty Cys93 i Cys100 oraz Cys303 i Cys343 mogą być połączone wiązaniem disulfidowym (baza danych MEROPS). Aktywność peptydazy kwaśnej jest hamowana przez pepstatynę oraz 1,2-epoksy-3-(p-nitrofenoksy)propan (EPNP), nie obserwuje się jednak utraty aktywności w obecności diazoacetylo-DL-norleucyny (DAN).

Szczep *Y. lipolytica* 37-1 ma zdolność do syntezy neutralnej proteazy zewnątrzkomórkowej. Białko to należy do proteaz serynowych zależnych od jonu metalu. Cząsteczka jest stabilizowana przez mostki disulfidowe, a optimum pH aktywności kazeinolitycznej tego enzymu wynosi 6 [Ogrydziak 1993].

Proteazy wewnątrzkomórkowe

Proteazy wewnątrzkomórkowe *Yarrowia lipolytica* są słabiej scharakteryzowane niż enzymy zewnątrzkomórkowe. Białka te pełnią wiele istotnych funkcji w szlakach metabolicznych komórek drożdżowych, jak np. w metabolizmie azotu, biorą udział w potranslacyjnych etapach dojrzewania białek, uczestniczą w odpowiedzi na stres wywołany brakiem substancji odżywczych, a także przyczyniają się do dymorfizmu *Yarrowia lipolytica*. Poziom ekspresji enzymów wewnątrzkomórkowych zależy od składu pożywki. Zatem ekspresja tych białek jest, jak w przypadku enzymów zewnątrzkomórkowych, regulowana dostępnością oraz rodzajem źródła węgla i azotu w medium (van den Tempel, Jacobsen 2000).

Wiele proteaz wewnątrzkomórkowych wykrytych w komórkach *Yarrowia lipolytica* jest charakterystyczna dla całej grupy mikroorganizmów, jaką stanowią drożdże. W bazie danych MEROPS skatalogowane zostały proteazy wyizolowane z *Y. lipolytica*. Między innymi wykryto obecność aminopeptydazy I (określanej mianem APEI, aminopeptydazy III oraz leucyloaminopeptydazy IV), która jest charakterystyczna dla drożdży piekarskich. Znajduje się ona w wakuolach, jest gliko- i fosfoproteina zbudowana z 469 aminokwasów, posiada aktywność metaloproteazy. Enzym ten ma budowę podjednostkową, a jego ligandami są jony cynku (każda podjednostka wiąże jeden jon). Aminopeptydaza ta preferuje reszty neutralne lub hydrofobowe (MEROPS, UniProtKB). Inną aminopeptydazą charakterystyczną dla drożdży jest aminopeptydaza Y (APE3), która jest glikoproteina wymagająca obecności jonu cynku jako kofaktora. Enzym ten występuje w lizosomach i wykazuje specyficzność wobec N-końcowej reszty lizyny. Kolejnym enzymem jest aminopeptydaza dipeptydylowa B (DPAPB), zbudowana z 818 aminokwasów, która jest glikoproteina zlokalizowaną w błonie komórkowej lizosomów i należy do aminopeptydaz serynowych. Innymi enzymami o aktywności aminopeptydazowej, wykrytymi w komórkach *Yarrowia lipolytica*, są dipeptydylopeptydaza III, aminopeptydaza aspartylowa (Dnpep) oraz dipeptydaza Xaa-Pro, które występują u wyższych eukariontów (baza danych MEROPS, UniProtKB).

Jedną z karboksypeptydaz wyizolowanych z komórek *Y. lipolytica* jest KEX1, którą pierwotnie odkryto w komórkach drożdży piekarskich. Jest to 707-aminokwasowe białko zlokalizowane w błonie komórkowej, które jest glikoproteina. Enzym ten preferencyjnie odcina C-końcową resztę argininy lub lizyny z łańcucha polipeptydowego. Kolejną karboksypeptydazą syntetyzowaną przez *Yarrowia lipolytica* jest karboksypeptydaza Y, która jest zlokalizowana w wakuolach i jest glikoproteina zaangażowaną w proces degradacji małych peptydów. Jest ona specyficzna wobec peptydów zawierających reszty alifatyczne lub hydrofobowe zlokalizowane w pozycji P1', a także wobec metioniny, leucyny albo fenyloalaniny w pozycji P1 wiązania estrowego [van den Tempel, Jacobsen 2000, baza danych MEROPS].

Gatunek *Y. lipolytica* charakteryzuje się wysokim poziomem produkcji wewnątrzkomórkowych enzymów proteolitycznych w czasie stacjonarnej fazy wzrostu na podłożu zawierającym pepton. Hernandez-Montanez i in. [2007] wykryli i oczyścili metodami chromatograficznymi trzy egzoproteazy: aminopeptydazę, karboksypeptydazę oraz diaminopeptydazę. Enzymy te były wrażliwe na inhibitory proteaz serynowych. Masy cząsteczkowe tych białek były zbliżone i wynosiły około 97 kDa. Optimum działania enzymy te wykazywały w pH 7 i temperaturze 37°C. Aminopeptydaza wykazała wysokie powinowactwo z substratami zawierającymi lizynę na N-końcu (substratów syntetycznych Lys-pNA). Van den Tempel i Jacobsen [2000] stwierdzili, że aminopeptydazy z *Yarrowia lipolytica* charakteryzują się wyższym powinowactwem z degradacją substratów zawierających na N-końcu reszty Leu niż Val.

ENZYMY LIPOLITYCZNE

Drożdże *Yarrowia lipolytica* wykazują zdolności do wykorzystywania triacylogliceroli jako źródła węgla. Syntetyzują lipazy zewnątrzkomórkowe związane ze ścianą komórkową oraz wewnątrzkomórkowe [Yu i in. 2007]. Poznano i zsekwencjonowano trzy geny

kodujące lipazy [Pignede i in. 2000]. Produkcja lipaz, podobnie jak proteaz, jest zależna od warunków środowiska, a w szczególności od rodzaju substratu wykorzystywanego przez komórki jako źródło węgla i azotu. Badania wykazały, że produkcja zewnątrzkomórkowej lipazy jest stymulowana obecnością w podłożu długołańcuchowych kwasów tłuszczowych, triacylogliceroli i azotem organicznym w postaci peptonów lub mocznika. Zastosowanie oliwy z oliwek w podłożu hodowlanym skutkowało wzrostem aktywności lipolitycznej [Pereira-Mirelles i in. 1997, Gdula i in. 2002, Fickers i in. 2004]. Przy niskim stężeniu glukozy w podłożu produkcja lipaz jest mniejsza, natomiast w obecności glicerolu i soli amoniowych nie jest w ogóle obserwowana [Fickers i in. 2003].

Peters i Neslon jako pierwsi stwierdzili [1948], że *Y. lipolytica* są zdolne do ekspresji lipazy, której sekrecja jest hamowana w obecności glukozy. Opisano dwa enzymy związane ze ścianą komórkową [Kalle i in. 1976]. Synteza pierwszego z nich jest hamowana obecnością glukozy, natomiast indukowana przez monooleinian sorbitolu. Drugi z omawianych enzymów jest produkowany konstytutywnie. Ota i in. [1982] oczyszczili dwa enzymy o podobnych właściwościach i zbliżonych masach cząsteczkowych 39 kDa (lipaza I) i 44 kDa (lipaza II). Oczyszczone białka wymagały do działania kwasu oleinowego, a w reakcji hydrolizy oleju z oliwek optymalne pH wynosiło około 8, natomiast w przypadku hydrolizy tributyriny 7,5. Obydwa enzymy były stabilne przez 20 minut w 37°C oraz przez 22 godziny w 5°C w zakresie pH od 4,5 do 8 [Ota i in. 1982, Vakhlu, Kour 2006].

Uważa się, że gen LIP2 jest odpowiedzialny za prawie całą zewnątrzkomórkową aktywność lipolityczną. Proces dojrzewania i sekrecji tego enzymu jest bardzo podobny do opisanego wyżej dojrzewania zewnątrzkomórkowej proteazy serynowej. Koduje on 334-aminokwasowy propeptyd, który począwszy od N-końca zawiera 33-aminokwasową sekwencję sygnałną, a następnie czterokrotne powtórzenie dipeptydów X-Ala, lub X-Pro oraz krótki 12-aminokwasowy proregion, kończący się dipeptydem Lys-Arg. W procesie dojrzewania tej lipazy, podobnie jak w przypadku proteazy alkalicznej, uczestniczy endopeptydaza kodowana przez gen XPR6, która odcina proregion od dojrzałej cząsteczki białka. Lipaza LIP2 jest wydzielana jako zewnątrzkomórkowa, 301-aminokwasowa glikoproteina (38 kDa), wykazująca optimum aktywności w pH 7 i w temperaturze 37°C [Destain i in. 1997] (rys. 5). Lipaza ta, w przeciwieństwie do lipaz związanych ze ścianą, wymaga kwasu oleinowego jako aktywatora.



Rys. 5. Schemat budowy lipazy Lip 2 (Merops)

Fig. 5. Structure of lipase Lip 2 (Merops)

Kolejnymi genami kodującymi enzymy o aktywności lipolitycznej są: Lip1 i Lip3. Produktami ekspresji tych genów są białka zbudowane z 486 (lip1) i 498 (lip3) aminokwasów. Lip1 zawiera dwa potencjalne miejsca N-glikozylacji oraz jedno miejsce fosforylacji zależne od cAMP, zlokalizowane w pobliżu C-końca łańcucha polipeptydowego.

Uważa się, że białka te mogą należeć do lipaz wewnątrzkomórkowych ze względu na brak w ich łańcuchu polipeptydowym sekwencji sygnałnej. Lipazy te są podobne do lipaz grzybowych *C.cilindraceae* i *G.candidum* i należą do rodziny karboksyesteraz [Pignede i in. 2000].

W genomie *Yarrowia lipolytica* wykryto również inne geny kodujące lipazy: LipY7 i LipY8. Produkty ekspresji tych genów stanowią białka o długości łańcucha polipeptydowego: 366 aminokwasów i 371 aminokwasów. Wklonowanie obu genów do systemów bakteryjnych przez Song i in. [2006] pozwoliło na ekspresję i oczyszczenie tych lipaz. Obie lipazy są glikoproteinami. Optymalna temperatura w reakcji hydrolizy pochodnej p-nitrofenylowej kwasu laurynowego dla lipazy LipY7 wynosiła 40°C, natomiast dla lipazy LipY8 45°C w pH 8. Stabilność obu enzymów była podobna i wynosiła 75% w zakresie pH od 5 do 10 przez 3 godz. w temperaturze pokojowej oraz 85% po inkubacji w 65°C przez 3 godz. w pH 7. Enzymy te różnią się specyficznością substratową. Lipaza LipY7 wykazywała maksimum aktywności wobec p-nitrofenylowej pochodnej kwasu kapronowego, jednak jest zdolna do hydrolizy wiązań estrowych przy dłuższych kwasach tłuszczowych (C8-C12). Natomiast lipaza LipY8 wykazuje najwyższe powinowactwo z kwasem kaprynowym, a w dalszej kolejności z kwasem kaprylowym [Song i in. 2006]. W komórkach *Y. lipolytica* zidentyfikowano również systemy transportujące kwasy tłuszczowe, osobny dla kwasów o długości 12–14 atomów węgla i dla kwasów o 16–18 atomach węgla [Kohlwein, Paltauf 1983].

Aktywność hydrolityczna lipaz *Y. lipolytica* wobec triacylgliceroli ujawnia się jedynie na granicy faz olej-woda. Drożdże *Yarrowia lipolytica* gromadzą się na powierzchni granicy faz woda-olej ze względu na większą dostępność substratu [Shelley i in. 1987]. W przeciwieństwie do lipaz esterazy katalizują reakcje hydrolizy substratów rozpuszczonych w wodzie. Matthey i Adoga [1991] opisali niskocząsteczkową, termostabilną esterazę zewnątrzkomórkową o masie 10 kDa, która wykazywała specyficzność wobec substratów zlokalizowanych w sn 1 pozycji triacylogliceroli.

LITERATURA

- Amaral P.F.F., da Silva J.M., Lehocky M., Barros-Timmons A.M.V., Coelho M.A.Z., Marrucho I.M., Coutinho J.A.P., 2006. Production and characterization of a bioemulsifier from *Yarrowia lipolytica*. *Process Biochem.*, 41, 1894–1898.
- Barth G., Gaillardin C., 1996. The dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica* [in:] *Genetics, Biochemistry, and Molecular Biology of Non Conventional Yeasts* K. Wolf (ed.) Springer Verlag, Heidelberg, 313–388.
- Barth G., Galiardin C., 1997. Physiology and genetics of dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Microb. Rev.*, 19, 219–237.
- Beckerich J-M., Boisramé-Baudevin A. Gaillardin C., 1998. *Yarrowia lipolytica*: a model organism for protein secretion studies. *I. Microbiol.*, 1, 123–130.
- Blanchin-Roland S., Da Costa G., Gaillardin C., 2008. Ambient pH signalling in the yeast *Yarrowia lipolytica* involves YIRim23p/PalC, which interacts with Snf7p/Vps32p, but does not require the long C terminus of YIRim9p/PalI. *Microbiol.*, 154, 1668–1676.
- Bon E., Casaregola S., Blandin G., Llorente B., Neuveglise C., Munsterkotter M., Guldener U., Mewes H.W., Van Helden J., Dujon B., Gaillardin C., 2003. Molecular Evolution of Eukaryotic Genomes: Hemiascomycetous Yeast Spliceosomal Introns. *Nucl. Acids Res.*, 31, 1121–1135.

- Butler G., Kenny C., Fagan A., Kurischko C., Gaillardin C., Wolfe K.H., 2004. Evolution of the MAT locus and its Ho endonuclease in yeast species. PNAS, 101(6), 1632–1637.
- Casaregola S., Neuvéglise C., Bon E., Gaillardin C., 2002. Ylli, a family of LTR-less retrotransposons in the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica*. Mol. Biol. Evol., 19, 664–677.
- Chernyavskaya O.G., Shishkanova N.V., Ilchenko A.P., Finogenova T.V. 2000. Synthesis of alpha-ketoglutaric acid by *Yarrowia lipolytica* yeast grown on ethanol. Appl. Microbiol. Biotechnol., 53, 152–158
- Czajgucka A., Chrzanowska J., Juszczyk P., Szołtysik M., Połomska X., Wojtatowicz M., 2006. Wzrost drożdży w modelowym serze i ich wpływ na degradacji białek i tłuszczów. Acta Sci. Pol. Biotechnologia 5 (1–2), 95–103.
- Davidow L.S., O'Donnell M.M., Kaczmarek F.S., Pereira D.A., Dezeew J.R., Franke A.E., 1987. Cloning and sequencing of the alkaline extracellular protease gene of *Yarrowia lipolytica*. J. Bacteriol., 169, 4621–4629.
- Destain J., Roblain D., Thonart T. 1997. Improvement of lipase production from *Yarrowia lipolytica*. Biotechnol. Letters, 19, 105–107.
- Dominguez A., Ferminan E., Gaillardin C., 2000. *Yarrowia lipolytica*: an organism amenable to genetic manipulation as a model for analysing dimorphism in fungi [in:] Contributions to Microbiol. Immunol., 5, 151–162.
- Dorn G., 1965. Phosphatase mutants in *Aspergillus nidulans*. Science 150, 1183–1184.
- Dujon B., Sherman D., Fischer G., Durrens P., Casaregola S., Lafontaine I., de Montigny J., Marck C., Neuvéglise C., Talla E., Goffard N., Frangeul L., Aigle M., Anthouar V., Babour A., Barbe V., Barnay S., Blanchin S., Beckerich J-M., Beyne E., Bleykasten C., Boisrame A., Boyer J., Cattolico L., Confanioleri F., de Daruvar A., Despons L., Fabre E., Fairhead C., Ferry-Dumazet H., Groppi A., Hantraye F., Hennequin C., Jauniaux N., Joyet P., Kachouri R., Kerrest A., Koszul R., Lemaire P., Lesur I., Ma L., Muller H., Nicaud J-M., Nikolski M., Ozta S., Ozier-Kalogeropoulos O., Pellenz S., Potie S., Richard G-F., Strau M-L., Suleau A., Swennen D., Tekaia F., Wesolowski-Louvel M., Westhof E., Wirth B., Zeniou-Meyer M., Zivanovic I., Bolotin-Fukuhara M., Thierry A., Bouchier C., Caudron B., Scarpelli C., Gaillardin C., Weissenbach J., Wincker P., Souciet J-L., 2004. Genome evolution in yeasts. Nature, 430, 35–44.
- Espeso E.A., Arest H.N., 2000. On the mechanism by which alkaline pH prevents expression of an acid – expressed gene. Mol. Cell. Biol., 20, 3355–3363.
- Fickers P., Benetti P.-H., Wache Y., Marty A., Mauersberger S., Smit M.S., Nicaud J.-M., 2005. Hydrophobic substrate utilisation by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications. FEMS Yeast Res., 5, 527–543.
- Fickers P., Nicaud J.M. Gaillardin C., Destain J., Thonart P., 2004. Carbon and nitrogen sources modulate lipase production. J. Appl. Microbiol., 96, 742–749.
- Fickers P., Nicaud J.M., Destain J., Thonart P., 2003. Overproduction of lipase by *Yarrowia lipolytica* mutants. Appl Microbiol Biotechnol., 63, 136–142.
- Gdula A. Chrzanowska J., Szołtysik M., Kieźel X., Wojtatowicz M., 2002. Factors affecting hydrolytic enzyme production by *Yarrowia lipolytica* strains. Acta Sci. Pol. Biotechnol., 1(1–2), 81–88.
- Glover D.J., McEwen R.K., Thomas C.R., Young T.W., 1997. pH-regulated expression of the acid and alkaline extracellular proteases of *Yarrowia lipolytica*. Microbiol., 143, 3045–3054.
- Gonzalez-Lopez C.I., Szabi R., Blanchin-Roland S., Gaillardin C., 2002. Genetic control of extracellular protease synthesis in the yeast *Yarrowia lipolytica*. Genetics 160, 416–427.
- Guerzoni M.E., Lanciotti R., Maachetti R. 1993. Survey of the physiological properties of the most frequent Yeasts associated with commercial chilled foods. Int. J. Food Microbiol., 17, 329–341.
- Hernandez-Montanez Z., Araujo-Osorio J., Noriega-Reyes Y., Chavez-Camarillo G., Villa-Tanaca L., 2007. The intracellular proteolytic system of *Yarrowia lipolytica* and characterization of an aminopeptidase. FEMS Microbiol Lett., 268(2), 178–86.

- Hurtado C.A.R., Rachubinski R.A., 2002. Isolation and characterization of YIBEM1, a gene required for cell polarization and differentiation in dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica*. *Eucaryotic Cell*, 1(4), 526–537.
- Kalle G.P., Deshpande S.Y., Lashkari B.Z., 1976. Fermentative production of cheese-like flavour concentrate by *Candida lipolytica*. *J. Food Sci. Technol.*, 13, 124–128.
- Kamzolova S.V., Morgunov I.G., Auroch A., Perevnikov O.A., Shishkanova N.V., Stottmeister U., Finogenova T.V., 2005. Lipase secretion and citric acid production in *Yarrowia lipolytica* yeast grown on animal and vegetable fat. *Food. Technol. Biotechnol.*, 43, 113–122.
- Kerscher S., Durstewitz G., Casaregola S., Gaillardin C., Brandt U., 2001. The complete mitochondrial genome of *Yarrowia lipolytica*. *Comp Funct Genom.*, 2, 80–90.
- Kohlwein S.D., Paltauf F., 1983. Uptake of fatty acids by the yeasts, *Saccharomyces uvarum* and *Saccharomyces lipolytica*. *Biochim. Biophys. Acta* 792, 310–317.
- Kojima S., Minagawa T., Miura K., 1997. The propeptide of subtilisin BPN⁷ as a temporary inhibitor and effect of an amino acid replacement on its inhibitory activity. *FEBS Lett*, 411, 128–132.
- Lambert, M., Blanchin-Roland, S., Le Louedec, F., Lepingle, A., Gaillardin, C., 1997. Genetic analysis of regulatory mutants affecting synthesis of extracellular proteinases in the yeast *Yarrowia lipolytica*: identification of a RIM101/pacC homolog. *Mol. Cell. Biol.*, 17, 3966–3976
- Li Y., Hu Z., Jordan F., Inouye M., 1995. Functional analysis of the propeptide of subtilisin E as an intramolecular chaperone for protein folding. Refolding and inhibitory abilities of propeptide mutants. *J. Biol. Chem.*, 270, 25127–25132.
- Marck C., Kachouri-Lafond R., Lafontailne I., Westhof E., Dujon B., Grosjean H., 2006. The RNA polymerase III-dependent family of genes in hemiascomycetes: comparative RNomics, decoding strategies, transcription and evolutionary implications. *Nucleic Acids Res.*, 34, 1816–1835
- Mattey M., Adoga G., 1991. Low molecular thermostable enzymes. *Enzyme Microb. Technol.*; 13, 525–525.
- Matoba S., Fukayama J., Wing R., Ogrzydziak D.M., 1988. Intracellular precursors and secretion of alkaline extracellular protease of *Yarrowia lipolytica*. *Mol. Cell Biol.*, 8(11), 4904–4916.
- Nel S., Labuschagne M. Albertyn J., 2009. Advances in gene expression in non-conventional yeasts, *Yarrowia lipolytica* w Satyanarayana T., Kunze G. (eds.) *Yeast biotechnology: Diversity and applications*, Springer Science+Business Media B.V, 381–384.
- Ogrzydziak D.M., 1977. Genetics of extracellular protease production in *Saccharomycopsis lipolytica*. *Genetics*, 87, 621–632.
- Ogrzydziak D.M., 1988. Production of alkaline extracellular protease by *Yarrowia lipolytica*. *Crit. Rev. Biotechnol.* 8, 177–187.
- Ogrzydziak D.M., 1993. Yeast extracellular protease. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 13, 1–55.
- Ota Y., Gomi K., Kato S., Sugiura T., Minoda Y., 1982. Purification and some properties of cell-bound lipase from *Saccharomycopsis lipolytica*. *Agric. Biol. Chem.*, 46, 2885–2893.
- Papanikolaou S., Chevalot I., Komaitis M., Marc I., Aggelis G., 2002. Single cell oil production by *Yarrowia lipolytica* growing on an industrial derivative of animal fat in batch cultures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 58, 308–312.
- Penalva M.A., Arst H.N., 2002. Regulation of gene expression by ambient pH in filamentous fungi and yeasts. *Micrbiol. Mol. Biol. Rev.*, 66(3), 426–446.
- Pereira- Meirelles F.V., Rocha-Leao M.M.H., Sant'Anna G.L., 1997. A stable lipase from *Candida lipolytica*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 63, 73–85
- Pereira-Meirelles F.V., Rocha-Leao M.H.M., Sant'Anna Jr. G.L., 2000. Lipase location in *Yarrowia lipolytica* cells. *Biotechnol. Letters*, 22, 71–75.
- Peters, I.I., Nelson, F.E., 1948. Factors influencing the production of *Mycotorula lipolytica*. *J. Bacteriol.*, 55(5), 581–591.

- Pignede G., Wang H., Fudalej F., Gaillardini C., Seman M., Nicaud J-M., 2000. Characterisation of an extracellular lipase encoded by LIP2 in *Yarrowia lipolytica*. *J. Bacteriol.*, 182(10), 2802–2810.
- Shelley A.W., Deeth H.C., Mac Rae J.C., 1987. Review of methods of enumeration detection and isolation of lipolytic microorganisms with special reference to dairy applications. *J. Microbiol. Methods*, 6, 123–137.
- Song H-T., Jiang Z-B., Ma L-X., 2006. Expression and purification of two lipases from *Yarrowia lipolytica* AS2.1216. *Prot. Express. Pur.*, 47, 393–397.
- Thevenieau F., Nicaud J-M., Gaillardin C., 2009. Applications of the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica* w Satyanarayana T., Kunze G. (eds.) *Yeast biotechnology: Diversity and applications*. Springer Science+Buisness Media B.V., 598–613.
- Vakhlu J., Kour A., 2006. Yeast lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. *Electron J. Biotechnol.*, 9, 1–17.
- van den Tempel T., Jakobsen M., 2000. The technological characteristics of *Debaryomyces hansenii* and *Yarrowia lipolytica* and their potential as starter cultures for production of Danablu. *Int.Dairy J.*, 10, 263–270.
- Vernis L., Poljak L., Chasles M., Uchida K., Casarégola S., Käs E., Matsuoka M., Gaillardin C., Fournier P., 2001. Only centromeres can supply the partition function required for ARS function in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J. Mol. Biol.*, 305, 203–217.
- van der Walt J.P., von Arx, J.A., 1980. The yeast genus *Yarrowia* gen. nov. *Antonie van Leeuwenhoek*, 46(6), 517–521.
- Yamada T, Ogrydziak D.M. 1983. Extracellular acid proteases produced by *Saccharomycopsis lipolytica*. *J. Bacteriol.* 154(1), 23–31.
- Young T.W.A., Wadeson D.J., Glover R.V., Quincey M.J., Butlin M.J., Kamei E.A., 1996. The extracellular acid protease gene of *Yarrowia lipolytica*: sequence and pH-regulated transcription. *Microbiol.*, 142, 2913–2921.
- Yu M., Lange S., Richter S., Tan T., Schmid R.D., 2007. High-level expression of extracellular lipase Lip2 from *Yarrowia lipolytica* in *Pichia pastoris* and its purification and characterization. *Prot Express. Pur.*, 53, 255–263.
- <http://www.biocatalysts.com>
- <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/> Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB)
- <http://www.led.uni-stuttgart.de/>
- <http://www.novozymes.com>
- <http://www.novozymes.com>
- <http://www.reuters.com/article/pressRelease/idUS202431+05-Dec-2007+BW20071205>
- Rawlings, N.D., Barrett, A.J. & Bateman, A. (2010) MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res* 38, D227-D233.
- ExpASy Proteomics Server: ENZYME (Enzyme nomenclature database)

YARROWIA LIPOLYTICA YEAST AND THEIR ABILITY TO SYNTHESIZE HYDROLYTIC ENZYMES

Abstract: *Yarrowia lipolytica* are nonconventional microorganisms able to assimilate organic compounds and produce extracellular enzymes. The current trend of their use is bio-conversion of secondary metabolites (mainly citric acid) and aroma compounds (γ -lacton) and obtaining oleic cells used in fodder production. The microorganisms are characterized by high proteo- and lipolytic activity. They are able to synthesize and secrete extracellular proteases: serine (AEP) and aspartyl (AXP) and lipases (LIP1, LIP2 i LIP3). The expression of those enzymes is pH dependent and influenced also by the yeast growth phase and availability of carbon, nitrogen and sulfur sources. The recent years research points out many different possibilities of *Y. lipolytica* enzymes utilization. The easy way of their isolation combined with the use of food industry waste-products makes them an attractive and competitive product in comparison to commercially available enzymes.

Key words: yeast, *Yarrowia lipolytica*, proteases, lipases

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 27.12.2012

Do cytowania – For citation: J. Niedbalska, M. Szoltyś, A. Dąbrowska, J. Chrzanowska, 2012. Drożdże *Yarrowia lipolytica* i ich uzdolnienia do syntezy enzymów hydrolitycznych. Acta Sci. Pol. Biotechnol., 11 (4), 25–38.

SPIS TREŚCI CONTENTS

Magdalena Gryzińska, Aneta Strachecka

Ocena wydajności izolacji dna z krwi ptasiej świeżej i przechowywanej za pomocą dwóch komercyjnych zestawów	5
Estimating the efficiency of dna isolation of fresh and stored of avian blood, with two commercial kits	

Kamila Myszka, Katarzyna Czaczyk

Selected cellular mechanisms determining <i>Pseudomonas aeruginosa</i> biofilm formation under starvation conditions	15
Wybrane mechanizmy komórkowe warunkujące tworzenie się biofilmów <i>Pseudomonas aeruginosa</i> w warunkach głodowych	

Joanna Niedbalska, Marek Szoltysik, Anna Dąbrowska, Józefa Chrzanowska

Drożdże <i>Yarrowia lipolytica</i> i ich uzdolnienia do syntezy enzymów hydrolitycznych	25
<i>Yarrowia lipolytica</i> yeast and their ability to synthesize hydrolytic enzymes	

RECENZENCI – REVIEWERS

prof. dr hab. Edmund Cibis Uniwersytet Ekonomiczny, Wrocław	edmund.cibis@ue.wroc.pl
prof. dr hab. Jolanta Bryjak Politechnika Wrocławska	jolanta.bryjak@pwr.wroc.pl
prof. dr hab. Waldemar Rymowicz Uniwersytet Przyrodniczy, Wrocław	waldemar.rymowicz@up.wroc.pl
prof. dr hab. Ewa Sawicka-Sienkiewicz Uniwersytet Przyrodniczy, Wrocław	ewa.sawicka-sienkiewicz@up.wroc.pl
prof. dr hab. Włodzimierz Grajek Uniwersytet Przyrodniczy, Poznań	grajak@up.poznan.pl
dr hab. Anna Rodziewicz, prof. UP Uniwersytet Przyrodniczy, Wrocław	anna.rodziewicz@up.wroc.pl
dr hab. Sławomir Ciesielski Uniwersytet Warmińsko-Mazurski, Olsztyn	slavcm@uwm.edu.pl
dr hab. Wanda Peczyńska, prof. PW Politechnika Wrocławska	w.peczynska@pvd.pl
prof. dr hab. Jerzy Pietkiewicz Uniwersytet Ekonomiczny, Wrocław	jerzy.pietkiewicz@ue.wroc.pl
dr hab. Małgorzata Krzywonos Uniwersytet Ekonomiczny, Wrocław	malgorzata.krzywonos@ue.wroc.pl
dr hab. inż. Katarzyna Czaczyk, prof. nadzw. Uniwersytet Przyrodniczy, Poznań	kasiacz@up.poznan.pl
prof. dr hab. Antoni Polanowski Uniwersytet Przyrodniczy, Wrocław	antonipolanowski@gmail.com
prof. dr hab. Tadeusz Miśkiewicz Uniwersytet Ekonomiczny, Wrocław	tadeusz.miskiewicz@ue.wroc.pl
dr Anna Krasowska Uniwersytet Wrocławski	aniak@biotrans.uni.wroc.pl
dr Wojciech Łaba Uniwersytet Przyrodniczy, Wrocław	wojciech.laba@up.wroc.pl
dr Maciej Kuczkowski Uniwersytet Przyrodniczy, Wrocław	maciej.kuczkowski@up.wroc.pl
dr Adam Dobrowolski Uniwersytet Przyrodniczy, Wrocław	adam.dobrowolski@up.wroc.pl