

ACTA SCIENTIARUM POLONORUM

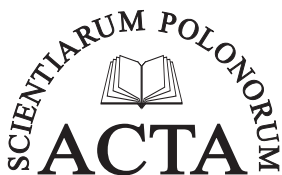
Czasopismo naukowe założone w 2001 roku przez polskie uczelnie rolnicze

Biotechnologia

Biotechnologia

Biotechnology

12(1) 2013



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: 3,4 Printing sheets: 3,25

Druk i oprawa:
PRINT sp. j. Z. Przyborowski, H. Ambroży
ul. Wykładowa 62, 51-520 Wrocław

Szanowni Państwo,

Przekazujemy Państwu kolejny zeszyt ACTA SCIENTIARUM 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 SCIENTIARUM POLONORUM Biotechnologia, a scientific journal published by all polish universities of environmental sciences. The series of Biotechnologia is released by publishing house of Wroclaw University of Environmental and Life Sciences since 2002.

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

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

Editorial Team

PROCES ZANIKANIA SUBSTANCJI ROPOPOCHODNYCH W SKAŻONEJ GLEBIE STYMULOWANY PREPARATEM FYRE-ZYME

Teresa Krzyśko-Łupicka¹, Tomasz Ciesielczuk²,
Marta Chwałowska

¹ Samodzielna Katedra Biotechnologii i Biologii Molekularnej,
Uniwersytet Opolski

² Samodzielna Katedra Ochrony Powierzchni Ziemi, Uniwersytet Opolski

Streszczenie. W warunkach laboratoryjnych oceniono przydatność preparatu o handlowej nazwie Fyre-Zyme do oczyszczania gleby z substancji ropopochodnych oraz jego wpływ na dynamikę zmian mikroflory glebowej. Testowany preparat, niemający w Polsce atestu, był najskuteczniejszy w ciągu 6 godzin od wprowadzenia do zanieczyszczonej gleby. Ubytek substancji ropopochodnych w tym czasie, w porównaniu z kontrolą, wynosił 29%, a po 60 dniach – 52%. Preparat Fyre-Zyme wspomagał usuwanie węglowodorów n-alifatycznych i WWA, natomiast nie wpływał na ubytek węglowodorów monoaromatycznych (BTEX). W obecności preparatu, w 60 dniu procesu zaobserwowano zmiany liczebności mikroorganizmów glebowych – obniżenie liczby mikroorganizmów eukariotycznych oraz wzrost liczby mikroorganizmów prokariotycznych. Natomiast nie odnotowano jego wpływu na liczebność mikroorganizmów metabolizujących heksadekan.

Słowa kluczowe: substancje ropopochodne, biodegradacja, biopreparaty, gleba

WSTĘP

Wydobycie, transport, magazynowanie i przetwarzanie ropy naftowej wiążą się z narastającym skażeniem środowiska w wyniku przenikania jej do otoczenia (awarie, wycieki spod rurociągów itp.). Większość składników ropy naftowej (węglowodory alifatyczne, aromatyczne, nafteny, asfalteny, heterozwiązki) jest toksyczna zarówno dla fauny, jak i flory, dlatego należy je możliwie szybko usuwać ze środowiska naturalnego [Kwapisz 2006], a metody fizyczne i chemiczne nie zawsze są skuteczne. Istotną rolę w przemia-

© Copyright by Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Adres do korespondencji – Corresponding author: Teresa Krzyśko-Łupicka, Samodzielna Katedra Biotechnologii i Biologii Molekularnej, Uniwersytet Opolski, ul. Kard. B. Kominka 6a, 45-035 Opole, e-mail: teresak@uni.opole.pl

nach związków ropopochodnych, skażających glebę odgrywają metody biologiczne, gdyż szacunkowo około 30% zanieczyszczeń, które są wprowadzane do gleby, ulega samorzutnemu biologicznemu rozkładowi w reakcjach wielofazowych.

Stopień bioremediacji gleby zależy od katalitycznej sprawności enzymów obecnych w komórkach mikroorganizmów bądź indukowanych, powstających wobec konkretnych substratów. Taką zdolność do uruchomienia odpowiednich egzoenzymów trawiących węglowodory posiadają bakterie z rodzajów: *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Burkholderia*, *Arthrobacter*, *Flavobacterium*, *Bacillus*, *Xantomonas*, *Ralstonia*, *Commomonas*, *Micrococcus*, *Vibrio*, *Mycobacterium* oraz *Nocardia* [Łebkowska i in. 1995, Bieszkiewicz i in. 1997, Eulberg i in. 1997, Duffner i in. 2000, Leys i in. 2005, Pandey i in. 2006, Kołwzan 2008]. Podobne zdolności wykazują także grzyby z rodzajów: *Candida*, *Pichia*, *Torulopsis*, *Saccharomyces*, *Yarrowia*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Aspergillus* i *Fusarium* [Borowiec i in. 1982, Michalcewicz 1995, Csutak i in. 2010, Krzyśko-Lupicka i Robak 2011].

W usuwaniu substancji ropopochodnych ze środowiska uczestniczą różnorodne mikroorganizmy autochtoniczne, ale zaledwie 0,01–1% ogólnej liczby bakterii glebowych wykazuje zdolność do biodegradacji węglowodorów, wykorzystując je jako źródło węgla i energii. Wielu naukowców widzi duże możliwości w zastosowaniu mikrobiologicznych preparatów, efektywnie oczyszczających skażony teren [Mrozik i in. 2005, Wójcik i Tomaszewska 2005]. Większość z tych preparatów zawierała bakterie lub drożdże w formie biomasy lub immobilizowanych komórek [Kołwzan 2008, Mrozik i in. 2005, Robak i in. 2011], albo preparatów handlowych – DBC-Plus typ R-5 [Papciak i Zamorska 2004]. Jednak stale poszukuje się nowych rozwiązań, które w pierwszej kolejności wymagają przetestowania w skali laboratoryjnej i określenia mechanizmu działania.

Warunkiem sprawnego przebiegu tego procesu jest dostępność węgla organicznego dla mikroorganizmów, zaś czynnikiem, który ogranicza biodostępność składników naftowych, jest ich relatywnie niska rozpuszczalność w wodzie, obniżająca się wraz ze wzrostem długości łańcucha lub ilością pierścieni w cząsteczce [Rosik-Dulewska i in. 2012]. Niska rozpuszczalność tych związków spowalnia tempo ich biodegradacji oraz ogranicza intensywność wzrostu mikroorganizmów [Łebkowska 1996].

Wzrost efektywności usuwania skażeń można osiągnąć, stosując różne techniki stymulacji oraz wprowadzając do środowiska biopreparaty (szczepionki drobnoustrojów i/ lub enzymy – oksygenazy, peroksydazy, hydrolazy i dehydrogenazy), które przyspieszają degradację ropy naftowej i jej pochodnych [Wójcik i Tomaszewska 2005, Zamorska i Papciak 2004, Guzik i in. 2008, Szpala i in. 2011].

Celem badań było określenie przydatności biopreparatu o handlowej nazwie Fyre-Zyme (nieposiadającego w Polsce atestu) do wspomagania procesu usuwania substancji ropopochodnych z gleby oraz przesłedzenie dynamiki zmian mikroflory glebowej.

MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Materiał badawczy stanowiła gleba gliniasta zanieczyszczona substancjami ropopochodnymi, pobrana z miejsca skażenia i składowana przez 2 lata w warunkach naturalnych. Miała ona postać zatłuszczonej masy barwy czarnej o specyficznym zapachu i pH 8,

w której zawartość substancji ropopochodnych wynosiła ok. 17 000 [mg/kg s. m]. Glebę tę wykorzystano do założenia modelowych doświadczeń wazonowych.

Preparat Fyre-Zyme (FZ) firmy International Enzymes (według informacji podawanych przez producenta) jest zastrzeżoną formułą skoncentrowanych enzymów z dodatkiem biosurfaktantów, których zadaniem jest ułatwienie desorpcji cząsteczek substancji ropopochodnych w glebie oraz pobudzenie bakterii glebowych do degradacji uwolnionych produktów ropopochodnych. Fyre-Zyme stanowi bogate źródło prostych cukrów, aminokwasów i innych czynników wzrostu. Do bioremediacji zanieczyszczeń ropopochodnych w glebie i w wodzie zalecane jest stosowanie 6% roztworu preparatu.

Próby badane (G+FZ) stanowiło 6 wazonów, do których wprowadzano po 1 kg gleby, a następnie dodano 6% roztwór wodny preparatu enzymatycznego Fyre-Zyme w dawce 10% (m/m). Kontrolę (K) stanowił obiekt bez dodatku preparatu. Wilgotność utrzymywano na poziomie 60% i co 2 dni uzupełniano ubytki wody, kontrolując masę wazonów za pomocą wagi. Doświadczenia wazonowe założono w 3 powtórzeniach. Tak przygotowaną glebę w nieosłoniętych wazonach inkubowano w temperaturze pokojowej 22°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) przez 60 dni.

Proces usuwania zanieczyszczeń z badanej gleby kontrolowano, pobierając z wazonów każdorazowo po 10 g gleby do oznaczeń chemicznych i mikrobiologicznych. Próby pobrano na początku doświadczenia (czas 0) po 6 godzinach oraz po 30 i 60 dniach. Skuteczność działania preparatu FZ określano w stosunku do kontroli (gleba bez preparatu).

Metody mikrobiologiczne

Oznaczenie składu jakościowego i ilościowego mikroorganizmów prowadzono standardową metodą hodowlaną w typowych dla poszczególnych mikroorganizmów podłożach. Wzrost grzybów oznaczano w podłożu Czapek z glukozą wg Fassatiowa [1983], drożdży – w podłożu YPG z chloramfenikolem (0,1g /l) [Barnett i in. 2000], bakterii – w Nutrient LAB – AgarTM firmy BIOCORP, promieniowców – w Starch Casein Nitrate Agar firmy Difco, a mikroorganizmy metabolizujące heksadekan – w podłożu MMT [Robak 2002]. Hodowle bakterii i grzybów prowadzono w temperaturze 22°C ($\pm 2^\circ\text{C}$).

Po 5 dobach inkubacji oznaczono ogólną liczbę bakterii i drożdży, a po 10 dobach – pozostałe grupy mikroorganizmów. Liczebność badanych mikroorganizmów podano w jtk/g s.m. Wyniki opracowano, wyznaczając odchylenie standardowe od średniej liczebności mikroorganizmów.

Zróżnicowane makroskopowo kolonie bakterii podzielono na grupy morfologiczne metodą barwienia Grama, a grzyby strzępkowe sklasyfikowano na podstawie cech morfologicznych, wykorzystując klucze diagnostyczne [Barnett i in. 2000].

Metody analityczne

Oznaczanie kwasowości odpadu w roztworze KCl (pH_{KCl}) wykonano metodą potencjometryczną, przy użyciu pH-metru typu N-512 firmy ELPO. Oznaczenie suchej masy przeprowadzono metodą wagową po suszeniu gleby w temperaturze pokojowej.

Oznaczanie węglowodorów n-alifatycznych o długości łańcucha węglowego od C8 do C40, węglowodorów aromatyczne (BTEX) oraz wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA) oznaczano metodą chromatografii gazowej.

Próbki do oznaczeń chromatograficznych uśredniano, ważono i suszono w temperaturze pokojowej bezwodnym siarczanem sodowym (POCH) [Ciesielczuk i Kusza 2008].

Ekstrakcję badanych związków przeprowadzono w automatycznym ekstraktorze fexIKA® firmy IKA – Werke. Do ekstrakcji BTEX oraz WWA zastosowano dichlorometan (POCH GC grade) [Ramus i Ciesielczuk 2010]. Do ekstrakcji n-alkanów – n-heksan (POCH GC grade). Ekstrakty do analiz WWA oczyszczano metodą chromatografii kolumnowej za pomocą aktywowanego tlenku glinu (Aldrich).

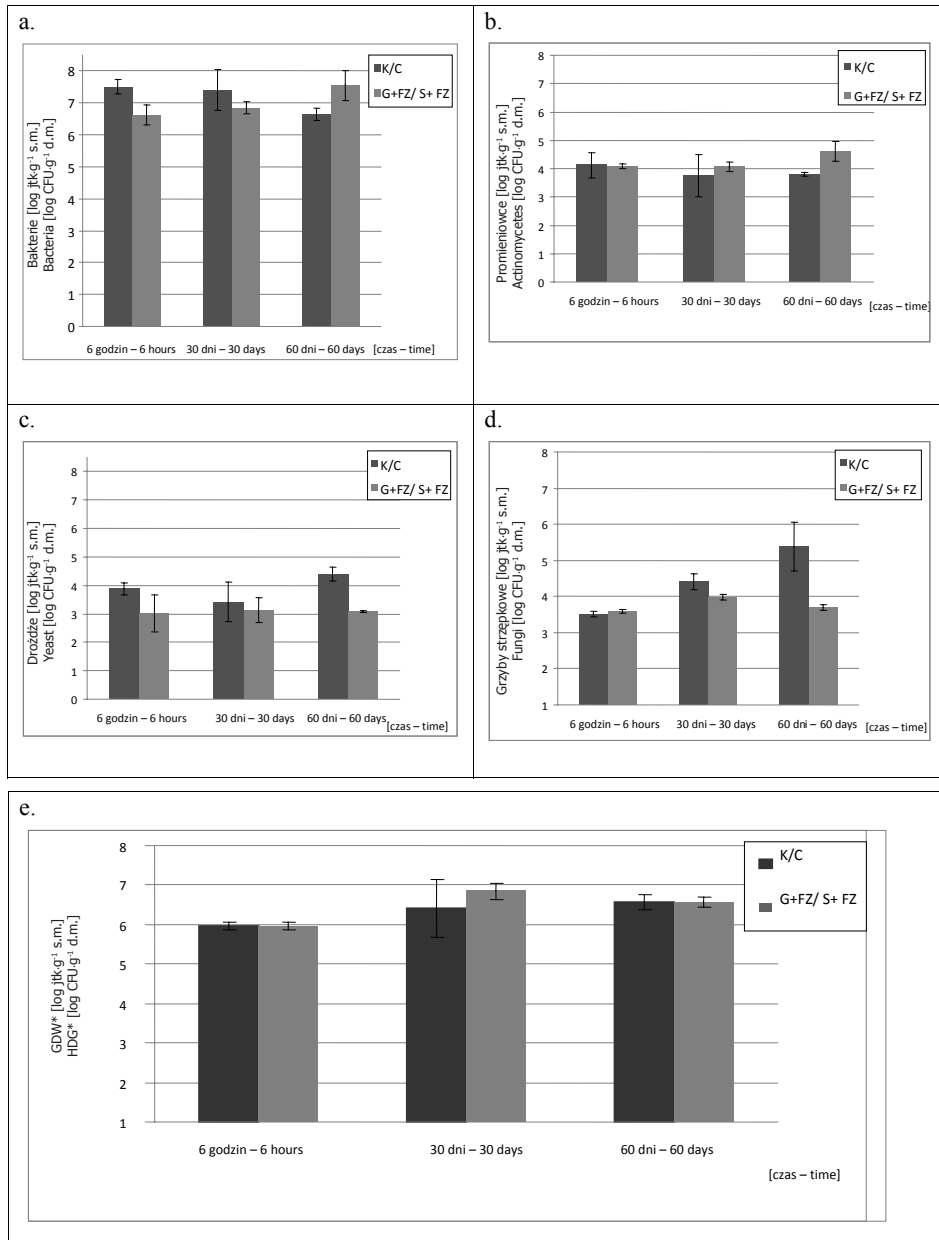
Analizę ilościową i jakościową otrzymanych ekstraktów prowadzono metodą chromatografii gazowej, przy zastosowaniu chromatografu gazowego VARIAN CP – 3800 z detektorem FID. Warunki prowadzenia analizy chromatograficznej przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Warunki analizy chromatograficznej
Table 1. The chromatographic analysis conditions

Warunki GC Conditions of GC	Węglowodory Hydrocarbons		
	BTEX	WWA PAHs	n-alfatyczne n-aliphatic
Kolumna kapilarna Capillary column	VF5 – ms, 30 m ID 0,25 mm if 0,25 µm	VF5 – ms, 30 m ID 0,25 mm if 0,25 µm	VF1 – ms, 30 m ID 0,53 mm if 1,50 µm
Przepływ gazu nośnego (He) The flow of carrier gas	1 cm ³ na minutę 1 cm ³ per minute	1 cm ³ na minutę 1 cm ³ per minute	3 cm ³ na minutę 3 cm ³ per minute
Temperatura dozownika Injector temperature	250°C	300°C	300°C
Temperatura detektora Detector temperature	280°C	310°C	325°C
Program temperaturowy Temperature range	30-2/4/50/5/150	105-2/4/300-10	100-1/12/320-12

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Wprowadzenie preparatu enzymatycznego FZ do gleby skażonej substancjami ropopochodnymi w niewielkim stopniu ograniczało liczebność mikroflory glebowej, z wyjątkiem grupy promieniowców (rys. 1a–e). Po 6 godzinach od wprowadzenia preparatu do gleby zaobserwowano 10-krotne obniżenie liczebności bakterii, drożdży i grzybów strzępkowych. W trakcie trwania doświadczenia liczebność drożdży była niższa niż w kontroli (K) i utrzymywała się na prawie stałym wyjściowym poziomie (10^3 jtk/g s.m.) W przypadku bakterii obserwowano stały wzrost ich liczebności, który osiągnął maksimum po 60 dniach procesu ($1,8 \cdot 10^7$ jtk/g s.m.) i był zbliżony do kontroli. Natomiast liczebność grzybów strzępkowych po 30 dniach inkubacji ulegała obniżeniu w stosunku do kontroli. Liczba mikroorganizmów metabolizujących heksadekan utrzymywała się na poziomie zbliżonym do kontroli.



Rys. 1. Zmiany liczebności mikroflory glebowej po 6 godzinach oraz 30 i 60 dniach trwania doświadczenia; bakterie (a), promieniowce (b), drożdże (c), grzyby strzępkowe (d), mikroorganizmy metabolizujące heksadecan (GDW) (e). (K – kontrola; G+FZ – gleba z preparatem Fyre-Zyme)

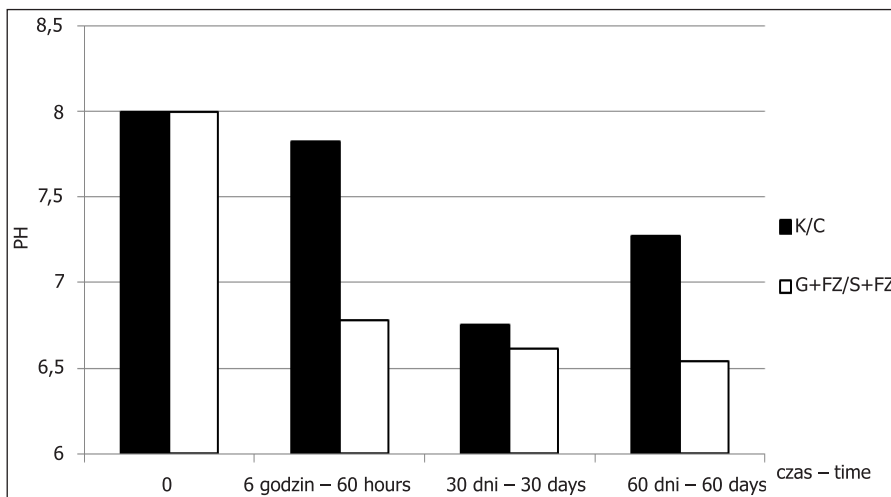
Fig. 1. The changes of soil microflora number after 6 hours and after 30 and 60 days of experiment: bacteria (a), actinomycetes (b), yeasts (c), fungi (d) and microorganisms using hexadecane as a sole carbon source (HGD)(e). (C – control; S+FZ – soil with Fyre-Zyme)

Zastosowana modyfikacja gleby preparatem FZ wpływała nie tylko na skład ilościowy, ale także jakościowy mikroorganizmów. Zaobserwowano 18% wzrost liczebności bakterii Gram-ujemnych (tab. 2). Na ten fakt również wskazują pozostali autorzy, chociaż wykorzystywali w badaniach inne typy preparatów biologicznych [Rakesh i in. 2005]. Zastosowany preparat sprzyjał także rozwojowi grzybów strzępkowych z rodzajów *Trichoderma*, *Acremonium* oraz klasy Zygomycetes.

Zmianom mikrobiologicznym w glebie modyfikowanej preparatem towarzyszyły zmiany pH i składów chemicznych badanych próbek. W obecności preparatu FZ odczyn gleby w porównaniu z kontrolą (pH 8) ulegał wyraźnemu obniżeniu i utrzymywał się na poziomie 6,8–6,5 (rys. 2). Może to wskazywać na aktywność metaboliczną drobnoustrojów.

Tabela 2. Udział bakterii G⁺ i G⁻ w ogólnej populacji [%], w trakcie trwania doświadczenia
Table 2. The part of G⁺ and G⁻ bacteria in total population [%], during experiment

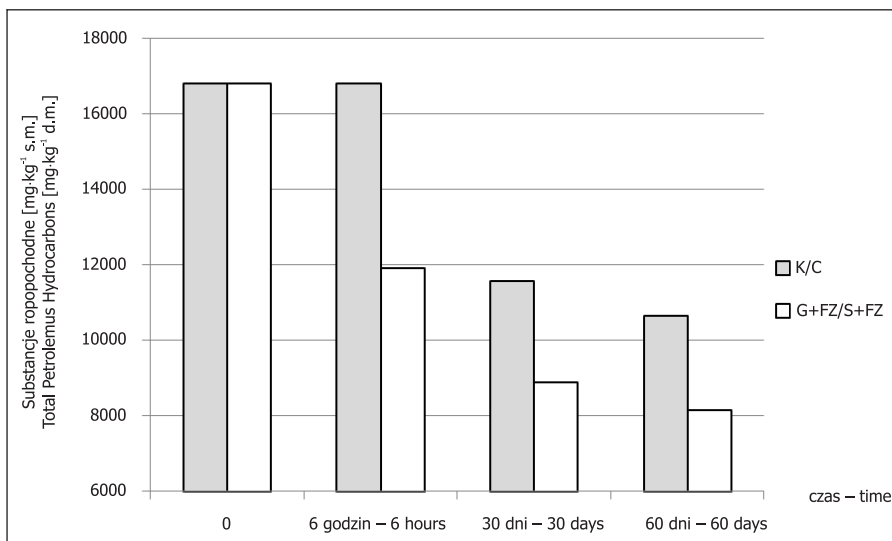
Bakterie [%]	6 godzin – 6 hours		30 dni – 30 days		60 dni – 60 days	
	K/C	G+FZ/S+FZ	K/C	G+FZ/S+FZ	K/C	G+FZ/S+FZ
G ⁺	16,4	13,3	38,9	28,6	38,7	20,9
G ⁻	83,6	86,7	61,1	71,4	61,3	79,1



Rys. 2. Zmiany pH próbek gleby skażonej substancjami ropopochodnymi po zastosowaniu preparatu enzymatycznego Fyre-Zyme w czasie trwania eksperymentu (K – kontrola; G+FZ – gleba z preparatem Fyre-Zyme)

Fig. 2. Changes of pH of soil samples polluted with crude oil products after use of enzymatic reagent Fyre-Zyme during experiment (C – control; S+FZ – soil with Fyre-Zyme)

Po wprowadzeniu preparatu FZ do gleby wzrosła skuteczność procesu usuwania zanieczyszczeń (rys. 3). W początkowym okresie (po 6 godzinach) stopień biodegradacji zanieczyszczeń wynosił 29% w stosunku do zawartości wyjściowej i zawartości w próbce kontrolnej. Po 30 i 60 dniach inkubacji degradacji uległo odpowiednio 47 i 52% wyjściowej ilości zanieczyszczeń. Jednakże równolegle w próbkach kontrolnych, w czasie inkubacji, zachodziły samorzutne przemiany substancji ropopochodnych, będące efektem aktywności mikroflory glebowej. Uwzględniając ten fakt, w obecności preparatu Fyre-Zyme stopień biodegradacji był wyższy o 23–24% w porównaniu z kontrolą.



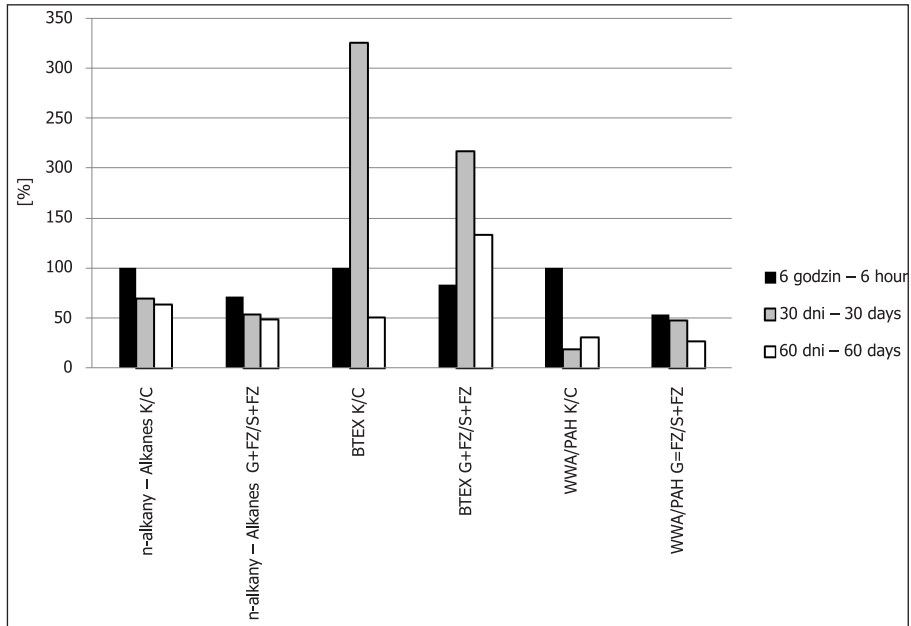
Rys. 3. Zmiany całkowitej zawartości substancji ropopochodnych [$\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ s.m.] w skażonej glebie po procesie biodegradacji (K – kontrola; G+FZ – gleba z preparatem Fyre-Zyme)

Fig. 3. The total content of crude oil products [$\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ d.m.] in polluted soil after biodegradation process (C – control; S+FZ – soil with Fyre-Zyme)

Analiza chemiczna substancji ropopochodnych wykazała obecność węglowodorów n-alfatycznych o długości łańcucha węglowego od C8 do C40, BTEX (benzen (B), toluen (T), m+p-ksylen (m+p-x), o-ksylen (o-x), styren (Sty), izopropylobenzen (Izo-pb) oraz WWA. W tej grupie węglowodorów oznaczono 16 związków zalecanych do monitoringu przez US-EPA: naftalen (Naf), acenaftylen (Acy), acenaften (Ace), fluoren (Flu), fenantren (Fen), antracen (Ant), fluoranten (Flt), piren (Pir), benzo[a]antracen (B[a]ant), chryzen (Chr), benzo[b,k]fluoranten (B[b,k]flt), benzo[a]piren (B[a]p), dibenzo[a,h]antracen (D[ah]ant), indeno[1,2,3-c,d]piren (Ind[123]p), benzo[g,h,i]perylene (B[ghi]p).

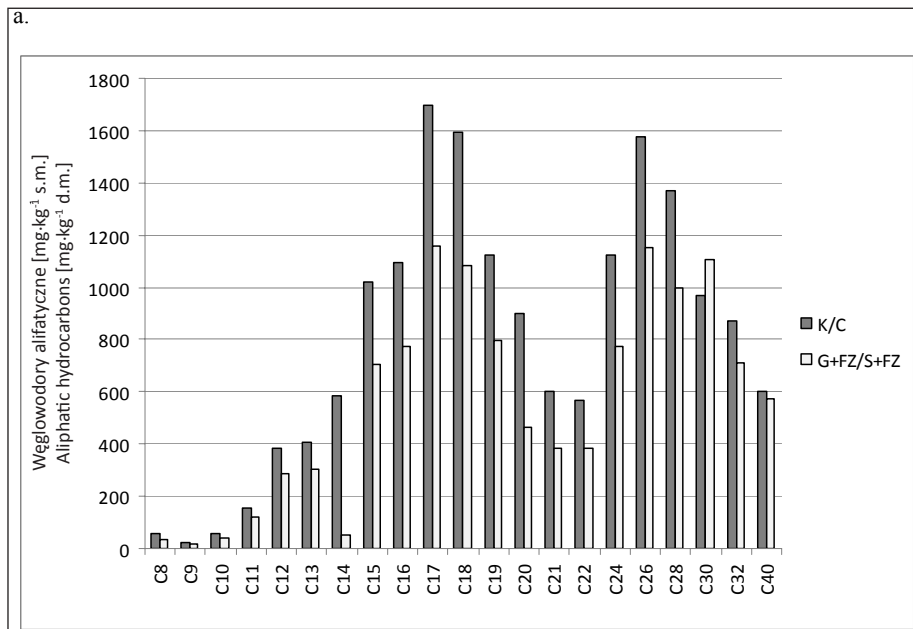
Węglowodory alifatyczne (C8-C40) ulegały degradacji w stosunku do ich wyjściowej zawartości w granicach 50% w obecności preparatu FZ, a w próbkach kontrolnych zmiany te były na poziomie 31–36%. Sumaryczna ilość węglowodorów monoaromatycznych ulegała znacznym zmianom w czasie i osiągnęła maksimum w 30. dniu inkubacji zarówno w obecności preparatu, jak i w kontroli. Jednakże nie zaobserwowano ilościowych ubytków tej grupy węglowodorów w próbkach z preparatem w porównaniu ze stężeniem wyjściowym. Sumaryczna zawartość WWA we wszystkich badanych próbkach ulegała wyraźnemu obniżeniu w stosunku do stężenia wyjściowego. W obecności Fyre-Zyme na poziomie 47–73%, natomiast w próbkach kontrolnych po 30 dniach o 82%. Po tym czasie następował wzrost ich zawartości (rys. 4). Mogło to być wynikiem miejscowej desorpcji i dyfuzji z różnych warstw gleby. Desorpcję zaadsorbowanych cząsteczek związków ropopochodnych podejrzewali także inni badacze [Robak i in. 2011].

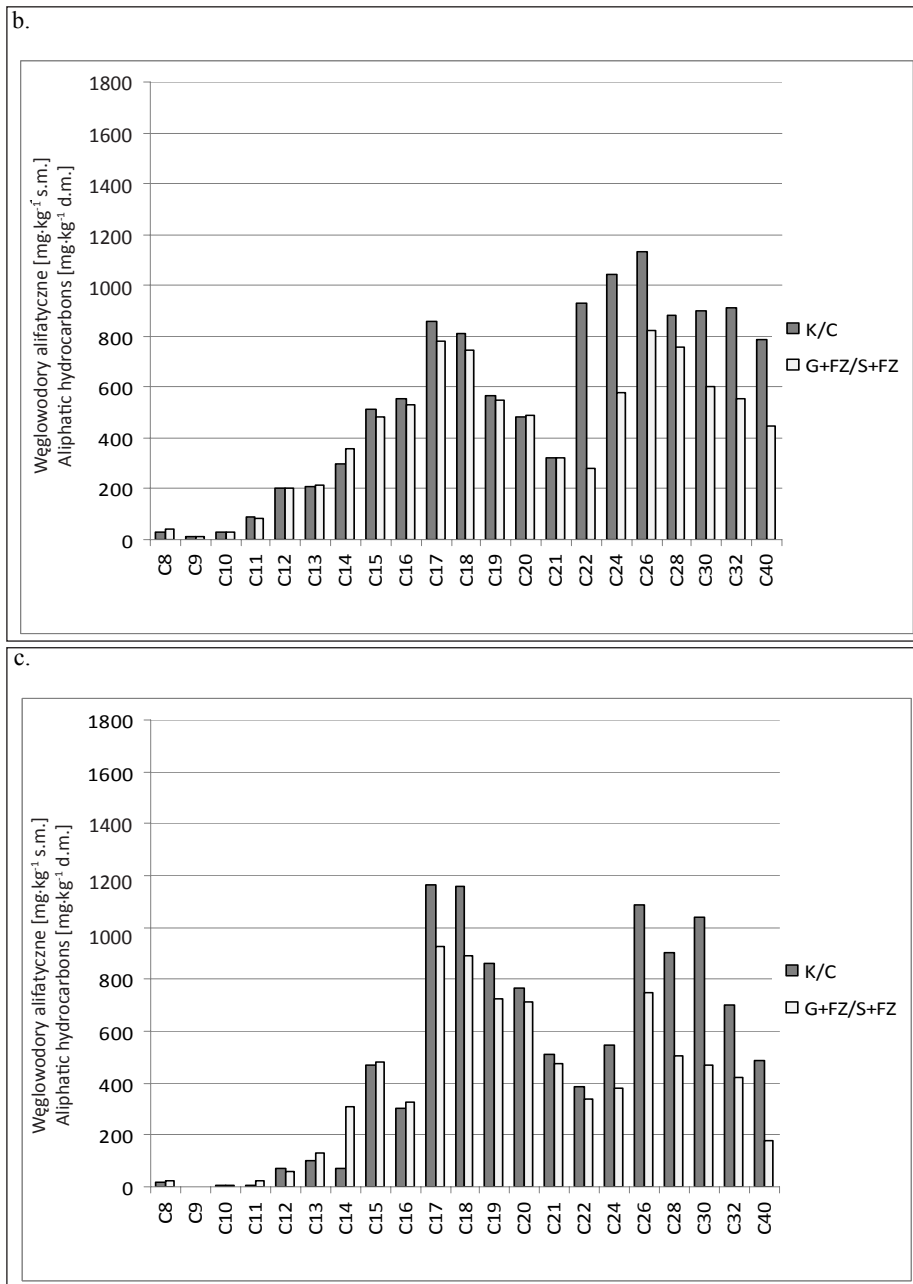
Analizując skład zarówno jakościowy, jak i ilościowy węglowodorów alifatycznych nie można jednoznacznie stwierdzić, które z nich łatwiej ulegają biodegradacji. W obecności preparatu w 60. dniu doświadczenia, w porównaniu z kontrolą, zaobserwowano generalnie obniżenie zawartości węglowodorów alifatycznych, z wyjątkiem ich niższych homologów (rys. 5 a,b,c).



Rys. 4. Zmiany ilościowe węglowodorów [%] w porównaniu ze stężeniem wyjściowym po 6 godzinach oraz 30 i 60 dniach inkubacji (K – kontrola; G+FZ – gleba z preparatem Fyre-Zyme)

Fig. 4. The quantitative changes of hydrocarbons content [%] in comparison to control after 6h and after 30 and 60 days of biodegradation (C – control; S+FZ – soil with Fyre-Zyme)





Rys. 5. Zmiany zawartości węglowodorów n-alfatycznych po 6 godzinach (a), 30 dniach (b) i 60 dniach (c) trwania procesu biodegradacji (K – kontrola; G+FZ – gleba z preparatem Fyre-Zyme)

Fig. 5. The content changes of n-alkane hydrocarbons during experiment after 6h (a), 30 days (b) and 60 days (c) after biodegradation process (C – control; S+FZ – soil with Fyre-Zyme)

Zawartość badanych związków monoaromatycznych ulegała obniżeniu w czasie trwania inkubacji zarówno w obecności preparatu Fyre-Zyme, jak i w kontroli (tab. 3). Wyjątek stanowił benzen, którego zawartość generalnie wzrastała w czasie procesu (rys. 7), co może sugerować oderwanie łańcuchów bocznych w związkach monoaromatycznych, tym bardziej że równolegle zaobserwowano wzrost stężeń niższych węglowodorów n-alifatycznych w porównaniu z kontrolą.

Tabela 3. Średnia zawartość węglowodorów monoaromatycznych (BTEX) po 6 godzinach oraz 30 i 60 dniach trwania procesu

Table 3. The content of monoaromatic hydrocarbons (BTEX) during experiment after 6 hours, 30 and 60 days

Węglowódor monoaromatyczny (BTEX)	Zawartość BTEX w próbach [mg/kg s.m.] – BTEX content [mg/kg d.m.]					
	G+FZ/S+FZ			K/C		
	6 h	30 dni 30 days	60 dni 60 days	6 h	30 dni 30 days	60 dni 60 days
Benzen	0,88	24,5	13,7	0,56	37,1	3,94
Toluen	0,50	0,28	0,20	1,56	0,26	0,89
Etylobenzen	1,08	0,28	0,75	0,34	0,55	0,09
m+p-ksylen	1,08	0,26	0,22	1,18	0,28	0,22
o-ksylen	0,63	0,07	0,12	1,58	0,28	0,22
Styren	0,73	0,26	0,30	1,37	0,20	0,08
Izopropylobenzen	4,74	0,48	0,71	4,97	0,36	0,54

K – kontrola; G+FZ – gleba z preparatem Fyre-Zyme,
C – control; S+FZ – soil with Fyre-Zyme

Analiza jakościowo-ilościowa badanych związków WWA wykazała obniżenie ich zawartości w porównaniu ze stężeniami wyjściowymi zarówno w obecności preparatu FZ, jak i w kontroli. Wyjątek stanowiły: fluoranten, piren, benzo(a)antracen i chryzen, których stężenie wzrastało w próbkach G+FZ, natomiast w kontroli wzrastało tylko stężenie benzo(a)antracenu (tab. 4) Podobne zjawiska, np. znacznego wzrostu antracenu (2000-krotny) czy chryzenu, zaobserwowali w swojej pracy Robak i in. [2011].

Dobrze dobrane biopreparaty mogą być skutecznym narzędziem w usuwaniu związków ropopochodnych w środowisku glebowym. Z reguły ich aktywność jest ukierunkowana na degradację poszczególnych grup węglowodorów będących składnikami ropy naftowej. W trakcie rozkładu zanieczyszczeń mogą powstawać metabolity, bardziej niebezpieczne niż związki wyjściowe, dlatego konieczny jest właściwy dobór biopreparatów, uwzględniający również ich wpływ na rozwój roślinności. Dotychczas w literaturze nie opisano efektywności i mechanizmu działania preparatu Fyre-Zyme w procesach biodegradacji, więc trudno się odnieść do jego skuteczności w usuwaniu różnych zanieczyszczeń. Zastosowany przez nas w badaniach laboratoryjnych preparat intensyfikował proces usuwania substancji ropopochodnych już w kilka godzin po wprowadzeniu do zanieczyszczonej gleby; nie wpływał na ubytek węglowodorów monoaromatycznych, ale przyspieszał degradację WWA i węglowodorów n-alifatycznych w porównaniu z kontrolą. Stężenie tych ostatnich uległo zmniejszeniu w przypadku węglowodorów o długości łańcucha C10-C22, ale również węglowodorów o łańcuchach dłuższych (C24-C40), które uważało się do tej pory za odporne na biodegradację [Piechowiak i Minta 2000, Guzik i in. 2010].

Tabela 4. Średnia zawartość wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych (WWA) [mg/kg s.m.] po 6 godzinach oraz 30 i 60 dniach trwania procesu

Table 4. The content of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) [mg/kg d.m.] during experiment after 6 hours, 30 and 60 days

WWA/PAHs	Zawartość WWA w próbach [mg/kg sm.] – PAHs content [mg/kg dm]					
	G+FZ/S+FZ			K/C		
	6 godzin 6 hours	30 dni 30 days	60 dni 60 days	6 godzin 6 hours	30 dni 30 days	60 dni 60 days
NAPH	18,35	6,22	3,33	23,98	3,70	3,64
Acy	9,41	4,91	2,20	13,82	2,22	2,90
Ace	29,22	11,29	9,78	42,89	4,87	12,12
Flu	4,35	1,76	0,53	5,23	0,87	1,07
Phe	11,88	3,38	3,96	10,17	1,34	2,77
Ant	8,37	6,77	5,32	13,61	1,99	5,27
Flt	4,67	4,21	7,08	23,53	1,26	4,73
Pyr	0,24	1,37	1,41	1,31	0,53	0,57
B(a)ant	0,64	22,4	11,58	2,09	4,63	17,05
Chr	2,53	7,94	4,77	11,60	1,07	0,53
B(b)flt	2,34	12,80	1,40	15,57	2,44	6,48
B(k)flt	6,08	8,49	0,96	5,75	2,28	1,32
B(a)p	0,97	2,34	0,65	4,97	1,77	0,45
In(123)p	5,79	0,53	0,20	27,76	3,99	1,24
D(ah)ant	2,36	2,19	0,78	1,36	3,76	2,46
B(ghi)per	1,08	0,64	0,58	1,84	0,53	0,37

K – kontrola; G+FZ – gleba z preparatem Fyre-Zyme,

C – control; S+FZ – soil with Fyre-Zyme

Zmiany ilościowe nie miały charakteru liniowego; w wielu przypadkach w 30. dniu procesu obserwowano wzrost stężeń węglowodorów w porównaniu z zawartością wyjściową. W obecności preparatu FZ stopień biodegradacji był wyższy o 23–24% w porównaniu z procesami samorzutnymi. Zaobserwowano również, że wprowadzenie preparatu obniżało pH gleby z 8,0 do 6,8 i utrzymywało się na poziomie 6,8–6,5 przez cały okres oczyszczania. Natomiast w procesie samorzutnym (autoremediacja) w 30. dniu po silnym obniżeniu pH do 6,8 wzrosło ono do 7,2 w 60. dniu, co może być wskaźnikiem przemian chemicznych. Zachodzące zmiany odczynu gleby były efektem powstających pośrednich produktów biodegradacji, chociaż Zamorska i Papciak [2004] uważają, że zmiany pH nie mają wyraźnego wpływu na ten proces, ale mogą być wskaźnikiem zachodzących przemian. Podsumowując, można stwierdzić, że testowany preparat enzymatyczny intensyfikował proces zanikania substancji ropopochodnych w glebie. Z kolei Ho i Rashid [2008] wykazali, że skuteczność bioremediacji osadów oleistych z rafinerii ropy naftowej przy zastosowaniu innego preparatu – EZ-enzym była wyższa niż bez jego użycia. Stwierdzili również, że szybkość biodegradacji oleju i smaru w próbce osadu zależała od stężenia zastosowanego preparatu. Dawka 100 ppm prowadziła do obniżenia zanieczyszczeń z 8 do 2% w ciągu dziewięciu tygodni procesu.

WNIOSKI

1. Preparat enzymatyczny Fyre-Zyme okazał się skuteczny we wspomaganie procesów usuwania substancji ropopochodnych z zanieczyszczonej gleby. Ubytki zawartości substancji ropopochodnych w glebie w obecności preparatu były o 25% wyższe w stosunku do przemian samorzutnych.

2. Skuteczność usuwania poszczególnych grup związków chemicznych, składników zanieczyszczeń ropopochodnych była zróżnicowana i uzależniona od ich budowy chemicznej – najbardziej podatne były węglowodory n-alifatyczne z wyjątkiem ich niższych homologów.

3. Testowany preparat był najskuteczniejszy w ciągu 6 godzin od wprowadzenia do zanieczyszczonej gleby. Ubytek substancji ropopochodnych w tym czasie w porównaniu z glebą bez preparatu (kontroli) wynosił 29%. Po 60 dniach procesu ubytek wzrósł do 52%.

4. Zastosowany preparat obniżał liczebność eukariotycznych mikroorganizmów glebowych. Natomiast na liczebność mikroorganizmów prokariotycznych praktycznie nie miał wpływu.

PIŚMIENNICTWO

- Barnett J.A., Payne R.W., Yarrow D., 2000. Yeast characteristics and identification. Third edition, Cambridge University Press.
- Bieszkiewicz E., Boszczyk-Maleszak H., Mycielski R., Wyszowska B., 1997. Biodegradacja frakcji olejowej ścieków petrochemicznych przez bakterie izolowane z zaolejonej gleby. *Biotechnologia*, 1(36), 70–76.
- Borowiec S., Dzienia S., Boligłowa E., 1982. Wpływ skażenia gleby produktami ropy naftowej na mikroflorę glebową. Cz. I. Mikroorganizmy glebowe w sąsiedztwie magazynów paliw. *Zesz. Nauk. AR Szczecin*, 94, 33–45.
- Ciesielczuk T., Kusza G., 2008. Zanieczyszczenie wielopierścieniowymi węglodorami aromatycznymi (WVA) gleb zalanych wodami powodziowymi [w:] Zarządzanie Kryzysowe – ochrona przed powodzią (rozwiązania praktyczne) (red.) Czamara W., Wiatkowski M. Katedra Ochrony Powierzchni Ziemi, Uniwersytet Opolski, 179–190.
- Csutak O., Stoica I., Ghindea R., Tanase A-M., Vassu T., 2010. Insights on yeast bioremediation processes. *Romanian Biotechnological Letters*, 15(2), 5066–5071.
- Duffner F.M., Kirchner U., Bauer M.P., Muller R., 2000 Phenol/cresol degradation by the thermophilic *Bacillus thermoglucosidasius* A7: Cloning and sequence analysis of five genes involved in the pathway. *Gene*, 215–221.
- Eulberg D., Golovleva L.A., Schlomann M., 1997. Characterization of catechol catabolic genes from *Rhodococcus erythropolis* 1CP. *Journal of Bacteriology*, 179, 370–381.
- Fassatiowa O., 1983. Grzyby strzępkowe w mikrobiologii technicznej. WN-T, Warszawa.
- Guzik U., Greń I., Wojcieszńska D., Łabużek S., 2008. Dioksygenazy – kluczowe enzymy degradacji związków aromatycznych. *Biotechnologia*, 3(82), 71–88.
- Guzik U., Wojcieszńska D., Krysiak M., Kaczorek E., 2010. Mikrobiologiczny rozkład alkanów ropopochodnych. *Nafta – Gaz*, 66(11), 1019–1027.
- Ho J.I., Rashid M., 2008. Application of EZ-enzyme in bioremediation of oily sludge. *Jurnal Teknologi, Universiti Teknologi Malaysia* 48(F), 21–32.
- Kołwzan B., 2008. Ocena przydatności inokulantów do bioremediacji gleby zanieczyszczonej produktami naftowymi. *Ochr. Środ.*, 30(4), 3–14.

- Kwapisz E., 2006. Szlaki tlenowej biodegradacji ropy naftowej. *Biotechnologia* 2(73), 166–188.
- Leys N.M., Ryngaert A., Bastiaens L., Wattiau P., Top E.M., Verstraete W., Springael D., 2005. Occurrence and community composition of fast-growing *Mycobacterium* in soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiology Ecology*, 51, 375–388.
- Łebkowska M., 1996. Wykorzystanie mikroorganizmów do biodegradacji produktów naftowych w środowisku glebowym. *Gaz, Woda i Technika Sanitarna*, 3, 117–118.
- Lupicka-Krzyśko T., Robak M., 2011. Drożdże *Yarrowia lipolytica* w biodegradacji substancji tłuszczowych w zaolejonej ziemi bielącej. *Acta Sci. Polon. Biotechnologia*, 10(4), 29–38.
- Łebkowska M., Karwowska E., Miałkiewicz E., 1995. Isolation and identification of bacteria from petroleum derivatives soil. *Acta Microb. Polon.*, 44, 297–303.
- Michalciewicz W., 1995. Wpływ oleju napędowego do silników Diesla na liczebność bakterii, grzybów, promieniowców oraz biomasę mikroorganizmów glebowych. *Rocz. PZH*, 46, 1, 91–97.
- Mrozik A., Piotrowska-Seget Z., Łabużek S., 2005. Bacteria in bioremediation of hydrocarbon – contaminated environments. *Post. Mikrobiol.* 44, 3, 227–238.
- Pandey G., Pandey J., Jain R.K., 2006. Monitoring *Arthrobacter protophormiae* RKJ 100 in a “tag and chase” method during *p*-nitrophenol bio-remediation in soil microcosms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 70, 757–760.
- Papciak D., Zamorska J., 2004. Możliwości zastosowania biopreparatu DBC-Plus do wspomagania procesów biodegradacji substancji ropopochodnych. *Zesz. Nauk. Politechniki Rzeszowskiej*, 218(38), 95–107.
- Piechowiak K., Minta M., 2000. Biologiczne metody oczyszczania wód i gruntów. *Ekopartner*, 1.
- Rakesh K.J., Manisha K., Sumeet L., Banwari L., Priyangshu S.M., Dhruva B., Indu S.T., 2005. Microbial diversity: Application of microorganisms for the biodegradation of xenobiotics. *Current Science*, 89(1), 101–112.
- Ramus K., Ciesielczuk T., 2010. Evaluating the efficiency of selected extraction methods for PAHs on the example of compost from urban wastes. *Ecological Chemistry and Engineering A*, 17(2), 1655–1661.
- Robak M., 2002. Studia nad wykorzystaniem octanu i wydzielaniem cytrynianu przez drożdże *Yarrowia lipolytica*. *Zesz. Nauk. AR Wrocław, Technologia Żywności*, 442, Rozprawy CXCI, 1–91.
- Robak M., Boruczowski T., Drożdż W., Lazar Z., Baranowska M., Prządo D., Steininger M., 2011. Zastosowanie drożdży *Yarrowia lipolytica* do bioremediacji gruntu zanieczyszczonego olejem krezotowym. *Ochr. Środ.* 33(2), 27–33.
- Rosik-Dulewska Cz., Ciesielczuk T., Krysiński M., 2012. Organic pollutants in groundwater in the former airbase. *Archives of Environmental Protection*, 38, 1, 27–34
- Szpała K., Krzyśko-Lupicka T., Konfederat T., 2011. Sposób oczyszczania gruntów zanieczyszczonych związkami organicznymi. Patent 390375, Biuletyn Urzędu Patentowego 17.
- Wójcik P., Tomaszewska B., 2005. *Biotechnologia w remediacji zanieczyszczeń organicznych*. *Biotechnologia* 4(71), 156–172.
- Zamorska J., Papciak D., 2004. Usuwanie związków ropopochodnych z gruntu – mikroorganizmy i warunki prowadzenia procesu. *Zesz. Nauk. Politechniki Rzeszowskiej*, 218(38), 159–170.

THE BIODEGRADATION OF PETROLEUM SUBSTANCES IN CONTAMINATED SOIL IN PRESENCE OF FYRE-ZYME PREPARATION

Abstract. The usefulness of the enzyme preparation Fyre-Zyme (trade name) for purification of hydrocarbon-contaminated soil was investigated under laboratory conditions. Parallely, its influence on the dynamics of soil microflora has been tested. Fyre-Zyme, which does not currently have a certificate in Poland, was the most effective during the first 6 hours of experiment. At this time, in comparison to control soil (without Fyre Zyme), the content of petroleum substance decreased by 29% and after 60 days by 52%. Fyre-Zyme preparation assisted the degradation of n-aliphatic hydrocarbons and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) but did not affect in loss of mono-aromatic hydrocarbons (BTEX). The changes of soil biotic relations were observed at presence of Fyre-Zyme – decrease of the number eukaryotic microflora and increase of prokaryotic microflora during 60 days of process. However, the enzyme preparation had no influence on the number of hexadecane degrading microorganisms.

Key words: petroleum products, biodegradation, preparation, soil

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 30.03.2013

Do cytowania – For citation: Krzyśko-Lupicka T., Ciesielczuk T., Chwałowska M., 2013. Proces zanikania substancji ropopochodnych w skażonej glebie stymulowany preparatem Fyre-Zyme. *Acta Sci. Pol. Biotechnol.*, 12(1), 5–18.

MIKROFLORA DROŹDŹOWA NATURALNIE FERMENTOWANYCH WARZYW

Zbigniew Lazar¹, Michał Piegza¹, Ewa Walczak²,
Wojciech Barszczewski¹, Małgorzata Robak¹

¹ Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

² Państwowa Wyższa Szkoła Zawodowa im. Witelona w Legnicy

Streszczenie. W prezentowanej pracy postanowiono ustalić, które gatunki drożdży zasiedlają domowe fermentowane produkty: kiszzone ogórki, kiszoną kapustę oraz kiszzone mieszane warzywa. Z wybranych do badań kiszzonek wyizolowano 75 szczepów drożdży, które zidentyfikowano na podstawie o testu API (bioMerieux), amplifikacji wybranych regionów genów rDNA (NS3-ITS4) i analizy restrykcyjnej oraz skanowania genomu w poszukiwaniu sekwencji mikrosatelitarnych. Za dominującą mikroflorę wszystkich kiszzonych produktów uznano drożdże *Saccharomyces cerevisiae* (38,7% izolatów) i *Yarrowia lipolytica* (25,6% izolatów). Z kiszonych produktów wyizolowano także szczepy należące do następujących gatunków: *Pichia etchellsii*, *P. ohmerii*, *Candida holmii*, *C. pelliculosa* i *Shizosaccharomyces japonicus*. Wykorzystując API 32C, niektóre izolaty zidentyfikowano tylko do rodzaju, a z uwagi na ubogie bazy danych szczepów wzorcowych nie wszystkie izolaty udało się jednoznacznie zidentyfikować na poziomie gatunku technikami molekularnymi. Wyniki badań pozwoliły na rozbudowanie tworzonej bazy danych o nowe szczepy drożdży (szczepy o odmiennych profilach restrykcyjnych), co w przyszłości powinno ułatwić prowadzenie prac identyfikacyjnych.

Słowa kluczowe: drożdże, RAPD, PCR, RLFP, kiszonki

WSTĘP

Drożdże są powszechnie obecne w środowisku, jednak mało jest danych dotyczących izolatów występujących w żywności tradycyjnie fermentowanej czy ukwaszanej. W Polsce, kraju o dużej tradycji kiszenia warzyw, brak jest opublikowanych danych dotyczących

© Copyright by Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Badania wykonano w ramach grantu MNiSW Nr N N312 140733

Adres do korespondencji – Corresponding author: Zbigniew Lazar, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, 51-630 Wrocław, ul. J. Chelmońskiego 37/41, e-mail: zbigniew.lazar@up.wroc.pl

gatunków drożdży występujących w naturalnie kiszonych ogórkach i kapuście. Identyfikację drożdży można przeprowadzić z wykorzystaniem klasycznych metod opierających się na charakterystyce morfologicznej i fizjologicznej, którą otrzymujemy dla danego izolatu po wykonaniu wielu testów. Pewnym uproszczeniem są dostępne zestawy identyfikacyjne (np. API 32C, bioMerieux, Francja), które często wystarczają do określenia gatunku. Nie gwarantują one jednak otrzymania pewnych, jednoznacznych wyników, ponieważ „mierzą” metabolizm komórki i nie umożliwiają różnicowania szczepów należących do tego samego gatunku. Przy użyciu technik biologii molekularnej identyfikacja drożdży na poziomie gatunku, a także różnicowanie poszczególnych szczepów, jest bardziej dokładne. Uzyskanie miarodajnych efektów wymaga jednak posiadania adekwatnych wyników dla szczepów wzorcowych. Metody molekularne znalazły już zastosowanie do badania drożdży występujących w mleczarstwie [Andrighetto i in. 2000, Lopandic i in. 2006], browarnictwie [Robak i in. 2005, Cocolin i in. 2011] oraz innych fermentowanych produktach żywnościowych [Tominaga 2004, Raspor i in. 2006, Mercado i in. 2007, Vogel i Ehrmann 2008, Rantsiou i Cocolin 2008, Abriouel i in. 2008, Hublot i Guyot 2008]. Umożliwiają nawet śledzenie zachodzących podczas fermentacji zmian różnorodności populacji mikrobiologicznej [Giraffa i Carminati 2008]. Dzięki tym metodom możliwe jest dokładne określenie gatunków dominujących na danym etapie fermentacji i kwaszenia.

Celem badań było poznanie gatunków drożdży występujących w Polsce, w tradycyjnie fermentowanej kapuście, ogórkach i mieszankach warzywnych. Do identyfikacji gatunku oraz zróżnicowania szczepów zastosowano galerie API 32C (bioMerieux), analizę restrykcyjną powielonego fragmentu NS3-ITS4 rDNA (PCR-RFLP rDNA) oraz skanowanie genomu poprzez losową amplifikację polimorficznego DNA (RAPD) z czterema starterami mikrosatelitarnymi.

MATERIAŁ I METODY

Szczepy drożdży

Kiszzone ogórki, kapusta oraz mieszanki warzywne pochodziły z domowych gospodarstw z terenu Dolnego Śląska, Kołobrzegu i Rybnika. Szczegółowy wykaz pobranych do badań próbek przedstawiono w tabeli 1. Z próbek tych izolowano szczepy i wstępnie identyfikowano za pomocą testów API 32C (bioMerieux) oraz z wykorzystaniem metod molekularnych. Jako podłoże izolacyjne stosowano podłoże OGY (zawierające oksytetracyklinę (Sigma), glukozę (POCH), ekstrakt drożdżowy (DIFCO)). Wzrost drożdży prowadzono w temperaturze 28°C przez 3–7 dni. Poszczególne izolaty przeszczepiano na skosy agarowe z podłożem YM (ekstrakt drożdżowy 5g/l i ekstrakt słodowy 3g/l). Izolaty pozyskane z kiszonych ogórków, kiszonej kapusty i kiszonych mieszanych warzyw zdeponowano w kolekcji własnej Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. W pracy wykorzystano też posiadane w kolekcji następujące szczepy wzorcowe: *Yarrowia lipolytica* A-101, *Y. lipolytica* A-101-1.31, *Y. lipolytica* A-101-1.22, *Y. lipolytica* ATCC 8661S, *Y. lipolytica* ATCC 32338A, *S. cerevisiae* PCM 2103, *S. cerevisiae* CLIB 251, *Saccharomyces pastorianus* 1244, *S. pastorianus* CLIB 537, *S. pastorianus* CLIB 276, *S. bayanus* 320 oraz *Schizosaccharomyces pombe* 356 i *Sch. japonicus* 354. Wzorcowe szczepy wykorzystano w molekularnej iden-

tyfikacji i analizie podobieństwa. Niektóre ze szczepów wzorcowych zostały wcześniej pozyskane z uznanych światowych kolekcji (ATCC – American Type Culture Collection; PCM – Polish Collection of Microorganismes; CLIB – Collection de Levures d'Intérêt Biotechnologique).

Tabela 1. Pochodzenie analizowanych szczepów drożdży, liczba izolatów oraz oznaczenie

Table 1. Provenance of analyzed yeast strains, number of isolates and nicknames

Gospodarstwo Farm	Liczba wyizolowanych szczepów Number of isolated strains	Oznaczenie Nickname
Kiszone ogórki – Pickled cucumbers		
Świdnica/1	4	1.1; 1.3–1.5
Świdnica/2	3	1.III–1.V
Jastrzębie Zdrój/1	6	2.1–2.6
Jastrzębie Zdrój/2	5	2.1–2.V
Borynia/1	4	3.1–3.4
Borynia/2	3	3.1–3.III
Kaczyce	6	4.1–4.6
O1	6	5.1–5.5;5.7
O2	5	6.1– 6.5
Σ	42	
Kiszona kapusta – Sauerkraut		
Kaczyce	4	4.1–4.III; 4.P
Świdnica	4	5.III–5.VI
Rybnik	3	6.1–6.III
K1	4	7.1–7.4
K2	3	8.1–8.3
Σ	18	
Kiszona mieszanka warzywna – Pickled vegetables		
Świdnica/1	5	7.1–7.V
Świdnica/2	3	8.1–8.III
Lwówek Śląski	2	9.1–9.2
Kołobrzeg	3	9.1–9.III
S1	2	10.1–10.2
Σ	15	
Ogólna liczba Total	75	

Izolacja DNA

Kultury drożdży hodowano przez 20 godzin w płynnym podłożu YM (ekstrakt drożdżowy 5g/l i ekstrakt słodowy 3 g/l), w temperaturze 28°C z wykorzystaniem wstrząsarki (New Brunswick Co.). Hodowle wirowano przez 20 minut przy 12 000 obr./min (wirówka 3-16K, Sigma). Odwirowana biomasa drożdży po przemyciu sterylną wodą destylowaną i ponownym odwirowaniu posłużyła do izolacji DNA według zmodyfikowanej metody Hoffmana i Winstona opisaną przez Barszczewskiego i Robak [2004].

PCR i analiza restrykcyjna uzyskanego produktu amplifikacji: PCR-RFLP rDNA

Z wykorzystaniem starterów NS3 – ITS4 amplifikowano część genu rybosomalnego DNA zawierającą obydwa fragmenty rozdzielające (ITS1, ITS2), cały fragment 5,8S rDNA oraz fragment obejmujący 18S rDNA. Reakcję PCR prowadzono w termocyklerze (Biometra) w warunkach podanych w pracy Walczak i in. [2007]. Wielkość uzyskanego produktu amplifikacji określano po elektroforezie w 1% żelu agarozowym (aparatus Midi, Sigma) i dokumentowano poprzez wykonanie zdjęcia w systemie BioCapt (Vilber Lourmat). Produkty PCR trawiono przez 2 godz. z udziałem następujących endonukleaz: *HaeIII*, *MspI*, *SerFI* (Fermentas, 37°C w buforze firmowym) w odpowiednich buforach. Ilość i wielkość produktów hydrolizy oceniano elektroforetycznie (nanoszono 10 µl/ścieżkę i rozdzielano przez 1,5 godz. przy stałym napięciu 120 V) oraz dokumentowano w postaci zdjęcia. Otrzymane profile porównywano z profilami 34 szczepów referencyjnych i na tej podstawie zidentyfikowano nieznaną izolację.

RAPD

W metodzie losowej amplifikacji polimorficznego DNA (RAPD) wykorzystano startery mikrosatelitarne o sekwencjach typu: (GTG)₅, (GAC)₅, (GACA)₄ oraz fragment sekwencji faga M13 (5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3'). Reakcję powielenia materiału genetycznego przeprowadzono w termocyklerze (Biometra) według Walczak i in. [2007]. Elektroforezę uzyskanych fragmentów DNA oraz dokumentację uzyskanych profili prowadzono w warunkach analogicznych do warunków zastosowanych w przypadku PCR-RFLP rDNA.

Analiza uzyskanych profili DNA i wprowadzanie do bazy danych

Zdjęcia profili DNA dokumentowane za pomocą oprogramowania BioCapt (Vilber Lourmat) przenoszono w postaci plików graficznych (*.tif) do oprogramowania BioGene (Vilber Lourmat). Program ten umożliwia precyzyjną analizę wielkości DNA oraz badanie podobieństw pomiędzy profilami zarówno w obrębie jednego żelu, jak i pomiędzy kilkoma zapisanymi zdjęciami. Dodatkowo, w ramach programu istnieje możliwość precyzyjnego określania podobieństwa, przy wykorzystaniu zaprogramowanych formuł matematycznych (współczynnik Dice). Na podstawie uzyskanych współczynników utworzono dendrogramy podobieństwa szczepów drożdży w odniesieniu do posiadanych wzorców. W celu utworzenia sumarycznego dendrogramu opartego na wynikach analizy restrykcyjnej i kilku analizach RAPD opracowano autorską aplikację WEPA (Wilgosz Excel Pstryczek Application) [Walczak i in. 2007].

WYNIKI

Kolonie, które izolowano z podłoża z oksytetracykliną, w pierwszej kolejności zidentyfikowano na podstawie wykorzystywanych źródeł węgla i programu identyfikacyjnego producenta galerii API 32C, (bioMerieux), a następnie metodami molekularnymi. Wyniki tak przeprowadzonej identyfikacji przedstawiono w tabelach 2–4. Dominującą mikroflorą drożdżową okazały się szczepy z gatunku *S. cerevisiae* oraz *Y. lipolytica*, stanowiące odpowiednio 38,7 i 16% ogólnej liczby izolatów. W przypadku 18 szczepów identyfikacja gatunku nie była możliwa. Trudności dotyczyły dyskryminacji pomiędzy *C. utilis*, a *C. pelliculosa* dla pięciu szczepów z kiszonych ogórków (1.1; 1.3; 4.1; 5.1; 6.2),

czterech z kiszonej kapusty (4.II; 4.III; 8.2; 8.3) i dwóch z kiszonej mieszanki warzywnej (7.V; 8.I) oraz pomiędzy *C. guilliermondi* i *C. famata* dla trzech szczepów z kiszonych ogórków (1.4; 4.2; 5.2), dwóch z kiszonej kapusty (4.P; 7.2) oraz dwóch z kiszonej mieszanki warzywnej (9.I; 9.II).

Testy API nie umożliwiają identyfikacji gatunku w przypadku rodzaju *Geotrichum* czy *Schizosaccharomyces* i dlatego w tabeli 2 podano tylko rodzaj. Dla szczepów zaznaczonych gwiazdką (tab. 2, 4) w identyfikacji molekularnej uzyskano odmienne wyniki niż w identyfikacji fizjologicznej. Dla wszystkich szczepów wykonano analizę PCR-RFLP - rDNA oraz RAPD z czterema starterami. Wyniki w postaci poszczególnych elektroforogramów przedstawiono na rysunkach (rys. 1, 2).

Tabela 2. Zidentyfikowane testem API 32C gatunki drożdży wyizolowane z kiszonych ogórków oraz częstość ich występowania (% ogólnej liczby izolatów)

Table 2. API 32C identification of yeasts strains isolated from pickled cucumber and frequency of occurrence (% of all isolated strains)

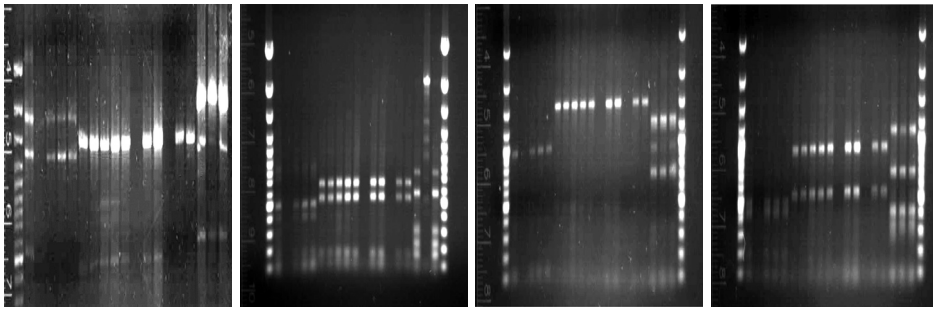
Gatunek Species	Szczep Strain	Procent z ogólnej liczby szczepów [%] Percentage according to total strains number
<i>C. utilis/C. pelliculosa</i>	1.1 ^a ; 1.3 ^a ; 4.1 ^{a*} ; 5.1; 6.2	12,2
<i>C. guilliermondi/C. famata</i>	1.4 ^a ; 4.2 ^{b*} ; 5.2	7,3
<i>S. cerevisiae</i>	1.5 ^c ; 3.2 ^c ; 3.1 ^d ; 3.II; 3.III ^d ; 4.3 ^{b*} ; 4.4 ^{e*} ; 5.3; 5.4; 5.7; 6.1 ^f ; 6.3 ^f ; 6.5 [*]	31,0
<i>C. pelliculosa</i>	1.III ^a ; 1.IV ^a	4,9
<i>P. etchellsii</i>	1.V; 4.5 ^{e*} ; 4.6 ^{e*}	7,3
<i>C. lipolytica/Yarrowia lipolytica</i>	2.1; 2.2; 2.4; 2.5; 2.6; 2.I; 2.II; 2.III; 2.IV; 2.V; 6.4 ^{g*}	11/26,8
<i>P. ohmeri</i>	2.3 [*] ; 3.4	2/4,9
<i>C. holmii</i>	3.1; 3.3	2/4,9
<i>Geotrichum</i> sp.	5.5 ^g	1/2,4

* odmiennie zidentyfikowane w analizie molekularnej – differently identified in molecular analysis

^{a-g} izolaty wykazujące wzajemnie wysokie podobieństwo w analizie molekularnej – strains showing mutually high similarity in molecular analysis

Kiszone ogórki

Wśród izolatów z fermentowanych ogórków w identyfikacji API 32C dominowały szczepy *S. cerevisiae* (13) oraz *C. lipolytica* (11) stanowiące odpowiednio 31 i 25,6% izolowanych drożdży (tab. 2). Trzy szczepy zidentyfikowano jako *P. etchellsii*, po dwa jako *C. pelliculosa*, *P. ohmerii*, *C. holmii*. Dziewięć szczepów zidentyfikowano metodą API32 tylko do rodzaju *Candida* (8 izolatów: *C. utilis/C. pelliculosa/C. guilliermondi/C. famata*) i *Geotrichum* (1 szczep). Zbiorcza analiza PCR-RFLP rDNA izolatów z kiszonych ogórków wykazała bardzo wysokie podobieństwo szczepów zidentyfikowanych testami API jako *C. lipolytica/Y. lipolytica* (rys. 3). Pośród 11 szczepów podobnych w 99% znalazł się jeden (2.3) zidentyfikowany w testach API jako *P. ohmerii*. Należy zatem uznać, że identyfikacja API 32C dla tego szczepu nie była prawidłowa. Szczep 6.4, zidentyfikowany z wykorzystaniem testów API 32C jako *C. lipolytica/Y. lipolytica*, wykazał z kolei najwyższe podobieństwo do szczepu 5.5 (81%), zidentyfikowanego w testach API jako *Geotrichum* sp.



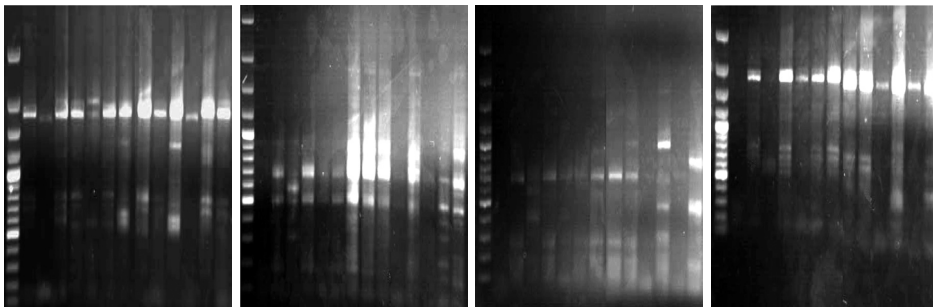
PCR NS3-ITS4

Hae III

Msp I

Scr FI

Kolejność ścieżek od lewej: marker oraz szczepy – Order of the paths from the left: marker and strains
 1.1; 1.3; 1.4; 1.III; 1.IV; 2.1; 2.2; 2.3; 2.4; 2.5; 2.6; 2.I; 2.II; 2.III; 2.IV; 2.V; 3.I; 3.II; 3.III



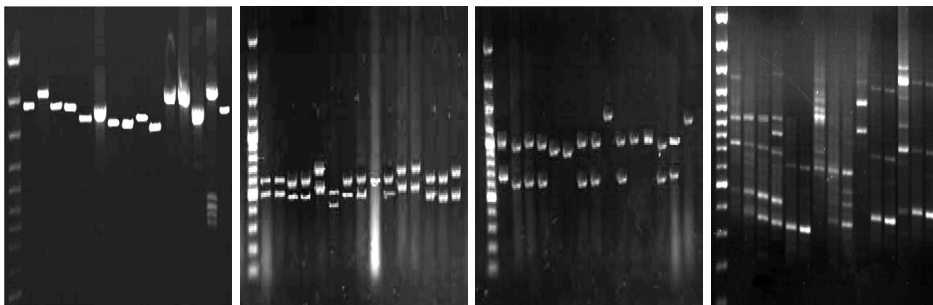
PCR NS3-ITS4

Hae III

Msp I

Scr FI

Kolejność ścieżek od lewej: marker oraz szczepy – Order of the paths from the left: marker and strains
 4.I; 5.I; 5.III; 5.IV; 5.V; 5.VI; 7.1; 7.2; 7.3; 7.4; 8.1; 8.2; 8.3



PCR NS3-ITS4

Hae III

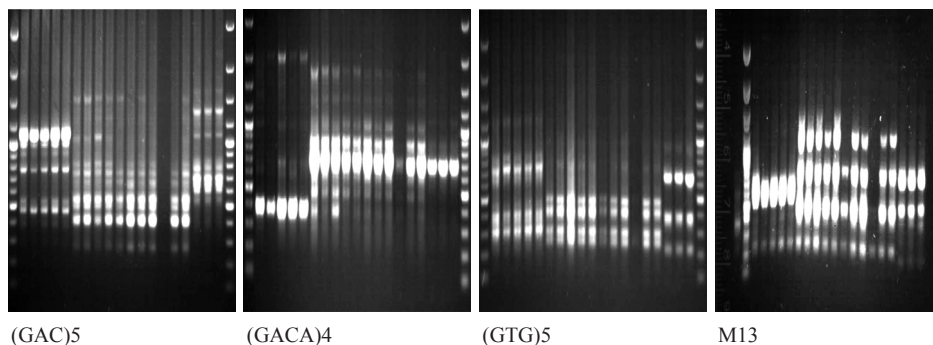
Msp I

Scr FI

Kolejność ścieżek od lewej: marker oraz szczepy – Order of the paths from the left: marker and strains
 7.I; 7.II; 7.III; 7.IV; 7.V; 8.I; 8.II; 8.III; 9.1; 9.2; 9.I; 9.II; 9.III; 10.1; 10.2

Rys. 1. Amplifikacja i analiza restrykcyjna fragmentu NS3-ITS4 genu rDNA niektórych szczepów drożdży wyizolowanych z kiszonych ogórków (A), z kiszonej kapusty (B) oraz kiszonych warzyw (C)

Fig. 1. Amplification and analysis of restrictions place of NS3-ITS4 rDNA gen some of the yeast strains isolated from: pickled cucumber (A), sauerkraut (B) and pickled vegetables (C)



(GAC)5 (GACA)4 (GTG)5 M13
 Kolejność ścieżek od lewej marker oraz szczepy – Order of the paths from the left marker and strains
 1.1; 1.3; 1.4; 1.III; 1.IV; 2.1; 2.2; 2.3; 2.4; 2.5; 2.6; 2.I; 2.II; 2.III; 2.IV; 2.V; 3.1; 3.II; 3.III

Rys. 2. Analiza RAPD z czterema starterami dla wybranych szczepów izolowanych z kiszonych ogórków

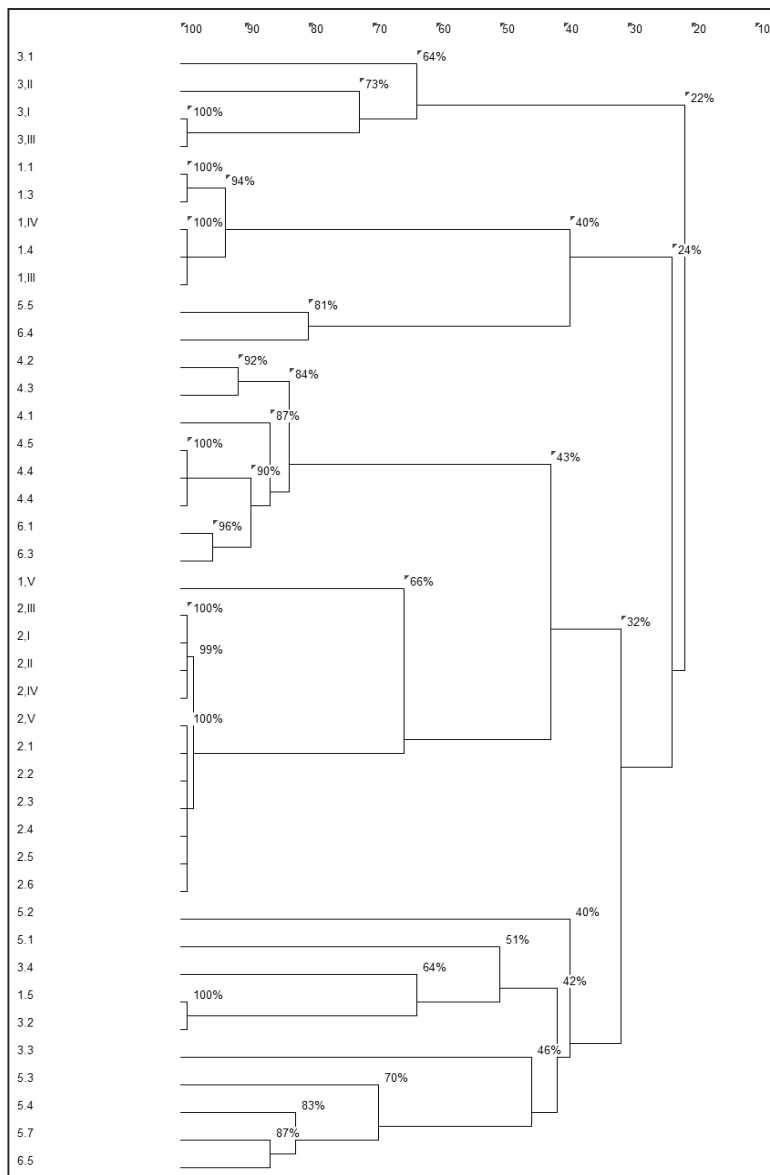
Fig. 2. RAPD analysis with four different starters for the strains isolated from pickled cucumber

Wśród izolatów z fermentowanych ogórków w identyfikacji API 32C dominowały szczepy *S. cerevisiae* (13) oraz *C. lipolytica* (11) stanowiące odpowiednio 31 i 25,6% izolowanych drożdży (tab. 2). Trzy szczepy zidentyfikowano jako *P. etchellsii*, po dwa jako *C. pelliculosa*, *P. ohmerii*, *C. holmii*. Dziewięć szczepów zidentyfikowano metodą API32 tylko do rodzaju *Candida* (8 izolatów: *C. utilis*/*C. pelliculosa*/*C. guilliermondi*/*C. famata*) i *Geotrichum* (1 szczep). Zbiorcza analiza PCR-RFLP rDNA izolatów z kiszonych ogórków wykazała bardzo wysokie podobieństwo szczepów zidentyfikowanych testami API jako *C. lipolytica*/*Y. lipolytica* (rys. 3). Pośród 11 szczepów podobnych w 99% znalazł się jeden (2.3) zidentyfikowany w testach API jako *P. ohmerii*. Należy zatem uznać, że identyfikacja API 32C dla tego szczepu nie była prawidłowa. Szczep 6.4, zidentyfikowany z wykorzystaniem testów API 32C jako *C. lipolytica*/*Y. lipolytica*, wykazał z kolei najwyższe 81% podobieństwo do szczepu 5.5 zidentyfikowanego jako *Geotrichum* sp. Wszystkie szczepy z kiszonych ogórków z Kaczyc (4.1–4.6), pomimo zaklasyfikowania na podstawie wyników testów API 32C do różnych gatunków (tab. 2), wykazywały wysokie 84% podobieństwo (rys. 4) i należałyby je zaliczyć do jednego gatunku (*S. cerevisiae*). Wiele badanych izolatów wykazywało wzajemnie 96–100% podobieństwo (rys. 3). Podobne izolaty zgrupowano w siedem zespołów (a–g). Poszczególne zespoły obejmują następujące szczepy: a – 1.1/1.3/1.IV/1.4/1.III; b – 4.2/4.3; c – 1.5/3.2; d – 3.I/3.III; e – 4.5/4.4/4.6; f – 6.1/6.3 oraz g – 6.4/5.5 (tab. 2). Na podstawie tak wysokiego podobieństwa należy uznać, że szczepy z danej grupy przynależą do tego samego gatunku.

Gatunkowa przynależność wybranych szczepów izolowanych z ogórków nie została w pełni potwierdzona zastosowanym protokołem analitycznym. Powielając metodą PCR fragment rDNA (NS3-ITS4), uzyskano produkty różniące się wielkością oraz odmiennym wzorem w analizie restrykcyjnej. Przykładowe wyniki analizy restrykcyjnej (PCR-RFLP rDNA) wskazują na odmienność izolatów zidentyfikowanych testami API jako *Y. lipolytica* od wzorców tego gatunku dostępnych w WEPABAZ (rys. 4A). Wykazują one tylko 56% podobieństwa do wzorców i 100% pomiędzy sobą. Identyczny profil dla izolatów i wzorców otrzymano w analizie ampikonów po trawieniu enzymem restrykcyjnym *MspI* (rys. 1A), natomiast odmienny po trawieniu enzymem *ScrFI*. Enzym ten hydrolizuje produkt amplifikacji wybranego regionu rDNA (1590/1600 pz) izolatów *Y. lipolytica* na

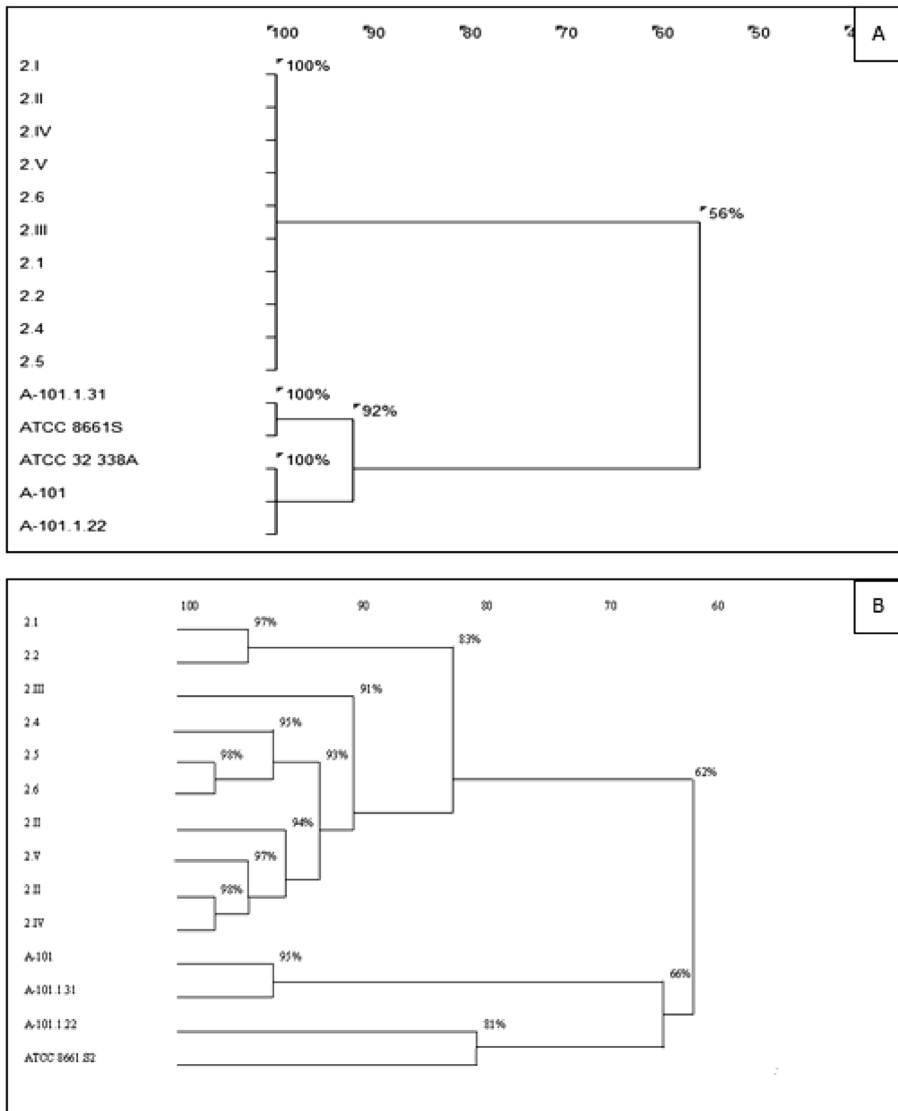
dwa duże fragmenty (1000 pz i 580 pz), podczas gdy w przypadku wzorców odcięcie dotyczy małego fragmentu nie obserwowanego w elektroforezie (poniżej 150 pz).

W analizie RAPD z czterema starterami izolaty *Y. lipolytica* wykazywały od 83 do 98% podobieństwa (rys. 4B). Można je zatem uznać za identyczne, chociaż ich profil różnił się od profili wzorców wykorzystywanych w pracy.



Rys. 3. Podobieństwo szczepów wyizolowanych z kiszonych ogórków na podstawie wyników analizy PCR-RFLP rDNA

Fig. 3. Similarity of strains isolated from pickled cucumbers on the basis of the results of PCR-RFLP rDNA analysis



Rys. 4. Podobieństwo szczepów *Y. lipolytica* (wzorców i izolatów) na podstawie (A) analizy PCR-RFLP rDNA oraz (B) zbiorczej PCR-RFLP rDNA plus RAPD z czterema starterami

Fig. 4. The similarity of *Y. lipolytica* strains on the basis of PCR-RFLP rDNA analysis (A) and (B) global: PCR-RFLP rDNA and four starter's RAPD analysis (B)

Kiszona kapusta

Wśród izolatów z kiszanej kapusty w identyfikacji API 32C wykazano osiem szczepów *S. cerevisiae* oraz po jednym z gatunków: *C. holmii*, *P. ohmerii*, *P. etchellsii* (tab. 3). Tylko cztery izolaty zidentyfikowano do rodzaju *Candida* (*C. utilis*/*C. pelliculosa*/*C. guilliermondi*/*C. famata*). Szczepy te były bardzo zróżnicowane w analizie PCR-RFLP rDNA (rys. 5). Izolaty 4.P oraz 6.I wykazały natomiast 100% podobieństwo, pomimo różnej identyfikacji metodą API 32C.

Tabela 3. Zidentyfikowane testem API 32C gatunki drożdży wyizolowane z kiszanej kapusty oraz częstość ich występowania (% ogólnej liczby izolatów).

Table 3. API 32C identification of yeasts strains isolated from sauerkraut and the frequency of occurrence (% of all isolated strains)

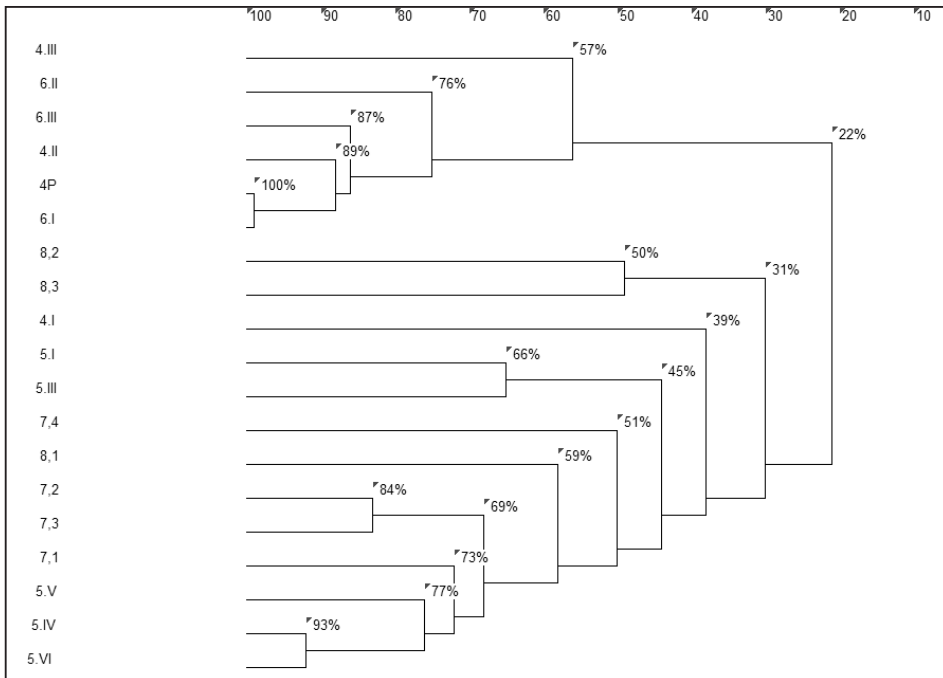
Gatunek Species	Szczepy Strains	Procent z ogólnej liczby szczepów [%] Percentage according to total strains number
<i>S. cerevisiae</i>	4.I; 5.I; 5.IV; 5.V; 6.II; 7.1; 7.3; 7.4	42,1
<i>C. utilis</i> / <i>C. pelliculosa</i>	4.II; 4.III; 8.2; 8.3	21,1
<i>C. guilliermondi</i> / <i>C. famata</i>	4.P*; 7.2	10,5
<i>C. holmii</i>	5.VI; 6.III	10,5
<i>C. lipolytica</i> / <i>Yarrowia lipolytica</i>	6.I	5,3
<i>P. ohmerii</i>	8.1	5,3

*odmiennie zidentyfikowane w analizie molekularnej – differently identified in molecular analysis

W odniesieniu do izolatów z kiszonych sałatek, zidentyfikowanych metodą API jako *S. cerevisiae* (tab. 4), sytuacja była podobna jak w przypadku szczepów zidentyfikowanych jako *C. lipolytica*/*Y. lipolytica*. Izolaty te wykazywały od 68 do 97% podobieństwa pomiędzy sobą (rys. 6A) i tylko 47% podobieństwa do innych gatunków z grupy *Saccharomyces sensu stricto* (rys. 6B). Należy jednak podkreślić, że w pracy jako wzorce stosowano głównie kolekcyjne szczepy o innej etiologii (browarne). Ponadto, porównując izolaty browarne i szczepy z fermentowanej żywności, zwrócono uwagę na to, że powielony fragment genu rDNA (NS3-ITS4) o wielkości ok. 2000 pz w przypadku obu ww. grup po trawieniu enzymem *MspI* dawał dwa fragmenty (rys. 1C). W przypadku izolatów pozyskanych w pracy fragmenty te były jednak o około 200 pz zasad mniejsze. Wskazuje to zatem na obecność w genomie izolatów z fermentowanej żywności, dodatkowych (co najmniej 2) miejsc restrykcji dla tego enzymu i odcięcia krótkich fragmentów nie obserwowanych w elektroforezie.

Kiszane mieszanki warzywne

W kiszanej sałatce warzywnej dominowały z kolei szczepy należące do gatunku *S. cerevisiae* (55,3%) oraz z rodzaju *Candida* (33,3%). W sałatkach tych nie wykryto szczepów z gatunku *Y. lipolytica*. Dla szczepu 7.IV wyizolowanego z fermentowanej sałatki warzywnej potwierdzenie przynależności gatunkowej, aczkolwiek odmiennej niż oznaczono z wykorzystaniem API 32C, uzyskano w dwustopniowej analizie opartej na RFLP-PCR rDNA. W pierwszej wykazano 47% podobieństwa do grupy reprezentowanej przez *Schizosaccharomyces pombe* (rys. 7A), a drugiej 100% podobieństwo do *Sch. japonicus* (rys. 7B).



Rys. 5. Podobieństwo szczepów izolowanych z kiszonej kapusty na podstawie analizy PCR-RFLP rDNA

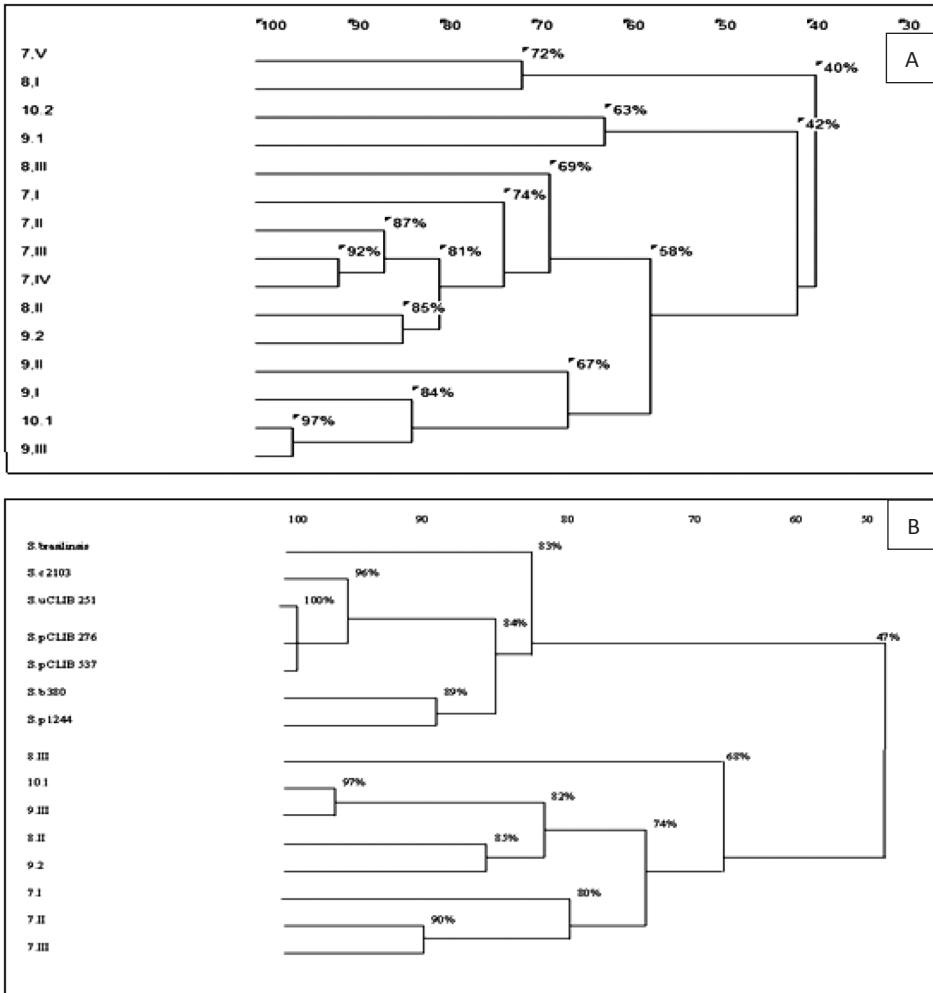
Fig. 5. Similarity of strains isolated from sauerkraut based on of PCR-RFLP rDNA analysis

Tabela 4. Zidentyfikowane testem API 32C gatunki drożdży wyizolowane z kiszonej mieszanki warzywnej oraz częstość ich występowania (% ogólnej liczby izolatów)

Table 4. API 32C identification of yeasts strains isolated from pickled vegetables and the frequency of occurency (% of all isolated strains)

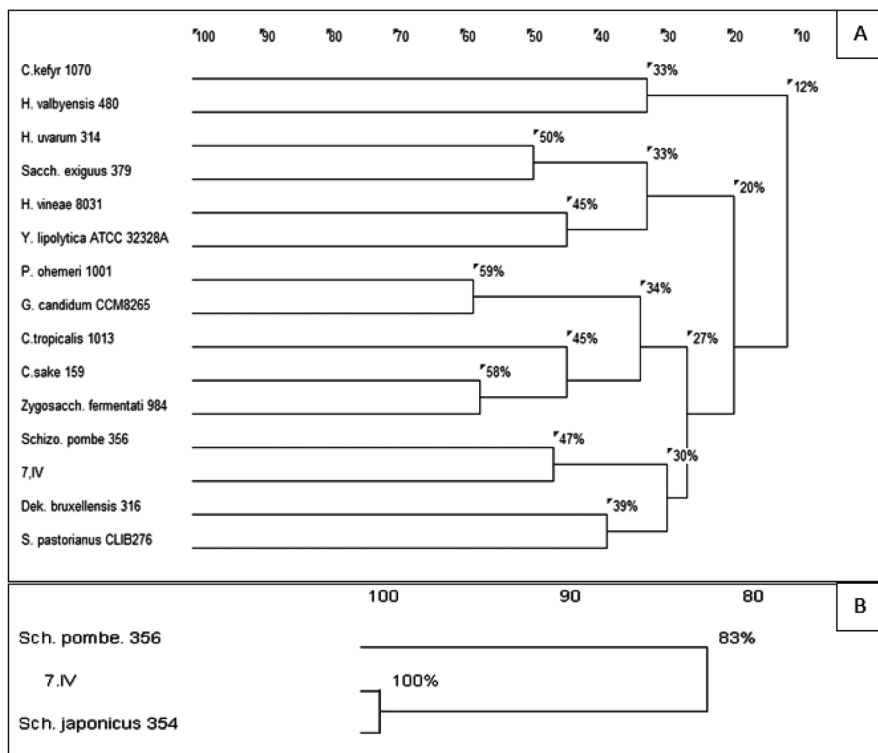
Gatunek Species	Szczepy Strains	Procent z ogólnej liczby szczepów [%] Percentage according to total strains number
<i>S. cerevisiae</i>	7.I; 7.II; 7.III; 8.II; 8.III; 9.2; 9.III; 10.1*	53,3
<i>P. ohmerii</i>	7.IV*	6,7
<i>C. ulilis/C. pelliculosa</i>	7.V; 8.I	13,3
<i>C. holmii</i>	9.1*	6,7
<i>C. guilliermondi/C. famata</i>	9.I; 9.II	13,3
<i>P. etchellsii</i>	10.2*	6,7

*odmiennie zidentyfikowane w analizie molekularnej – differently identified in molecular analysis



Rys. 6. Podobieństwo szczepów izolowanych z kiszonych sałatek warzywnych na podstawie analizy PCR-RFLP rDNA. (A) podobieństwo wszystkich izolatów; (B) podobieństwo szczepów zidentyfikowanych w API jako *S. cerevisiae* do siedmiu wzorcowych szczepów z rodzaju *Saccharomyces*

Fig. 6. Similarity of strains isolated from pickled vegetables on the basis of PCR-RFLP rDNA analysis. (A) similarity between all strains; (B) similarity of strains identified by API test as a *S. cerevisiae* to seven type strains of *Saccharomyces* gender



Rys. 7. Molekularna identyfikacja szczepu 7.IV do rodzaju (A) oraz do gatunku (B) oparta na analizie PCR-RFLP rDNA

Fig. 7. Molecular identification of 7.IV strain to the genus (A) and species (B) based on PCR-RFLP rDNA analysis

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Wysoce czułe i powtarzalne metody oparte na technikach analizujących materiał genetyczny są coraz bardziej popularne jako metody różnicowania szczepów mikroorganizmów. W badaniu drożdży najczęściej wykorzystywane są dwie techniki: polimorfizm długości fragmentów restrykcji (RFLP) genów rDNA oraz losowo amplifikowany polimorficzny DNA (RAPD) [Abriouel i in. 2008]. Pierwsza z nich, bazująca na analizie restrykcyjnej genów rRNA (PCR-RFLP rDNA), pozwala na różnicowanie szczepów należących do tego samego rodzaju [Yamagishi i in. 1999, Loureiro i Querol 1999], a często nawet do tego samego gatunku [Baleiras-Couto i in. 1996, Perez i in. 2001, Raspor i in. 2006]. W metodzie tej wykorzystana jest budowa genu 45S pre-rRNA kodującego jednocześnie trzy rybosomalne kwasy nukleinowe (18S rRNA; 5,8S rRNA i 26S rRNA) i zawierającego sekwencje niekodujące (ITS1, ITS2) [Gromadka i Rytka 2000]. Gen ten występuje w wielu kopiach w genomie jądrowym komórki eukariotycznej. U kilkunastu gatunków drożdży kodujące obszary tego genu są wysoce homologiczne (od 87–99%), podczas gdy obszary niekodujące różnią się zarówno wielkością, jak i sekwencją nukleotydową [de Barros Lopes i in. 1996, Souciet i in. 2000, Las Heras-Vazquez i in. 2003, Lopandic i in.

2006, Senses-Ergul i in. 2006]. Pham i in. [2011] stosując technikę PCR-RFLP rDNA opartą na analizie restrykcyjnej regionów ITS1 oraz ITS2 z wykorzystaniem 3 endonukleaz (*CfoI*, *HaeIII*, *HinfI*), wykazali obecność 59 szczepów drożdży „dzikich” (nie *Saccharomyces* i nie browarnych *Saccharomyces*) skażających proces produkcji piwa, a także obecność izolatów z rodzaju *Pichia*. W tej pracy także wykazano odmiennosc niekodujących fragmentów (ITS1 i ITS2).

Druga z ww. technik biologii molekularnej RAPD jest odmianą PCR. Jak dotąd była ona wykorzystywana m.in. do różnicowania drożdży górnej i dolnej fermentacji [Tournai-Lehoczki i Dlauchy 2000] oraz drożdży występujących w różnych produktach żywnościowych [Robak i in. 2005, Piegza i in. 2006, Walczak i in. 2007]. Fakharedine i in. [2011] zastosowali mikrosatelitarny starter (GTG)₅ do różnicowania drożdży zawartych w ściekach z pochodzących z wycłaczarni oleju z oliwek. Guenaoui i in. [2013] z kolei wykorzystali technikę RAPD w badaniu pokrewieństwa odmian czosnku dzikiego (*Allium ampeloprasum*). W porównaniu z PCR jedyna różnica w wykonaniu polega na zastosowaniu jednego, a nie dwóch starterów reakcji amplifikacji fragmentu (ów) materiału genetycznego. W RAPD powieleniu ulegają przypadkowe odcinki DNA rozpoczynające się sekwencją komplementarną do zastosowanego startera i kończące sekwencją użytego startera. „Losowe” przyłączanie się starterów podczas PCR zachodzi na całej długości matrycy i dlatego przeprowadzamy w ten sposób „skanowanie” całego genomu. Wadą tej metody jest stosunkowo niska powtarzalność analiz przeprowadzanych przez różne laboratoria [Marciniak i Robak 2013]. Specyficzność RAPD jest ściśle związana z sekwencją wykorzystanego startera i dlatego w celu poprawnego różnicowania często stosuje się kilka amplifikacji z różnymi starterami [Robak i in. 2005]. Wielkość produktów jest także uwarunkowana zastosowanym czasem etapu elongacji podczas PCR. Im jest on krótszy, tym krótsze odcinki ulegają powieleniu. Zmienność produktów w RAPD jest także uwarunkowana zastosowaną polimerazą, dobraną temperaturą annealingu, a nawet wykorzystanym termocyklerem. Dlatego w metodzie RAPD tak istotne jest wybranie odpowiedniego profilu temperaturowo-czasowego podczas reakcji powielania DNA i stosowanie tej samej polimerazy. Niemniej, jest to najtańsza metoda, nieuwarunkowana wcześniejszym poznaniem sekwencji genomu czy wybranych genów.

Metodologia oparta na RAPD sprawdziła się także w przypadku oceny zmian genetycznych jakie zaszły w genomie transformantów *Y. lipolytica*. W czterech analizach RAPD ze starterami M13, (GTG)₅, (GAC)₅ i (GACA)₄ transformanty, w których doszło do homologicznej lub heterologicznej integracji wprowadzanej kasyety, podzieliły się na dwie grupy [Walczak 2009, praca doktorska, dane niepublikowane].

Uzyskane profile elektroforetyczne porównywano ze zgromadzonymi w WEPABAZ wzorcami [Barszczewski i in. 2006]. Nie zawsze uzyskiwano jednak jednoznaczne wyniki. Także klasyczna identyfikacja oparta na testach wzrostowych nie zawsze umożliwia dokonanie pełnej identyfikacji. Verweij i in. [1999] porównali siedem systemów identyfikacji fizjologicznej drożdży, uzyskując właściwy wynik dla 59,6–80,8% badanych szczepów drożdży klinicznych. Biorąc pod uwagę wyniki badań własnych oraz prac innych autorów, należy zatem stwierdzić, że w wielu przypadkach dopiero zderzenie różnych metod umożliwia poprawną identyfikację.

PODSUMOWANIE

Zastosowana metodologia badawcza (identyfikacja fizjologiczna i molekularna) umożliwiła identyfikację i ocenę pokrewieństwa drożdży izolowanych z kiszonych produktów warzywnych. Populacja drożdży izolowanych z fermentowanej żywności cechuje się odmiennymi, od szczepów browarnych czy serowarskich, sekwencjami genomu. W wyniku przeprowadzonych badań wzbogacono kolekcję drożdży w Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności o nowe szczepy, pozyskane w Polsce z naturalnie fermentowanych kiszzonek warzywnych.

WNIOSKI

1. Dominującą mikroflorą drożdżową w kiszonych warzywach są przedstawiciele gatunku *Saccharomyces cerevisiae* i *Yarrowia lipolytica*.

2. Na podstawie analizy profili elektroforetycznych uzyskanych w PCR-RFLP rDNA oraz RAPD wykazano wysokie podobieństwo pośród izolatów zidentyfikowanych jako *S. cerevisiae* oraz izolatów zidentyfikowanych jako *Y. lipolytica*.

3. Szczepy izolowane z fermentowanej żywności wykazują odmienne względem szczepów kolekcyjnych, browarnych i serowarskich właściwości genomu (dodatkowe miejsca restrykcji).

4. W przypadku kilku szczepów molekularna identyfikacja nie potwierdziła przynależności gatunkowej ustalonej na podstawie testów API 32C.

5. Szczepy wyizolowane z jednej partii ogórków, zidentyfikowane jako różne gatunki na podstawie wyników analizy API 32C, w analizie RFLP-PCR rDNA wykazały 84% podobieństwo.

6. Obie zastosowane metody nie dają 100% pewności co do uzyskanych wyników identyfikacji.

7. Metody molekularne jednoznacznie ukazują podobieństwo izolatów należących do tego samego gatunku.

PIŚMIENNICTWO

- Abriouel H., Omar N.B., Pulido R.P., Lopez L.R., Ortega E., Canamero M.M, Galvez A., 2008. Vegetable fermentations [in:] Molecular techniques in the microbial ecology of fermented foods, (eds.) Cocoli L., Ercolini D., Springer, NY. 145–161.
- Andrighetto C., Psomas E., Tzanetakis N., Suzzi G., Lombardi A., 2000. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) for the identification of yeasts isolated from dairy products. Letters in Applied Microbiology, 30, 5–9.
- Baleiras-Couto M.M., Eijmsa B., Hofsta H., Huisin't Veld J.H., van der Vossen J.M. B.M., 1996. Evaluation of molecular typing techniques to assign genetic diversity among *Saccharomyces cerevisiae* strains. Applied and Environmental Microbiology, 62, 41–46.
- Barszczewski W., Robak M., 2004. Differentiation of contaminating yeasts in brewery by PCR-based techniques. Food Microbiology 21, 227–231.
- Barszczewski W., Robak M., 2006. PCR-based differentiation and homology of brewing and type strains of the genus *Saccharomyces*. J. Inst. Brew., 112(2), 165–172.
- Bougnoux M-E., Aanensen D.M., Morand S., Theraud M., Spratt B.G., d'Enfert Ch., 2004. Multilocus sequence typing of *Candida albicans*: strategies, data exchange and applications. Infection, Genetics and Evolution, 4, 243–252.

- Cocolin L., Campolongo S., Gorra R., Rolle L., Rantsiou K., 2011. *Saccharomyces cerevisiae* biodiversity during the brewing process of an artisanal beer: A preliminary study. *J. Inst. Brew.* 117(3), 352–358.
- de Barros Lopes M., Soden A., Henschke P.A., Langridge P., 1996. PCR differentiation of commercial yeast strains using intron splice site primers. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 4514–4520.
- Giraffa G., Carminati D., 2008. Molecular techniques in food fermentation: principles and applications [in:] *Molecular techniques in the microbial ecology of fermented foods* (eds.) Cocolin L., Ercolini D., Springer, NY. 1–30.
- Fakharedine N., Ouadghiri M., Amar M., Winterton P., Hafidi M., Ouhdouch Y., 2011. Isolation and identification of a yeast strain involved in the degradation of Marrakech olive mill wastewater. *Eurasia J. Biosci.* 5, 127–137.
- Gromadka R., Rytka J., 2000. Ribosome biogenesis and nucleolar function in yeast. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 5, 191–216.
- Guenoui C., Mang S., Figliuolo G., Neffati M., 2013. Diversity in *Allium ampeloprasum*: from small and wild to large and cultivated. *Genet. Resour. Crop Evol.* 60, 97–114.
- Hublot C., Guyot J-P., 2008. Other fermentations [in:] *Molecular techniques in the microbial ecology of fermented foods* (eds.) Cocolin L., Ercolini D., Springer, NY. 208–224.
- Jacobsen M.D., Bounoux M-E., d'Enfert Ch., Odds F.C., 2008. Multilocus sequence typing of *Candida albicans* isolates from animals, *Research in Microbiology*, 159, 436–440.
- Las Heras-Vazquez F.R., Mingorance-Cazorla L., Clemente-Jimenez C., Rodriguez-Vico F., 2003. Identification of yeast species from orange fruit and juice by RFLP and sequence analysis of the 5.8S rRNA gene and the two internal transcribed spacer. *FEMS Yeast Research*, 3, 3–9.
- Lopandic K., Zelger S., Bánszky L.K., Eliskases-Lechner F., Prillinger H., 2006. Identification of yeasts associated with milk products using traditional and molecular techniques. *Food Microbiology*, 23(4), 341–350.
- Loureiro V., Querol A., 1999. The prevalence and control of spoilage yeasts in food and beverages. *Trends in Food Science and Technology*, 10, 356–365.
- Marciniak M., Robak M., 2012. PCR jako narzędzie do identyfikacji i różnicowania drobnoustrojów. *Acta Sci. Pol. Biotechnologia* 11(2), 5–16.
- Mercado L., Dalcer A., Masuelli R., Combina M., 2007. Diversity of *Saccharomyces* strains on grapes and winery surfaces: Analysis of their contribution to fermentative flora of Malbec wine from Mendoza (Argentina) during two consecutive years. *Food Microbiology*, 24(4), 403–412.
- Perez M.A., Gallego F.J., Hidalgo P., 2001. Evaluation of molecular techniques for the genetic characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains. *FEMS Microbiology Letters*, 205, 375–378.
- Pham T., Wimalasena T., Box W.G., Koivuranta K., Storgards E., Smart K.A., Gibson B.R., 2011. Evaluation of ITS PCR and RFLP for differentiation and identification of brewing yeast and brewery 'Wild' yeast contaminants. *J. Inst. Brew.* 117(4), 556–568.
- Piezza M., Barszczewski W., Witkowska D., Stempniewicz R., Robak M., 2006. Scanning of *Geotrichum candidum* genome by RFLP-PCR of rDNA and RAPD. *EJPAU, Biotechnology*, 9(3), art. 21.
- Pitarch A., Abian J., Carrascal M., Sanchez M., Nombela C., Gil C., 2004. Proteomics-based identification of novel *Candida albicans* anti-gens for diagnostic of systematic candidiasis in patient with underlying hematological malignancies. *Proteomics*, 10, 3084–3106.
- Połomska X., Juszczak P., Cadez N., Raspor P., Robak M., Wojtatowicz M., 2007. Comparison of physiological and PCR-RFLP rDNA identification of yeast species commonly found in cheese. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 57(2), 221–226.
- Rantsiou K., Cocolin L., 2008. Fermented meat products [in:] *Molecular techniques in the microbial ecology of fermented foods* (eds.) Cocolin L., Ercolini D., Springer, NY. 91–118.

- Robak M., Baranowska K., Barszczewski W., Wojtatowicz M., 2005. RAPD jako metoda różnicowania i identyfikacji drożdży. *Biotechnologia*, 4(71), 143–156.
- Senses-Ergul S., Agoston R., Belak A., Deak T., 2006. Characterization of some yeasts isolated from foods by traditional and molecular tests. *Int. J. Food Microbiol.*, 108(1), 120–124.
- Souciet J.-L. i wsp., 2000. A set of yeast species for molecular evolution studies. *FEBS Letters*, 487, 1–10.
- Tominaga T., 2004. Rapid identification of pickle yeasts by fluorescent PCR and microtemperature-gradient gel electrophoresis. *FEMS Microbiology Letters*, 238(1), 43–48.
- Tornai-Lehoczki J., Dlauchy D., 2000. Delimitation of brewing yeast strains using different molecular techniques. *Int. J. Food Microbiol.*, 62, 37–45.
- Vogel R.F., Ehrmann M.A., 2008. Sourdough fermentations, [in:] *Molecular techniques in the microbial ecology of fermented foods*. (eds) Cocolin L., Ercolini D., Springer, NY. 119–144.
- Walczak E., Czaplinska A., Barszczewski W., Wilgosz M., Wojtatowicz M., Robak M., 2007. RAPD with microsatellite as a tool for differentiation of *Candida* genus yeasts isolated in brewing. *Food Microbiology*, 24, 305–312.
- Yamagishi H., Otsuta Y., Funahashi W., Ogata T., Sakai K., 1999. Differentiation between brewing and non-brewing yeasts using a combination of PCR and RFLP. *J. Appl. Microbiol.*, 86, 505–513.
- Zaręba D., Ziarno M., 2011. Alternatywne probiotyczne napoje warzywne i owocowe. *Bromat. Chem. Toksykol.* XLIV(2), 160–168.

YEASTS MICROFLORA OF NATURALLY FERMENTED VEGETABLES

Abstract. This research aims at determining which yeast types can be encountered in the following home products: pickled cucumbers, sauerkraut and mixed pickled vegetables. Seventy-five strains of yeast have been isolated from the pickles selected for the research. These strains have been identified on the basis of API tests (bioMerieux), amplification of the selected regions of rDNA genes (NS3-ITS4) and restrictive analysis, as well as genome scanning, performed in order to detect microsatellite sequences. Yeast *Saccharomyces cerevisiae* (38.7% isolates) and *Yarrowia lipolytica* (25.6% isolates) have been determined as a dominant microflora for the pickles. There have been also isolated strains belonging to the following types: *Pichia etchellsii*, *P. ohmerii*, *Candida holmii*, *C. pelliculosa* and *Shizosaccharomyces japonicus*. With the use of API 32C, some isolates have been identified merely in accordance to their type, and due to a limited data base of model strains, not all the isolates have been possible to be classified on the level on their type with the support of molecular techniques. The obtained results of the research allowed to supply the database with new yeast strains (strains of different restrictive profiles), which should consequently facilitate conducting the identifying works.

Key words: yeast, RAPD, PCR, RLFP, pickles

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 30.03.2013

Do cytowania – For citation: Lazar Z., Piegza M., Walczak E., Barszczewski W., Robak M., 2013. Mikroflora drożdżowa naturalnie fermentowanych warzyw, *Acta Sci. Pol. Biotechnol.*, 12(1), 19–36.

BIOSYNTENZA ERYTRYTOLU Z GLICEROLU PRZEZ SZCZEP *YARROWIA LIPOLYTICA* WRATISLAVIA K1-UV21 W RÓŻNYCH SYSTEMACH HODOWLANYCH

Anita Rywińska, Ludwika Tomaszewska, Krzysztof Cybulski,
Waldemar Rymowicz

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Streszczenie. Erytrytol, czterowęglowy alkohol wielowodorotlenowy, jest substancją słodzącą coraz częściej stosowaną jako zamiennik sacharozy. Jego produkcja na skalę przemysłową odbywa się wyłącznie w procesach biotechnologicznych.

Celem pracy było porównanie wydajności i dynamiki produkcji erytrytolu z glicerolu odpadowego, pochodzącego z produkcji biodiesla, przez szczep *Yarrowia lipolytica* Wratislavia K1-UV21 w hodowli okresowej, okresowej zasilanej i powtórzeniowej hodowli okresowej. Hodowle prowadzono w bioreaktorze Biostat B Plus. Całkowite stężenie glicerolu wynosiło 150 i 250 g·dm⁻³, odpowiednio w hodowli okresowej i okresowej zasilanej. Powtórzeniową hodowlę okresową rozpoczęto jako hodowlę okresową zasilaną, a po wyczerpaniu glicerolu, z bioreaktora usunięto 40% jego zawartości i uzupełniono taką samą objętością świeżego podłoża. Po każdej wymianie stężenie glicerolu wynosiło 100 g·dm⁻³. Przeprowadzono 4 takie cykle. W hodowli okresowej i okresowej zasilanej drożdże produkowały odpowiednio 84,1 i 136 g·dm⁻³ erytrytolu. Wydajność produkcji tego związku była zbliżona (0,53 g·g⁻¹) w obu systemach hodowlanych, natomiast szybkość objętościowa, jak i właściwa syntezy erytrytolu była wyższa w hodowli okresowej. Podczas powtórzeniowej hodowli okresowej wysoką wydajność (0,51–0,55 g·g⁻¹), jak i dynamikę produkcji erytrytolu (0,80–1,05 g·dm⁻³·h⁻¹) uzyskano podczas trzech pierwszych cykli.

Słowa kluczowe: erytrytol, *Yarrowia lipolytica*, glicerol odpadowy, hodowla okresowa, hodowla okresowa zasilana, powtórzeniowa hodowla okresowa

WSTĘP

Erytrytol jest jedynym poliolem, do którego produkcji na skalę przemysłową wykorzystuje się naturalny proces fermentacji [O'Brien-Nabros i in. 2011]. Zdolność do nadprodukcji

Adres do korespondencji – Corresponding author: Anita Rywińska, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, ul. Chelmońskiego 37/41, 51-630 Wrocław, e-mail: anita.rywinska@up.wroc.pl

znacznych ilości erytrytolu posiadają takie rodzaje grzybów strzępkowych i drożdży jak np.: *Moniliella*, *Aureobasidium*, *Trichosporon*, *Candida*, *Pichia*, *Torulopsis*, *Trigonopsis* [Moon i in. 2010]. Jako źródło węgla i energii wykorzystywane są w tym procesie: czysta glukoza, sacharoza, a także glukoza pochodzącej z enzymatycznej lub chemicznej hydrolizy skrobi kukurydzianej albo skrobi pochodzącej z pszenicy [Aoki i in. 1993]. Informacje dotyczące wykorzystania innych substratów jak do tej pory są jednostkowe [Jeya i in. 2009, Rymowicz i in. 2009, Ueda i Yamagishi 1997].

Badania nad produkcją erytrytolu skupiają się nie tylko na izolacji szczepów i ich ulepszaniu przy użyciu klasycznych metod mutagenizacji, ale także na optymalizacji warunków procesu technologicznego w ramach hodowli okresowych, okresowych z zasilaniem czy powtórzeniowych hodowli okresowych [Jeya i in. 2009, Oh i in. 2001, Yang i in. 1999]. W zależności od użytego mikroorganizmu warunki wzrostu i produkcji erytrytolu mogą być różne. Hodowle okresowe z zasilaniem mają tę przewagę nad prostymi hodowlami okresowymi, że pozwalają m.in. na ciągłe kontrolowanie stężenia składników podłoża w trakcie trwania hodowli, skrócenie fazy logarytmicznego wzrostu czy zwiększenie stężenia biomasy, ale przede wszystkim umożliwiają stosowanie większych ilości źródła węgla.

Celem niniejszej pracy było porównanie wydajności i dynamiki produkcji erytrytolu z glicerolu odpadowego przez szczep *Y. lipolytica* Wratislavia K1-UV21 w hodowli okresowej, okresowej zasilanej i powtórzeniowej hodowli okresowej.

MATERIAŁ I METODY

Mikroorganizmy. Przedmiotem badań był szczep drożdży *Yarrowia lipolytica* Wratislavia K1-UV21 uzyskany w wyniku mutagenезы indukowanej promieniowaniem UV w szczepie *Y. lipolytica* Wratislavia K1 [Rywińska i in. 2012].

Substrat. W badaniach wykorzystano czysty glicerol (98%) oraz glicerol odpadowy z produkcji biodiesla, pochodzący z rafinerii Trzebinia (grupa LOTOS) o czystości 76% (v/w) i zawartości NaCl 7,6%.

Podłoża. Podłoża inokulacyjne do hodowli bioreaktorowych zawierało ($\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$): glicerol (98%) – 50,0; ekstrakt drożdżowy – 3,0; ekstrakt słodowy – 3,0; bactopecton – 5,0; woda destylowana do 1 dm^3 . Podłoża produkcyjne do hodowli w bioreaktorach miało skład ($\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$): glicerol – 150 (hodowle okresowe) lub 250 (hodowle okresowe zasilane i powtórzeniowe hodowle okresowe); $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 2,25; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 1,0; KH_2PO_4 – 0,22; ekstrakt drożdżowy – 1,0; NaCl – 26,4; woda wodociągowa – do 1 dm^3 .

Dla uzyskania stężenia glicerolu 150 i 250 $\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ do podłoża (w hodowlach z substratem odpadowym) wprowadzano odpowiednio 197, 329 $\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ glicerolu odpadowego.

Podłoża sterylizowano w 121°C przez 20 minut.

Warunki prowadzenia hodowli

Hodowle inokulacyjne. Hodowle inokulacyjne prowadzono analogicznie jak w pracy Tomaszewskiej i in. [2011].

Hodowle produkcyjne w bioreaktorach. Proces biosyntezy erytrytolu prowadzono w 5-litrowym bioreaktorze Biostat B Plus. Szybkość przepływu powietrza wynosiła 0,6 vvm, szybkość obrotowa mieszałki 400–1100 rpm, temperatura 30°C. W czasie procesu pH = 3,0 utrzymywano automatycznie za pomocą 20% NaOH.

W hodowlach okresowych (batch culture) początkowe stężenie glicerolu wynosiło $150 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$, objętość robocza 2 dm^3 , proces prowadzono do całkowitego wyczerpania glicerolu.

W hodowlach okresowych zasilanych (fed-batch culture) po wprowadzeniu inokulum do bioreaktora objętość robocza wynosiła około $1,65 \text{ dm}^3$. Początkowe stężenie glicerolu w tych procesach wynosiło około $100 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$. Kolejne porcje glicerolu, do uzyskania jego całkowitego stężenia $250 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ oraz objętości roboczej bioreaktora 2 dm^3 , wprowadzano po obniżeniu stężenia substratu do około $5\text{--}18 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$, zgodnie z oznaczeniami na rysunkach 2 i 3.

Powtórzeniowe hodowle okresowe (repeated-batch culture) poprowadzono jako kontynuację hodowli okresowych zasilanych. Po wyczerpaniu glicerolu odebrano z bioreaktora $0,8 \text{ dm}^3$ zawiesiny komórkowej (co stanowiło 40% jego zawartości) i uzupełniano analogiczną objętością świeżego podłoża do objętości 2 dm^3 , przy czym stężenie glicerolu po każdej wymianie wynosiło $100 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$. Każdorazowo (w przypadku glicerolu czystego i odpadowego) przeprowadzono cztery takie wymiany.

Metody analityczne

Biomasę, stężenie glicerolu, erytrytoli, mannitolu, arabitoli, kwasu cytrynowego oraz kwasu α -ketoglutarynowego oznaczano zgodnie z metodyką opisaną w pracy Rywińskiej i in. [2012].

Spis symboli

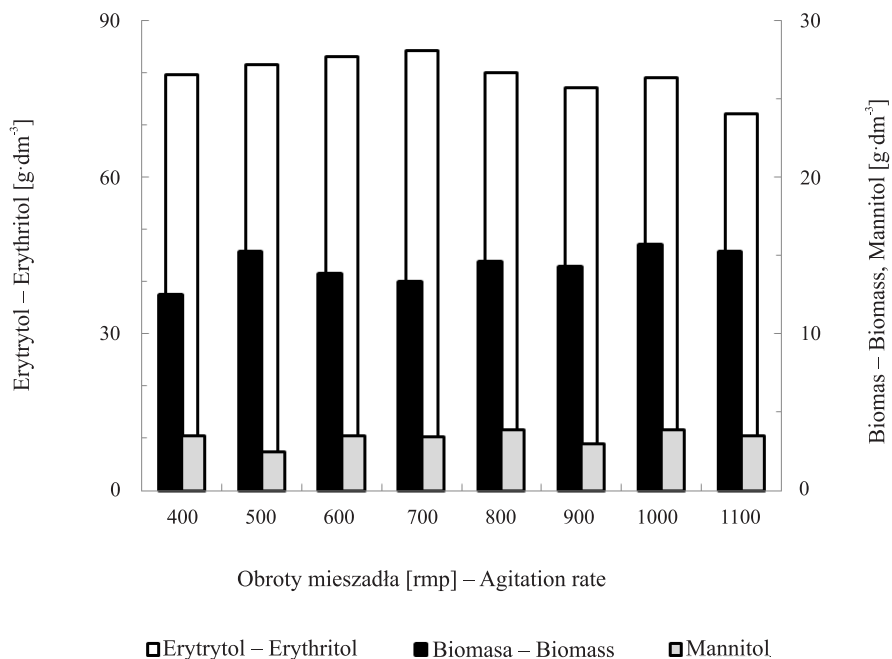
- Q – szybkość objętościowa produkcji erytrytoli, volumetric erythritol production rate ($\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$),
q – szybkość właściwa produkcji erytrytoli, erythritol specific production rate ($\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$),
Y – wydajność produkcji erytrytoli, erythritol production yield ($\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$).

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Wykorzystany w niniejszej pracy szczep *Y. lipolytica* Wratislavia K1-UV21 został wyłoniony spośród 24 szczepów, uzyskanych w wyniku mutagenizacji promieniowaniem UV szczepu Wratislavia K1 [Rywińska i in. 2012].

Pierwszym etapem badań prezentowanych w niniejszej pracy był dobór szybkości obrotów mieszadła do wydajnej biosyntezy erytrytoli z glicerolu odpadowego. Przeprowadzono hodowle okresowe, przy stałym napowietrzaniu i szybkości obrotów mieszadła wynoszącej od 400 do 1100 rpm. Stężenie biomasy, erytrytoli i mannitolu przedstawiono na rysunku 1, natomiast wartości parametrów produkcji zestawiono w tabeli 1. Stężenie biomasy w fazie stacjonarnej wzrostu wynosiło od $12,5 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ (przy 400 rpm) do $15,7 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ (przy 1000 rpm). W badanym zakresie obrotów mieszadła drożdże produkowały podobne ilości erytrytoli, od 72 do $85 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$, przy czym najwięcej tego związku uzyskano przy szybkości obrotów 700 rpm. Warto zauważyć, że jest to jak dotąd najwyższe stężenie erytrytoli uzyskane w hodowlach okresowych z udziałem drożdży *Y. lipolytica* (tab. 2). Wpływ obrotów mieszadła na wydajność i szybkość produkcji erytrytoli

z glicerolu odpadowego przez szczep *Wratislavia K1* badali Marcinkiewicz i in. [2012]. Najwyższe stężenie erytrytoli, $80 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$, uzyskano przy 800 rpm, aczkolwiek hodowle prowadzono przy szybkości napowietrzania 0,48 vvm, czyli niższej niż w badaniach prezentowanych w tej pracy.



Rys. 1. Wpływ szybkości obrotów mieszadła bioreaktora na stężenie biomasy, erytrytoli i manitolu w hodowlach okresowych szczepu *Y. lipolytica* *Wratislavia K1-UV21*. Substrat: glicerol odpadowy

Fig. 1. Effect of agitation rate on the concentration of biomass, erythritol and mannitol in batch cultures of *Y. lipolytica* *Wratislavia K1-UV21* strain. Substrate: crude glycerol

Tabela 1 Parametry biosyntezy erytrytoli z glicerolu odpadowego przez szczep *Y. lipolytica* *Wratislavia K1-UV21* przy różnych szybkościach obrotów mieszadła

Table 1. Parameters of erythritol biosynthesis from crude glycerol by *Wratislavia K1-UV21* strain of *Y. lipolytica* at various agitation rate

Parametry Parameters	Obroty mieszadła [rpm] – Agitation rate							
	400	500	600	700	800	900	1000	1100
Y [$\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$]	0,48	0,50	0,51	0,53	0,51	0,48	0,49	0,45
Q [$\text{g} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$]	0,49	0,68	0,68	0,8	0,74	0,70	0,77	0,72
q [$\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$]	0,045	0,045	0,049	0,060	0,051	0,049	0,049	0,047

Tabela 2. Porównanie parametrów produkcji erytrytolu z glicerolu przez drożdże *Y. lipolytica*
 Table 2. Comparison of the present results and literature values regarding erythritol production from glycerol by *Y. lipolytica* yeasts

Szczep Strain	Glicerol Glycerol	Erytrytol Erythritol [g·dm ⁻³]	Mannitol [g·dm ⁻³]	Y [g·g ⁻¹]	Q [g·dm ⁻³ ·h ⁻¹]	Lit. Ref.
Hodowle okresowe – Batch cultures Stężenie glicerolu – Concentration of glycerol – 150 g·dm ⁻³						
Wratislavia K1	Czysty – Pure	84,1	3,8	0,50	0,86	Tomaszewska i in. [2012]
	Odpadowy – Crude	80,0	4,5	0,49	1,00	
Wratislavia K1	* Odpadowy Crude	80,0	12,0	0,53	1,01	Marcinkiewicz i in. [2012]
A-10	Czysty – Pure	63,0	9,0	0,41	0,74	Tomaszewska i in. [2011]
	Odpadowy – Crude	52,2	9,3	0,36	0,68	
A-15	Czysty – Pure	71,0	8,0	0,44	0,95	Tomaszewska i in. [2012]
	Odpadowy – Crude	64,9	14,9	0,39	0,72	
AUV ¹	Czysty – Pure	63,0	8,8	0,39	0,84	Tomaszewska i in. [2012]
	Odpadowy – Crude	51,0	5,7	0,34	0,81	
DNIW2a	Czysty – Pure	69,7	-	0,45	0,72	Musiał i in. [2011]
Wratislavia 1.31	Czysty – Pure	59,8	6,0	0,41	0,65	Rywińska i in. [2012]
	Odpadowy – Crude	67,5	5,7	0,46	0,68	
Wratislavia K1-UV21	Czysty – Pure	65,5	3,4	0,45	0,68	Rywińska i in. [2012]
Wratislavia K1-UV21	Odpadowy – Crude	85,0	3,3	0,53	0,80	w pracy this work
Hodowle okresowe zasilane – Fed-batch cultures						
Wratislavia K1	* Odpadowy – Crude (300 g·dm ⁻³)	170,0	12,0	0,56	1,00	Rymowicz i in. [2009]
A-15	* Czysty – Pure (250 g·dm ⁻³)	66,3	41,4	0,27	0,44	Tomaszewska i in. [2012]
AUV ¹		91,6	38,1	0,37	0,69	
Wratislavia K1-UV21	Czysty – Pure (250 g·dm ⁻³)	122,5	8,3	0,49	0,72	w pracy this work
	Odpadowy – Crude (250 g·dm ⁻³)	136,0	10,9	0,54	0,57	

*podłoża bez suplementacji w NaCl
 media without NaCl supplementation

Jako produkty uboczne podczas biosyntezy erytrytolu z glicerolu prowadzonej przez drożdże *Y. lipolytica* powstają niewielkie ilości kwasów organicznych i arabitolu, natomiast udział mannitolu może być znacząco wyższy. Jak wykazały wcześniejsze badania, stężenie mannitolu ogranicza dodatek NaCl do podłoża produkcyjnego lub obecność tej soli w odpadowym substracie [Tomaszewska i in. 2012]. W niniejszej pracy niezależnie od obrotów mieszadła stężenie produktów ubocznych było niskie. Końcowe stężenie kwasu cytrynowego i α -ketoglutarynowego nie przekraczało $2,6 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ (dane nieprezentowane), natomiast innych polioli, mannitolu i arabitolu $3,9 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$. Jak pokazano w tabeli 2, ilość mannitolu w hodowlach innych szczepów drożdży *Y. lipolytica* była wyższa i wynosiła od $3,8$ do $14,9 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$.

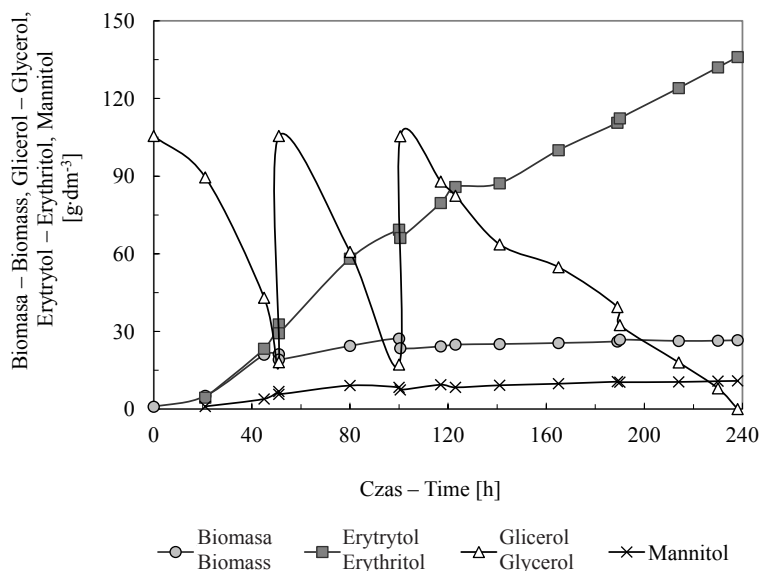
Szczep Wratislavia K1-UV21 produkował erytrytol z podobną wydajnością, wynoszącą od $0,45$ do $0,53 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$, niezależnie od obrotów mieszadła (tab. 1). Dla porównania, szczep wyjściowy Wratislavia K1 produkował erytrytol z glicerolu odpadowego z wydajnością $0,53$ i $0,56 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$, odpowiednio w hodowli okresowej i okresowej zasilanej [Marcinkiewicz i in. 2012, Rymowicz i in. 2009]. W hodowlach okresowych innych szczepów drożdży *Y. lipolytica* wartość tego parametru mieściła się w zakresie $0,34$ – $0,46 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ (tab. 2).

Szybkość obrotów mieszadła miała znaczący wpływ na szybkość objętościową (Q), jak i właściwą (q) produkcji erytrytolu przez szczep Wratislavia K1-UV21. Zdecydowanie najwyższą wartość obu parametrów, $Q = 0,8 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$ i $q = 0,060 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, uzyskano przy 700 rpm (tab. 1). Szybkość objętościowa produkcji erytrytolu w przypadku szczepu Wratislavia K1 była wyższa i wynosiła $0,86$ oraz $1,0 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$, odpowiednio w hodowli z czystym i odpadowym glicerolem [Tomaszewska i in. 2012].

W kolejnych hodowlach prezentowanych w niniejszej pracy obroty mieszadła utrzymywano na poziomie 700 rpm . Przeprowadzono dwie hodowle okresowe zasilane, z substratem odpadowym (rys. 2) i czystym (rys. 3). Całkowite stężenie glicerolu w obu procesach wynosiło $250 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$.

W procesie z glicerolem odpadowym uzyskano $136 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ erytrytolu (rys. 2). Czas niezbędny do całkowitego wykorzystania glicerolu wynosił 238 godz. Stężenie biomasy nieznacznie rosło, od $24 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ w $100. \text{ godz.}$ hodowli do $26 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ na końcu procesu. Jest prawdopodobne, że glicerol odpadowy zawiera składniki odżywcze przyswajane przez komórki, stąd stały przyrost biomasy i znacząco wyższe jej stężenie niż w hodowli z czystym substratem. W hodowli z czystym glicerolem drożdże całkowicie wykorzystały glicerol w czasie 169 godz. Końcowe stężenie erytrytolu wynosiło $122,5 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$. Stężenie biomasy utrzymywało się od około 60 godz. na stałym poziomie wynoszącym około $17,6 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$. Przy wykorzystaniu szczepu Wratislavia K1 w hodowli okresowej zasilanej, w której całkowite stężenie glicerolu wynosiło $300 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$, uzyskano $170 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ erytrytolu w czasie 170 godz. [Rymowicz i in. 2009]. Jak pokazano w tabeli 2, jest to jak dotychczas najwyższe stężenie tego związku uzyskane przy udziale drożdży *Y. lipolytica*. Modyfikacje procesów okresowych (okresowe zasilane lub powtórzeniowe hodowle okresowe) umożliwiają, poprzez przedłużenie fazy efektywnej produkcji, uzyskanie wyższych parametrów biosyntezy [Kim i in. 2007, Levišauskas i in. 2006]. Przykładem może być wzrost szybkości objętościowej produkcji erytrytolu przez drożdże *Candida magnoliae* z $0,54 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ (stężenie glukozy $200 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$) w hodowli okresowej do $1,4 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ (przy stężeniu początkowym glukozy wynoszącym $300 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$) w hodowli okresowej zasilanej [Yang i in. 1999]. Oh i in. [2001] przy wykorzystaniu *Torula* sp. osiągnęli w hodowli

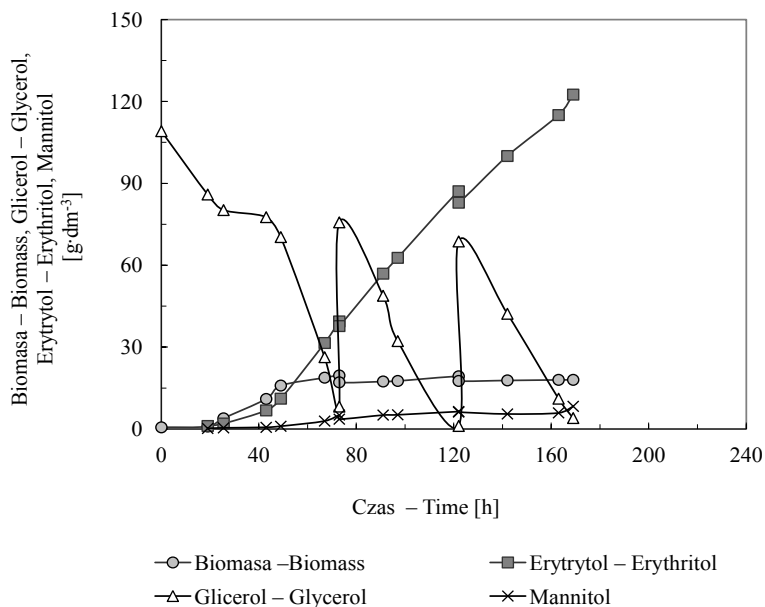
okresowej zasilanej z 40% zawartością glukozy stężenie erytrytolu wynoszące $40 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$ już w 20. godz. trwania procesu, podczas gdy w hodowli okresowej zawierającej również $400 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ glukozy to samo stężenie erytrytolu zostało osiągnięte dopiero w 58. godz. procesu. Park i in. [1998] przebadali zdolność produkcji erytrytolu przez *Trichosporon* sp. w czterech typach hodowli: okresowej zasilanej roztworem syropu glukozowego, syropu i namoku kukurydzianego, powtórzeniowej hodowli okresowej z zasilaniem z trzykrotną wymianą $0,25 \text{ dm}^3$ podłoża i jednorazową wymianą $0,75 \text{ dm}^3$ podłoża. Przy podobnej wydajności produkcji, $0,45 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$, najlepszą produktywność erytrytolu ($1,86 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ h}^{-1}$) otrzymali w ostatnim z wymienionych wariantów. Jednak w prezentowanych w tej pracy badaniach, prowadzonych z wykorzystaniem szczepu Wratislavia K1-UV21 i glicerolu jako substratu, w hodowlach okresowych zasilanych nie uzyskano wyższych parametrów biosyntezy erytrytolu niż w hodowlach okresowych (tab. 3).



Rys. 2. Przebieg biosyntezy erytrytolu z glicerolu odpadowego przez szczep *Y. lipolytica* Wratislavia K1-UV21 w hodowli okresowej zasilanej. Glicerol był wprowadzony do bioreaktora periodycznie w 51. i 100. godz. (co pokazują strzałki) do całkowitego stężenia $250 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$

Fig. 2. Time course of erythritol biosynthesis from crude glycerol by Wratislavia K1-UV21 strain of *Y. lipolytica*. Glycerol was periodically fed into the fermentor at 51 and 100 h (indicated by an arrows) until the total concentration of $250 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ was reached after the initiation of the fed-batch mode

Kolejnym etapem badań była biosynteza erytrytolu z glicerolu odpadowego w powtórzeniowej hodowli okresowej (rys. 4). Dla porównania, podobnie jak w przypadku hodowli okresowej zasilanej, przeprowadzono proces z wykorzystaniem czystego substratu (rys. 5). Po zakończeniu hodowli okresowej zasilanej z bioreaktora usunięto 40% podłoża wraz z komórkami i uzupełniono w sposób sterylny taką samą objętością świeżego podłoża, którego skład był skomponowany tak, aby przy objętości roboczej bioreaktora 2 dm^3 stężenie glicerolu wynosiło $100 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$. Każdorazowo przeprowadzono cztery takie wymiany podłoża.



Rys. 3. Przebieg biosyntezy erytrytolu z glicerolu czystego przez szczep *Y. lipolytica* Wratislavia K1-UV21 w hodowli okresowej zasilanej. Glicerol był wprowadzony do bioreaktora periodycznie w 73. i 122. godz. (co pokazują strzałki) do całkowitego stężenia $250 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$

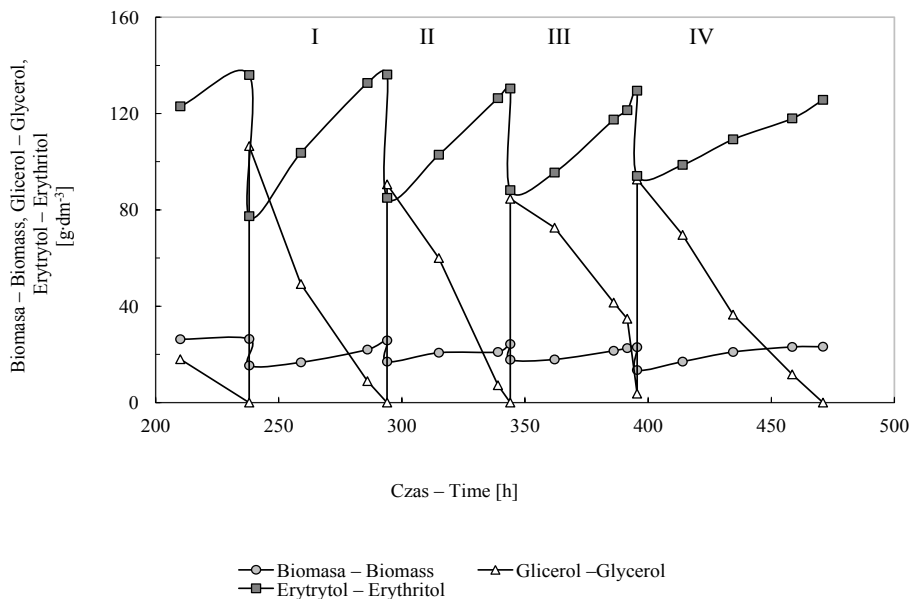
Fig. 3. Time course of erythritol biosynthesis from pure glycerol by *Y. lipolytica* Wratislavia K1-UV21 strain of *Y. lipolytica*. Glycerol was periodically fed into the fermentor at 73 and 122 h (indicated by an arrows) until the total concentration of $250 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ was reached after the initiation of the fed-batch mode

Tabela 3. Charakterystyka biosyntezy erytrytolu przez szczep *Y. lipolytica* Wratislavia K1-UV21 w hodowlach okresowych zasilanych

Table 3. Characteristic of the erythritol biosynthesis in fed-batch culture by Wratislavia K1-UV21 strain of *Y. lipolytica*

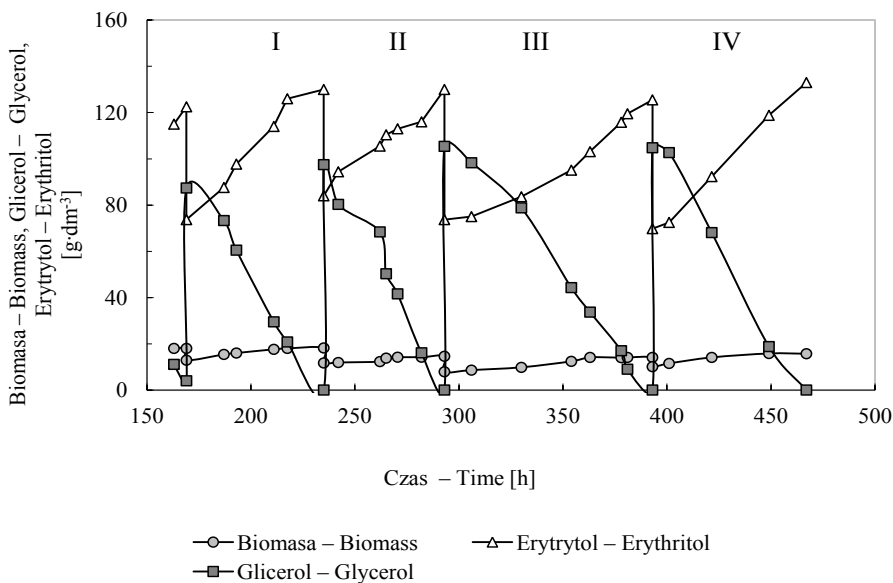
Substrat Substrate	Czas Time [h]	Erytrytol Erythritol [$\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$]	Mannitol [$\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$]	Y [$\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$]	Q [$\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$]	q [$\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$]
Glicerol odpadowy Crude glycerol	238	136	10,9	0,54	0,57	0,021
Glicerol czysty Pure glycerol	169	122,5	8,3	0,49	0,72	0,040

Podczas hodowli prezentowanej na rysunku 4 czas kolejnych cykli, czyli konieczny do wyczerpania $100 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ glicerolu, wynosił od 51 do 75,5 godz. Stężenie biomasy w kolejnych cyklach było zbliżone i wynosiło około $23 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$. Maksymalne końcowe stężenie erytrytolu, $136 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$, odnotowano podczas I i II wymiany, w kolejnych cyklach ilość tego związku nieznacznie się obniżała do stężenia $125,7 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$, które oznaczono na końcu procesu w 471. godz.



Rys. 4. Wzrost i biosynteza erytrytolu przez szczep *Y. lipolytica* Wratislavia K1-UV21 podczas okresowej hodowli powtórzeniowej w podłożu z glicerolem odpadowym

Fig. 4. Growth and erythritol biosynthesis by Wratislavia K1-UV21 strain of *Y. lipolytica* during repeated-batch culture on crude glycerol media



Rys. 5. Wzrost i biosynteza erytrytolu przez szczep *Y. lipolytica* Wratislavia K1-UV21 podczas okresowej hodowli powtórzeniowej w podłożu z czystym glicerolem

Fig. 5. Growth and erythritol biosynthesis by Wratislavia K1-UV21 strain of *Y. lipolytica* during repeated-batch culture on pure glycerol media

Drożdże produkowały erytrytol z podobną wydajnością i dynamiką podczas trzech pierwszych cykli, jednak w czwartym odnotowano znaczące obniżenie parametrów produkcji tego związku (tab. 4).

W hodowli z czystym substratem czas kolejnych cykli hodowlanych był dłuższy i wynosił od 58 do 100 godz., co było spowodowane niższym stężeniem biomasy (rys. 5). W czwartym cyklu zaobserwowano wzrost stężenia biomasy, w stosunku do dwóch poprzednich, a także najwyższe stężenie erytrytolu, 133 g·dm³. Warto zauważyć, że w tej hodowli ilość produkowanego erytrytolu nie obniżała się, jak miało to miejsce w przypadku glicerolu odpadowego. Podczas tej hodowli w pierwszym cyklu hodowlanym odnotowano bardzo wysoką wartość wydajności produkcji erytrytolu, 0,64 g·g⁻¹ (tab. 4). Teoretyczna wydajność produkcji tego związku z glicerolu wynosi 66,3% [Rywińska i in. 2013].

Tabela 4. Charakterystyka biosyntezy erytrytolu w okresowej hodowli powtórzeniowej przez *Y. lipolytica* Wratislavia K1-UV21

Table 4. Results of the erythritol production from glycerol in repeated-batch culture by Wratislavia K1-UV21 strain of *Y. lipolytica*

Parametry Parameters	Numer wymiany – Batch No.			
	Glicerol odpadowy – Crude glycerol			
	I	II	III	IV
Y [g·g ⁻¹]	0,55	0,50	0,49	0,33
Q [g·dm ⁻³ ·h ⁻¹]	1,05	0,91	0,80	0,42
	Glicerol czysty – Pure glycerol			
Y [g·g ⁻¹]	0,64	0,49	0,5	0,60
Q [g·dm ⁻³ ·h ⁻¹]	0,85	0,79	0,52	0,85

Zróznicowany czas oraz różne wartości parametrów produkcji erytrytolu w kolejnych cyklach powtórzeniowej hodowli okresowej, zaprezentowanych w niniejszej pracy, mogą świadczyć o złym zbilansowaniu składników wprowadzanego podłoża, co jest niezwykle istotne nie tylko dla odtworzenia biomasy, ale również utrzymania dobrej żywotności i aktywności produkcyjnej komórek. Obniżanie parametrów produkcji erytrytolu w kolejnych cyklach hodowli z glicerolem odpadowym mogło być spowodowane zawartością w tym substracie niekorzystnych składników. Zanieczyszczenia obecne w surowcach odpadowych mogą mieć znaczący wpływ na przebieg wzrostu mikroorganizmu, ale także procesy metaboliczne.

Jak wiadomo, szczepy modyfikowane genetycznie są bardziej narażone na zmiany degeneracyjne w długoterminowych procesach ciągłych. Podczas prezentowanych na rysunkach 4 i 5 hodowli nie monitorowano jednak udziału w populacji komórek pączkujących czy martwych, co mogłoby dostarczyć istotnych informacji na temat stanu fizjologicznego drożdży. Ponadto, w hodowlach powtórzeniowych ważna jest ilość wymienianego podłoża. W niniejszej pracy wymianie poddano 40% objętości roboczej bioreaktora – być może wymiana innej ilości podłoża hodowlanego byłaby korzystniejsza. Podczas

biosyntezy kwasu cytrynowego przez szczep *Wratislavia* 1.31 w powtórzeniowej hodowli okresowej intensyfikacja procesu i wzrost stężenia kwasu cytrynowego nastąpiły, kiedy odbierano 0,4 dm³ podłoża wraz z zawiesiną komórek, co stanowiło 30% objętości bioreaktora [Rywińska i in. 2009].

PODSUMOWANIE

Reasumując, obroty mieszadła bioreaktora na poziomie 700 rpm uznano za najkorzystniejsze do biosyntezy erytrytolu z glicerolu przez drożdże *Y. lipolytica* *Wratislavia* K1-UV21. Badany szczep produkował znaczne ilości erytrytolu, przy niewielkim udziale produktów ubocznych zarówno z glicerolu czystego, jak i odpadowego. W zależności od zastosowanego substratu i systemu hodowlanego otrzymano od 84,1 do 139,5 g·dm⁻³ erytrytolu. W porównaniu z hodowlą okresową zasilaną wyższe parametry produkcji erytrytolu, takie jak wydajność i szybkość objętościowa, uzyskano w hodowli okresowej, gdzie wyniosły odpowiednio 0,53 g·g⁻¹ i 0,8 g·dm⁻³·h⁻¹. Wyższą wydajność produkcji erytrytolu, zbliżoną do teoretycznej, uzyskano w pierwszych cyklach powtórzeniowej hodowli okresowej, jednak w kolejnych etapach zarówno wydajność, jak i dynamika biosyntezy tego związku obniżały się. Konieczne są dalsze badania zmierzające do poprawy wartości parametrów biosyntezy erytrytolu przez badany szczep w długoterminowych procesach hodowlanych.

Podziękowania. Badania realizowano w ramach projektu nr POIG.01.01.02-00-074/09; „Biotechnologiczna konwersja glicerolu do polioli i kwasów dikarboksylowych” oraz w ramach grantu N N312256640 „Metabolizm glicerolu do erytrytolu w komórkach drożdży *Yarrowia lipolytica*”.

PIŚMIENNICTWO

- Aoki M., Pastore G., Park Y., 1993. Microbial transformation of sucrose and glucose to erythritol. *Biotechnol. Lett.* 15(4), 383–388.
- Jeya M., Lee K.-M., Kumar T. M., Kim J.-S., Gunasekaran P., Kim S.-Y., Kim I.-W., Lee J.-K., 2009. Isolation of a novel high erythritol-producing *Pseudozyma tsukubaensis* and scale-up of erythritol fermentation to industrial level. *Appl Microbiol. Biotechnol.* 83, 225–231.
- Kim Y.-H., Kang S.W., Lee J.H., Chang H.-I., Yun Ch.-W., Paik H.-D., Kang Ch.-W., Kim S.W., 2007. High cell density fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* JUL3 in fed-batch culture for the production of β -glucan. *J. Ind. Eng. Chem.* 13(1), 153–158.
- Levišauskas D., Galvanauskas V., Simutis R., Žilinskas A., Žilinskas J., 2006. Optimization of biomass production in fed-batch culture by feed and dilution control actions. *Inf. Technol. Control*, 35(4), 383–390.
- Marcinkiewicz M., Juszcyk P., Rywińska A., Rymowicz W., 2012. Wpływ warunków hodowli drożdży *Yarrowia lipolytica* na wydajność syntezy erytrytolu z glicerolu. *Nauki Inżynierskie i Technologiczne*. 3(6), 90–98.
- Moon H.J., Jeya M., Kim I.W., Lee J.K., 2010. Biotechnological production of erythritol and its applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86, 1017–1025.
- Musiał I., Wojtatowicz M., Juszcyk P., Rywińska A., 2011. Erythritol production by *Yarrowia lipolytica* DN I W 2a and its UV mutants on media containing glycerol. *Curr. Opin. Biotech.* 22 (Suppl. 1) 594.
- O'Brien-Nabros L., 2011. *Alternative sweeteners – 4th edition*, CRC Press: 249–264.

- Oh D.K., Cho C.H., Lee J.K., Kim S.Y., 2001. Increased erythritol production in fed-batch cultures of *Torula* sp. by controlling glucose concentration. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 26, 248–252.
- Park J.B., Seo B.C., Kim J.R., Park Y.K., 1998. Production of erythritol in fed-batch cultures of *Trichosporon* sp. *J. Ferment. Bioeng.* 86, 577–580.
- Rymowicz W., Rywińska A., Marcinkiewicz M., 2009. High-yield production of erythritol from raw glycerol in fed-batch cultures of *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol. Lett.* 31, 377–380.
- Rywińska A., Juszczak P., Gryszkin A., Rymowicz W., 2009. Charakterystyka półciągłej biosyntezy kwasu cytrynowego z glicerolu przez drożdże. *Acta Sci. Pol., Biotechnologia* 8(3), 3–14.
- Rywińska A., Juszczak P., Wojtatowicz M., Robak M., Lazar Z., Tomaszewska L., Rymowicz W., 2013. Glycerol as a promising substrate for *Yarrowia lipolytica* biotechnological applications. *Biomass Bioenergy* 48, 148–166.
- Rywińska A., Bąk M., Rakicka M., Tomaszewska L., Boruckowski T., Lazar Z., Musiał I., Rymowicz W., 2012. Selekcja UV mutantów drożdży *Yarrowia lipolytica* do biosyntezy erytrytolu z glicerolu. *Acta Sci. Pol., Biotechnologia* (w druku).
- Tomaszewska L., Rywińska A., Musiał I., Utecht M., Juszczak P., Rymowicz W., Wojtatowicz M., Połomska X., 2011. Skryning szczepów drożdży *Yarrowia lipolytica* do biosyntezy erytrytolu z glicerolu. *Acta Sci. Pol., Biotechnologia* 10 (1), 15–28.
- Tomaszewska L., Rywińska A., Gładkowski W., 2012. Production of erythritol and mannitol by *Yarrowia lipolytica* yeast in media containing glycerol. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 39, 1333–1343.
- Ueda M., Yamagishi K., 1997. Method for producing erythritol. European Patent Application EP0770683.
- Yang S.-W., Park J.-B., Han N.S., Ryu Y.-W., Seo J.-H., 1999. Production of erythritol from glucose by an osmophilic mutant of *Candida magnoliae*. *Biotechnol Lett.* 21, 887–890.

ERYTHRITOL BIOSYNTHESIS FROM GLYCEROL BY WRATISLAVIA K1-UV21 STRAIN OF *YARROWIA LIPOLYTICA* IN VARIOUS CULTIVATION SYSTEMS

Abstract. Erythritol, a four-carbon polyhydric alcohol, is a sweetener presently more often used as sucrose replacement. Its production on commercial scale is performed only in biotechnological processes. The aim of this study was to compare yield and dynamics of erythritol production from glycerol, derived from biodiesel production, by strain Wratislavia K1-UV21 of *Y. lipolytica* in batch, fed-batch and repeated-batch cultures. The cultivations were performed in Biostat B Plus bioreactor. The total concentration of glycerol was 150 and 250 g·dm⁻³, in batch and fed-batch culture, respectively. The repeated-batch culture was started as fed-batch culture. Next, after glycerol depletion, from the bioreactor 40% of culture broth was withdrawn and replaced by the same amount of fresh medium, in which glycerol concentration was 100 g·dm⁻³. Such cycle was repeated four times. In batch and fed-batch cultures yeast produced 84.1 and 136 g·dm⁻³ of erythritol, respectively. The production yield was similar (0.53 g·g⁻¹) in both processes. However, volumetric productivity and specific erythritol production rate were higher in batch cultivation. In repeated-batch culture high yield (0.51–0.55 g·g⁻¹) and dynamics of erythritol production (0.80–1.05 g·dm⁻³·h⁻¹) was achieved during first three cycles.

Key words: erythritol, *Yarrowia lipolytica*, crude glycerol, batch culture, fed-batch culture, repeated-batch culture

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 30.03.2013

Do cytowania – For citation: Rywińska A., Tomaszewska L., Cybulski K., Rymowicz W., 2013. Biosynteza erytrytolu z glicerolu przez szczep *Yarrowia Lipolytica* Wratislavia K1-UV21 w różnych systemach hodowlanych, Acta Sci. Pol. Biotechnol., 12(1), 37–50.

SPIS TREŚCI

Teresa Krzyśko-Lupicka, Tomasz Ciesielczuk, Marta Chwałowska

Proces zanikania substancji ropopochodnych
w skażonej glebie stymulowany preparatem Fyre-Zyme..... 5
The biodegradation of petroleum substances
in contaminated soil in presence of Fyre-Zyme preparation

**Zbigniew Lazar, Michał Piegza, E. Walczak, W. Barszczewski,
Małgorzata Robak**

Mikroflora drożdżowa naturalnie fermentowanych warzyw 19
Yeasts microflora of naturally fermented vegetables

**Anita Rywińska, Ludwika Tomaszewska, Krzysztof Cybulski,
Waldemar Rymowicz**

Biosynteza erytrytolu z glicerolu przez szczep
Yarrowia Lipolytica Wratislavia K1-UV21
w różnych systemach hodowlanych..... 37
Erythritol biosynthesis from glycerol
by Wratislavia K1-UV21 strain of *Yarrowia Lipolytica*
in various cultivation systems