

**Sylwia Kowalczyk, Elwira Komoń-Janczara, Agnieszka Glibowska,
Zdzisław Targoński**

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

e-mails: elwira.komon.janczara@up.lublin.pl; agnieszka.glibowska@up.lublin.pl;

zdzislaw.targonski@up.lublin.pl

**SELEKCJA SZCZEPÓW GRZYBÓW
Z RODZAJU *RHIZOPUS* ZDOLNYCH
DO PRODUKCJI KWASU FUMAROWEGO
Z GLICEROLU JAKO JEDYNEGO ŹRÓDŁA WĘGLA***

**SELECTION OF *RHIZOPUS* STRAINS WITH ABILITY
TO PRODUCE FUMARIC ACID FROM GLYCEROL
AS A SOLE CARBON SOURCE**

DOI: 10.15611/nit.2015.3.02

JEL Classification: L65

Streszczenie: Celem badań była ocena uzdolnień szczepów należących do rodzaju *Rhizopus*, pochodzących z kolekcji zagranicznych oraz izolatów ze środowisk naturalnych województwa lubelskiego, do biosyntezy kwasu fumarowego z glicerolu jako jedynego źródła węgla. Badania te są pierwszym skринingiem przeprowadzonym na tak licznej i zróżnicowanej grupie obiektów. Posłużyły one do wyodrębnienia tych szczepów grzybów *Rhizopus*, które znajdują zastosowanie w produkcji kwasu fumarowego w podłożach zawierających glicerol odpadowy. Ich zdolność do utylizacji glicerolu została przetestowana w różnych warunkach temperatury i pH podłoża. Umieszczone w artykule wstępne badania wykazały, iż badane szczepy różnią się optymalną temperaturą wzrostu. Szczepy pozyskane z zagranicznych kolekcji drobnoustrojów wykazywały najszybszy wzrost w zakresie wartości temperatur 35-38°C, podczas gdy zdecydowana większość izolatów charakteryzowała się najszybszym wzrostem w przedziale 25-30°C. Optymalne pH w fazie wzrostu grzybni dla zdecydowanej większości szczepów mieściło się w zakresie wartości pH 4,0-5,0. Obecność glicerolu i glukozy w podłożu hodowlanym sprzyjała szybszemu wzrostowi grzybni większości szczepów z rodzaju *Rhizopus* w porównaniu z szybkością wzrostu na pojedynczych źródłach węgla. Zdecydowana większość szczepów była zdolna do syntezy kwasu fumarowego, gdy jedynym źródłem węgla był glicerol, jednak po 7-dniowej hodowli stopień wykorzystania glicerolu był stosun-

* Praca finansowana z Programu operacyjnego „Innowacyjna gospodarka”, projekt: PO IG 01.01.02-00-074/09 pt.: „Biotechnologiczna konwersja glicerolu do polioli i kwasów dikarboksylowych”. This study was prepared within the framework of the project PO IG 01.01.02-00-074/09, co-funded by The European Union from The European Regional Development Fund within the framework of the Innovative Economy Operational Programme 2007-2013.

kowo niski, a stężenie kwasu fumarowego wynosiło co najwyżej kilka gramów w 1L filtratu pochodowlanego.

Słowa kluczowe: *Rhizopus*, kwas fumarowy, glicerol, temperatura optymalna, pH optymalne.

Summary: The paper deals with the *Rhizopus* strains selection based on their ability to produce fumaric acid on glycerol-containing medium. Preliminary studies demonstrated significant differences in optimal growth temperature for two groups of fungi. Strains from foreign collections showed the fastest growth in the temperature range of 35 – 38°C, while the vast majority of environmental isolates have grown faster in the lower temperature scope, from 28 to 30°C. The presence of glycerol and glucose in the culture medium was conducive to the faster growth of the mycelium of most tested strains of the genus *Rhizopus* in comparison to the rate of growth in media containing each of these carbon sources separately. Most of the strains were able to produce fumaric acid in medium containing glycerol as a sole carbon source, however, the utilization of this substrate after 7-day shaking flasks culture was quite low and the concentration of produced fumaric acid was at most few grams per liter of filtered broth.

Keywords: *Rhizopus* sp., fumaric acid, glycerol, optimal temperature, optimal pH.

1. Wstęp

Kwas fumarowy jest naturalnie występującym kwasem organicznym, stanowiącym jeden z kluczowych kwasów cyklu Krebsa. Znajduje zastosowanie w produkcji żywności i napojów, jako dodatek do pasz, w przemyśle papierniczym, w produkcji nienasyconych poliestrów, w farmacji i innych gałęziach przemysłu [Roa Engel i in. 2008]. Do lat 40. XX wieku kwas fumarowy produkowany był metodą fermentacyjną z wykorzystaniem grzybów nitkowych z rodzaju *Rhizopus*. W kolejnych dziesięcioleciach kwas fumarowy zaczęto produkować na drodze syntezy chemicznej, wykorzystując do tego proces utleniania benzenu, a następnie n-butanu. Wzrost cen ropy naftowej, postęp w różnych obszarach biotechnologii i bioinżynierii sprawiły, iż ponownie zainteresowano się opracowaniem nowoczesnej technologii kwasu fumarowego wytwarzanego przez drobnoustroje.

Podjęmowane są próby modyfikacji genetycznej szczepów *Rhizopus oryzae*, naturalnych producentów kwasu fumarowego, ale także drożdży *Saccharomyces cerevisiae* i innych drobnoustrojów, w celu nadprodukcji tegoż kwasu [Zhang, Yang 2012]. Ponadto uwagi badaczy koncentrują się na optymalizacji procesu produkcyjnego, doborze odpowiednich składników do podłoża w celu obniżenia kosztów produkcji.

Glicerol wraz z rozwojem produkcji biodiesla stał się tanim, stosunkowo łatwo dostępnym źródłem węgla dla procesów biotechnologicznych. Należy również zwrócić uwagę, iż część związków chemicznych może być wytwarzana na drodze fermentacji z wyższą wydajnością, gdy źródłem węgla w podłożu jest właśnie glicerol, niż gdy do biosyntezy wykorzystuje się inne, popularnie stosowane sacharydy. Wynika to z faktu, iż średni stopień redukcji atomów węgla w glicerolu jest wyższy niż sacharydów, takich jak glukoza czy ksyloza.

Glicerol jest z powodzeniem wykorzystywany do wytwarzania takich produktów biotechnologicznych, jak: 1,3-propandiol, erytrytol, kwas cytrynowy i in. [Almeida i in. 2012]. Natomiast istnieje zaledwie kilka doniesień o próbach wykorzystania glicerolu do produkcji kwasu fumarowego [Zhou i in. 2014].

Celem badań była wstępna ocena możliwości wytwarzania kwasu fumarowego z glicerolu z wykorzystaniem szczepów grzybów z rodzaju *Rhizopus* sprowadzonych ze znanych zagranicznych kolekcji drobnoustrojów oraz pozyskanych w ramach badań własnych ze środowisk naturalnych województwa lubelskiego.

2. Materiały i metody badań

2.1. Mikroorganizmy

Szczepy grzybów z rodzaju *Rhizopus* pochodziły z następujących kolekcji mikroorganizmów: DSMZ (*German Collection of Microorganisms and Cell Collection*), NRRL (*Agricultural Research Service Culture Collection*), NBRC (*Biological Resource Center Culture Collection*), Kolekcji Kultur Drobnoustrojów Przemysłowych IBPRS w Warszawie oraz Kolekcji Kultur Drobnoustrojów Katedry Biotechnologii, Żywienia Człowieka i Towaroznawstwa Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie (tab. 1).

2.2. Podłoża hodowlane

Do określania dynamiki wzrostu grzybów z rodzaju *Rhizopus* w różnych temperaturach stosowano następujące składniki: 2g KH_2PO_4 ; 0,5g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,4g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,3g CaCl_2 ; 1g ekstraktu drożdżowego; 1 ml Tween 80; 100g glicerolu; 0,5ml roztworu mikroelementów ($5 \text{ g/dm}^3 \text{ FeSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$; $1,96 \text{ g/dm}^3 \text{ MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; $1,66 \text{ g/dm}^3 \text{ ZnSO}_4$); 0,1g zieleni bromokrezolowej; 15g agaru; 7,5g CaCO_3 i uzupełniano wodą destylowaną do 1L. pH podłoża wynosiło 5,6.

W drugiej części badań zastosowano standardowe podłoże PDA (Difco) z dodatkiem następujących źródeł węgla: glukozy cz.d.a. 40g/L, glicerolu cz.d.a. 40g/L, glicerolu technicznego z rafinerii w Trzebini 40g/L oraz mieszaniny glukozy cz.d.a. 40 g/L z glicerolem cz.d.a. 20g/L. Podczas badania wpływu wartości pH podłoża na dynamikę wzrostu grzybów konieczne było wyeliminowanie węglanu wapnia z wspomnianej pożywki. Badane wartości pH wynosiły 3,0; 4,0 i 5,0.

2.3. Przygotowywanie zawiesiny zarodników

Hodowlę grzybów *Rhizopus* prowadzono na podłożu stałym PDA (Difco) w temp. 30°C przez 5-7 dni, a następnie przechowywano w temp. 4°C.

Skosy z zarodnikującą grzybnią zalewano sterylną wodą z dodatkiem 0,1% Tween 80, wytrząsano ręcznie celem uzyskania zawiesiny zarodników. Liczbę zarodników w 1 ml określano za pomocą bezpośredniej metody liczenia w komorze Thoma [Libudysz, Kowal, Żakowska (red.) 2007].

2.4. Określenie dynamiki wzrostu wybranych szczepów/izolatów grzyba z rodzaju *Rhizopus* w różnych temperaturach

Badania przeprowadzono z wykorzystaniem 69 izolatów grzybów z rodzaju *Rhizopus*. Dokonano oceny dynamiki wzrostu poszczególnych szczepów/izolatów w różnych temperaturach.

Stężenie zawiesiny zarodników, uzyskanej z hodowli wybranych szczepów/izolatów *Rhizopus* spp., ustalano na poziomie 10^6 spor/ml (procedura opisana w punkcie 2.3). Następnie pobierano 10 μ l określonej zawiesiny i наносzono na centralną część płytki z podłożem selektywnym. Zaszczepione płytki Petriego inkubowano w cieplarni w temperaturach: 25°C, 27°C, 30°C, 32°C, 35°C, 37°C, 39°C, 41°C i 43°C. Dla każdego układu izolat: temperatura wykonano po trzy powtórzenia.

Po upływie 14 godzin dokonano pierwszego pomiaru stref wzrostu poszczególnych szczepów/izolatów. Kolejnych pomiarów dokonywano w 2-, 3-godzinnych odstępach czasowych.

Na podstawie uzyskanych wyników (przyrost grzybni w mm, mierzony w 2-, 3-godzinnych odstępach czasowych) obliczano średnią szybkość przyrostu grzybni [mm/h] dla każdego szczepu/izolatu w poszczególnych temperaturach.

2.5. Określenie wpływu pH środowiska hodowlanego na wzrost izolatów grzybów z rodzaju *Rhizopus*

Badania przeprowadzono przy wykorzystaniu 69 izolatów grzybów z rodzaju *Rhizopus*. Ocenę dynamiki wzrostu grzybów *Rhizopus* spp. przeprowadzono, bazując tym razem na zmiennej wartości pH środowiska hodowlanego (podłoża selektywnego). Przygotowano 3 warianty podłoża o takim samym składzie, ale różnej wartości pH (pH 3,0; pH 4,0; pH 5,0). Zawiesiną zarodników o stężeniu 10^6 spor/ml (w ilości 10 μ l), przygotowaną zgodnie z wytycznymi opisanymi w punkcie 2.3, zaszczepiano przygotowane wcześniej podłoża selektywne. Zawiesinę zarodników наносzono na centralną część płytki z podłożem. Dla każdego szczepu i dla każdej wartości pH wykonano po trzy powtórzenia. Zaszczepione płytki Petriego inkubowano w temperaturze 28°C lub 35°C (w zależności od tolerancji temperaturowej danego szczepu/izolatu).

Po upływie 14 godzin dokonano pierwszego pomiaru stref wzrostu poszczególnych szczepów/izolatów na płytkach Petriego. Kolejne pomiary prowadzono w 2-, 3-godzinnych odstępach czasowych.

Na podstawie uzyskanych wyników obliczano średnią szybkość przyrostu grzybni [mm/h] dla każdego szczepu/izolatu w określonym pH i optymalnej dla ich wzrostu temperaturze.

2.6. Analiza statystyczna uzyskanych wyników

Analizę statystyczną uzyskanych wyników przeprowadzono z wykorzystaniem oprogramowania StatGraphics Centurion XV (wersja 15.1.02).

3. Wyniki badań, ich omówienie i dyskusja

Wzrost drobnoustrojów uzależniony jest od wielu czynników. Do podstawowych parametrów decydujących o szybkości wzrostu należą temperatura i pH podłoża. Badaniom poddano 69 szczepów *Rhizopus* spp., pochodzących z różnych światowych kolekcji kultur drobnoustrojów oraz izolatów skatalogowanych w Katedrze Biotechnologii, Żywności Człowieka i Towaroznawstwa Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie (tab. 1).

Tabela 1. Wykaz mikroorganizmów wykorzystanych w badaniach
Table 1. List of the microorganisms used in this study

Numer Number	Nazwa gatunku Name of the species	Źródło Origin
1	2	3
R-1	<i>Rhizopus oryzae</i>	DSM 905
R-2	<i>Rhizopus stolonifer</i>	wyizolowany z resztek spożywczych/isolated from food scraps
R-3	<i>Rhizopus oryzae</i>	wyizolowany z gleby/isolated from soil
R-4	<i>Rhizopus oryzae</i>	DSM 2200
R-5	<i>Rhizopus oryzae</i>	DSM 63539
R-6	<i>Rhizopus oryzae</i>	NRRL 3562
R-7	<i>Rhizopus oryzae</i>	NRRL 3563
R-8	<i>Rhizopus oryzae</i>	NRRL 3613
R-9	<i>Rhizopus oryzae</i>	NRRL 6201
R-10	<i>Rhizopus oryzae</i>	NRRL 2005
R-11	<i>Rhizopus oryzae</i>	NRRL 2582
R-12	<i>Rhizopus oryzae</i>	NRRL 1526
R-13	<i>Rhizopus oryzae</i>	NBRC 4697
R-14	<i>Rhizopus oryzae</i>	NBRC 4730
R-15	<i>Rhizopus oryzae</i>	NBRC 4756
R-16	<i>Rhizopus oryzae</i>	NBRC 4758
R-17	<i>Rhizopus oryzae</i>	NBRC 4771
R-18	<i>Rhizopus oryzae</i>	NBRC 4773
R-19	<i>Rhizopus oryzae</i>	NBRC 4775
R-20	<i>Rhizopus oryzae</i>	NBRC 4776
R-21	<i>Rhizopus oryzae</i>	NBRC 6154
R-22	<i>Rhizopus oryzae</i>	NRRL 6400
R-23	<i>Rhizopus oryzae</i>	NRRL 6202
R-24	<i>Rhizopus stolonifer</i>	wyizolowany z resztek jabłka/isolated from apple remains
R-25	<i>Rhizopus stolonifer</i>	wyizolowany z resztek chleba/isolated from bread remains
R-26	<i>Rhizopus stolonifer</i>	wyizolowany z resztek chleba/isolated from bread remains

1	2	3
R-27	<i>Rhizopus stolonifer</i>	wyizolowany z nasion zbóż/isolated from crop grains
R-28	<i>Rhizopus stolonifer</i>	wyizolowany z nasion zbóż/isolated from crop grains
R-29	<i>Rhizopus stolonifer</i>	wyizolowany z nasion zbóż/isolated from crop grains
R-30	<i>Rhizopus stolonifer</i>	wyizolowany z nasion zbóż/isolated from crop grains
R-31	<i>Rhizopus stolonifer</i>	wyizolowany z nasion zbóż/isolated from crop grains
R-32	<i>Rhizopus stolonifer</i>	wyizolowany z nasion zbóż/isolated from crop grains
R-33	<i>Rhizopus stolonifer</i>	wyizolowany z nasion zbóż/isolated from crop grains
R-34	<i>Rhizopus stolonifer</i>	wyizolowany z nasion zbóż/isolated from crop grains
R-35	<i>Rhizopus stolonifer</i>	wyizolowany z nasion zbóż/isolated from crop grains
R-36	<i>Rhizopus oryzae</i>	wyizolowany z nasion zbóż/isolated from crop grains
R-37	<i>Rhizopus stolonifer</i>	wyizolowany z nasion zbóż/isolated from crop grains
R-38	<i>Rhizopus stolonifer</i>	wyizolowany z nasion zbóż/isolated from crop grains
R-39	<i>Rhizopus stolonifer</i>	wyizolowany z nasion zbóż/isolated from crop grains
R-40	<i>Rhizopus oryzae</i>	wyizolowany z gleby/isolated from soil
R-41	<i>Rhizopus oryzae</i>	wyizolowany z gleby/isolated from soil
R-42	<i>Rhizopus oryzae</i>	wyizolowany z gleby/isolated from soil
R-43	<i>Rhizopus oryzae</i>	wyizolowany z gleby/isolated from soil
R-44	<i>Rhizopus oryzae</i>	IBPRS, Warszawa/IAFB Warsaw
R-45	<i>Rhizopus oryzae</i>	IBPRS, Warszawa/IAFB Warsaw
R-46	<i>Rhizopus stolonifer</i>	wyizolowany z nasion zbóż/isolated from crop grains
R-47	<i>Rhizopus stolonifer</i>	wyizolowany z nasion zbóż/isolated from crop grains
R-48	<i>Rhizopus stolonifer</i>	wyizolowany z resztek spożywczych/isolated from food scraps
R-49	<i>Rhizopus stolonifer</i>	wyizolowany z wody/isolated from water
R-50	<i>Rhizopus oryzae</i>	IBPRS, Warszawa/IAFB Warsaw
R-52	<i>Rhizopus oryzae</i>	IBPRS, Warszawa/IAFB Warsaw
R-53	<i>Rhizopus stolonifer</i>	IBPRS, Warszawa/IAFB Warsaw
R-54	<i>Rhizopus stolonifer</i>	wyizolowany z nasion zbóż/isolated from crop grains
R-55	<i>Rhizopus stolonifer</i>	wyizolowany z nasion zbóż/isolated from crop grains
R-56	<i>Rhizopus stolonifer</i>	wyizolowany z resztek jabłka/isolated from apple remains
R-57	<i>Rhizopus stolonifer</i>	wyizolowany z nasion zbóż/isolated from crop grains
R-58	<i>Rhizopus stolonifer</i>	wyizolowany z nasion zbóż/isolated from crop grains
R-59	<i>Rhizopus stolonifer</i>	wyizolowany z nasion zbóż/isolated from crop grains
R-60	<i>Rhizopus stolonifer</i>	wyizolowany z nasion zbóż/isolated from crop grains
R-61	<i>Rhizopus stolonifer</i>	wyizolowany z nasion zbóż/isolated from crop grains
R-62	<i>Rhizopus stolonifer</i>	wyizolowany z nasion zbóż/isolated from crop grains
R-63	<i>Rhizopus stolonifer</i>	wyizolowany z nasion zbóż/isolated from crop grains
R-64	<i>Rhizopus stolonifer</i>	wyizolowany z nasion zbóż/isolated from crop grains
R-65	<i>Rhizopus stolonifer</i>	wyizolowany z nasion zbóż/isolated from crop grains
R-66	<i>Rhizopus stolonifer</i>	wyizolowany z nasion zbóż/isolated from crop grains
R-67	<i>Rhizopus microsporus</i>	wyizolowany z nasion zbóż/isolated from crop grains
R-68	<i>Rhizopus stolonifer</i>	wyizolowany z nasion zbóż/isolated from crop grains
R-69	<i>Rhizopus stolonifer</i>	wyizolowany z nasion zbóż/isolated from crop grains
R-70	<i>Rhizopus stolonifer</i>	wyizolowany z nasion zbóż/isolated from crop grains

Źródło: opracowanie własne.

Source: own elaboration.

Ustalenie optymalnych warunków temperaturowych dla wzrostu grzybów z rodzaju *Rhizopus* umożliwiło wyznaczenie granicznego progu temperaturowego, powyżej lub poniżej którego szczepy nie rosły w ogóle lub ich wzrost był znacznie ograniczony. Ponadto wyniki pomiarów stref wzrostu poszczególnych szczepów/izolatów *Rhizopus* spp. wyrosłych na płytkach pozwoliły na określenie szybkości przyrostu grzybni [mm/h] dla każdego szczepu/izolatu w poszczególnych temperaturach, zastosowanych w omawianym eksperymencie. Wyniki przeprowadzonego doświadczenia zebrano w tab. 2-3.

Tabela 2. Średnia szybkość wzrostu grzybów z rodzaju *Rhizopus* w różnych temperaturach – szczepy z kolekcji zagranicznych

Table 2. The average growth rate of fungi of the genus *Rhizopus* at different temperatures – strains of the foreign collections

Szczep Strain	Średnia szybkość wzrostu w określonej temperaturze [mm/h] The average growth rate at a certain temperature [mm/h]								
	25°C	27°C	30°C	32°C	35°C	37°C	39°C	41°C	43°C
R-1					1,83	2,21*	2,21	1,67	0,00
R-4					1,92	1,88	1,75	1,75	0,00
R-5					0,83	0,96	1,21	1,00	1,23
R-6					1,79	1,83	1,58	1,29	0,00
R-7					1,67	2,00	1,75	1,50	0,00
R-8					1,58	1,96	1,73	1,27	0,00
R-9					1,25	1,13	0,92	0,75	0,00
R-10					1,63	1,88	1,52	1,17	0,00
R-11					1,58	1,96	1,92	1,46	0,00
R-12					1,79	1,96	2,17	1,71	0,00
R-13					1,92	1,75	1,75	1,35	0,00
R-14	0,00	0,38	0,46	0,17	0,67	0,38	0,00	0,08	0,00
R-15					1,67	1,58	1,79	1,52	0,00
R-16					1,79	2,04	1,88	1,35	0,00
R-17	1,08	1,00	1,58	1,71	1,17	1,54	1,67	1,33	0,00
R-18					1,58	1,88	1,88	1,38	0,00
R-19					1,75	1,50	1,79	1,46	0,00
R-20					1,54	1,63	1,67	1,63	0,00
R-21	1,25	1,13	1,42	1,33	1,00	0,92	1,00	0,67	0,00
R-22					1,96	1,75	1,88	1,42	0,00
R-23					0,83	1,00	0,92	0,63	0,00
R-44					1,75	1,50	1,58	1,42	0,00
R-45					1,92	1,96	2,04	1,58	0,00
R-50					1,92	1,92	1,54	1,29	0,00
R-52					1,67	1,75	1,50	1,25	0,00

* Kolorem szarym oznaczono najwyższą średnią szybkość wzrostu danego szczepu *Rhizopus* spp./ Grey – the highest average growth range of certain *Rhizopus* spp. Strain.

Źródło: opracowanie własne.

Source: own elaboration.

Tabela 3. Średnia szybkość wzrostu grzybów z rodzaju *Rhizopus* w różnych temperaturach – izolaty ze środowiska

Table 3. The average growth rate of fungi of the genus *Rhizopus* at different temperatures – environmental isolates

Izolat Isolate	Średnia szybkość wzrostu w określonej temperaturze [mm/h] The average growth rate at a certain temperature [mm/h]							
	25°C	27°C	30°C	32°C	35°C	37°C	39°C	41°C
R-2	1,21	1,04	1,29**	1,19				
R-3	0,73	1,14	1,26	1,37	2,04	1,83	1,79	1,21
R-24	1,33	1,21	1,29	1,35	0,00	0,00	0,00	0,00
R-25	1,21	1,21	1,25	1,24				
R-26	1,29	1,29	1,38	1,27				
R-27	1,13	1,29	1,33	1,30				
R-28	1,21	1,38	1,33	1,28				
R-29	1,29	1,33	1,21	1,08				
R-30	1,38	1,21	1,33	1,21				
R-31	1,33	1,33	1,29	1,29				
R-32	1,29	1,38	1,46	1,29				
R-33	1,25	1,29	1,25	1,16				
R-34	1,25	1,33	1,42	1,38				
R-35	1,13	1,21	1,21	1,00				
R-36	1,08	1,17	1,38	1,61	1,92	1,79	2,17	1,46
R-37	1,13	1,17	1,29	1,08				
R-38	1,25	1,17	1,21	1,08				
R-39	0,71	1,04	1,21	0,88				
R-40	0,58	0,83	1,08	1,52	2,08	2,04	2,25	1,42
R-41	0,92	0,92	1,17	1,52	1,92	2,00	1,92	1,29
R-42	0,79	0,75	1,13	1,48	2,04	1,96	2,13	1,50
R-43	0,67	0,88	1,08	1,60	2,00	1,92	2,21	1,42
R-46	1,29	1,13	1,21	1,17				
R-47	1,17	1,08	1,25	1,00				
R-48	1,38	1,33	1,42	1,00				
R-49	1,13	1,13	1,38	1,00				
R-53	1,38	1,38	1,25	1,17	0,50	0,00	1,29	0,46
R-54	0,90	1,10	1,02	1,03				
R-55	0,94	1,05	1,09	1,05				
R-56	0,93	1,22	1,10	1,09				
R-57	0,99	1,20	1,12	1,12				
R-58	0,84	1,10	1,17	1,03				
R-59	1,09	1,17	1,19	0,81				
R-60	1,04	1,24	1,27	0,66				
R-61	0,93	1,23	1,19	0,85				
R-62	1,11	1,17	1,07	0,79				
R-63	1,02	1,16	1,15	0,88				
R-64	0,95	1,10	1,07	0,92				
R-65	0,87	1,12	1,15	0,97				
R-66	0,82	1,16	0,98	0,66				
R-67	0,90	1,22	1,05	1,21				
R-68	0,95	1,13	1,12	1,16	0,00	0,00	0,00	0,00
R-69	0,75	1,14	1,03	0,93				
R-70	0,82	1,10	1,06	0,80				

* Izolaty, pozyskane ze środowiska naturalnego, włączone do kolekcji własnej mikroorganizmów Katedry Biotechnologii, Żywnienia Człowieka i Towaroznawstwa Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie / Isolates from natural environment, added to collection of Department of Biotechnology, Human Nutrition And Science of Food Commodities.

** Kolorem szarym oznaczono najwyższą średnią szybkość wzrostu danego izolatu *Rhizopus* spp./ Grey – the highest average growth range of certain strain/isolate.

Źródło: opracowanie własne.

Source: own elaboration.

Stwierdzono wyraźną różnicę pomiędzy optimum temperaturowym dla szczepów pochodzących z kolekcji zagranicznych i izolatów własnych. Zdecydowana większość szczepów pochodzących ze światowych kolekcji wykazywała optymalne temperatury wzrostu w przedziale 35-39°C, podczas gdy izolaty pozyskane ze środowiska naturalnego województwa lubelskiego preferowały niższe temperatury, głównie w zakresie 25-30°C. Zanotowano jednak pewne wyjątki, zarówno w grupie szczepów z kolekcji zagranicznych, w których niektóre szczepy wykazywały optimum wzrostu w niższych temperaturach, tj. 30°C (R-21) i 32°C (R-17), jak i wśród izolatów ze środowiska, u których optimum temperaturowe było nieco wyższe i wyniosło odpowiednio: 32°C (R-24, R-68), 35°C (R-3), 37°C (R-41) oraz 39°C (R-36, R-40, R-42, R-43). Temperatura 43°C okazała się zbyt wysoka dla większości szczepów z rodzaju *Rhizopus*. Wyjątkiem był szczep R-5, który wykazywał dobry wzrost w tej właśnie temperaturze.

Zastosowanie podłoża hodowlanego o zróżnicowanej wartości pH, pozwoliło uzyskać informacje dotyczące optymalnych warunków wzrostu grzybów z rodzaju *Rhizopus*, a także ustalić przedział wartości pH, w którym badany grzyb wykazywał najszybszy wzrost (tab. 4). Pomiar stref wzrostu poszczególnych szczepów/izolatów na płytkach Petriego pozwolił określić szybkość przyrostu grzybni [mm/h] w różnym pH i w temperaturach optymalnych dla ich wzrostu.

Badania opisane w tej pracy wykazały, iż wzrost badanych grzybów *Rhizopus* spp. jest możliwy w podłożu o pH 3,0, jednakże przyrost grzybni w tych warunkach jest stosunkowo niewielki. Optymalne wartości pH dla wzrostu szczepów/izolatów grzybów z rodzaju *Rhizopus* zanotowano w pH 4,0 i pH 5,0. Niektóre z badanych szczepów/izolatów wykazały dobry wzrost jedynie na podłożu o pH 4,0, podczas gdy inne rosły znacznie szybciej w pH 5,0. Dobór odpowiedniego pH podłoża hodowlanego wpływa nie tylko na szybkość przyrostu biomasy grzybni, ale także często na formę, w jakiej ta biomasa występuje. W zdecydowanej większości przypadków niskie pH, zbliżone do pH 3,0, sprzyja tworzeniu grzybni w postaci *pellets*, zaś pH w zakresie wartości 4,0-6,0 wpływa na tworzenie grzybni w formie dyfuzyjnej (rozproszonej) lub w formie zbitej [Liao i in. 2007; Roa Engel i in. 2011 oraz własne dane niepublikowane], przy czym często jest to uzależnione od danego szczepu.

Badane parametry stanowią podstawę do opracowania optymalnych warunków do wzrostu grzybni, której kondycja jest kluczowym elementem prowadzenia dalszych procesów mikrobiologicznych. Wyniki przedstawione w niniejszej pracy są zgodne z obserwacjami opisanymi przez Sparringa i in. w 2002 r., którzy zastosowali model wykazujący jednoczesny wpływ temperatury, pH oraz dodatkowo aktywności wodnej i stężenia CO₂ na rozwój grzybni szczepów z gatunku *Rhizopus oligosporus*. Obserwacje przeprowadzone w niniejszej pracy wykazały, iż odpowiednia temperatura stymuluje grzybnię do szybszego wzrostu, lecz dopiero w połączeniu z odpowiednim pH stanowi optymalne warunki do wzrostu grzyba.

Charakterystyka badanych szczepów zależy w głównej mierze od naturalnego środowiska, z którego zostały wyizolowane. Szczepy gatunku *Rhizopus stolonifer*,

Tabela 4. Średnia szybkość wzrostu [mm/h] szczepów/izolatów grzybów z rodzaju *Rhizopus* na podłożach o różnych wartościach pH (pH 3, pH 4, pH 5)**Table 4.** The average growth range [mm/h] of strains/isolates of genus *Rhizopus* on media with different pH values (pH 3,0; pH 4,0, pH 5,0)

Szczep/Izolat Strain/Isolate	Średnia szybkość wzrostu [mm/h] The average growth range [mm/h]				Szczep Strain	Średnia szybkość wzrostu [mm/h] The average growth range [mm/h]			
	pH 3	pH 4	pH 5	Temp.		pH 3	pH 4	pH 5	Temp.
R-1	0,71	2,17	1,92	32°C	R-36	0,75	1,71	1,75	32°C
R-2	1,25	1,58	1,75	28°C	R-37	1,13	1,75	1,50	28°C
R-3	0,83	2,04	1,96	35°C	R-38	1,33	1,67	1,92	
R-4	0,83	1,88	2,03		R-39	1,29	1,42	1,29	
R-5	0,19	1,17	1,08		R-40	0,65	1,79	1,88	
R-6	0,75	1,63	2,08		R-41	1,25	2,00	1,96	
R-7	0,67	1,54	1,88		R-42	0,75	1,96	1,79	
R-8	0,75	1,83	1,75		R-43	0,58	2,04	1,79	
R-9	0,23	1,42	1,42		R-44	0,67	1,92	1,83	
R-10	0,5	2,04	1,83		R-45	0,54	2,29	2,56	
R-11	1,25	1,96	1,75		R-46	1,21	1,63	1,71	
R-12	0,83	2,13	1,92		R-47	1,17	1,38	1,71	
R-13	0,58	1,75	1,88	R-48	1,08	1,5	1,75		
R-14	0,29	0,71	0	R-49	0,96	1,63	1,33		
R-15	0,63	1,79	1,83	R-50	0,79	1,96	2,04		
R-16	0,71	1,63	1,92	R-52	0,73	1,96	1,83		
R-17	1,02	1,75	1,92	R-53	0,96	1,42	1,42		
R-18	1,38	2,17	2,08	R-54	0,63	1,42	1,46		
R-19	0,92	1,96	2,13	R-55	0,96	1,46	1,33		
R-20	0,63	1,83	1,96	R-56	0,92	1,63	1,63		
R-21	1,08	1,54	1,25	28°C	R-57	1,08	1,33	1,58	
R-22	0,5	1,71	1,96	35°C	R-58	0,96	1,46	1,46	
R-23	0,29	1,38	1,46		R-59	0,83	1,5	1,46	
R-24	0	0	0,44		R-60	0,67	1,42	1,58	
R-25	1,13	1,42	1,63	28°C	R-61	0,79	1,58	1,38	
R-26	1,25	1,67	1,75	28°C	R-62	0,75	1,67	1,5	
R-27	1,17	1,71	1,75		R-63	0,67	1,58	1,38	
R-28	1,08	1,75	1,63		R-64	0,79	1,50	1,42	
R-29	1,17	1,54	1,54		R-65	0,71	1,58	1,17	
R-30	1,17	1,63	1,29		R-66	0,79	1,54	1,42	
R-31	1,17	1,71	1,5		R-67	0,92	1,58	1,75	
R-32	1,08	1,75	1,79		R-68	0,58	1,46	1,42	
R-33	1,13	1,83	1,58		R-69	0,75	1,54	1,63	
R-34	0,92	1,42	1,54		R-70	0,67	1,58	1,21	
R-35	1,17	1,83	1,54						

*Kolorem szarym oznaczono najwyższą średnią szybkość wzrostu danego szczepu/izolatu/
Grey – the highest average growth range for certain strain/isolate.

Źródło: opracowanie własne.

Source: own elaboration.

badane w niniejszej pracy, wykazywały szybszy wzrost w temperaturach 25-30°C (z wyjątkami), natomiast izolat tego gatunku pozyskany na terenie Nigerii i opisany przez Odeniyi i in. w 2009 r. charakteryzował się wyższą optymalną temperaturą wzrostu, która wynosiła 37°C. Wartość pH tolerowana najlepiej przez szczepy gatunku *R. stolonifer* w obu pracach oscylowała w granicach 4,0-5,0.

W kolejnych badaniach porównano szybkości wzrostu grzybni wybranych szczepów/izolatów z rodzaju *Rhizopus* na podłożach zawierających różne, łatwo przyswajalne źródła węgla oraz glicerol o różnym stopniu czystości chemicznej. Badanie miało na celu określenie przydatności glicerolu jako składnika podłoża zastępującego standardowe, lecz droższe substraty, takie jak glukoza czy fruktoza. Wyniki badań przedstawiono w tab. 5. Najszybszy wzrost grzybni badanych szczepów/izolatów obserwowano, gdy źródłem węgla była glukoza. Był on jednak niewiele większy w stosunku do wzrostu badanych szczepów/izolatów na podłożu z glicerolem cz.d.a., z wyjątkiem szczepu R-22. Ta zależność nie potwierdziła się w temperaturze 40°C, gdyż na pięć przebadanych szczepów dwa wykazywały większą szybkość wzrostu na podłożu z glicerolem niż na podłożu z glukozą. Może to świadczyć o istotnej roli ochronnej glicerolu podczas wzrostu w ekstremalnych temperaturach. Natomiast szybkość wzrostu grzybni szczepów/izolatów z rodzaju *Rhizopus* była spowolniona, gdy źródłem węgla był glicerol techniczny, zawierający liczne zanieczyszczenia organiczne i nieorganiczne. Najszybszy wzrost grzybni większości badanych szczepów/izolatów uzyskano, gdy w podłożu obecne były glukoza oraz glicerol

Tabela 5. Średnia szybkość wzrostu wybranych szczepów i izolatów z rodzaju *Rhizopus* w różnych temperaturach i na różnych podłożach

Table 5. The average growth range of selected strains and isolates of genus *Rhizopus* at different temperature and media conditions.

Zmienne czynniki Variable factors		Średnia szybkość wzrostu w określonej temperaturze [mm/h] The average growth range at certain temperature [mm/h]				
Szczep/izolat Strain/isolate	Podłoże Medium	30°C	32°C	35°C	37°C	40°C
1	2	3	4	5	6	7
R-12	PDA	1,92	2,25	2,52	2,57	2,28
	z GL 40[g/L]	1,99	2,48	2,72	2,67	2,58
	z G cz.d.a. 40[g/L]	1,76	2,29	2,70	2,66	2,72
	z GT 40[g/L]	1,12	1,41	1,69	1,52	1,48
	z GL 40[g/L] i G cz.d.a. 20[g/L]	1,91	2,23	3,33	2,74	2,65
R-18	PDA	1,84	2,08	2,06	2,14	1,42
	z GL 40[g/L]	2,17	2,55	-	2,48	2,03
	z G cz.d.a. 40[g/L]	1,76	2,12	2,50	2,44	2,41
R-18	z GT 40[g/L]	0,90	1,24	1,49	1,56	1,19
	z GL 40[g/L] i G cz.d.a. 20[g/L]	1,77	2,30	3,00	1,88	1,91

1	2	3	4	5	6	7
R-20	PDA	1,71	2,10	2,16	2,14	1,72
	z GL 40[g/L]	2,43	2,89	2,53	2,57	2,43
	z G cz.d.a. 40[g/L]	1,77	2,14	2,40	2,66	2,20
	z GT 40[g/L]	1,08	1,49	1,68	1,65	1,39
	z GL 40[g/L] i G cz.d.a. 20[g/L]	1,58	2,47	-	2,81	2,52
R-22	PDA	1,42	1,64	1,98	2,02	1,68
	z GL 40[g/L]	1,30	1,39	1,63	1,40	1,61
	z G cz.d.a. 40[g/L]	0,97	1,52	2,16	1,90	2,01
	z GT 40[g/L]	0,63	0,76	1,25	1,29	1,31
	z GL 40[g/L] i G cz.d.a. 20[g/L]	1,16	1,07	1,44	1,85	2,31
R-37	PDA	1,32	1,00	0,00	0,00	0,00
	z GL 40[g/L]	1,87	1,40	0,00	0,00	0,00
	z G cz.d.a. 40[g/L]	1,24	1,06	0,00	0,00	0,00
	z GT 40[g/L]	0,85	0,69	0,00	0,00	0,00
	z GL 40[g/L] i G cz.d.a. 20[g/L]	1,69	1,51	0,0	0,00	0,00
R-38	PDA	1,23	1,02	0,00	0,00	0,00
	z GL 40[g/L]	1,87	1,29	0,00	0,00	0,00
	z G cz.d.a. 40[g/L]	1,21	1,0	0,00	0,00	0,00
	z GT 40[g/L]	0,70	0,66	0,00	0,00	0,00
	z GL 40[g/L] i G cz.d.a. 20[g/L]	1,58	1,38	0,00	0,00	0,00
R-45	PDA	1,83	2,14	2,25	2,25	1,70
	z GL 40[g/L]	1,91	2,34	2,52	2,62	0,51
	z G cz.d.a. 40[g/L]	1,63	2,04	2,41	2,64	2,55
	z GT 40[g/L]	0,77	1,04	1,43	1,52	1,02
	z GL 40[g/L] i G cz.d.a. 20[g/L]	1,80	2,24	3,56	2,71	1,04
R-46	PDA	1,28	1,04	0,00	0,00	0,00
	z GL 40[g/L]	1,62	1,50	0,00	0,00	0,00
	z G cz.d.a. 40[g/L]	1,26	1,06	0,00	0,00	0,00
	z GT 40[g/L]	0,86	0,79	0,00	0,00	0,00
	z GL 40[g/L] i G cz.d.a. 20[g/L]	1,61	1,59	0,00	0,00	0,00
R-54	PDA	1,46	1,01	0,00	0,00	0,00
	z GL 40[g/L]	1,78	1,42	0,00	0,00	0,00
	z G cz.d.a. 40[g/L]	1,30	1,13	0,00	0,00	0,00
	z GT 40[g/L]	0,93	0,67	0,00	0,00	0,00
	z GL 40[g/L] i G cz.d.a. 20[g/L]	1,66	1,02	0,00	0,00	0,00

PDA – agar ziemniaczano-dekstrozowy; GL – glukoza; G cz.d.a. – glicerol czysty 99%; GT – glicerol techniczny z rafinerii w Trzebinii (2013) / PDA – potatoe dextrose agar, GL – glucose, G cz.d.a. – pure glycerol 99%; GT – crude glycerol from refinery in Trzebinia (2013).

* Kolorem szarym oznaczono najwyższe średnie stężenia kwasu fumarowego/zużycie glicerolu/wydajności produktu / Grey – the highest average concentration of fumaric acid/glycerol utilization/yield of product.

Źródło: opracowanie własne.

Source: own elaboration.

cz.d.a. Wyniki te wskazują, że łączenie sacharydów z glicerolem w podłożu hodowlanych może przyczynić się nie tylko do szybszego namnożenia grzybni, ale także może zwiększyć produkcję kwasu fumarowego z wykorzystaniem tych źródeł węgla.

Przedstawione wyniki badań wskazują, że glicerol jest bardzo dobrym źródłem do pozyskania biomasy grzybów – potencjalnych producentów kwasu fumarowego. Dlatego też w kolejnym eksperymencie wybrane szczepy grzybów z rodzaju *Rhizopus* oceniano po względem uzdolnienia do produkcji kwasu fumarowego w podłożach płynnych z glicerolem jako jedynym źródłem węgla. Przedstawione w tab. 6 wyniki badań pokazują, że zdecydowana większość szczepów ma uzdolnienie do produkcji kwasu fumarowego, jednakże po przeprowadzeniu 7-dniowej hodowli wytrąsanej ilości nagromadzonego kwasu były niewielkie, a zużycie glicerolu niecałkowite. Glicerol w postaci gliceryny technicznej wykorzystywany jest już jako

Tabela 6. Porównanie produkcji kwasu fumarowego/wykorzystania glicerolu/wydajności produktu przez wybrane szczepy *Rhizopus* spp. w podłożu z dodatkiem 40g/L glicerolu – analiza wariancji
Table 6. Comparison of fumaric acid production/use of glycerol/yield of product by the selected strains of *Rhizopus* spp. in a medium containing 40 g/L glycerol – analysis of variance

Szczep Strain	Stężenie kwasu fumarowego [g/L] Concentration of fumaric acid [g/L]		Wykorzystanie glicerolu [g/L] Glycerol utilization [g/L]		Wydajność produktu [g/g] Yield of product [g/g]	
	$\bar{x} \pm SD$	Min-Max	$\bar{x} \pm SD$	Min-Max	$\bar{x} \pm SD$	Min-Max
1	2	3	4	5	6	7
R-1	1,40 _{abc} ± 0,48	0,89-1,84	19,37 _{hij} ± 2,55	16,77-21,86	0,07 _{ab} ± 0,02	0,05-0,08
R-4	2,63 _{bcdefg} ± 0,39	2,20-2,97	13,60 _{efg} ± 3,44	10,50-17,30	0,20 _{cdefgh} ± 0,04	0,16-0,23
R-5	0,91 _{ab} ± 0,13	0,78-1,04	8,53 _{abcd} ± 2,32	6,40-11,00	0,11 _{abcd} ± 0,02	0,09-0,12
R-6	3,27 _{cdefg} ± 0,97	2,50-4,36	19,98 _{ij} ± 3,73	16,30-23,75	0,16 _{bcddefgh} ± 0,02	0,15-0,18
R-7	3,23 _{cdefg} ± 0,74	2,40-3,80	14,23 _{fg} ± 2,47	11,60-16,49	0,23 _{efgh} ± 0,02	0,21-0,24
R-8	4,37 _{ghi} ± 0,32	4,00-4,60	17,07 _{ghi} ± 1,08	16,43-18,31	0,25 _{gh} ± 0,02	0,24-0,27
R-9	1,30 _{abc} ± 1,15	0,40-2,60	9,96 _{cdef} ± 3,47	6,12-12,86	0,12 _{abcde} ± 0,07	0,07-0,20
R-10	2,20 _{abcdef} ± 0,72	1,40-2,80	10,64 _{def} ± 2,67	7,66-12,81	0,20 _{defgh} ± 0,03	0,18-0,24
R-11	4,23 _{fghi} ± 3,07	1,00-7,10	15,80 _{ghi} ± 6,68	8,48-21,56	0,24 _{fghi} ± 0,11	0,12-0,33
R-12	3,14 _{cdefg} ± 1,24	2,22-4,55	23,18 _{jk} ± 3,08	20,11-26,26	0,14 _{bcddefg} ± 0,08	0,10-0,23
R-13	3,60 _{defgh} ± 1,30	2,20-4,78	16,67 _{ghi} ± 3,30	13,40-20,0	0,21 _{defgh} ± 0,04	0,16-0,24
R-14	0,75 _{ab} ± 0,11	0,63-0,85	4,66 _{ab} ± 0,58	4,00-5,12	0,16 _{bcddefgh} ± 0,04	0,12-0,19
R-15	4,23 _{fghi} ± 2,21	1,90-6,30	16,52 _{ghi} ± 1,10	15,53-17,70	0,26 _a ± 0,15	0,12-0,41
R-16	2,22 _{abcdef} ± 0,40	1,95-2,68	20,23 _{ij} ± 6,02	14,80-26,70	0,11 _{abcde} ± 0,02	0,10-0,14
R-17	2,46 _{bcdefg} ± 0,47	2,10-2,99	14,79 _{fgh} ± 3,05	11,92-18,00	0,17 _{bcddefgh} ± 0,01	0,16-0,18
R-18	3,93 _{efgh} ± 3,35	0,10-6,30	14,17 _{efg} ± 2,25	12,63-16,76	0,27 _n ± 0,22	0,01-0,41
R-19	1,87 _{abcde} ± 0,38	1,60-2,30	14,07 _{efg} ± 1,49	12,76-15,69	0,13 _{bcddef} ± 0,04	0,10-0,17
R-20	3,77 _{defgh} ± 0,31	3,50-4,10	27,29 _k ± 2,67	24,38-29,64	0,14 _{bcddefg} ± 0,03	0,12-0,17
R-21	0,13 _a ± 0,15	0,00-0,30	13,74 _{efg} ± 1,68	12,22-15,55	0,01 _a ± 0,01	0,00-0,02

1	2	3	4	5	6	7
R-22	5,63 _{hi} ± 1,08	4,81-6,86	26,12 _k ± 3,01	22,97-28,96	0,22 _{efgh} ± 0,07	0,17-0,30
R-23	0,80 _{ab} ± 0,29	0,58-1,13	9,22 _{bcde} ± 1,21	8,10-10,50	0,09 _{abc} ± 0,03	0,06-0,11
R-44	1,75 _{abcd} ± 0,45	1,28-2,18	12,73 _{defg} ± 1,62	11,00-14,20	0,14 _{bcdef} ± 0,02	0,12-0,15
R-45	6,10 _i ± 2,57	3,20-8,08	26,93 _k ± 4,72	21,72-30,93	0,24 _{fgh} ± 0,12	0,10-0,32
R-50	0,24 _a ± 0,07	0,18-0,31	3,88 _a ± 0,35	3,50-4,18	0,06 _{ab} ± 0,01	0,05-0,07
R-52	0,34 _a ± 0,11	0,26-0,46	5,78 _{abc} ± 1,16	4,70-7,00	0,06 _{ab} ± 0,01	0,05-0,07
Ogółem/ Total	2,58 ± 1,95	0,00-8,08	15,17 ± 6,87	3,50-30,93	0,16 ± 0,09	0,00-0,41

* Średnia arytmetyczna stężenia kwasu fumarowego, wykorzystanego źródła węgla, wydajności produktu/ próbę ± odchylenie standardowe; wyniki oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie statystycznie ($p > 0,05$) / The arithmetic mean of the concentration of fumaric acid, used carbon source yield of product/sample ± standard deviation; results marked with the same letter do not differ significantly ($p > 0.05$).

**Koloriem szarym oznaczono najwyższe średnie stężenia kwasu fumarowego/zużycie glicerolu/ wydajności produktu / Grey – the highest average concentration of fumaric acid/glycerol utilization/ yield of product.

Źródło: opracowanie własne.
Source: own elaboration.

substrat w mikrobiologicznej konwersji do wielu metabolitów, tj. etanol, 1,3-propandiol [Li i in. 2013; Celińska i in. 2015] oraz kwas mlekowy [Wang i in. 2015]. Pojawiają się pierwsze doniesienia o nowych substratach do mikrobiologicznej produkcji kwasu fumarowego. Dane te wskazują, że glicerol może być wartościowym źródłem węgla również w produkcji tego kwasu, jednak konieczne są dalsze badania nad fizjologią badanych szczepów. Wydaje się także, iż istnieje konieczność wykorzystania inżynierii metabolizmu i inżynierii genetycznej celem zwiększenia zdolności modyfikowanych szczepów z rodzaju *Rhizopus* do produkcji kwasu fumarowego na podłożach z glicerolem.

4. Wnioski

1. Optymalne temperatury wzrostu szczepów z rodzaju *Rhizopus* pochodzących z zagranicznych kolekcji mikroorganizmów są na ogół wyższe niż optymalne temperatury wzrostu izolatów pochodzących ze środowisk naturalnych województwa lubelskiego.

2. Większość badanych szczepów z rodzaju *Rhizopus* sp. wykazuje szybszy wzrost, gdy pH podłoża wynosi od 4,0 do 5,0.

3. Dla wszystkich przebadanych szczepów z kolekcji zagranicznych obserwowano najszybszy wzrost grzybni na podłożu zawierającym glicerol i glukozę, a nieco wolniejszy, gdy każde z tych źródeł węgla występowało w podłożu osobno.

4. W temperaturze 40°C zaobserwowano znacznie szybszy wzrost badanych szczepów na podłożach z dodatkiem glicerolu cz.d.a. niż na podłożach zawierających glukozę, podczas gdy w niższych temperaturach obserwowano zjawisko odwrotne.

Literatura

- Almeida J.R.M., Favaro L.C.L., Quirino B., F., 2012, *Biodiesel biorefinery: Opportunities and challenges for microbial production of fuels and chemicals from glycerol waste*, AIDIC, 5, s. 48-63.
- Celińska E., Drożdżyńska A., Jankowska M., Białas W., Czaczyk K., Grajek W., 2015, *Genetic engineering to improve 1,3-propanediol production in an isolated *Citrobacter freundii* strain*, Process Biochemistry, vol. 50, issue 1, s. 48-60.
- Li C., Lesnik K.L., Liu H., 2013, *Microbial conversion of waste glycerol from biodiesel production into value-added products*, Energies, 6, s. 4739-4768.
- Liao W., Liu Y., Frear C., Chen S., 2007, *A new approach of pellet formation of a filamentous fungus – *Rhizopus oryzae**, Bioresource Technology, 98 (18), s. 3415-3423.
- Libudzisz Z., Kowal K., Żakowska Z. (red.), 2007, *Mikrobiologia techniczna* (tom 1 i 2), Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- Odeniyi O.A., Onilude A.A., Ayodele M.A., 2009, *Growth and substrate utilization patterns of a *Rhizopus stolonifer* strain isolated from depolymerising rice husk*, World Applied Sciences Journal 6 (5), s. 595-599.
- Roa Engel C.A., Straathof A.J.J., Zijlmans, van Gulik W.M., van der Wielen L.A.M., 2008, *Fumaric acid production by fermentation*, Applied Microbiology and Biotechnology, vol. 78, no. 3, s. 379-389.
- Roa Engel C.A., Van Gulik W.M., Marang L., Van der Wielen L.A.M., Straathof A.J.J., 2011, *Development of a low pH fermentation strategy for fumaric acid production by *Rhizopus oryzae**, Enzyme and Microbial Technology, 48 (1), s. 39-47.
- Sparringa R.A., Kendall M., Westby A., Owens J.D., 2002, *Effects of temperature, pH, water activity and CO₂ concentration on growth of *Rhizopus oligosporus* NRRL 2710*, Journal of Applied Microbiology, 92, s. 329-337.
- Wang X., Ruan Z., Guan W., Kraemer R., Zhong Y., Liu Y., 2015, *Evaluation of fungal lactic acid accumulation using glycerol as the sole carbon source*, Biotechnology and Bioprocess Engineering, vol. 20, issue 3, s. 389-395.
- Zhang B., Yang S.-T., 2012, *Metabolic engineering of *Rhizopus oryzae*: Effects of overexpressing *fumR* gene on cell growth and fumaric acid biosynthesis from glucose*, Process Biochem., vol. 47, no. 12, s. 2159-2165.
- Zhou Y., Nie K., Zhang X., Liu S., Wang M., Deng L., Wang F., Tan T., 2014, *Production of fumaric acid from biodiesel-derived crude glycerol by *Rhizopus arrhizus**, Bioresource Technol., 163, s. 48-53.