

**ZESZYTY NAUKOWE
AKADEMII ROLNICZEJ
WE WROCŁAWIU**

NR 442

ROZPRAWY CXCII

MAŁGORZATA ROBAK

**STUDIA NAD WYKORZYSTANIEM OCTANU
I WYDZIELANIEM CYTRYNIANU PRZEZ DROŹDŹE
*Yarrowia lipolytica***

**KATEDRA BIOTECHNOLOGII
I MIKROBIOLOGII ŻYWNOŚCI**



WROCŁAW 2002

MAŁGORZATA ROBAK

**STUDY OF ACETATE UTILISATION AND CITRATE
SECRETION BY *Yarrowia lipolytica* YEAST**

**DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY
AND FOOD MICROBIOLOGY**



WROCŁAW 2002

Opiniodawca

prof. dr hab. Antoni Polanowski

Redaktor merytoryczny

dr hab. Ewelina Dziuba prof. nadzw.

Opracowanie redakcyjne i korekta

mgr Elżbieta Winiarska-Grabosz

Łamanie:

Maria Barbara Rocho

Teresa Alicja Chmura

Projekt okładki

Grażyna Kwiatkowska

© Copyright by Wydawnictwo Akademii Rolniczej we Wrocławiu, Wrocław 2002

ISSN 0867-7964

ISSN 0867-1427

WYDAWNICTWO AKADEMII ROLNICZEJ WE WROCŁAWIU

Redaktor naczelny – J e r z y S o b o t a

ul. Sopocka 23, 50-344 Wrocław, tel./fax (071) 328-12-77

e-mail: wyd@ozi.ar.wroc.pl

Nakład: 100 + 16 egz. Ark. druk. 5,0

Druk i oprawa: ELMA

SPIS TREŚCI

Wykaz stosowanych skrótów	7
Przedmowa	9
1. Wstęp	11
1.1. Wprowadzenie	11
1.2. Charakterystyka drożdży <i>Yarrowia lipolytica</i>	13
1.3. Metabolizm octanu	15
1.4. Regulacja nadprodukcji kwasu cytrynowego	16
2. Geneza i cel pracy	18
3. Omówienie wyników badań własnych	20
3.1. Utylizacja octanu przez badane szczepy <i>Y. lipolytica</i>	20
3.1.1. Indukcja utylizacji octanu przez mutanty oct^-	21
3.1.2. Powinowactwo drożdży do octanu	33
3.1.3. Wpływ glukozy i octanu na ilość kwasów Cyklu Kwasów Trikarboksylowych – CKT gromadzonych w komórkach lub wydzielanych do podłoża	34
3.2. Poszukiwanie defektu genetycznego mutantów oct^-	38
3.2.1. Substraty wykorzystywane jako jedyne źródło węgla	38
3.2.2. Komórkowa zawartość kwasów tłuszczowych oraz sacharydów	39
3.2.3. Aktywność enzymów CKT i cyklu gliksalowego	42
3.3. Przyczyny i regulacja wydzielania kwasu cytrynowego (CA) przez badane szczepy <i>Y. lipolytica</i>	43
3.3.1. Regulacja początkowego etapu nagromadzenia CA: wpływ natlenienia na aktywność dehydrogenazy izocytrynianowej (ICDH)	43
3.3.2. Regulacja syntezy CA: wpływ jonu amonowego na aktywność syntazy cytrynianowej (SC)	44
3.3.3. Izoenzymy syntazy cytrynianowej (SC)	47
3.3.4. Stopień utylizacji i powinowactwo komórek do glukozy	50
3.3.5. Wewnątrzkomórkowa zawartość cytrynianu	53
4. Dyskusja	55
5. Wnioski	63
6. Aneks – Materiały i metody	66
6.1. Szczepy	66
6.2. Podłoża i warunki hodowli	66
6.3. Metody analityczne	67
6.4. Graficzne wyznaczenie powinowactwa do glukozy i octanu	69
6.5. Metody biologii molekularnej	70
7. Piśmiennictwo	74

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

Acu ⁻ (oct ⁻)	– mutant drożdży niezdolny do wykorzystania octanu
ACS	– acetylo-CoA syntetaza
ARS	– autosomalnie replikujące się sekwencje DNA
ATCC	– Amerykańska kolekcja wzorcowych szczepów (American Type Culture Collection)
ATP	– adenozynotrifosforan
CA	– kwas cytrynowy
CIT	– gen syntazy cytrynianowej
CKT	– cykl kwasów trikarboksylowych
CoA	– koenzym A (adenozynodifosforan β-merkapto-etyloamino-pantotenowego kwasu)
DNA	– kwas dezoksyrybonukleinowy
GC	– chromatografia gazowa
H ₄	– jedna z podjednostek budujących cząsteczkę histonu
HA	– akonitaza (hydrataza akonitanowa)
HAT	– gen kodujący histonową acetylotransferazę
HPLC	– wysokosprawna (wysokociśnieniowa) chromatografia cieczowa
ICDH	– dehydrogenaza izocytrynianowa
ICL	– liaza izocytrynianowa
IRD	– dziecięca choroba Refsuma
K _M	– stała Michaelisa-Menten
mRNA	– matrycowy (informacyjny) kwas rybonukleinowy
oct ⁻ (acu ⁻)	– mutant drożdży niezdolny do wykorzystania octanu
OD	– gęstość optyczna, zmętnienie
ORF	– otwarta ramka odczytu (open reading frame)
μ	– szybkość wzrostu w [h ⁻¹]
MMT	– mineralne minimalne podłoże z tiaminą
MS	– spektroskopia masowa
NALD	– adrenoleukodystrofia neonatalna
PCM	– Polska Kolekcja Drobnoustrojów
PCR	– reakcja łańcuchowa polimeryzacji
pb	– para zasad nukleotydowych, jednostka długości genu (lub fragmentu)
rRNA	– rybosomowy kwas rybonukleinowy
RT	– czas retencji
SC	– syntaza cytrynianowa

PRZEDMOWA

Prezentowana praca, mająca stanowić rozprawę habilitacyjną, jest opracowaniem kilkuletnich badań nad metabolizmem drożdży z gatunku *Yarrowia lipolytica*. W skład rozprawy wchodzi przede wszystkim oryginalne nie publikowane wyniki, które stanowią 25 z 32 dokumentów przedstawionych w rozdziale „Omówienie wyników badań własnych”. Są one w tekście zaznaczone adnotacją odsyłającą czytelnika do odpowiedniego punktu części metodycznej przedstawionej w rozdziale „Aneks”. Ponadto, z uwagi na konieczność szerszej interpretacji otrzymanych wyników badań oraz dla porównania z danymi dotyczącymi innych szczepów i innych układów, niektóre wyniki zawarte we wcześniej opublikowanych pozycjach zostały skrótowo przytoczone w siedmiu dokumentach. Dotyczą one: wewnątrzkomórkowej zawartości cytrynianu, aktywności niektórych enzymów w wybranych procesach biosyntezy kwasu cytrynowego oraz charakterystyki badanych szczepów pod względem uzdolnień do utylizacji substratów węglowych. Obok tych wyników znajduje się rzymska cyfra oznaczająca odpowiednią pozycję bibliograficzną wyszczególnioną poniżej. Pozostałe pozycje piśmiennictwa są przytaczane poprzez cytowanie autorów i roku wydania pracy.

W druku ukazały się następujące prace:

- I. Robak M., Wojtatowicz M., Rymowicz W.: 1994. Some enzyme activities of acetate mutants of *Yarrowia lipolytica*, *Biulletin of the Polish Academy of Sciences, Biological Sciences* 42 (2), 151–157.
- II. Robak M., Patrzek E.: 1995. Wewnątrzkomórkowy kwas cytrynowy w drożdżach *Yarrowia lipolytica*, *Zeszyty Naukowe AR Wrocław, Technologia Żywności VIII*, 21–28.
- III. Robak M., Wojtatowicz M., Rymowicz W.: 1996. Aktywność dehydrogenazy izocytrynianowej drożdży a tempo tworzenia kwasu cytrynowego, *Zeszyty Naukowe AR Wrocław, Technologia Żywności X*, 27–35.
- IV. Robak M.: 1997. Syntaza cytrynianowa drożdży *Yarrowia lipolytica*, *Zeszyty Naukowe AR Wrocław, Technologia Żywności XI*, 47–56.
- V. Robak M.: 1999. Aktywność syntazy cytrynianowej i dehydrogenazy izocytrynianowej drożdży *Yarrowia lipolytica* podczas biosyntezy kwasu cytrynowego z hydrołu glukozowego, *Zeszyty Naukowe AR Wrocław, Technologia Żywności XIII*, 125–135.
- VI. Robak M.: 2000, Metabolic changes in acetate mutants of *Yarrowia lipolytica* Yeast, *Biulletin of the Polish Academy of Sciences, Biological Sciences* 48(4), 277–286.

1. WSTĘP

1.1. Wprowadzenie

Pomimo rosnącej w zaskakującym tempie wiedzy dotyczącej genomu – badania nad regulacją metabolizmu komórki, tej najlepiej zorganizowanej biotechnologicznej fabryki, nadal nie tracą na aktualności. Główne szlaki przemian, jak cykl Krebsa (cykl kwasów trójkarboksylowych: CKT) czy glikoliza, mimo iż zostały opisane w latach 30. i 40. ubiegłego wieku [Krebs i Johnson 1937, Streyer 1999], ciągle są przedmiotem badań [Pitson i wsp. 1999, McCammon 1996, Merle i wsp. 1996]. Wewnątrzorganelowa organizacja białek niektórych szlaków w tak zwane metabolony [Przybyła–Zawislak i wsp. 1999], superkompleksy [Schagger i Pfeifer 2000] czy maszyny białkowe [Alberts i wsp. 1999] znacznie usprawnia przepływ poszczególnych metabolitów, lecz utrudnia ich badanie. Proteasomy komórki eukariotycznej są kolejnym tego przykładem. Są to zorganizowane kompleksy enzymów proteolitycznych hydrolizujące, po uprzedniej ubikwitynacji, białka niepotrzebne komórce [Alberts i wsp. 1999, Dahlmann i wsp. 2000]. Do nomenklatury biochemicznej wprowadzane są nowe pojęcia, jak: proteom i transkryptom [Abbot 1999a,b]. Analogicznie do genomu obejmującego całość genów, proteom dotyczy białek, a transkryptom wszystkich cząsteczek mRNA występujących w komórce. Postęp w poznaniu sposobu regulacji ekspresji genów jest ogromny. Teoria operonu laktozowego była pierwszym przykładem takiej regulacji. Dziś znane są sekwencje regulatorowe usytuowane nawet o kilkadziesiąt nukleotydów przed właściwą sekwencją kodującą białko (– częścią genu zwaną otwartą ramką odczytu: ORF (open reading frame) [Turner i wsp. 2000]. Ekspresja genów zależy też od takich czynników, jak: pH [Glover i wsp. 1997], tlen [Zitomer i Lowry 1992] czy stan fizjologiczny mitochondrium [Liao i wsp. 1991, Wright i wsp. 2001]. Kontrolę podlega nawet proces rozluźnienia (rozwinienia) chromatyny [Gregory i wsp. 2001]. Acetylacja reszt lizyny w białkach histonowych jest takim mechanizmem regulacyjnym i modelującym własności chromatyny, który umożliwia transkrypcję wybranych odcinków DNA [Cress i Seto 2000, Wittschieben i wsp. 1999, Eberharter i wsp. 2000, Gregory i wsp. 2001]. Przykładowo, u drożdży *Saccharomyces cerevisiae* gen HAT1 koduje acetylotransferazę acetylującą lizynę w pozycji 12 podjednostki H4 histonu [Ruiz-Garcia i wsp. 1998]. W regulacji transkrypcji biorą też udział deacetylazy [Rundlet i wsp. 1996, Perez-Martin i Johnson 1998,]. Zatem acetylacja i deacetylacja białek histonowych jest przykładem regulacji pierwszego etapu ekspresji genów – transkrypcji. Nie wiadomo tylko, jak kontrolowany

jest ten proces i dlaczego reszta lizyny położona w danym miejscu w białku histonowym ma być acetylowana? lub deacetylowana? Takich **nowych** pytań jest wiele, a wzajemne powiązania pomiędzy poszczególnymi szlakami metabolicznymi dodatkowo utrudniają badania. Ostatecznie regulacja metabolizmu komórki jest bardzo złożona. To co zachodzi w danym momencie w komórce, jest wynikiem kompromisu pomiędzy jej możliwościami (zdolnościami) a środowiskiem zewnętrznym. W wielu aplikacjach procesów biotechnologicznych komórki są zmuszane do ograniczenia metabolizmu do określonego szlaku przemian. W ten sposób produkowane są niektóre witaminy [Koizumi i wsp. 2000, Stahmann i wsp. 2000], egzogenne dla człowieka i zwierząt aminokwasy [Egging i Sham 1999], enzymy [Gimenez i wsp. 2000, Glover i wsp. 1997, Hube i wsp. 2000, O'Hagan i Parker 1998, Sanchez i wsp. 1999], kwasy organiczne [Chernyavskaya i wsp. 2000, Lin i wsp. 2000], emulgatory [Rosenberg i Ron 1999, Banat i wsp. 2000], substancje zapachowe [Enderizzi i wsp. 1996, Pagot i wsp. 1997, Krings i Berger 1998], kwasy tłuszczowe i tłuszcze [Picataggio i wsp. 1992, Ratledge 1997], a nawet plastiki [de Koning 1995, Anderson i wsp. 1995]. Komórki można też modyfikować genetycznie, doprowadzając do nagromadzenia i wydzielania obcych dla niej protein, zwanych białkami heterologicznymi. Badania takie dotyczą między innymi syntazy cytrynianowej i innych enzymów z archebakterii [Connaris i wsp. 1998, 1999, Gellissen 2000], syntetazy skwalenu [Merkulov i wsp. 2000], inwertazy [Nicaud i wsp. 1989, Perez i wsp. 2001]. Powyższe aplikacje są możliwe dzięki poznaniu budowy genów i genomów, regulacji ich ekspresji i kontroli transkrypcji oraz rozwojowi metod inżynierii genetycznej. Pomimo że znana jest całkowita sekwencja nukleotydów w genomie *S. cerevisiae* [<http://Genome.Stanford.Edu>] oraz ludzkiego chromosomu XXI [Hattori i wsp. 2000] i chromosomu XXII [Dunham i wsp. 1999], funkcje wielu poznanych genów są w dalszym ciągu nieznanne [Oliver 2000, Brown i wsp. 2001]. Dochodzą do tego zaskakujące odkrycia, z których wynika, że białka enzymatyczne obok udziału w określonych szlakach przemian pełnią funkcje regulatorową w ekspresji genów (np. akonitaza) [Frishman i Hentze 1996]. Dlatego, pomimo ogromnego postępu wiedzy badania nad zagadnieniami z zakresu regulacji i współzależności podstawowych szlaków metabolicznych są w dalszym ciągu uzasadnione. Można procesy te badać metodami inżynierii genetycznej, ale można również je śledzić klasycznymi sposobami: wykorzystując pomiar aktywności enzymów czy ocenę wzrostu komórki w warunkach deficytu jakiegoś składnika pożywki. Bardzo często właśnie te podstawowe badania biochemiczne doprowadzają do zainteresowania się uwarunkowaniami genetycznymi komórek i możliwością ich wykorzystania w określonym procesie biotechnologicznym. Przy czym najczęściej badane są komórki mikroorganizmów. Można je łatwo namnożyć, poddać mutacjom i ograniczyć ich metabolizm do wybranych szlaków. W tym celu stosowane jest naświetlanie promieniami ultrafioletowymi, działanie chemicznymi czynnikami mutagennymi lub ograniczanie źródła podstawowych pierwiastków potrzebnych do wzrostu: węgla, azotu czy siarki. Zastosowanie drożdży jako modelu komórki eukariotycznej jest szczególnie cenne. Mikroorganizmy te zawierają wszystkie główne elementy strukturalne: jądro otoczone błoną, mitochondria, retikulum endocytoplazmatyczne, aparat Goldgiego, rybosomy, peroksysonomy oraz wakuole, które zastępują lizosomy występujące w komórkach wyższych eukariotów.

Ponadto do badań możemy wybrać gatunek charakteryzujący się określonymi właściwościami, np. wykorzystaniem alkanów, alkenów, olejów i tłuszczu jako jedyne źródła węgla przy jednoczesnym ograniczonym wykorzystaniu substratów węglowodanowych. Właśnie gatunek drożdży *Yarrowia lipolytica* cechuje się takimi właściwościami [Barnett i wsp. 1983].

1.2. Charakterystyka drożdży *Yarrowia lipolytica*

Drożdże *Y. lipolytica* są gatunkiem, którego pierwszy szczep wyizolowano z zepsutej margaryny i opisano już w roku 1921 [Barnett i wsp. 1983]. Gatunek ten należy do rodziny *Dipodascaceae*, gromady *Saccharomycetales* (*Endomycetales*), klasy *Hemiascomycetes*, rzędu *Ascomycota*, działu *Mycophyta* (grzyby), królestwa Roślin. Nie jest patogeniczny [Yoshida i Hashimoto 1986, Barns i wsp. 1991], chociaż ostatnio doniesiono o grzybicy skóry u osobników o obniżonej funkcji układu immunologicznego [Chang i wsp. 2001, D'Antonio i wsp. 2002]. Dziko żyjące drożdże tego gatunku izolowano z wielu nisz ekologicznych. Z powodzeniem rosną one zarówno w naturalnych zasobach wodnych [Sinigaglia i wsp. 1994], glebie [Wojtatowicz 1991], jak i stanowią dominującą florę w produktach spożywczych, zawierających dużo tłuszczu czy białka [Sinigaglia i wsp. 1994, Rodriguez i Pais 2000, Ismail i wsp. 2001, Deak 2001]. Są izolowane z serów i partycypują w ich dojrzewaniu [Andrighetto i wsp. 2000, Wojtatowicz i wsp. 2001]. Cechują się bowiem rzadko spotykaną u drożdży zdolnością do hydrolizowania białka i tłuszczu. Drożdże te rosną na podłożach stałych w postaci białych lub kremowych kolonii, a komórki mogą przybierać różne kształty (okrągły, owalny lub wydłużony). Rozmnażają się one przez wielostronne pączkowanie i przez askospory. W określonych warunkach potrafią tworzyć pseudogrzybnię, a czasem septowaną grzybnię właściwą. Dlatego często nazywane są grzybami dimorficznymi [Rodriguez i Dominguez 1984, Lopez i wsp. 1994, Chen i wsp. 1997, Barth i Gaillardin 1997, Hurtado i Rachubiński, 1999]. Próbowano usystematyzować poszczególne izolaty poprzez charakterystykę niektórych parametrów wzrostowych oraz zawartość składników komórkowych [Sinigaglia i wsp. 1994, Rupcic i Maric 1998]. Jednak gatunek ten cechuje duża zmienność w zależności od źródła izolacji, w tym także od strefy klimatycznej. Jednocześnie podstawowymi kryteriami definiującymi przynależność do tego gatunku jest dobry wzrost na n-alkanach, tłuszczach, białkach, a z cukrów – jedynie na glukozie, fruktozie i rybozie [Barnett i wsp. 1983, Kreger van Rij 1984].

W pierwszych pracach nad chromosomami wykazano u *Y. lipolytica* duży polimorfizm długości i oszacowano ich liczbę na 4–6 w haploidalnej komórce [Naumova i wsp. 1993]. W późniejszych pracach wykazano obecność 5 dużych grup nukleotydów o wielkościach 2, 6; 2, 8; 3, 5, 4, 3 i 4, 9 kpar zasad i dopiero w dalszych badaniach udowodniono wspólną migrację dwóch chromosomów [Casaregola i wsp. 1997, Casaregola i wsp. 1999]. Ostatecznie haploidalny genom *Y. lipolytica* zorganizowany jest w 6 chromosomów zawierających $1,1 \times 10^7$ par zasad [Barth i Gaillardin 1996, Casaregola i wsp. 1999]. Wielkość (długość) chromosomów w poszczególnych izolowanych szczepach

jest różna, spowodowana zmienną liczbą fragmentów DNA kodującymi rRNA [Casaregola i wsp. 1999]. Powoduje to heterogenność rybosomów w obrębie tego gatunku drożdży [Fournier i wsp. 1986]. Całkowita ilość DNA w komórce *Y. lipolytica* wynosi 4×10^9 Da [Heslot 1990].

W komórkach tych drożdży po raz pierwszy stwierdzono i opisano regulację ekspresji genów pod wpływem pH [Young i wsp. 1996, Cordeo i Gallardin 1996] oraz autosomalnie replikujące się sekwencje ARS [Fournier i wsp. 1991]. Prowadzono też badania nad systemem umożliwiającym chromosomalną integrację wielu kopii wprowadzanego genu [Le Dall i wsp. 1994].

W bazach danych opisano dla *Y. lipolytica* sekwencje aminokwasowe i nukleotydowe ponad 200 białek lub ich fragmentów (głównie enzymów), jednak nie w każdym przypadku wyizolowano dane białko. Pierwszorzędową strukturę oznaczono dla jednego z białek ściany komórkowej, heksokinazy, 3 różnych dehydrogenaz alkoholowych, liazy izocytrynianowej, proteazy kwaśnej i alkalicznej, lipazy [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>]. W przypadku kinazy kazeinowej II sklonowano gen kodujący podjednostkę katalityczną enzymu [Benetti i wsp. 1997]. Prowadzone są badania nad oksydazami acylo-CoA umożliwiającymi wykorzystanie kwasów tłuszczowych jako źródła węgla [Wang i wsp. 1998], nad białkami wiążącymi tłuszcze [Dell'Angelica i wsp. 1996] i nad thiolazami [Yamagami i wsp. 2001]. Szlaki przemian substratów tłuszczowych i procesy hydroksylacji z udziałem cytochromów P450 są ściśle związane z występowaniem specyficznych organelli zwanych peroksysomami [Nicaud i wsp. 1993, Smaczyńska i Skonieczny 1993]. Badania nad tymi organellami u *Y. lipolytica* są prowadzone w wielu kierunkach. Pierwszy z nich dotyczy badań nad procesem indukcji enzymów i białek, które są zamknięte wewnątrz lub tworzą ich membranę [Nicaud i wsp. 1993, Brown i wsp. 2000]. Drugim kierunkiem są badania nad mechanizmem tworzenia, biogenezą peroksysomów (poprzez agregację składników w organellum otoczone jednowarstwową błoną) i ich podziałem [Nuttley i wsp. 1994, Eitzen i wsp. 1995, Titorenko i wsp. 1996, Brown i wsp. 2000]. Trzecim kierunkiem są badania dotyczące genów kodujących poszczególne białka, ich transkrypcją i transportem produktów (białek) do miejsca agregacji [Hettema i wsp. 1995, Eitzen i wsp. 1996, Brown i wsp. 2000]. Badania nad peroksysomami są cenne ze względu na możliwość porównania defektów związanych z ich biogenezą do dziedzicznych chorób ludzkich. Do takich chorób należą: syndrom Zellwegera, adrenoleukodystrofia neonatalna (NALD), dziecięca choroba Refsum'a (IRD) [Nicaud i wsp. 1993, Smaczyńska i Skonieczny 1993]. Są one spowodowane defektem w tworzeniu peroksysomów (PBD = peroxisome biogenesis disorders).

W peroksysomach jest też usytuowany cykl gliksalowy umożliwiający komórce wzrost na alkanach i innych substratach konwertowanych do dwu węglowych jednostek, w tym octanu i etanolu [De Virgilio i wsp. 1992, Smaczyńska i Skonieczny 1993]. W przypadku *Y. lipolytica* wyizolowano mutanty nie wykorzystujące octanu, gdy jest on jedynym źródłem węgla w podłożu (oznaczone w dalszej pracy jako oct⁻) [Barth i Weber 1987, Wojtatowicz i wsp. 1993, 1995, Heslot 1990]. Opisano 4 klasy mutantów niezdolnych do wzrostu na octanie, różniących się między sobą utylizacją n-alkanów i etanolu [Heslot 1990; Kujau i wsp. 1992; Mauersberger i wsp. 1995, Barth i Gaillardin 1996].

Jedna z tych klas obejmuje mutanty niezdolne do wzrostu na octanie i na n-alkanach, a zdolne do wzrostu na etanolu [Kujau i wsp. 1992]. Metabolizm szczepów zaliczanych do tej klasy jest bardzo mało poznany, podobnie jak szlak (-i?) przemian octanu.

1.3. Metabolizm octanu

Kwas octowy od lat wykorzystywany jest jako konserwant w przetwórstwie owoców i warzyw, gdyż jego dodatek ogranicza wzrost mikroorganizmów. Mechanizm jego toksyczności nie jest wyjaśniony [Pijanowski i wsp. 1996]. Według jednej z istniejących hipotez niezdysocjowany kwas octowy działa jako czynnik rozprzegający transport protonów z cytoplazmy i do cytoplazmy, doprowadzając do osłabienia siły protomotorycznej, która jest niezbędna do oksydatywnej fosforylacji i innych procesów endoergicznych błony. Według drugiej hipotezy toksyczny efekt octanu wynika z akumulacji samego anionu w cytoplazmie [Diez-Gonzalez i Russel 1997, Chang i wsp. 1999, O'Beirne i Hamer 2000]. W przypadku bakterii tolerancja na octan jest bardzo różna i zależy od obecności glukozy czy glicerolu [Lasko i wsp. 2000]. Wiadomo, że niektóre szczepy „bakterii octowych” (AAB) rosną przy stężeniu octanu 70g/L, a akumulują go nawet do 150g/L. Równie mało wrażliwe są niektóre szczepy z gatunku *Lactobacillus acetotolerans*, wyrastają nawet w obecności 100 g/L octanu [za Lasko i wsp. 2000]. Natomiast najwyższą tolerancję, pośród takich bakterii jak *Staphylococcus capitis*, *Acetobacter aceti*, *Gluconobacter suboxydans*, *Lactobacillus acetotolerans*, *Lactobacillus bulgaricus* i *Escherichia coli*, wykazano dla pierwszego z cytowanych gatunków. Wyrastał on jeszcze w obecności 44 g/L octanu. Natomiast tolerancja pozostałych gatunków, zdawałoby się opornych na octan, jest niewiele wyższa niż w przypadku *E. coli*. Wrażliwość drożdży na octan jest także bardzo różna. Dla *Candida albicans* granicznym stężeniem octanu sodu w pożywcze umożliwiającym wzrost jest 0,24 M (14,4 g/L) [Shimokawa i Nakayama 2000]. Większość izolatów drożdży *Y. lipolytica* wyrasta przy stężeniach od 4 do 10 g/L [Barth i Gaillardin 1996], a nieliczne tolerują 20 g/L [Finogenova i wsp. 1986]. Tylko dla niektórych mutantów tego gatunku już stężenie 0,03 M (1,8 g/L) jest toksyczne i hamuje wzrost, nawet w obecności glukozy [Tzschoppe i wsp. 1999].

Obok toksyczności, jaką wykazuje octan, pełni on także ważną rolę w zarodnikowaniu grzybów, drożdży i bakterii. Jest składnikiem tak zwanych podłoży sporulacyjnych [Barnett i wsp. 1983]. Mechanizm tej indukcji nie jest wyjaśniony. Ponadto wiele mikroorganizmów jest zdolnych do wzrostu w obecności niskich stężeń octanu jako jedynego źródła węgla [De Virgilio i wsp. 1992; van den Berg i Steensma 1995]. U drożdży *S. cerevisiae* wykazano, że za wykorzystanie octanu są odpowiedzialne przynajmniej 43 geny [McCammont 1996, Przybyła-Zawislak i wsp. 1999]. Mutanty wykazujące uszkodzenie w niektórych z tych genów posiadają defekty w enzymach glukoneogenezy, enzymach cyklu glioksalowego oraz cyklu Krebsa, w regulacji procesów metabolicznych oraz w wewnątrzkomórkowym przepływie informacji pomiędzy mitochondriami, peroksysomami i jądrem [Dennis i wsp. 1999; Gadde i McCammont 1997; Liao i Butow 1993; Small i wsp. 1995]. Wpływ octanu na tak wiele szlaków metabolicznych wynika z faktu, że aktywna forma octanu, inaczej „aktywny octan” znany jako acetylo-koenzym A (acetylo-CoA), odgrywa

bardzo ważną rolę w metabolizmie każdej komórki. Jego wewnątrzkomórkowe stężenie ma istotne znaczenie dla wzrostu i życia komórki [Chohman i wsp. 1997, Chang i wsp. 1999]. Pochodzi on z degradacji biologicznych polimerów: cukrów, białek i tłuszczu. Jest centralnym związkiem usytuowanym na skrzyżowaniu głównych anabolicznych i katabolicznych szlaków biochemicznych. Jest prekursorem aminokwasów, kwasów tłuszczowych, cukrów, cholesterolu, acetylocholino i wielu innych ważnych dla funkcjonowania komórki (i organizmu) metabolitów. W związku z tym, że błony komórkowe są dla acetylo-CoA nieprzepuszczalne, nie dochodzi do chaosu w komórce. Wewnątrzkomórkowa dystrybucja enzymów uczestniczących w przemianach aktywnego octanu pomiędzy mitochondria, peroksysony i cytoplazmę powoduje, że metabolizm octanu jest ciekawym, intrygującym przedmiotem badań [Szutowicz i wsp. 1998a, 1998b, 1999; Tzschoppe i wsp. 1999; McCammon 1996; Przybyła-Zawislak i wsp. 1999; Chaure i Connerton 1995; Todd i wsp. 1997]. Acetylo-CoA wchodzący do cyklu Krebsa jest syntetyzowany w mitochondrium przy udziale dehydrogenazy pirogronianowej [E. C. 1. 2. 4. 1]. W cytoplazmie komórek ssaków aktywny octan pochodzi z degradacji kwasów tłuszczowych (β -oksydacji), katabolicznych przemian aminokwasów i kwasów nukleinowych. W komórkach prokariotycznych aktywny octan może pochodzić z przemian pirogronianu, degradacji kwasów tłuszczowych i katabolicznych przemian innych związków oraz z octanu. Opisano aktywację octanu przez bursztynylo – CoA: acetylo – CoA transferazę, przez kinazę octanową i fosfotransacetylazę [Galushko i Schink, 2000, Brasen i Schonheit 2001]. Acetylo-CoA jest także bezpośrednim prekursorem kwasu cytrynowego, który nagromadzany jest przez niektóre szczepy drożdży *Y. lipolytica*.

1.4. Regulacja nadprodukcji kwasu cytrynowego

Kwas cytrynowy (CA) pełni wielofunkcyjną rolę w regulacji zarówno anabolizmu, jak i katabolizmu. Odgrywa rolę pozytywnego i negatywnego modulatora wielu kluczowych enzymów podstawowego metabolizmu [Srere 1965, Srere 1972, Evans i Ratledge 1985]. Cytrynian podlega oksydacji w cyklu Krebsa, który dostarcza prekursorów wymaganych w reakcjach biosyntezy. U *S. cerevisiae* oraz w tkankach ssaków cytrynian aktywuje cytosoliczną karboksylazę acetylo-CoA [Bloch i Vance 1977, Wakil i wsp. 1983], inhibuje glikolizę na poziomie 6-fosfofruktokinazy [Evans i Ratledge, 1984] oraz kinazy pirogronianowej [Barbalace i wsp. 1971]. W przypadku nagromadzenia tego kwasu przez *Apergillus niger* kluczowym momentem jest niewrażliwość na cytrynian fosfofruktokinaza – pierwszy regulacyjny enzym glikolizy [Stryer 1999, Szczodrak 1981]. W badaniach nad kontrolą nadprodukcji kwasu poprzez regulację aktywności enzymów cyklu Krebsa wykazano wpływ ponad 7 enzymów na proces [Torres 1996], przy czym samo 11-krotne powielenie genu syntazy cytrynianowej (SC) nie prowadzi do zwiększenia pozakomórkowego nagromadzenia CA [Ruijter i wsp. 2000]. Na ilość wydzielanego kwasu cytrynowego wpływa stężenie jonu amonowego [Mayilvahanan i wsp. 1996]. Pomimo że *A. niger* wykorzystywany jest do produkcji kwasu cytrynowego od początku ubiegłego wieku, do tej pory nie udało się jednoznacznie ustalić krytycznych punktów

kontroli tego procesu [Kubicek i Rohr 1980, Szczodrak 1981, Kubicek i Rohr 1986, Jaklitsch i wsp. 1991, Pazuoki i wsp. 2000].

W przypadku innego znanego producenta tego kwasu , drożdży *Y. lipolytica* nadprodukcja CA indukowana jest deficytem azotu w podłożu prowadzącym do zatrzymania wzrostu biomasy [Behrens i wsp. 1987, Wojtatowicz, 1991]. Wydzielanie CA można także spowodować deficytem siarki lub fosforu. W przypadku produkcji CA z udziałem *Y. lipolytica* prowadzono szereg badań. Dotyczyły one optymalizacji składu podłoża glukozowego do produkcji CA [Wojtatowicz 1991, Rymowicz 1995], doboru i optymalizacji procesu, wykorzystania różnych systemów hodowlanych (półciągłe, ciągłe) [Rymowicz i Wojtatowicz 1999, Rymowicz i wsp. 1993c, Wojtatowicz i Rymowicz 1994, Rymowicz 1998]. Badano możliwość wykorzystania innych substratów niż glukoza (melasa, etanol, parafiny, hydrol glukozowy) [Nakanishi i wsp. 1972, Marchal i wsp. 1980, Furukawa i wsp. 1982, Finogenova i wsp. 1986, Wojtatowicz i Rymowicz 1990, 1991, Wojtatowicz i wsp. 1993, Kautola i wsp. 1992, Arzumanov i wsp. 2000, Żarowska 1999]. Prowadzono też prace nad zastosowaniem w procesach biosyntezy CA genetycznie modyfikowanych szczepów oraz mutantów [Rymowicz i Wojtatowicz 1996, Rymowicz i wsp. 1996, Wojtatowicz i wsp. 1997, Żarowska 1999]. Wykorzystywano także unieruchomione komórki drożdży jako producentów CA [Maddox i Kingston 1983, Rymowicz i wsp. 1993a, b]. W najkorzystniejszych z wyżej wymienionych systemów, z wykorzystaniem najlepszych producentów otrzymywano 100–200 g/l CA lub jego soli, przy szybkości właściwej produkcji 0,073–0,1 g/g/h i wydajności 0,65–0,9 g/g [Wojtatowicz i Rymowicz 1994, Rymowicz 1998, Arzumanov i wsp. 2000]. Niemniej, w dalszym ciągu jest to proces niestabilny. Komórki tracą zdolność kwasotwórczą, gdyż pojawiają się mniej aktywne segreganty [Wojtatowicz i wsp. 1995]. Jednak porównanie procesów z udziałem pleśni i drożdży wypadło na korzyść tych ostatnich [Rane i Sims 1993, Moresi 1994].

Prowadzone były też badania aktywności kluczowych dla procesu biosyntezy CA enzymów. Między innymi: syntazy cytrynianowej (SC), izocytrynianowej dehydrogenazy (ICDH) i liazy izocytrynianowej (ICL) [Glazunova i Finogenova 1976, Behrens i wsp. 1977, Matsuoka i wsp. 1977, Franke-Rinker i wsp. 1983, Katajeva i Finogenova 1987]. Badano też wpływ stężenia glukozy i szybkości jej wykorzystania na proces pozakomórkowego nagromadzenia CA [Rane i Sims 1993, Kim i Roberts 1991].

Pomimo wielu badań nie wykazano w dalszym ciągu istoty regulacji nadprodukcji kwasu cytrynowego przez drożdże i dalsze badania mające na celu wykazanie możliwych punktów sterowania tym procesem są w pełni uzasadnione.

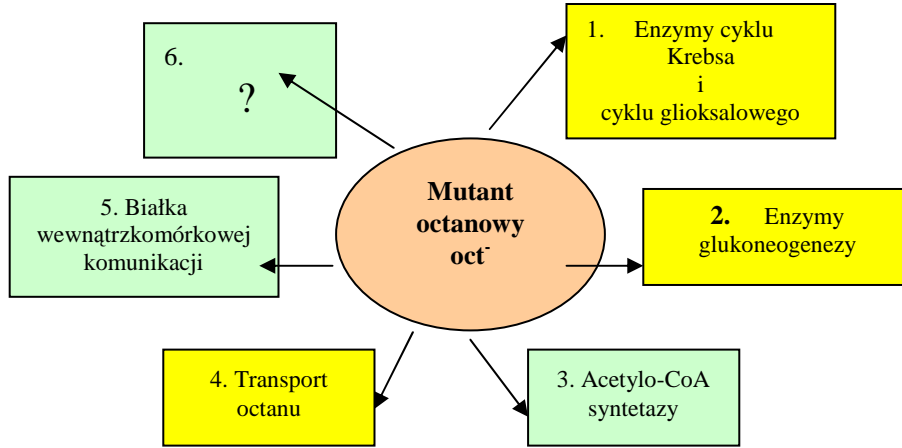
2. GENEZA I CEL PRACY

Do rozpoczęcia badań nad metabolizmem *Y. lipolytica* przyczyniły się prowadzone w Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności od ponad 10 lat badania dotyczące wykorzystania tego gatunku drożdży do produkcji kwasu cytrynowego (CA) [Wojtatowicz 1991, Rymowicz 1998]. Biorąc pod uwagę technologię, cenne są zwłaszcza szczepy A-101.1.31 i A-101.1.31.K1 cechujące się dużą stabilnością przechowalniczą [Wojtatowicz i Rywińska, 1999] i nagromadzające kwas cytrynowy praktycznie bez udziału kwasu izocytrynowego w mieszaninie poreakcyjnej [Wojtatowicz 1991]. Są to mutanty octanowe (oznaczone oct), nie wykorzystujące octanu gdy jest on jedynym źródłem węgla w podłożu. Podobnie jak szczep rodzicielski (A-101) czy inny mutant (A-101.1.22) nie były one wcześniej przedmiotem badań mogących prowadzić do bliższego ich scharakteryzowania. Szczególnie ważne były aspekty poznawcze związane z wykorzystaniem octanu oraz wydzielaniem cytrynianu. Stanowiły one cel prowadzonych badań, których pierwszym punktem było poznanie defektu warunkującego fenotyp oct⁻ szczepów A-101.1.31 i A-101.1.31.K1, a drugim wyjaśnienie komórkowych podstaw biosyntezy i wydzielania kwasu cytrynowego przez drożdże *Y. lipolytica*.

Realizacja pierwszego punktu celu mogła obejmować wiele kierunków: badanie enzymów cyklu Krebsa (CKT) i cyklu gliksalowego, enzymów glukoneogenezy, acetylo-CoA syntetaz, transportu octanu, białek wewnątrzkomórkowego przekazu informacji czy bliżej dziś nieznanymi czynnikami (rys. 1). Natomiast w prezentowanej pracy pierwszy punkt celu stanowiły kierunki badań oznaczone kolorem żółtym. Były to badania nad: enzymami CKT i cyklu gliksalowego, funkcjonowaniem szlaku glukoneogenezy poprzez analizę wzrostu na substratach innych niż cukry oraz nad prawidłowym funkcjonowaniem transportu octanu do komórki.

Badania drugiego punktu celu obejmowały pomiar aktywności enzymów kluczowych dla biosyntezy kwasu cytrynowego, wyznaczenie powinowactwa do glukozy, ocenę stopnia utylizacji glukozy, porównanie komórkowego składu cukrowego i zawartość kwasów tłuszczowych oraz wewnątrzkomórkowego cytrynianu.

Pomimo że cel pracy został sformułowany w dwóch punktach, trudno byłoby rozdzielać wyniki tak, aby najpierw omawiać pierwszy, a następnie drugi z nich. Oba badane zagadnienia wzajemnie się przenikały i uzupełniały. Często wyniki jednych badań sugerowały dalsze niewyjaśnione aspekty studiowanego problemu i ostatecznie doprowadziły do wielopłaszczyznowego scharakteryzowania czterech szczepów *Y. lipolytica*: A-101; A-101.1.31; A-101.1.31.K1 oraz A-101.1.22



Rys. 1. Możliwe miejsca uszkodzenia szlaków metabolicznych prowadzące do ekspresji fenotypu octan minus (oct⁻). Kolorem żółtym oznaczono punkty badane w pracy

Fig. 1. Possible metabolic alteration sites leading to the expression of acetate minus phenotype (acu⁻). Yellow coloured boxes were studied in this work

3. OMÓWIENIE WYNIKÓW BADAŃ WŁASNYCH

Część wyników dotycząca badanych problemów zawarta jest w pracach już opublikowanych, których dane bibliograficzne zamieszczono w przedmowie, oznaczając je kolejnymi numerami rzymskimi. Z opublikowanych pozycji przytoczono tylko te wyniki, które wymagały porównania z danymi dotyczącymi innych szczepów, innych układów lub posłużyły do szerszej interpretacji badań. Natomiast dotychczas niepublikowane wyniki przedstawiono szerzej, podając w nawiasie odpowiednią pozycję aneksu odsyłającą czytelnika do metodycznego opisu wykonanego badania.

Cztery szczepy drożdży *Y. lipolytica*: A-101, A-101.1.31, A-101.1.31.K1 oraz A-101.1.22 produkujące kwas cytrynowy i będące przedmiotem badań założonych w celu pracy stanowią swoistą „rodzinę”. Pierwszy jest szczepem rodzicielskim, a pozostałe są mutantami [Wojtatowicz i wsp. 1993]. Szczepy A-101.1.31 i A-101.1.31.K1 to mutanty octanowe (oct⁻), a szczep A-101.1.22 – nazywany w dalszej pracy rewertantem – jest mutantem, który w krótkim czasie utracił fenotyp oct⁻ i cechuje się zdolnością do wykorzystania octanu jako jedynego źródła węgla. Szczepy te nagromadzają obok CA także kwas izocytrynowy (ICA), przy czym mutanty octanowe wydzielają go mniej niż rodzic [Wojtatowicz 1991; Robak 1995; Żarowska 1999].

Piąty szczep, *Y. lipolytica* ATCC 32 338A, nie należący do rodziny i nie nagromadzający CA był w tych badaniach szczepem wzorcowym (kontrolnym) umożliwiającym porównanie producentów CA. Dla porównania cech producentów badano też zdolne do biosyntezy kwasu szczepy *Y. lipolytica* ATCC 20 324 i ATCC 20 320, które nie są spokrewnione ze szczepem A-101. W badaniach nad genem syntazy cytrynianowej kontrolę stanowił szczep *S. cerevisiae* PCM 2103.

Mając na uwadze przejrzystość prezentowanych wyników badań, podzielono je na trzy części: wykorzystanie octanu, poszukiwanie defektu genetycznego oraz regulacja wydzielania CA. Dwa pierwsze dotyczą głównie pierwszego, a ostatni – drugiego punktu celu. Należy jednak zaznaczyć, że niektóre wyniki dotyczą jednocześnie obydwóch aspektów badawczych.

3.1. Utylizacja octanu przez badane szczepy *Y. lipolytica*

Spśród wybranych do badań szczepów drożdży *Y. lipolytica* do wykorzystania octanu jako jedynego źródła węgla zdolne były: A-101, A-101.1.22 oraz ATCC 32 338A [VI]. Wyrastały one zarówno przy niskich (0,1%), jak i wysokich (1%) koncentracjach

tego substratu. Natomiast, jak się spodziewano, mutanty oct⁻: A-101.1.31 oraz A-101.1.31.K1 nie wyrastały przy żadnym z zastosowanych stężeń octanu. Nieoczekiwanie mutanty te korzystały z etanolu jako jedyne źródła węgla [VI], co świadczy o ich zdolności do przyswajania i metabolizowania dwu węglowych związków. Postawiono więc sprawdzić, czy octan jest asymilowany, gdy w podłożu jest inne źródło węgla, np. glukoza.

3.1.1. Indukcja utylizacji octanu przez mutanty oct⁻

Badano zdolność mutantów oct⁻ i pozostałych szczepów do wzrostu z octanu sodu w zakresie jego stężeń od 0 do 1% w podłożu zawierającym 1% glukozy jako drugie źródło węgla [Aneks: 6.1, 6.2].

Plon biomasy poszczególnych szczepów był różny w zależności od ilości i stężenia substratów węglowych (tab. 1). Octan sodu dodany do podłoża glukozowego w stężeniu 1% zwiększył ilość biomasy szczepu A-101 o 10% w stosunku do sumy biomasy wyrosniętej na pojedynczych substratach (4,04 g/L w MMT z glukozą plus 1,7 g/L w MMT z octanem = 5,74 g/L, a 6,37 g/L w MMT z octanem i glukozą).

Tabela 1

Table 1

Porównanie plonu biomasy otrzymanej w hodowli *Y. lipolytica* w podłożu MMT z jednym lub dwoma źródłami węgla
Comparison of the yeast biomass level obtained in *Y. lipolytica* culture on MMT with one or two carbon source

Szczep Strain	Glukoza* Glucose* [10 g/L]	Octan sodu jako źródło węgla [g/L] Sodium acetate as carbon source [g/L]						
		0	1	2	4	6	8	10
		Plon biomasy [gsm/L] – Biomass level [gdm/L]						
Oct ⁺ , Acu ⁺								
A-101	+	4,04	4,64	4,75	4,75	5,65	6,09	6,37
	-	Ng	0,16	0,38	0,54	1,16	1,54	1,70
A-101.22	+	3,38	3,60	4,06	3,77	3,93	4,49	3,23
	-	Ng	0,27	0,30	0,41	0,76	0,84	1,20
ATCC 32 338A	+	1,34	1,56	1,84	2,12	2,05	1,93	2,05
	-	Ng	0,19	0,42	0,65	0,91	1,29	1,36
Oct ⁻ , Acu ⁻								
A-101.1.31	+	3,35	3,75	4,39	4,95	4,97	5,02	5,08
	-	Ng	Ng	Ng	Ng	Ng	Ng	Ng
A-101.1.31.K1	+	3,66	4,09	3,98	4,12	4,66	4,73	5,83
	-	Ng	Ng	Ng	Ng	Ng	Ng	Ng

Ng = brak wzrostu, no growth

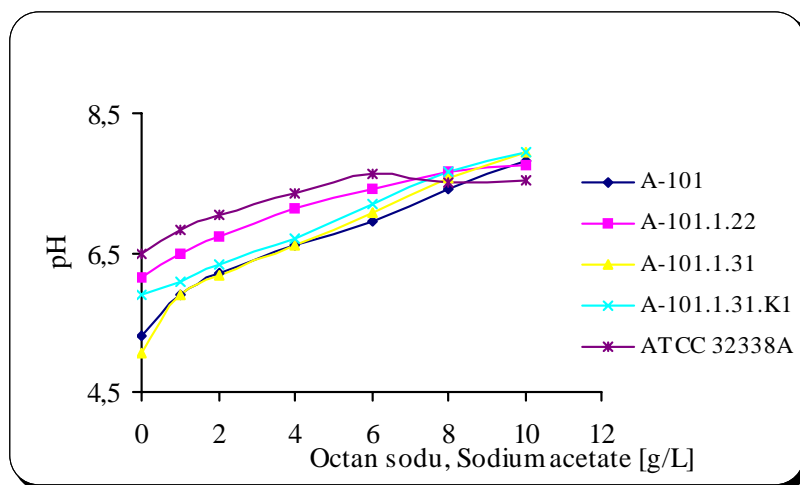
*(+)- dodana lub (-) nie dodana do podłoża

(+) added or (-) not added to the medium

Dla mutantów octanowych A-101.1.31 i A-101.1.31.K1 ilość biomasy była o 50% wyższa na podwójnym źródle węgla niż w obecności tylko glukozy (3,35 i 3,66g/L z glukozy oraz 5,08 i 5,83 g/L z glukozy z octanem). W podłożu z samym octanem szczepy te nie wyrastały. Dla szczepu A-101.1.22 obserwowano obniżenie ilości biomasy wraz z dodatkiem octanu, podobne jak dla szczepu ATCC 32338A, nie gromadzącego kwasu cytrynowego.

Reasumując, potwierdzono brak zdolności szczepów A-101.1.31 i A-101.1.31.K1 do wzrostu na octanie, wykazując jednocześnie że octan przy obecności glukozy w środowisku zwiększał plon ich biomasy, podobnie jak plon biomasy szczepu A-101 (rodzica). Wykazano również, że dodatek octanu do podłoża glukozowego wywierał zróżnicowany wpływ na zdolność namnażania się szczepu A-101.1.22 (rewertanta) i szczepu ATCC 32338A. Mogło to być spowodowane ograniczonym wykorzystaniem glukozy.

Podczas wzrostu drożdży w podłożu zawierającym tylko glukozę obserwowano zakwaszanie środowiska. Końcowe pH wynosiło od 5 do 6,5. Natomiast podczas wzrostu w podłożu glukozowym wzbogaconym o octan sodu końcowe pH wynosiło 7,5–8,0 w przypadku wzrostu wszystkich badanych szczepów (rys. 2). Alkaliczacja środowiska związana była z wykorzystaniem anionu octanowego i uwolnieniem kationu sodowego. Świadczy to o asymilacji octanu. Wykorzystanie octanu potwierdzono także, oznaczając jego stężenie w płynie hodowlanym oraz w biomacie [Aneks : 6.3.2].



Rys. 2. Końcowe pH w hodowli szczepów w podłożu MMT z glukozą z różnymi dawkami octanu sodu
 Fig. 2. Final pH in culture of strains on glucose MMT medium with different concentration of sodium acetate

W przypadku szczepów A-101 oraz A-101.1.31.K1 nie wykryto pozostałości octanu w hodowlach (tab. 2). Natomiast dla szczepu A-101.1.31 oraz A-101.1.22 resztkowe stężenie octanu w hodowli wynosiło od 0,05 do 0,25 g/L i wzrastało proporcjonalnie do zastosowanej dawki, nie przekraczając jednak 2,5% ilości dodanej wyjściowo. Dla szczepu ATCC 32 338A pozostałość octanu wynosiła od 0,17 do 0,96g/L (czyli 2,8–9,6% dodanej ilości). W biomacie badanych szczepów nie wykryto octanu. Mutanty octanowe podobnie jak pozostałe szczepy wykorzystywały octan.

Tabela 2
Table 2

Resztkowe stężenie octanu w hodowli szczepów *Y. lipolytica* w podłożu MMT z glukozą (10 g/L) i wzrastającymi stężeniami octanu sodu
Residual level of acetate in cultures of *Y. lipolytica* strains on MMT medium with glucose (10 g/L) and increasing concentrations of sodium acetate

Octan sodu (początkowe stężenie) Sodium acetate (initial concentration) [g/L]	Resztkowe stężenie octanu – Residual level of acetate [g/L]				
	A-101	A-101.22	ATCC 32 338A	A-101.1.31.K1	A-101.1.31
0	0	0	0	0	0
1	0	0	0	0	0,05
2	0	0	0	0	0,06
4	0	0	0	0	0,06
6	0	0	0,17	0	0,06
8	0	0	0,54	0	0,13
10	0	0,25	0,96	0	0,10

Podsumowując, wykorzystanie octanu przez szczepy A-101.1.31 oraz A-101.1.31.K1 było możliwe ze względu na jednoczesną obecność glukozy w podłożu; przy czym glukoza również została skonsumowana przez drożdże.

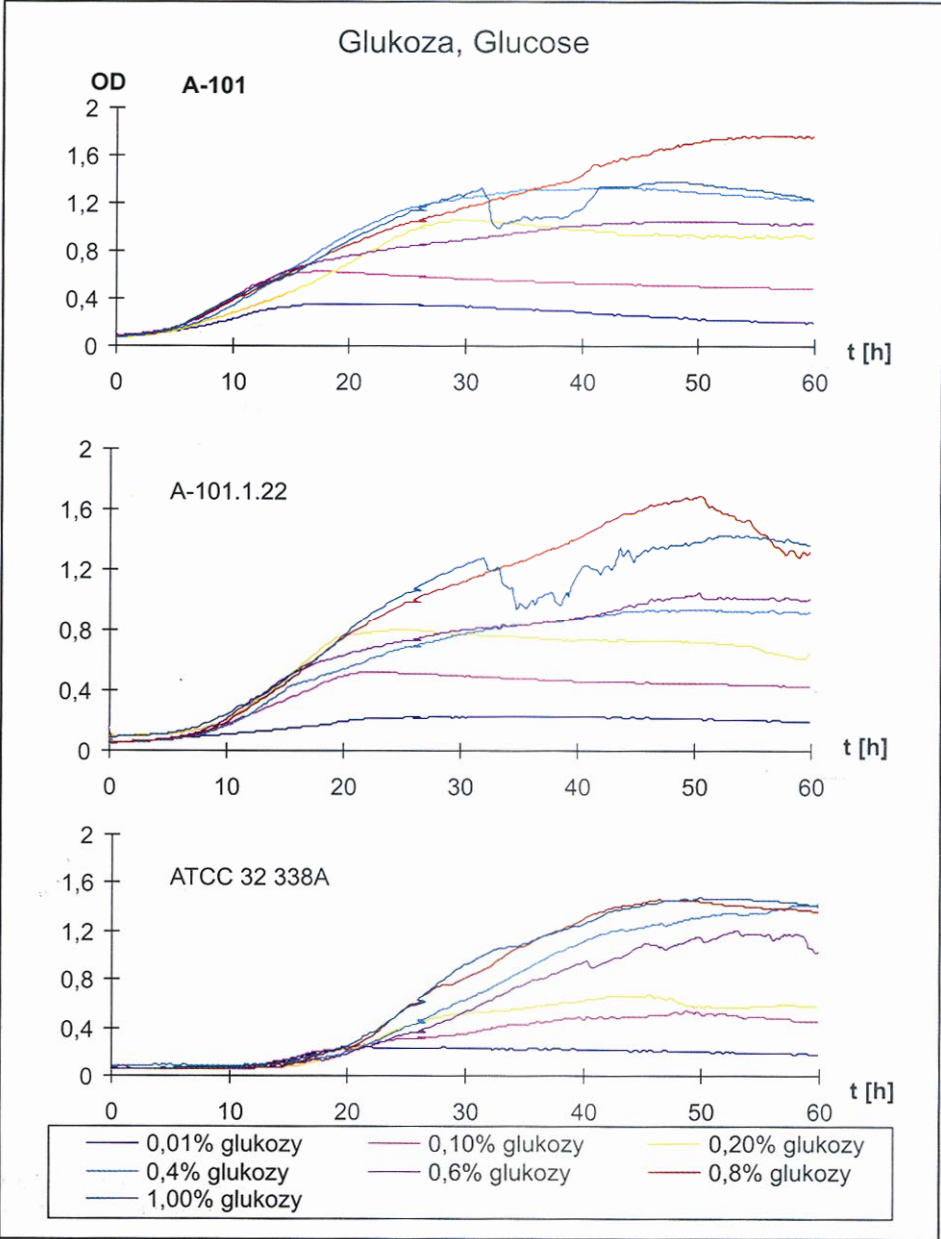
Resztkowe stężenie glukozy po wzroście szczepów A-101, A-101.1.31 i A-101.1.31.K1 wynosiło od 0,11 do 0,16 g/L, co stanowiło od 1,1 do 1,6% dodanej ilości i było praktycznie niezależnie od dawki octanu (tab. 3). Po hodowli szczepu A-101.1.22 pozostało od 0,23 do 1,9 g/L glukozy (od 2,3 do 19% dodanej ilości), a w przypadku szczepu ATCC 32 338A nawet 4,87–6,17 g/L (48,7–61,7%). W tych dwóch ostatnich przypadkach wraz ze wzrostem stężenia octanu obserwowano hamowanie stopnia wykorzystania glukozy przez drożdże.

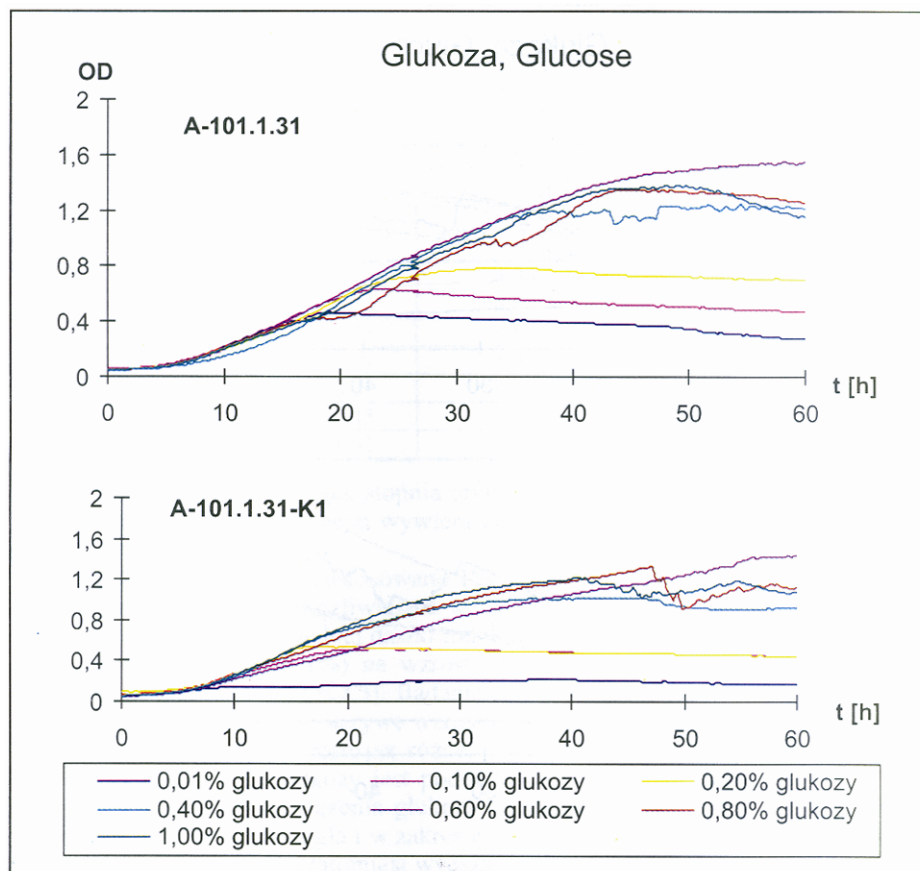
Reszkowe stężenie glukozy w hodowli szczepów *Y. lipolytica* w podłożu MMT z glukozą (10 g/L) i wzrastającymi stężeniami octanu sodu
Residual level of glucose in cultures of *Y. lipolytica* strains on MMT medium with glucose (10 g/L) and increasing concentrations of sodium acetate

Octan sodu Sodium acetate [g/L]	Reszkowe stężenie glukozy – Residual level of glucose [g/L]				
	A-101	A-101.22	ATCC 32 338A	A-101.1.31.K1	A-101.1.31
0	0,13	0,23	4,96	0,16	0,13
1	0,13	0,23	4,87	0,14	0,11
2	0,11	0,25	4,87	0,13	0,13
4	0,12	0,21	5,39	0,15	0,14
6	0,14	0,31	6,17	0,14	0,13
8	0,14	0,45	6,00	0,16	0,16
10	0,16	1,91	5,39	0,16	0,16

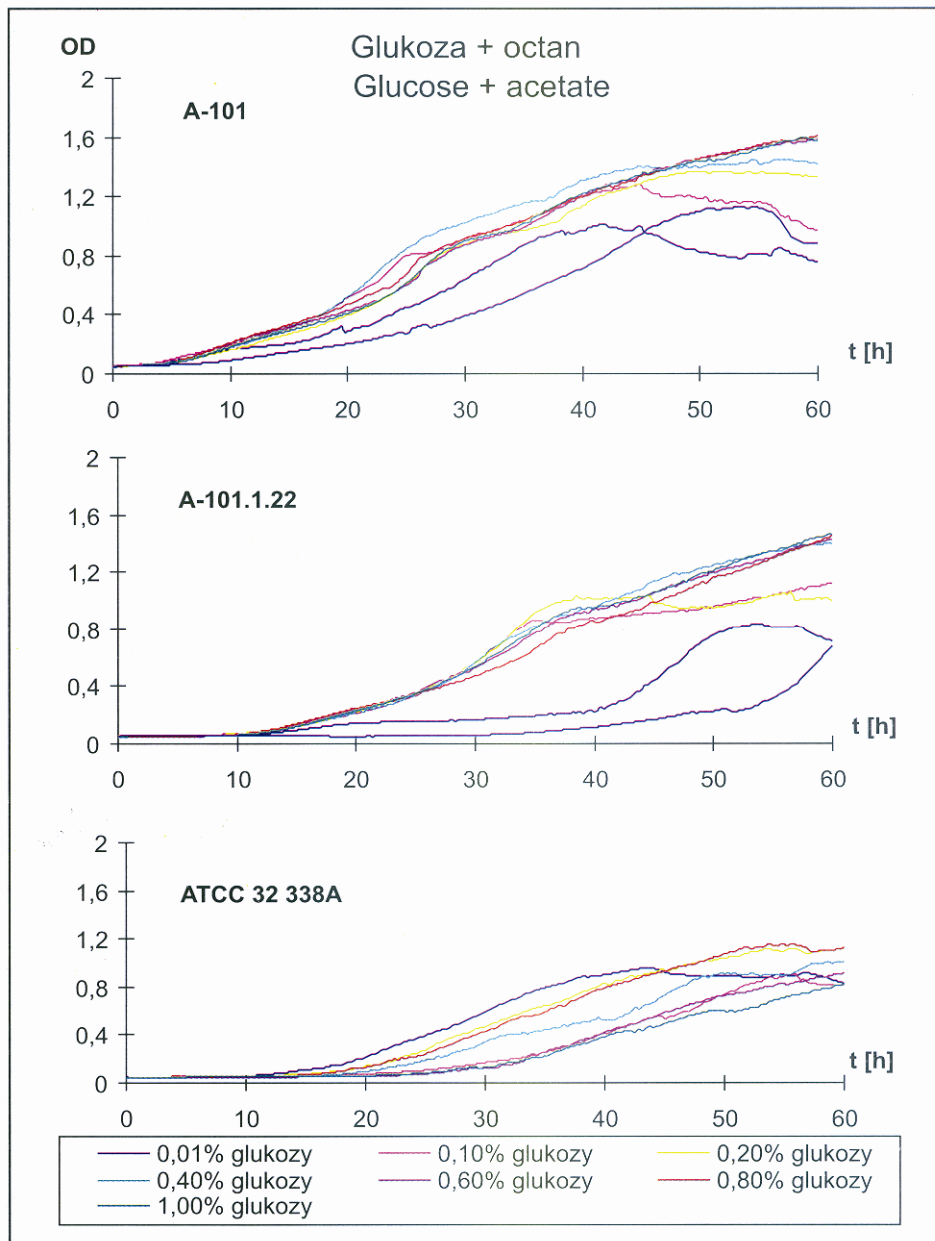
Przedstawione dane dotyczące stopnia utylizacji glukozy ukazują, że dodatek octanu w zależności od badanego szczepu wywiera zróżnicowany wpływ na stopień wykorzystania glukozy.

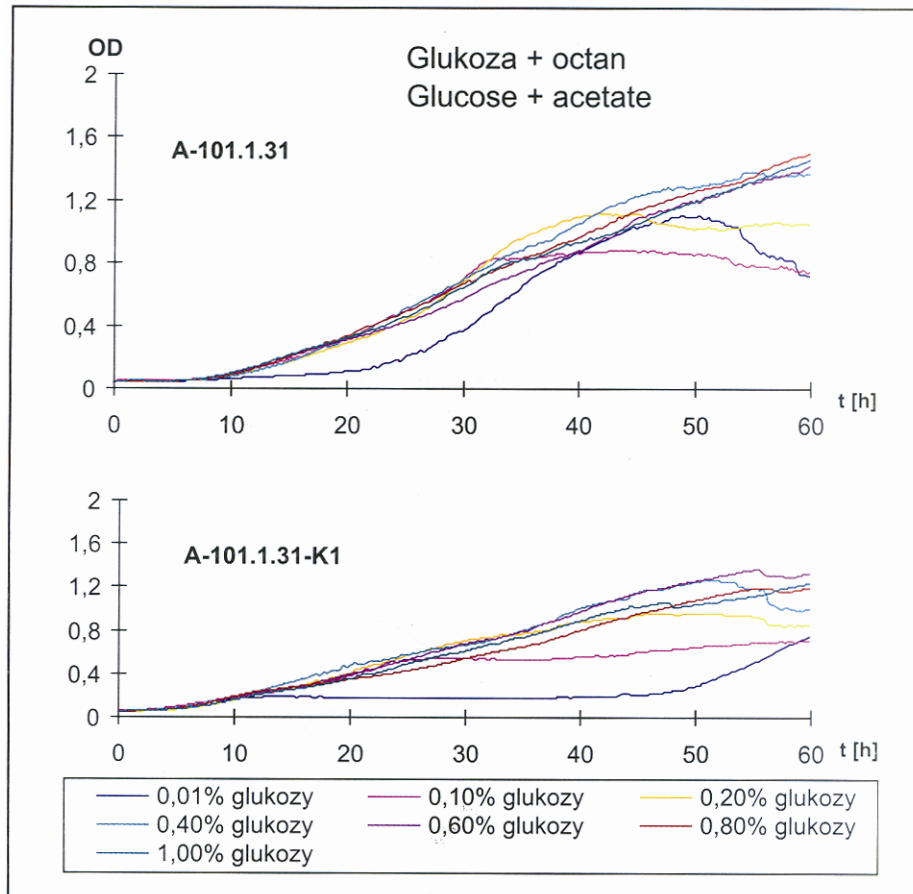
W powyższych badaniach zastosowano 1% stężenie glukozy i nie było wiadomo, czy jest to najmniejsza dawka umożliwiająca wzrost i wykorzystanie octanu przez mutanty oct⁻. W celu określenia minimalnej dawki indukującej jego wykorzystanie badano wpływ różnych dawek glukozy (0–1%) na wzrost szczepów w podłożu zawierającym 0,6% octanu sodu [Aneks: 6.1 oraz 6.2.3]. Badanie przeprowadzono w automacie do hodowli mikroorganizmów, a uzyskane krzywe wzrostu biomasy (OD) przedstawiono na rysunku 3 i 4. Otrzymane profile wzrostu są różne, chociaż końcowa biomasa szczepów przy poszczególnych dawkach glukozy jest podobna. Ilość biomasy (OD) wszystkich badanych szczepów zależała od stężenia glukozy w zakresie od 0,01 do 0,4% (rys. 3), gdy była ona jedynym źródłem węgla i w zakresie od 0,01 do 0,1%, gdy w podłożu był obecny również octan (rys. 3, 4). Natomiast wyższa dawka glukozy nie miała wpływu na plon biomasy szczepu rodzicielskiego, mutantów oct⁻ oraz szczepu A-101.1.22. Ilość biomasy szczepu ATCC 32338A wyrastająca z glukozy zależała od ilości tego substratu w szerokim zakresie stężeń (od 0,01 do 1%), podczas gdy wyrastająca w podłożu z octanem i z różnymi dawkami glukozy była zdecydowanie zróżnicowana podczas początkowych godzin hodowli, osiągając jednak w 60 godzinie podobny poziom (rys. 4). Powyżej przytoczone zależności są najbardziej widoczne, gdy przykładowo porównamy OD hodowli (ilość biomasy) w 30 godzinie wzrostu szczepów w podłożu z poszczególnymi zastosowanymi stężeniami glukozy i octanu (tab. 4). Otrzymane wyniki wskazują także na większy plon biomasy szczepów z podłoża zawierającego obok małych dawek glukozy również 0,6% octanu sodu. Szczególnie istotny jest przyrost biomasy mutantów oct⁻ w hodowli z glukozą w dawce 0,1% oraz 0,2%. Dla szczepu A-101.1.31 i dawki 0,1% przyrost ten wynosił ponad 24%, a dla szczepu A-101.1.31.K1 i dawki 0,2% – ponad 60% ilości biomasy otrzymanej z tych samych dawek glukozy bez octanu. Potwierdza to indukcję wykorzystania octanu przez mutanty oct⁻. Efekt indukcji utylizacji octanu (w postaci przyrostu różnicy OD) obserwowano również w przypadku szczepów A-101 oraz ATCC 32 338A przy zastosowaniu najmniejszej dawki glukozy (0,01%) (tab. 4).





Rys. 3. Wzrost drożdży (gęstość optyczna, OD) w podłożu MMT w zależności od stężenia glukozy
 Fig. 3. Growth of yeast (optical density, OD) on MMT medium in relation to the concentration of glucose





Rys. 4. Wzrost drożdży (gęstość optyczna, OD) w podłożu MMT z 0,6% octanem sodu w zależności od stężenia glukozy (drugie źródło węgla)

Fig. 4. Growth of yeast (optical density, OD) on MMT medium with 0,6% of sodium acetate in relation to concentration of glucose (second carbon source)

Biomasa (OD) w 30 godzinie hodowli drożdży w podłożu MMTz różnymi dawkami glukozy bez octanu i z octanem
Biomass (OD) at 30 hours of yeasts culture on MMT medium with different doses of glucose without or with acetate

Glukoza Glucose [%]	A-101	A-101.1.22	A-101.1.31	A-101.1.31.K1	ATCC 32 338A
Bez octanu – without acetate					
0	0,080	0,059	0,050	0,056	0,058
0,01	0,329	0,214	0,425	0,200	0,226
0,1	0,563	0,488	0,587	0,497	0,343
0,2	1,051	0,789	0,765	0,497	0,516
0,4	1,200	0,767	1,094	0,908	0,641
0,6	0,886	0,786	1,007	0,826	0,521
0,8	1,155	1,112	0,895	0,980	0,807
1,0	1,272	1,219	0,936	1,065	0,923
Z octanem, with acetate (0,6%)					
0	0,389	0,099	0,054	0,056	0,280
0,01	0,642	0,164	0,368	0,178	0,590
0,1	0,895	0,590	0,725	0,550	0,134
0,2	0,896	0,620	0,730	0,710	0,505
0,4	1,024	0,595	0,695	0,700	0,350
0,6	0,890	0,590	0,570	0,678	0,134
0,8	0,890	0,482	0,672	0,620	0,420
1,0	0,899	0,530	0,643	0,608	0,127

Ostatecznie minimalne stężenie glukozy niezbędne do indukcji wykorzystania octanu przez mutanty oct⁻ wyniosło 0,01%. Jest to bardzo czytelne gdy porównamy plon biomasy (OD) jednego z mutantów (A-101.1.31) z poszczególnych godzin hodowli (tab. 5). Przyrost biomasy na podwójnym źródle węgla (0,01% glukozy i 0,6% octanu) w 36 godzinie hodowli wyniósł prawie 65% w stosunku do biomasy wyrastającej w obecności tylko glukozy (w 48 godzinie ponad 150%!). W przypadku szczepu A-101.1.31.K1 obserwowana indukcja utylizacji octanu minimalną dawką glukozy (0,01%) następowała później niż dla szczepu A-101.1.31, około 50 godziny hodowli (rys. 4).

Podsumowując, minimalna dawka glukozy niezbędna do wywołania indukcji wykorzystania octanu przez mutanty octanowe wynosi 0,01%. Efekt indukcji tym szybciej był obserwowany, im większa była dawka dodanej glukozy.

Biomasa (OD) szczepu A-101.1.31 w kolejnych godzinach hodowli w podłożu MMT z 4 najmniejszymi dawkami glukozy bez octanu i z octanem
Biomass (OD) of strain A-101.1.31 at different hours of culture on MMT medium with 4 smaller doses of glucose without or with acetate

Glukoza Glucose [%]	Czas Time 0h	Czas Time 12h	Czas Time 24h	Czas Time 36h	Czas Time 48h
Bez octanu – without acetate					
0	0,040	0,045	0,040	0,050	0,045
0,01	0,051	0,284	0,445	0,405	0,364
0,1	0,047	0,257	0,629	0,554	0,510
0,2	0,049	0,252	0,694	0,778	0,727
0,4	0,047	0,195	0,747	1,170	1,228
Z octanem, with acetate (0,6%)					
0	0,054	0,056	0,055	0,055	0,054
0,01	0,051	0,069	0,169	0,708	1,092
0,1	0,053	0,124	0,464	0,834	0,870
0,2	0,051	0,108	0,398	0,993	1,048
0,4	0,050	0,106	0,459	0,918	1,280

Wpływ jednoczesnej obecności glukozy i octanu w podłożu na wzrost drożdży można też analizować poprzez porównanie właściwych szybkości wzrostu szczepów. Na podstawie prezentowanych krzywych przyrostu biomasy badanych szczepów (rys. 3 i 4) obliczono, według równania Wilson i wsp. [1982], maksymalną szybkość wzrostu drożdży (μ_{\max}) z poszczególnymi dawkami glukozy bez octanu oraz z dodatkiem octanu (tab. 6).

Najwyższą szybkość właściwą wzrostu wyznaczono dla szczepu ATCC 32 338A zarówno w hodowli na glukozie, na octanie, jak i na glukozie z octanem. Jednak μ_{\max} szczep ten osiągał dopiero w 16–17 godzinie w hodowli bez dodatku octanu i około 20–30 godzinie w hodowli z dodatkiem octanu (tab. 7).

Wysoka wartość μ_{\max} wyznaczona dla mutantów oct⁻ (A-101.1.31 i A-101.1.31.K1) podczas wzrostu na MMT z 0,01% glukozy i 0,6% octanem dodatkowo świadczy o utylizacji octanu przez te szczepy i indukcji tego wykorzystania (uaktywnieniu odpowiedniej drogi metabolicznej), gdyż wartość μ_{\max} była osiągana po dłuższym czasie, nawet ponad 20 godzin.

Szczep A-101 niezależnie od obecności octanu i od stężenia glukozy wykazywał w zbliżonym czasie podobną maksymalną szybkość wzrostu ($\mu_{\max} = 0,215-0,310[h^{-1}]$). Natomiast szczep A-101.1.22 wykazał wyższą szybkość wzrostu na podłożu bez octanu ($\mu_{\max} = 0,243-0,442[h^{-1}]$) w porównaniu do maksymalnej szybkości wzrostu na podłożu z octanem ($\mu_{\max} = 0,155-0,258[h^{-1}]$). Ponadto maksymalna szybkość wzrostu szczepu A-101.1.22 zależała od stężenia glukozy. Najwyższą μ_{\max} wyznaczono podczas

wzrostu tego szczepu przy 0,6% glukozy, bez octanu ($\mu_{\max} = 0,442[h^{-1}]$) i z octanem ($\mu_{\max} = 0,214[h^{-1}]$). Oba szczepy miały niższą szybkość wzrostu ($\mu_{\max} < 0,2 [h^{-1}]$) na podłożu z 0,01% glukozy, ale w przypadku szczepu A-101.1.22 dodatek octanu spowodował ponad dwukrotny wzrost tej szybkości ($\mu_{\max} = 0,258[h^{-1}]$). Szczep ten charakteryzował się wyższą szybkością wzrostu na samym octanie niż rodzic, chociaż osiągał ją po dużo dłuższym czasie.

Tabela 6
Table 6

Maksymalna szybkość właściwa wzrostu (μ_{\max}) drożdży w podłożu MMT z różnymi dawkami glukozy bez octanu i z octanem
Maximum of specific yeast growth rate (μ_{\max}) on MMT medium with different doses of glucose without or with acetate

Glukoza Glucose [%]	A-101	A-101.1.22	A-101.1.31	A-101.1.31.K1	ATCC 32338A
Bez octanu, without acetate					
1	2	3	4	5	6
0,01	0,159	0,154	0,046	0,173	0,403
0,1	0,264	0,243	0,246	0,228	0,322
0,2	0,253	0,253	0,208	0,265	0,576
0,4	0,253	0,251	0,254	0,246	0,304
0,6	0,293	0,442	0,219	0,295	0,393
0,8	0,311	0,254	0,253	0,239	0,452
1,0	0,265	0,297	0,255	0,249	0,414
Z octanem, with acetate [0,6%]					
0	0,130	0,212	Ng*	Ng*	0,258
0,01	0,158	0,258	0,412	0,279	0,277
0,1	0,255	0,191	0,227	0,246	0,177
0,2	0,215	0,155	0,189	0,212	0,429
0,4	0,234	0,208	0,260	0,296	0,404
0,6	0,263	0,214	0,199	0,276	0,328
0,8	0,260	0,192	0,198	0,229	0,457
1,0	0,237	0,179	0,220	0,276	0,301

* Ng brak wzrostu, no growth

Podsumowując wykazano, że wartości właściwej szybkości wzrostu szczepu rodzicielskiego A-101 oraz rewertanta A-101.1.22 różniły się zasadniczo. Różnice te świadczą o odmienności metabolicznej, a więc i genotypowej szczepów A-101.1.22 i A-101. Ponadto wykazano indukcyjny charakter wykorzystania octanu przez mutanty oct^r. Induktorem tego wykorzystania najprawdopodobniej był produkt przemiany glukozy.

Czas [h] potrzebny do osiągnięcia maksymalnej właściwej szybkość wzrostu (μ_{\max}) drożdży w podłożu MMT z różnymi dawkami glukozy bez octanu i z octanem
Time [h] necessary to reach the maximum of specific yeast growth rate (μ_{\max}) on MMT medium with different doses of glucose without or with acetate

Glukoza Glucose [%]	A-101	A-101.1.22	A-101.1.31	A-101.1.31.K1	ATCC 32338A
Bez octanu – without acetate					
0,01	2,5	5,75	6,5	5,0	15,5
0,1	5,25	7,25	11,5	5,25	11,75
0,2	5,0	13,75	5,25	11	19
0,4	11	13	14,0	7,25	16,25
0,6	9,0	11	7,0	6,25	16,75
0,8	5,25	9,5	6,25	7	16,25
1,0	5,75	7,75	8,25	9,5	9,75
Z octanem – with acetate [0,6%]					
0	9,75	57,5	Ng	Ng	19,25
0,01	2,5	40,5	25,25	43,5	18,75
0,1	5,25	20,5	17,25	4,75	38,75
0,2	11	20,25	12,25	7,75	20,0
0,4	6,75	15,25	18,0	19,5	26,0
0,6	7	28,5	9,25	17,25	33,5
0,8	6,75	12,75	11,75	7,25	20,75
1,0	7	13,5	9,75	26,0	27,75

* Ng brak wzrostu, no growth

W dalszych badaniach postanowiono sprawdzić czy etanol, który był utylizowany jako źródło węgla przez wszystkie badane szczepy [VI], powoduje indukcję wykorzystania octanu przez mutanty oct^r. Zastosowano trzy stężenia etanolu (0,1%; 0,5% i 1%) jako dodatek do podłoża zawierającego 0,6% octanu sodu [Aneks: 6.1, 6.2, 6.3.]. W warunkach jednoczesnej obecności octanu i etanolu w podłożu wzrost mutantów A-101.1.31 oraz A-101.1.31.K1 był całkowicie zahamowany, pomimo że były one zdolne do utylizacji etanolu (tab. 8). Przy czym dodana ilość etanolu nie miała wpływu na stopień zahamowania wzrostu. Wzrost szczepu rodzicielskiego, A-101, w obecności etanolu z octanem, był ograniczony w 84% w stosunku do wzrostu w środowisku z etanolem i w 62% w porównaniu do wzrostu w podłożu z octanem.

Wzrostu drożdży (OD) w podłożu MMT z octanem, etanolem i obydwoma źródłami węgla
Yeast growth (OD) on MMT medium with acetate, ethanol and both carbon sources

Źródło węgla Carbon source	A-101	A-101.1..31	A-101.1.31.K1
Octan, Acetate [0,6%]	0,600	0,044	0,046
Octan, Acetate [0,6%] + Etanol, Ethanol [0,1%]	0,235	0,045	0,046
Octan, Acetate [0,6%] + Etanol, Ethanol [0,5%]	0,227	0,048	0,045
Octan, Acetate [0,6%] + Etanol, Ethanol [1%]	0,230	0,048	0,045
Etanol, Ethanol [1%]	1,425	1,085	0,864

Reasumując, etanol w żadnym z zastosowanych stężeń (0,1; 0,5 i 1%) nie indukował wykorzystania octanu przez mutanty oct⁻. Ponadto, w warunkach jednoczesnej obecności octanu i etanolu badane szczepy nie wzrastały pomimo zdolności do utylizacji przynajmniej jednego z tych substratów.

3.1.2. Powinowactwo drożdży do octanu

W związku z tym, że mutanty oct⁻ *Y. lipolytica* były zdolne do asymilacji octanu w warunkach dostępności glukozy, postanowiono sprawdzić, czy nie wyróżniają się one jednak innym powinowactwem (K_M) komórek do octanu niż szczep rodzicielski. Graficznie, na podstawie porównania poziomu biomasy otrzymanej przy wzrastających stężeniach octanu do jej poziomu z hodowli bez octanu (w obu przypadkach z dodatkiem 1% glukozy), wyznaczono K_M dla wykorzystania octanu przez komórki [Aneks: 6.4]. Wartość ta jest podobna dla wszystkich badanych szczepów (tab. 9). Wynosi 152–158 mM i świadczy o niskim powinowactwie komórek do tego substratu.

Powinowactwo drożdży *Y. lipolytica* do octanu sodu
Affinity of *Y. lipolytica* yeast to sodium acetate

Szczep Strain	K_M	
	[g/L]	[mM]
A-101	12,44	152
A-101.1.31	12,64	158
A0101.1.31.K1	12,84	157
A-101.1.22	12,60	154
ATCC 32338A	12,95	158

Zbliżona dla tych szczepów wartość K_M wskazuje na brak różnic pomiędzy szczepami w zdolności do przyswajania octanu. Mutanty octanowe nie są więc upośledzone we wchłanianiu octanu.

3.1.3. Wpływ glukozy i octanu na ilość kwasów Cyklu Kwasów Trikarboksylowych – CKT gromadzonych w komórkach lub wydzielanych do podłoża

Udowodniona jednoczesna utylizacja glukozy i octanu przez komórki drożdży *Y. lipolytica* była do tej pory nieznanym elementem metabolizmu. Dlatego chcąc bliżej poznać zmiany zachodzące podczas hodowli drożdży w obecności glukozy i octanu, oznaczono zawartość poszczególnych kwasów Cyklu Kwasów Trikarboksylowych (CKT) w biomacie drożdży wyrosniętej w obecności glukozy, octanu oraz glukozy z octanem (tab. 10) [Aneks: 6.1, 6.2, 6.3.2].

Wykazano, że w biomacie szczepu A-101 i mutantów oct⁻, wyrastającej na podwójnym źródle węgla, zawartość bursztynianu była od 1,6 do ponad 6-krotnie wyższa niż w biomacie nagromadzonej w obecności samej glukozy czy samego octanu. Ilość fumaranu była także wyższa w biomacie wymienionych szczepów wyrosniętej w MMT zawierającym podwójne źródło węgla. Nie zanotowano takiego przyrostu fumaranu i bursztynianu w komórkach szczepu A-101.1.22, chociaż zawartość bursztynianu w biomacie tego szczepu była wysoka (23,2–54,4mg/gsm).

W komórkach szczepu ATCC 32 338A w ogóle nie stwierdzono obecności bursztynianu. W biomacie szczepu A-101.1.31.K1 nagromadzonej na podwójnym źródle węgla większa była też ilość jabłczanu. W biomacie badanych szczepów nie wykazano obecności 2-oksoglutaranu, cytrynianu (i izocytrynianu), akonitanu oraz szczawio-octanu.

Tabela 10
Table 10

Kwasy CKT oznaczone w biomacie drożdży *Y. lipolytica* rosnących w podłożu MMT zawierającym jedno lub dwa źródła węgla
TCA cycle acids detected in the biomass of *Y. lipolytica* yeast grown on MMT medium containing one or two carbon sources

Szczep Strains	Kwasy CKT* TCA cycle acids*	Stężenie kwasów w biomacie drożdży [mg/gsm] wyrastającej w MMT z następującymi źródłami węgla Acid level in biomass[mg/gdm] grown on MMT with as carbon source		
		Octan Acetate [10g/L]	Glukoza Glucose [10g/L]	Octan plus glukoza Acetate plus glucose [10g/L] [10g/L]
Oct ⁺ – Acu ⁺				
A-101	Jabłczan Malate Fumarany Fumarate Bursztynian Succinate	2,56 0,08 13,90	1,35 0,36 5,70	2,92 0,49 35,30
A-101.1.22	Jabłczan Malate Fumarany Fumarate Bursztynian Succinate	3,53 0,12 23,20	1,8 0,33 54,40	3,53 0,64 53,50
ATCC 32338A	Jabłczan Malate Fumarany Fumarate Bursztynian Succinate	0 0,03 0	6,96 0 0	6,5 0,14 0
Oct ⁻ – Acu ⁻				
A-101.1.31.K1	Jabłczan Malate Fumarany Fumarate Bursztynian Succinate	Brak wzrostu No growth	0,83 0,21 51,20	10,31 1,2 84,70
A-101.1.31	Jabłczan Malate Fumarany Fumarate Bursztynian Succinate	Brak wzrostu No growth	0,78 0,19 4,68	0,87 0,32 25,30

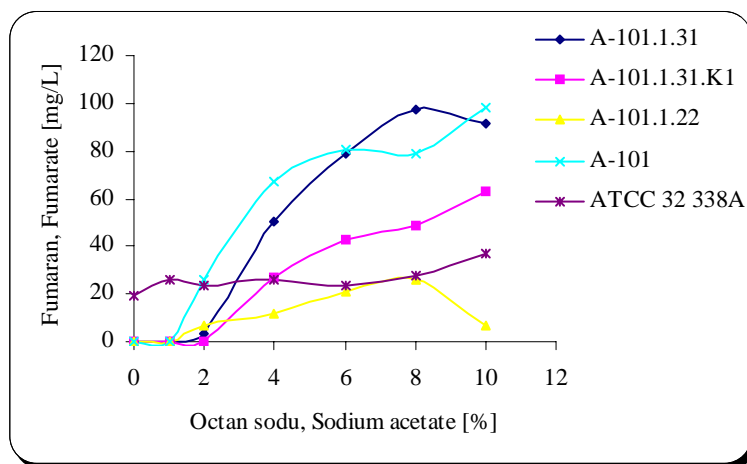
*W biomacie drożdży nie wykazano obecności innych kwasów CKT

*No other TCA were detected in biomass of yeast

Podsumowując, octan obecny jako dodatkowe źródło węgla wpływał w sposób zróżnicowany na zawartość jabłczanu, bursztynianu i fumaranu w komórkach mutantów oct oraz rodzica. Zatem w obecności podwójnego źródła węgla odmienne są przemiany metaboliczne zachodzące w obrębie CKT, o czym świadczą także wcześniej przedstawione wyniki dotyczące ilości biomasy (tab. 1) i końcowego pH (rys. 3).

Odmienny metabolizm w zależności od zastosowanego źródła węgla potwierdziły też wyniki rozdzielów chromatograficznych płynów pochodowlanych. Podczas wzrostu drożdży w podłożu MMT z 1% glukozą nie były wydzielane kwasy CKT. Były one wydzielane podczas wzrostu szczepów z 1% octanem i 1% glukozą, oraz z 3,2% glukozą i 1% octanem. Głównie były to: pirogronian (RT 8,35), fumaran (RT 15,43), jabłczan (RT 9,21) oraz akonitan (RT 10,7). Wykazano też obecność pozostałości octanu (RT 14,34).

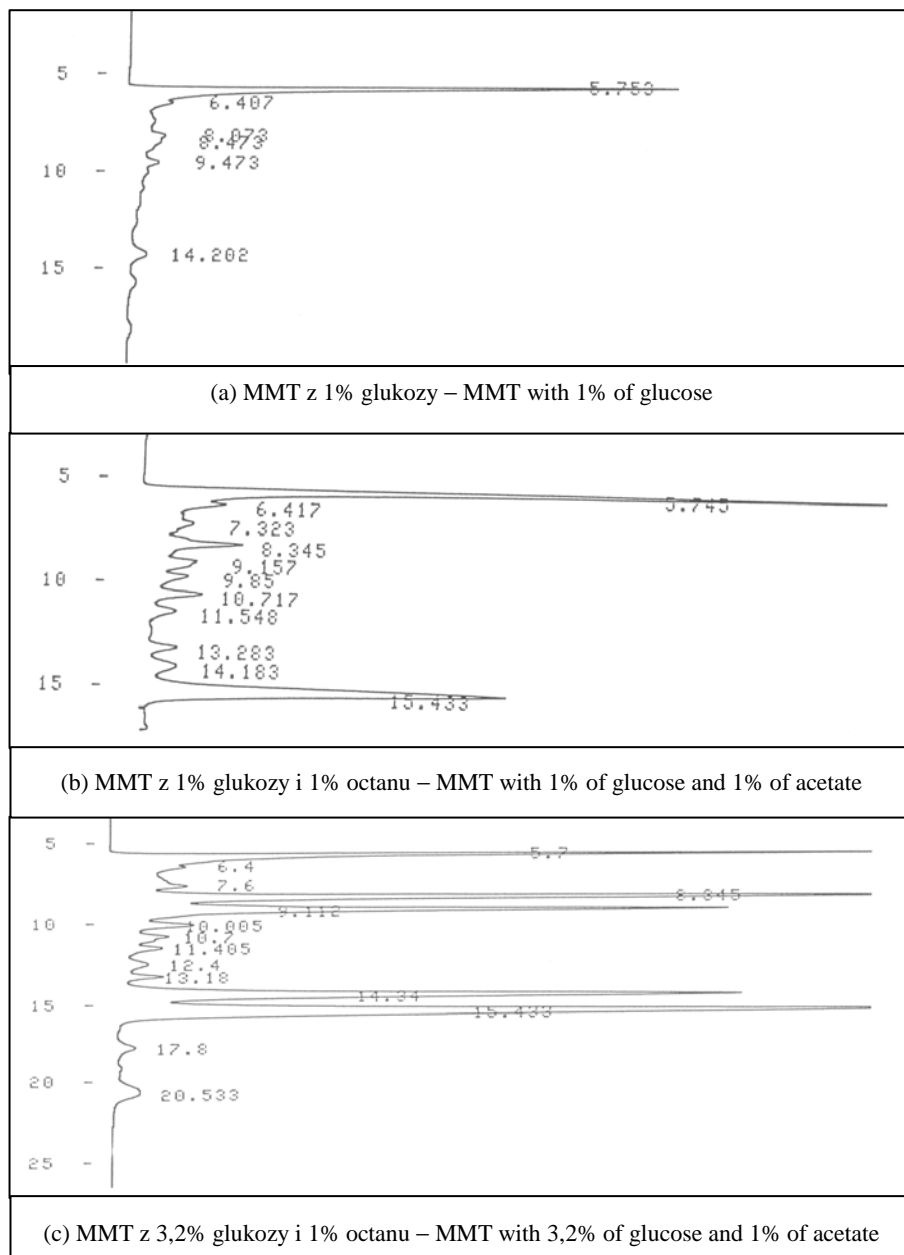
Nie było związku pomiędzy ilością wydzielanego pirogronianu, jabłczanu i akonitanu a wyjściowym stężeniem octanu w podłożu hodowlanym. Jedynie ilość fumaranu wydzielanego przez szczepy do podłoża wzrastała proporcjonalnie do stężenia dodanego octanu jako drugiego źródła węgla (rys. 5).



Rys. 5. Fumaran wydzielony do podłoża MMT podczas hodowli szczepów z glukozą i różnymi dawkami octanu sodu

Fig. 5. Fumarate secreted into the MMT medium during the culture of strains on glucose and different doses of sodium acetate

Przykładowe rozdziały płynów po hodowli (szczep A-101.1.31) przedstawiono na rysunku 6 (a, b i c). Należy zaznaczyć, że podczas wzrostu w podłożu zawierającym większą dawkę glukozy (3,2%) przy jednakowym stężeniu octanu (1%) wzrastała ilość poszczególnych kwasów, pośredników CKT (rys. 6 c). Świadczy to o zaburzeniu równowagi w przemianach cyklu Krebsa podczas wzrostu drożdży w podłożu zawierającym większą dawkę glukozy i octan.



Rys. 6. Rozdziały HPLC płynów pochodzących otrzymanych podczas wzrostu szczepu A-101.1.31

Fig. 6. HPLC separation of culture broth obtained during the growth of A-101.1.31 podczas wzrostu drożdży w podłożu zawierającym większą dawkę glukozy i octanu

3.2. Poszukiwanie defektu genetycznego mutantów oct'

Dotychczas otrzymane wyniki potwierdziły odmienność fenotypową mutantów octanowych (A-101.1.31 i A-101.1.31.K1), rewertanta (A-101.1.22) oraz rodzica (A-101). W dalszej pracy podjęto badania umożliwiające dokładniejsze umiejscowienie obserwowanej fenotypowo mutacji w genomie *Y. lipolytica*. W tym celu przeprowadzono badania dotyczące wykorzystania niektórych źródeł węgla przez drożdże, komórkowej zawartości kwasów tłuszczowych oraz cukrów (jako składników błon), a także pomiaru wybranych aktywności enzymatycznych. Dla porównania szczepów pod względem zdolności do wydzielania CA – w badaniach tych wykorzystano również szczep ATCC 32 338A nie zdolny do jego nagromadzenia.

3.2.1. Substraty wykorzystywane jako jedyne źródło węgla

Szczepy A-101; A-101.1.31, A-101.1.31.K1, A-101.1.22 oraz ATCC 32 338A hodowano na 49 różnych kwasach organicznych, alkanach, alkoholach i cukrach jako jedyne źródło węgla [VI]. Substraty te różniły się długością łańcucha węglowego, obecnością dodatkowej grupy aminowej, oksy czy hydroksy lub były estryfikowane glicerolem (olej rzepakowy i olej rycynowy).

Mutanty octanowe (A-101.1.31 i A-101.1.31.K1) nie rosły w podłożu zawierającym oleje lub alkanany jako źródło węgla, ale asymilowały kwasy tłuszczowe. Nie korzystały jednak z krótkołańcuchowych kwasów: jabłkowego, octowego, pirogronowego, glikolowego, bursztynowego i izocytrynowego. Nie wyrastały w obecności L-arabinozy, a szczep A-101.1.31.K1 nie korzystał z mezoinozytolu. Oba mutanty, a także pozostałe szczepy wykorzystały etanol jako źródło węgla. Szczep ATCC 32 338A wyrastał w obecności wszystkich badanych substratów oprócz rafinozy, trehalozy, D-xylozy podobnie jak szczep A-101 i rewertant A-101.1.22. Wszystkie szczepy obficie wyrastały w obecności glicerolu. Wzrost mutantów octanowych w obecności kwasu 2-oksoglutarynowego i asparaginynowego był słaby. Równie słabo wyrastał szczep A-101.1.31 w podłożu z bursztynianem i arabitołem, podczas gdy A-101.1.31.K1 nie rósł na tych substratach.

Po przeanalizowaniu wyników wzrostu w obecności wyżej wymienionych źródeł węgla do badań wybrano betainę oraz następujące aminokwasy: glicynę, serynę, leucynę, lizynę, kwas asparaginynowy i kwas glutaminowy. Są to związki, których szlaki przemian zazębiają się z przemianami octanu, bursztynianu oraz 2-oksoglutarynu. Mutanty wyrastały jedynie, gdy źródłem węgla był kwas glutaminowy lub asparaginynowy [VI].

Podsumowując, defekt genetyczny warunkujący fenotyp mutantów oct' dotyczył szlaków asymilacji alkanów, olejów, jabłczanu, octanu, pirogronianu, glikolanu, bursztynianu, izocytrynianu, L-arabinozy, betainy, glicyny, seryny, leucyny i lizyny, a w przypadku szczepu A-101.1.31.K1 – także mezoinozytolu.

3.2.2. Komórkowa zawartość kwasów tłuszczowych oraz sacharydów

W następnej kolejności postanowiono porównać zawartość niektórych składników komórki szczególnie obficie występujących w błonach cytoplazmatycznych, mianowicie cukrowców oraz kwasów tłuszczowych [Aneks: 6.3.4].

Komórki mutantu octanowego A-101.1.31.K1 wyrastające w podłożu MMT zawierały, w porównaniu do komórek pozostałych szczepów, najmniej pentoz oraz glukozy, a najwięcej mannozy i galaktozy (tab.11). Ten sam szczep wyrastając w podłożu produkcyjnym (P2), w bioreaktorze, zawierał sześciokrotnie więcej glukozy, dwukrotnie mniej pentoz i mannozy oraz ponad czterokrotnie mniej galaktozy. Dodatkowo wykazano w jego komórkach obecność glukozaminy (7,22%) i heptozy (9,22%) (nie uwzględnione w tab. 11).

Tabela 11

Table 11

Rozkład (%) * węglowodanów we frakcji błon drożdży *Y. lipolytica* otrzymany metodą GC-MS
GC-MS separation of carbohydrates (%) * of membrane fraction of *Y. lipolytica*

RT**	5,51	6,8	8,96	9,8	9,9	10,03	14,64
Szczep – Strain		pentoses		mannose	glucose	galactose	
A-101	2,01	16,2		55,91	10,11	15,76	
A-101.1.22		12,25	2,06	54,01	12,71	17,16	1,81
A-101.1.31.K1	1,1	6,67		66,07	7,81	19,44	
A-101.1.31.K1***		2,41	7,23	28,97	40,83	4,1	
ATTC 32338A		13,9		62,66	23,44		

* Wyznaczono na podstawie powierzchni rozdzielonych pików poszczególnych cukrowców
Determined from the area of the separated different carbohydrate peaks

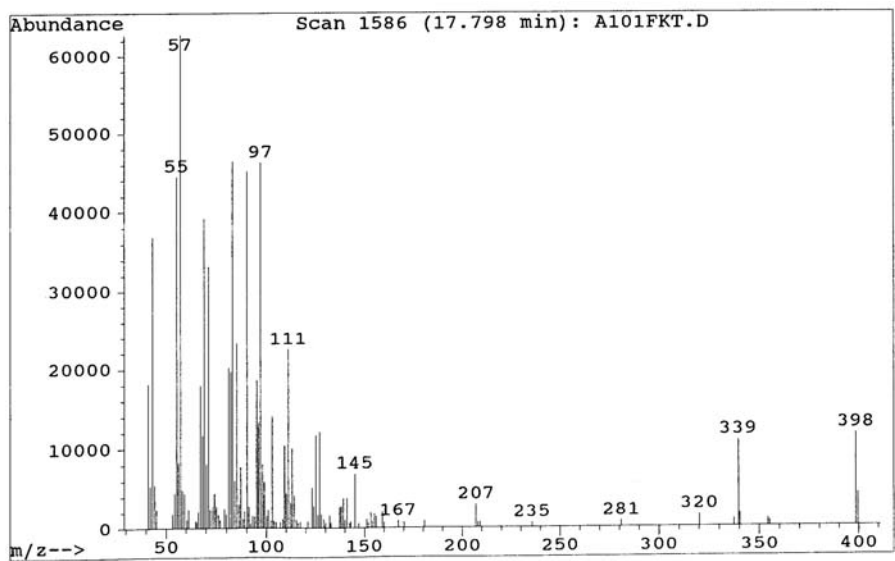
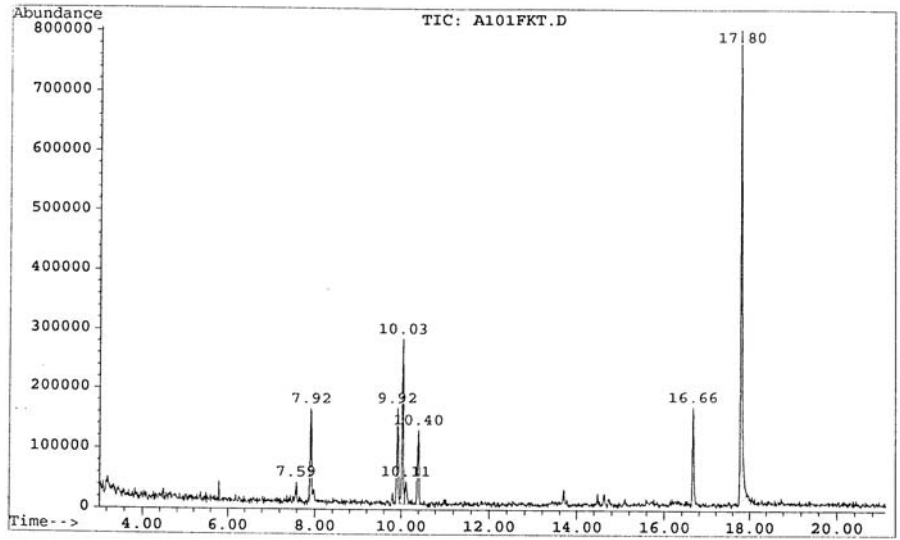
** Czas retencji, retention time

*** Biomasa szczepu z procesu biosyntezy kwasu cytrynowego w bioreaktorze na podłożu P2 z glukozą
Strain biomass from citric acid biosynthesis process in bioreactor on P2 medium with glucose

Natomiast szczep nie nagromadzający cytrynianu różnił się od producentów CA ponad dwukrotnie większą zawartością glukozy i brakiem galaktozy we frakcji węglowodanowej komórek (tab. 11).

W biomacie badanych szczepów zidentyfikowano kwasy tłuszczowe zarówno we frakcji węglowodanowej, jak i lipidowej komórek drożdży rosnących w podłożu MMT w obecności glukozy lub heksadekanu (tab. 12). Obecne były głównie następujące kwasy: oleinowy (C18:1) i linolenowy (C18:2) oraz palmitynowy (C16:0). Ilość C18 kwasów była ponad 2-krotnie większa w komórkach z hodowli w podłożu z glukozą niż z heksadekanem. W komórkach niektórych szczepów stwierdzono obecność: kwasu mirystynowego (A-101 oraz A-101.1.31.K1), kwasu arachidonowego (A-101.1.31.K1) i kwasu gadaleinowego (A-101 i A-101.1.31.K1). Natomiast zaskoczeniem była obecność kwasów tłuszczowych we frakcji „cukrowej” ekstrahowanej z biomasy. Dodatkowo we frakcji tej wykazano obecność niezidentyfikowanego składnika o RT 17,8, którego stężenie dochodziło nawet do 50% sumy powierzchni pików dla zidentyfikowanych kwasów (rys. 7 a, b).

File : C:\DATABASE\
 Operator : mm
 Acquired : 21 Apr 97 2:31 pm using AcqMethod SAMA4.M
 Instrument : MS_5971
 Sample Name: A 101, fenol, glukoza, fames,
 Misc Info : HP-1, 150-270, 8C/min., sama4, 1z 10ul
 Vial Number: 1



Rys. 7. Rozdział w GC frakcji „cukrowej” komórek *Y. lipolytica*: (a) rozdział poszczególnych kwasów tłuszczowych, „(b)” widmo masowe frakcji o RT 17,8

Fig. 7. GC separation of „sugar” fraction of the *Y. lipolytica* cells: (a) separation of different fatty acids, (b) mass spectrum of the peak of RT 17,8

Tabela 12
Table 12

Zawartość kwasów tłuszczowych (% powierzchni pików) we frakcji lipidowej i cukrowej biomasy drożdży wyrastającej w MMT z glukozą lub heksadekanem. (W tabeli 22, zamieszczonej w Aneksie, zebrano poszczególne kwasy tłuszczowe występujące w komórkach *Y. lipolytica* grupując je wg nazwy systematycznej, nazwy zwyżkowej i czasu retencji-RT)

Fatty acids contents (% of peak area) of lipid and sugar fraction of biomass of yeast growing on MMT medium with glucose or hexadecan. (In the table 22, presented in Aneks are grouped, by their common and systematic name and the retention time –RT, all fatty acids detected in *Y. lipolytica* cells)

Kwas tłuszczowy – Fatty acid	C14:0	C16:1	C16:0	C18:2	C18:1	C18:0	C20:1	C20:0	C24:0	???
RT	5.23	7.59	7.93	9.96	10.05	10.4	12.32		16.6	17.8
Szczep – Strain : A-101										
A*		2.9	6.7	12.3	12.4	3.2			6.3	51.3
B*		7.3	14.6	36.2	38.2	3.7				
C*	1.1	9.9	15.7	13.6	21.8	2.1	0.9			
Szczep – Strain : A-101.1.22										
A		2.1	6.9	8.9	15.0	8.0			9.4	46.7
B		4.9	18.2	27.6	33.0	5.9				
C		10.2	15.6	19.3	15.9	1.7				
Szczep – Strain : A-101.1.31- K1										
A		2.1	5.6	8.3	8.3	8.4		16.5	2.4	40.8
B		6.6	18.3	27.3	37.3	4.8				
C _{glu}		10.9	20.4	24.5	33.3	4.9				
Szczep – Strain : ATTTC 32 338A										
A		3.6	9.2	17.2	15.0	8.8			2.3	40.2
B		4.3	16.9	38.4	36.7	3.7				
C _{glu}		11.3	19.9	8.9	9.7	2.2				

A* Wzrost na glukozie, ekstrakcja fenol: woda, glucose growth, fenol: water extraction

B* Wzrost na glukozie, ekstrakcja metanol: chloroform, glucose growth, methanol: chloroforme extraction

C* Wzrost na heksadekanie (C_{glu} z glukozą), ekstrakcja jak B, hexadecane growth (C_{glu} with glucose), extraction as B

Ostatecznie trudno dopatrzeć się możliwości wyjaśnienia obserwowanych fenotypów drożdży „rodziny” szczepu A-101 na podstawie różnic w ich składzie cukrowym i lipidowym. Wniosek ten można rozszerzyć i mówić o braku różnic w budowie błon, ponieważ obie grupy tych związków przede wszystkim wchodzi w skład błoniastych struktur komórki. Natomiast odmienną budową błon (dwukrotnie więcej glukozy i brak galaktozy we frakcji cukrowej) charakteryzował się szczep ATCC 32 338A niezdolny do pozakomórkowego nagromadzenia CA.

3.2.3. Aktywność enzymów CKT i cyklu glioksalowego

W następnym etapie badań nad ustaleniem miejsca mutacji wykonano pomiary aktywności niektórych enzymów wchodzących w skład najważniejszego dla komórki szlaku przemian –CKT oraz jego krótkiego obejścia – cyklu glioksalowego. Do badań wybrano cztery enzymy: syntazę cytrynianową (SC)[E.C. 4.1.3.7, szczawiooctano-liazę cytrynianu], akonitazę (HA)[E.C.4.2.1.3, hydroliazę cytrynianu(izocytrynianu)], dehydrogenazę izocytrynianową (ICDH)[E.C. 1.1.1.42, oksydoreduktazę treo-Ds izocytrynianu] i liazę izocytrynianową (ICL) [4.1.3.1, glioksylo-liaza treo-Ds izocytrynianu]. Trzy pierwsze są enzymami cyklu kwasów trikarboksylowych (CKT), a ostatni jest enzymem cyklu glioksalowego. Są to enzymy kluczowe dla funkcji obu cykli, a różnice w obrębie ich aktywności mogłyby zarówno tłumaczyć defekt mutacyjny, jak i istotę nadprodukcji CA przy jednoczesnym znacznym ograniczeniu wydzielania izocytrynianu.

Aktywność SC, HA, ICDH i ICL badano w bezkomórkowych ekstraktach biomasy rozbitej ultradźwiękami [I]. Najwyższą aktywność właściwą SC wyznaczono dla szczepu ATCC 32 338A nie będącego producentem CA (tab. 13). Była ona dwukrotnie wyższa od wyznaczonej dla pozostałych szczepów. Natomiast aktywność właściwa ICDH była najniższa dla najlepszych producentów kwasu: szczepów A-101 oraz A-101.1.22. W obrębie szczepów badanej „rodziny” aktywność HA była najniższa dla A-101 (rodzica), a aktywność ICL nie różniła się znacznie.

Tabela 13
Table 13

Aktywność właściwa wybranych enzymów w fazie liniowego wzrostu komórek drożdży podczas produkcji kwasu cytrynowego z glukozy
Specific activity of selected enzymes in lineary growing cells during citric acid production on glucose

Szczep Strain	Szybkość właściwa syntezy CA [g/gsm/h] Specific rate of CA synthesis [g/gdm/h]	Aktywność właściwa µmole/min/mg białka Specific activity µmole/min/mg of protein				Oдноśnik Reference
		SC	HA	ICDH	ICL	
A-101	0,112	0,48	0,067	0,035	0,038	(I)
A-101.1.22	0,150	0,50	0,107	0,035	0,040	
A-101.1.31	0,077	0,53	0,123	0,050	0,026	
ATCC 20324	0,057	0,21	Nb*	0,056	0	Aneks: 6.1,6.2,6.3.1
ATCC 20320	0,049	0,37	Nb	0,058	0,065	
ATCC 32338A	0,005	1,38	Nb	0,055	0,001	

*Nb – nie badane, non tested

Podsumowując, pomiędzy szczepami należącymi do „rodziny” szczepu A-101 nie wykazano znaczących różnic w zawartości wybranych enzymów. Świadczy to o innym miejscu mutacyjnego uszkodzenia genomu niż geny kodujące badane enzymy.

3.3. Przyczyny i regulacja wydzielania kwasu cytrynowego (CA) przez badane szczepy *Y. lipolytica*

Szczepy *Y. lipolytica* będące przedmiotem powyżej przedstawionych badań nad wykorzystaniem octanu są cenne z biotechnologicznego punktu widzenia przez fakt pozakomórkowego nagromadzenia CA. Dotychczas jednak nieznaną są komórkowe podstawy tej sekrecji ani główne sposoby jej regulacji. W celu bliższego poznania przyczyn oraz regulacji wydzielania kwasu przez szczepy z „rodziny” A-101 w procesie biosyntezy cytrynianu z glukozy przeprowadzono badania: enzymatyczne, stopnia utylizacji substratu, wyznaczono powinowactwo komórek do tego źródła węgla i oznaczono wewnątrzkomórkową zawartość CA.

3.3.1. Regulacja początkowego etapu nagromadzenia CA: wpływ natlenienia na aktywność dehydrogenazy izocytrynianowej (ICDH)

Dla procesu biosyntezy CA najważniejsze są dwa enzymy: syntaza cytrynianowa (SC) i dehydrogenaza izocytrynianowa (ICDH). Pierwszy bezpośrednio odpowiada za syntezę CA, a drugi za jego rozkład w mitochondrium. W badaniach skoncentrowano się na tych dwóch enzymach, wyrażając ich aktywność w $\mu\text{moli}/\text{min}$ w przeliczeniu na 1 gsm lub na 1 L hodowli. Najlepiej obrazuje ona odpowiednio aktywność biomasy lub hodowli wykorzystanych do biosyntezy CA drożdży.

Podczas wzrostu komórek aktywność ICDH wynosiła od 15,03 do 17,3 $\mu\text{moli}/\text{min}/\text{gsm}$ w procesie dobrze natlenianym (40–60% stanu nasycenia tlenem) oraz 7,01 $\mu\text{moli}/\text{min}/\text{gsm}$ przy 20% natlenieniu [I]. W tym ostatnim przypadku niska aktywność ICDH umożliwiła nagromadzenie CA przez komórki równoległe z ich wzrostem. Wskazuje to na możliwość sterowania momentem rozpoczęcia biosyntezy CA poprzez ograniczenie dostępu tlenu.

Podczas fazy wydzielania kwasu aktywność ICDH obniżała się do 1,08 $\mu\text{mola}/\text{min}/\text{gsm}$. Zmniejszenie aktywności tego enzymu zanotowano również w kolejnych godzinach procesu biosyntezy CA z hydrołu glukozowego (szczep A-101.1.31) [V].

Niska aktywność ICDH korelowała także ze zmniejszeniem udziału kwasu izocytrynowego w sumie kwasów z 9,8% do 2,6%, a w przypadku komórek wykazujących najniższą aktywność tego enzymu – nawet do 0,7% [V]. Natomiast zmniejszenie udziału izocytrynianu nie było wynikiem niższej aktywności HA, gdyż najniższą aktywnością cechował się szczep A-101.1.31 nagromadzający najmniej tego kwasu (tab. 13) [Robak 1995].

Reasumując, obniżenie aktywności ICDH jest korzystne dla procesu biosyntezy CA, ograniczone są bowiem dalsze przemiany tego kwasu w CKT. Można doprowadzić do obniżenia aktywności tego enzymu poprzez ograniczenie dostępu tlenu.

3.3.2. Regulacja syntezy CA: wpływ jonu amonowego na aktywność syntazy cytrynianowej (SC)

Stożek natlenienia hodowli, który wpływał na ICDH, nie miał istotnego wpływu na aktywność SC [I, III]. Najwyższą aktywność właściwą zanotowano w biomacie w procesie okresowym z zasilaniem, prowadzonym na podłożu ze zhydrolizowaną melasą przy 40% natlenieniu hodowli. Wynosiła ona 1,62 $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{mg}$ białka i była 1,5–2,5-krotnie wyższa w porównaniu do aktywności komórek pochodzących z procesu prowadzonego na glukozie [II]. W procesie okresowym, bez zasilania, zaobserwowano niekorzystną dla biosyntezy CA utratę aktywności SC w biomacie pochodzącej z kolejnych godzin hodowli (tab. 14).

Tabela 14

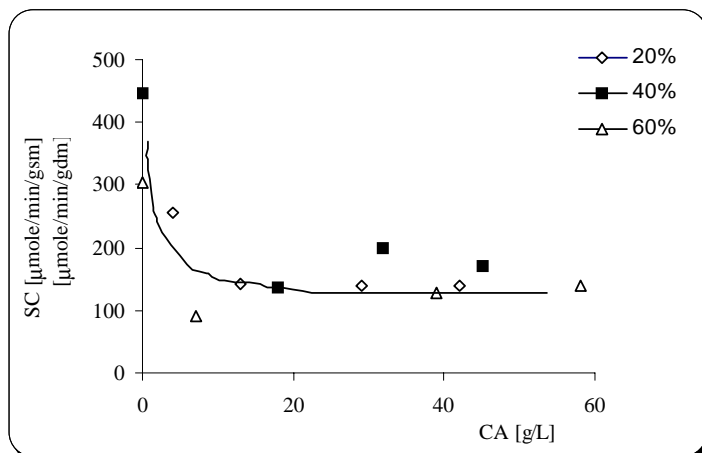
Table 14

Aktywność SC biomasy w kolejnych godzinach okresowego procesu biosyntezy CA
SC activity of biomass in successive hours of biosynthesis of CA process

Szczep Strain	Godzina hodowli Time of culture [h]	Aktywność biomasy $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{gsm}$ Biomass activity $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{gdm}$	Odnosnik Reference
A-101	9	238,7	I
	14	76,3	
	48	20,6	
A-101.1.22	9	205,3	I
	14	92,6	
	48	7,2	
A-101.1.31	9	266,3	I
	14	73,0	
	48	31,0	
ATCC 20 320	11	148,4	Aneks 6.1,6.2,6.3.1
	19	33,7	
	48	20,4	

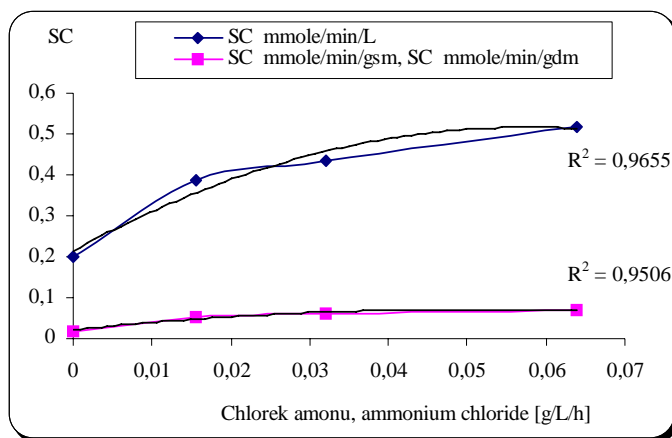
Aktywność SC była najwyższa w biomacie podczas logarytmicznego wzrostu komórek (255–445 $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{gsm}$), a następnie utrzymywała się na niższym, lecz stałym poziomie (około 143 $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{gsm}$) niezależnie od natlenienia oraz od ilości wydzielanego CA (rys. 8). Zatem zaobserwowana początkowa utrata aktywności syntazy nie była spowodowana wzrastającym stężeniem cytrynianu, a przypuszczalnie – pogłębiającym się deficytem źródła azotu. Wszystkie dotychczas stosowane do produkcji CA podłoża zawierały ilości siarczanu amonu lub chlorku amonowego ograniczające dalszy wzrost

komórek. Doprowadziło to do obniżenia aktywności SC w kolejnych fazach procesu, nawet do 0,8 $\mu\text{mole}/\text{min}/\text{gsm}$ [V]. Nie obserwowano takiej utraty aktywności syntazy w procesie okresowym zasilanym, w którym wraz z dozowaną pożywką (melasa) dostarczano również azot w postaci aminokwasowej (lub jonu amonowego) [III].



Rys. 8. Aktywność SC biomasy w zależności od stężenia wydzielanego CA. Proces prowadzony w podłożu ze zhydrolizowaną melasą i zróżnicowanym stanem nasycenia tlenem

Fig. 8. SC activity of biomass in relation to the secreted concentration of CA Process in hydrolysed mollasses medium with different oxygen level saturation



Rys. 9. Aktywność SC w zależności od ilości dozowanego chlorku amonowego, proces ciągły (chemostat)

Fig. 9. SC activity in relation to the amount of dosed ammonium chloride, continuous process (chemostat)

W przypadku procesu ciągłej biosyntezy CA z udziałem szczepu A-101.1.31 (Chemostat) aktywność SC zwiększała się wraz z wzrastającą ilością dozowanego jonu amonowego (NH_4^+) w postaci chlorku amonowego (rys. 9) [Aneks:6.2,6.3.1]. Również zastosowanie NH_4OH jako neutralizatora odczynu kwaśnego doprowadziło do wzrostu aktywności SC [V]. Zatem w przypadku ciągłej biosyntezy CA w celu utrzymania wysokiej aktywności SC wskazane jest dozowanie jonu amonowego, w przybliżeniu w ilości 1mmol/L/h (około 0,054 g/L/h chlorku amonowego).

Wysoka aktywność SC nie jest jednak jedynym warunkiem wydajnej syntezy CA z glukozy przez *Y. lipolytica*. Przyrost tej wartości powyżej 70 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{gsm}$ (w przypadku procesu prowadzonego na glukozie) nie prowadził do dalszego wzrostu szybkości syntezy kwasu (tab. 15) [Aneks: 6.2,6.3.1]. Najszybciej (0,125 g/gsm/h) CA był syntetyzowany przy aktywności SC 55,7 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{gsm}$, a ponad 5-krotnie wolniej (0,027 g/gsm/h) przy aktywności 81,9 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{gsm}$. Proces ten podlega zatem jeszcze innej regulacji oprócz aktywacji syntazy jonami amonowymi. Czynnikiem regulacyjnym może być ilość obecnej w podłożu glukozy lub stężenie cytrynianu.

Tabela 15

Table 15

Aktywność SC, biomasa i szybkość właściwa syntezy kwasu cytrynowego z glukozy przez A-101.1.31 w procesie ciągłym przy wzrastającej ilości chlorku amonowego i wzrastającej szybkości rozcieńczania hodowli
Activity of SC, biomass and specific production rate of citric acid synthesis on glucose by A.101.1.31 in continuous process with increasing amount of ammonium chloride and increasing culture dilution rate

Stężenie Concentration NH_4Cl [g/L]	Czas hodowli Time of culture [h]	D szybkość rozcieńczania dilution rate [h ⁻¹]	Biomasa [gsm/L] Biomass [gdm/L]	Szybkość właściwa syntezy CA Specific CA synthesis rate [g/g/h]	Aktywność SC – Activity of SC		
					właściwa [$\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ białka] specific [$\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ of protein]	hodowli of culture [$\mu\text{mol}/$ min/L]	biomasy [$\mu\text{mol}/\text{min}/$ gsm] biomass [$\mu\text{mol}/\text{min}/$ gdm]
1,0	10	0	11,11	0	0,181	202,4	18,23
	27	0	10,06	0	0,179	201,2	19,94
	96	0,0156	7,23	0,064	0,292	291,4	40,32
	169	0,0156	7,20	0,079	0,560	486,1	67,51
	225	0,032	7,2	0,104	0,370	432,9	59,71
	264	0,064	7,3	0,125	0,329	406,3	55,66
336	0,064	7,65	0,027	0,468	626,7	81,91	
2,0	27	0	10,6	0	0,141	196,1	18,5
	107	0,0156	9,2	0,082	0,193	253,4	27,54
	168	0,0156	9,25	0,074	0,361	474,0	47,64
	260	0,032	11,19	0,071	0,476	711,6	59,8
3,0	143	0,0156	11,67	0,071	0,540	779,2	66,77
	220	0,032	11,33	0,099	0,586	846,6	68,66
	358	0,032	15,4	0,036	0,747	1733,0	112,54

Inną przyczyną obniżenia aktywności kwasotwórczej może być zmieniający się w czasie udział w metabolizmie komórki poszczególnych izoenzymów syntazy występujących w mitochondriach oraz w peroksysomach.

3.3.3. Izoenzymy syntazy cytrynianowej (SC)

Trzy izoenzymy SC, kodowane przez trzy geny jądrowe (CIT1, CIT 2 i CIT 3), występują w komórkach drożdży *S. cerevisiae* [Robak, 2000], a występowanie izoenzymów SC u drożdży *Y. lipolytica* zostało potwierdzone badaniami aktywności tego enzymu w środowisku o różnym pH (zakres od 6,5 do 8,5) [IV]. Początkowo, na podstawie aktywności syntazy wysokooczyszczonego preparatu enzymatycznego (preparat SC z *Y. lipolytica* A-101 o aktywności właściwej 162 $\mu\text{moli}/\text{min}/\text{mg}$ białka) sądzono, że ewidentne są dwa optima: w pH 7,8 i 8,45. Sugerowało to obecność dwóch izoenzymów SC w komórkach *Y. lipolytica*. Jednak analizując bliżej aktywność kilku mniej oczyszczonych preparatów w zależności od pH zaobserwowano większą jej zmienność (tab. 16). Można spekulować o istnieniu izoenzymów wykazujących najwyższą aktywność w pH wynoszącym: (1) < 6,95; (2) = 7,8; (3) = 8,0; (4) = 8,45; (5) > 8,45.

Tabela 16
Table 16

Aktywność SC wybranych preparatów w buforze o różnym pH
SC activity of selected preparation in buffer at different pH

Preparat Preparation	Aktywność SC(%)# – SC activity (%)#					
	pH 6,95	pH 7,5	pH 7,8	pH 8,0	pH 8,2	pH 8,45
Frakcje z wirowania w gradiencie sacharozy Fractions from saccharose gradient centrifugation						
1.1	115	100	126	133	132	142
1.2	87	100	109	118	123	159
1.4	80	100	97	104	99	77
Frakcja z rozdzielu na kolumnie jonowymiennej Fraction from ion exchange chromatography						
5	127	100	188	167	171	187

Aktywność SC jako % aktywności enzymu w pH 7,5
SC activity as % of enzyme activity in pH 7,5

O występowaniu w komórkach tego szczepu pięciu izoenzymów wydają się wskazywać również przeprowadzone badania dotyczące genów SC. W reakcji łańcuchowej polimerazy w obecności oligonukleotydów (primerów) specyficznie flankujących region centrum aktywnego SC kodowanej przez CIT1 (gen *S. cerevisiae*) wykazano obecność aż pięciu swoistych produktów amplifikacji dla szczepów A-101

i A-101.1.31. Dla szczepu nie gromadzącego kwasu-ATCC 32338A i dla szczepu kontrolnego-PCM 2103 (*S. cerevisiae*) wykazano tylko jeden produkt o spodziewanym ciężarze około 480pz (tab. 17) [Aneks: 6.5].

Tabela 17
Table 17

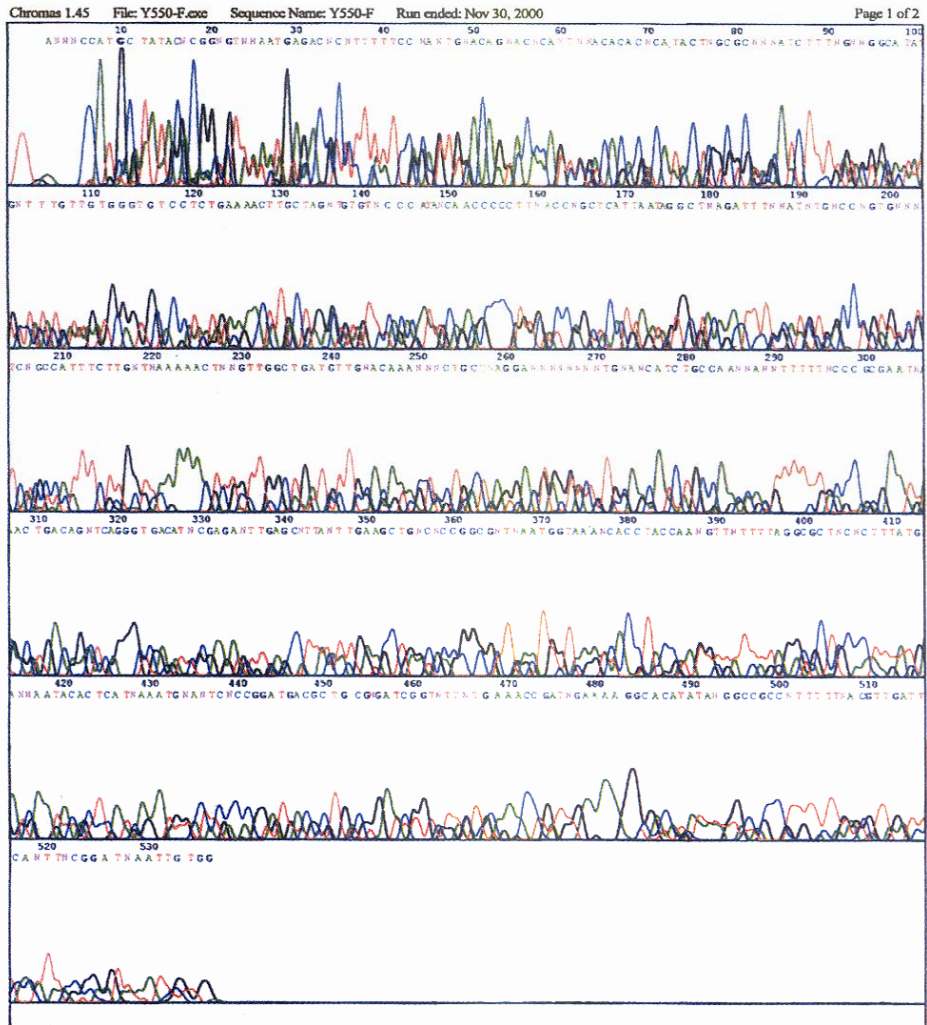
Produkty amplifikacji genomowego DNA drożdży z udziałem primerów flankujących regionu genu CIT1 (480pz) kodujący centrum aktywne syntazy
Yeast genomic DNA amplification products with primers flanking the CIT 1 gene region (480bp) encoding the active site of synthase

Szczep Strain	Produkty amplifikacji (pz) Amplification products (bp)				
A-101	480	550	670	790	900
A-101.1.31	480	550	670	790	900
ATCC 32338A	480				
PCM-2103	480				

W analizie restrykcyjnej z udziałem *EcoRI* wykazano, że pojedynczy produkt (480pz) otrzymany w przypadku amplifikacji DNA z *S. cerevisiae* PCM 2103 nie ulega całkowitemu rozdzieleniu na dwa fragmenty (ok. 150 pz i ok. 350 pz) [Aneks:6.5.6]. Jest więc produktem amplifikacji prawdopodobnie wszystkich trzech genów SC obecnych u *S. cerevisiae* (CIT 1, CIT 2 i CIT 3). Bowiern tylko amplifikowany fragment genu CIT 1 zawiera miejsce hydrolizowane przez użyty enzym restrykcyjny. Natomiast żaden z otrzymanych dla szczepu *Y. lipolytica* A-101 produktów amplifikacji nie został rozcięty do mniejszych fragmentów użytym enzymem (brak prążków w elektroforezie). Zatem amplifikowane fragmenty nie zawierają sekwencji **GAATTC** rozpoznawanej przez *EcoRI*.

Przeprowadzono wstępną analizę sekwencji nukleotydowej jednego z produktów, fragmentu o długości 550 pz (rys. 10) [Aneks: 6.5.7]. Zawiera on 471 oznaczonych oraz 79 nieoznaczonych nukleotydów. Pośród oznaczonych nukleotydów jest 111 guanidynowych (G), 104 cytydynowe (C), 141 adeninowych (A), 115 tymidynowe (T).

Podsumowując, w komórkach *Y. lipolytica* występuje kilka genów powielanych przy zastosowaniu oligonukleotydów oskrzydających centrum aktywne CIT 1 (jeden z trzech genów SC u *S.cerevisiae*). Jednak dopiero dalsze badania dotyczące sekwencji nukleotydowej otrzymanych produktów amplifikacji i ich porównanie do znanych sekwencji kodujących syntazę umożliwi ostateczne określenie liczby izoenzymów występujących u *Y. lipolytica*.



Rys. 10. Sekwencja nukleotydoma fragmentu o długości 550 pz
 Fig. 10. Nucleotide sequence of the fragment of 550bp length

3.3.4. Stopień utylizacji i powinowactwo komórek do glukozy

Z dotychczas prezentowanych wyników badań (rozdział 3.2.2) można sądzić, że nieznaczne różnice w budowie błon mogą być podstawą aktywnego wydzielania CA. Różnice te mogą także warunkować zdolność komórek drożdży do aktywnego przyswajania glukozy. Dlatego przeprowadzono analizę wyników dotyczących stopnia wykorzystania glukozy z podłoża produkcyjnego oraz wyznaczono powinowactwo komórek do glukozy.

Stopień utylizacji glukozy przez szczepy z rodziny A-101 podczas wzrostu w MMT z glukozą wynosił ponad 97% (tab. 8), a w podłożu produkcyjnym tylko 67–73% (tab. 18). W tym ostatnim przypadku wyjściowa ilość glukozy wynosiła 100g/L i nie był to koniec procesu (48 h). W tych samych warunkach dwa inne szczepy zdolne do biosyntezy CA: ATCC 20 320 i ATCC 20 324 wykorzystywały odpowiednio 61 i 94 % glukozy z podłoża produkcyjnego (P1). Natomiast szczep ATCC 32 338A jako jedyny wykorzystał nie więcej niż 50,4 % dostępnej glukozy, nawet gdy wyjściowe jej stężenie wynosiło tylko 10 g/L. Był to też jedyny szczep nie nagromadzający cytrynianu.

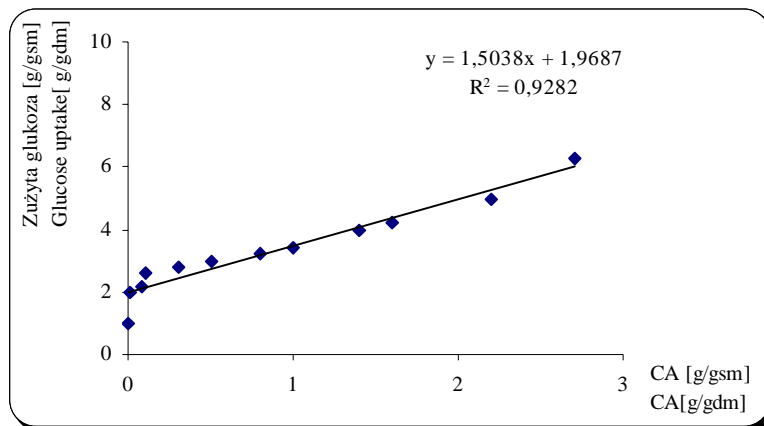
Tabela 18

Table 18

Stopień wykorzystania glukozy (%) podczas wzrostu w podłożu MMT (z glukozą) i podczas biosyntezy CA w podłożu produkcyjnym (P1) przez szczepy *Y. lipolytica*
 Glucose utilisation (%) during the growth on MMT medium (on glucose) and during biosynthesis of CA on production medium (P1) by *Y. lipolytica* strains

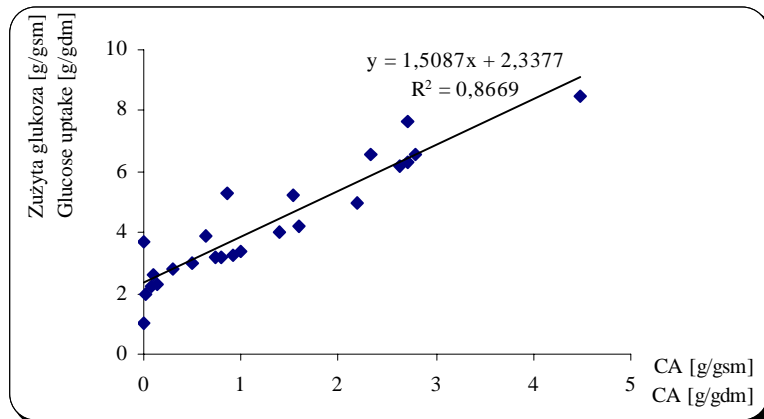
Szczep Strain	Wzrost Growth (1% glukozy – 1% glucose)	Biosynteza Biosynthesis (10% glukozy – 10% glucose)		
	24 h	24 h	32 h	48 h
A-101	98,7	39,0	56	75,0
A-101.1.31	98,7	36,0	46	67
A-101.1.31.K1	98,4	nb	nb	nb
A-101.1.22	97,7	46	54	73
ATCC32 338A	50,4	12	33	40
ATCC 20 320	nb	38	50	61
ATCC 20 324	nb	60	72	94

W dalszych badaniach wykazano, że efektywność wykorzystania glukozy z podłoża i zdolność do nagromadzenia w nim kwasu cytrynowego są ze sobą ściśle związane. Przedstawia to liniowa zależność ilości zużytej glukozy od ilości nagromadzonego kwasu w odniesieniu do 1 grama biomasy dla szczepu A-101.1.31 (rys. 11). W przypadku szczepu niezdolnego do produkcji kwasu (ATCC 32338A) ilość zużytej glukozy w przeliczeniu na 1 g suchej biomasy była stała, wynosiła około 3,5 g glukozy/gsm [II]. Zestawienie wyników otrzymanych z kilku różnych procesów okresowych biosyntezy CA przeprowadzonych z udziałem szczepów zdolnych do produkcji kwasu, niezależnie od czasu trwania procesu, końcowej ilości biomasy czy ilości kwasu również układa się w liniową zależność (rys. 12).



Rys. 11. Zużyta glukoza w funkcji wydzielonego CA przez 1 gsm drożdży *Y. lipolytica* – szczep A-101.1.31 (proces typu batch culture, biomasa zebrana w różnych godzinach)

Rys. 11. Consumed glucose in relation to the secreted CA by 1 gdm of *Y. lipolytica* yeast – strain A-101.1.31 (batch culture process, biomass collected at different hours)



Rys. 12. Zużyta glukoza w funkcji wydzielonego CA przez 1 gsm drożdży *Y. lipolytica* zdolnych do jego biosyntezy (wyniki otrzymane w niezależnych 24 i 48 godzinnych procesach typu batch culture, biomasa zebrana w różnych godzinach)

Rys. 12. Consumed glucose in relation to the secreted CA by 1 gdm of *Y. lipolytica* yeast able to CA biosynthesis (results obtained in separated 24 and 48 hours batch culture processes, biomass collected at different hours)

Równanie (1) opisujące zależność zużytej glukozy od ilości wydzielonego CA w przeliczeniu na 1g biomasy przedstawia się następująco:

Równanie 1

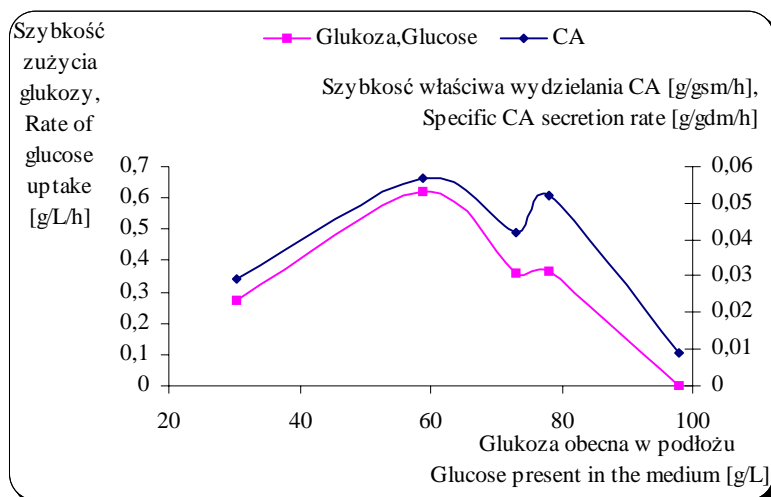
$$Y = 1,5087 X + 2,3377$$

gdzie:

Y = g zużytej glukozy przez 1 gsm

X = g CA wydzielone przez 1 gsm

Równanie to pozwala, dla konkretnej ilości biomasy, wyznaczyć stężenie glukozy w środowisku niezbędne do otrzymania określonej ilości CA. Równanie to wyznaczono jednak dla krótkotrwałych procesów. W dłuższych eksperymentach obserwowano zmienne w czasie tempo produkcji kwasu i zużycia glukozy [IV]. Przykładowo maksymalna wartość właściwej szybkości produkcji CA (q_{CA}) wynosiła 0,089 g/gsm/h, a minimalna 0,021 g/gsm/h; maksymalna wartość objętościowej szybkości zużycia glukozy (Q_{glu}) wynosiła podczas fazy wzrostu drożdży 3,5 g/L/h i 1,0 g/L/h podczas fazy kwaszenia, a minimalna 0,017 g/L/h. Mogą więc istnieć „krytyczne” stężenia substratu lub produktu warunkujące zmiany szybkości przemian na szlakach metabolicznych (glikoliza, cykl Krebsa, anaplerotyczna droga syntezy szczawiooctanu ...). Mogą to być stężenia cytrynianu: 10; 20; ~35 g/L, odpowiednio 0,057; 0,114 i ~0,2 M [IV], oraz odczytane z rysunku 13 stężenia glukozy: 80; 75; 60 g/l, odpowiednio 0,44; 0,42 i 0,33 M.



Rys. 13. Szybkość wykorzystania glukozy i sekrecji CA w zależności od aktualnego stężenia glukozy w podłożu

Fig. 13. Rate of uptake of glucose and secretion of CA in relation to the glucose concentration measured in the medium

Jednak ostateczny wpływ stężenia cytrynianu czy glukozy na przebieg wzrostu i procesu biosyntezy jest bardzo trudny do zbadania. Jest zbyt dużo zmiennych: ubywająca glukoza, przyrastający kwas cytrynowy, wpływ innych metabolitów. Także obecność kilku izoenzymów SC o różnej wrażliwości na cytrynian może prowadzić do otrzymania takiego obrazu.

Jak wynika z przytoczonych powyżej wyników badań zdolność do utylizacji glukozy i zdolność do biosyntezy CA są bezpośrednio ze sobą związane. Natomiast w dalszym ciągu nie wiadomo, czy efektywna zdolność do utylizacji glukozy przez komórki warunkuje ich zdolność do wydzielania kwasu, czy może jest na odwrót. Pośrednio udało się to wyjaśnić przez wyznaczenie powinowactwa komórek szczepów *Y. lipolytica* nagromadzających CA (A-101, A-101.1.31, A-101.1.31.K1 oraz A-101.1.22) i nie nagromadzającego CA (ATCC 32 338A) do glukozy (tab.19) [Aneks:6.2, 6.3.1, 6.4].

Tabela 19
Table 19

Powinowactwo komórek *Y. lipolytica* do glukozy
Affinity of *Y. lipolytica* cells for glucose

Szczep Strain	K_M [mM]	
	System o niskim powinowactwie Low affinity system	System o wysokim powinowactwie High affinity system
ATCC 32338A	20	1,4
A-101	22	1,2
A-101.1.22	17,5	0,87
A-101.1.31	22	0,64
A-101.1.31.K1	16,6	1,9

U wszystkich badanych szczepów występują dwa systemy odpowiedzialne za wchłanianie glukozy: o niskim i o wysokim powinowactwie, K_M odpowiednio wynosiło ~20mM i 0,64–1,9mM. Wartości te są podobne dla szczepów niezależnie, czy są one zdolne, czy nie do biosyntezy kwasu. Zatem to zdolność szczepów do wydzielania CA prowadzi do wykorzystania 98% glukozy z podłoża.

3.3.5. Wewnątrzkomórkowa zawartość cytrynianu

Chcąc ostatecznie potwierdzić hipotezę, że wydzielanie CA z komórki prowadzi do efektywnej utylizacji glukozy, oznaczono wewnątrzkomórkową zawartość cytrynianu w szczepach *Y. lipolytica* zdolnych do wydzielania CA (szczepy: A-101, A-101.1.31, A-101.1.22, ATCC 20 320, ATCC 20 324 oraz w szczepie kontrolnym, nie zdolnym do wydzielania CA (ATCC 32 338A) [II]. Zawartość ta w badanych szczepach była różna i zmienna w czasie. W biomacie pobranej na początku procesu produkcyjnego (czas 0) jego zawartość wynosiła od 19,3 mg/gsm (dla szczepu A-101) do 53,1 mg/gsm

(dla A-101.1.22). W biomacie szczepu nie gromadzącego kwasu (ATCC 32 338A) zawartość cytrynianu była wartością pośrednią: 38 mg/gsm. Po 48 godzinach wartości te odpowiednio wynosiły: od 14,9 mg/gsm (dla ATCC 32 338A) do 121,2 mg/gsm (dla ATCC 20 324). Natomiast porównując mM kwasu wewnątrzkomórkowego i obecnego na zewnątrz można sądzić, że CA dyfunduje swobodnie do podłoża w przypadku szczepów ATCC 20320 i ATCC 20324 i jest aktywnie wydzielany przez szczepy A-101, A-101.1.22 i A-101.1.31 (tab. 20).

Wewnątrzkomórkowe stężenie cytrynianu w szczepie nie nagromadzającym kwasu ATCC 32338A było ponad 5-krotnie wyższe niż zewnętrzne (tab. 20). Na tej podstawie można jednoznacznie stwierdzić, że zdolność do wydzielania CA leży u podstawy zdolności drożdży do aktywnego metabolizowania glukozy.

Tabela 20
Table 20

Stosunek kwasu cytrynowego wewnątrzkomórkowego do zewnątrzkomórkowego
w biomacie drożdży z 48 godziny procesu biosyntezy
Ratio of intracellular and extracellular citric acid in yeast biomass at 48 h
of biosynthesis process

Szczep Strain	Stosunek wew/zew CA Ratio intra/extra of CA
ATCC 20 320	2,12
ATCC 20 324	2,12
ATCC 32 338A	5,31
A-101	0,18
A-101.1.22	0,50
A-101.1.31	0,58

4. DYSKUSJA

W szczepach *S. cerevisiae* niezdolnych do wykorzystania octanu mutacja może dotyczyć jednego z 43 genów [McCammont 1996, Przybyła-Zawislak i wsp. 1999], a w szczepach *Y. lipolytica* – przynajmniej jednego z około 80 genów [Kujau i wsp. 1992]. W obrębie gatunku *Y. lipolytica* wyodrębniono cztery klasy mutantów niezdolnych do wzrostu na octanie, różniących się między sobą utylizacją n-alkanów i etanolu [Heslot 1990; Kujau i wsp. 1992; Mauersberger i wsp. 1995, Barth i Gaillardin 1996;]. Jedną z tych klas obejmuje mutanty niezdolne do wzrostu na octanie i na n-alkanach, a zdolne do wzrostu na etanolu [Kujau i wsp. 1992]. Metabolizm szczepów zaliczanych do tej klasy jest bardzo mało poznany, a mutanty octanowe A-101.1.31 i A-101.1.31.K1 do niej należą [VI].

Główne, prawdopodobne miejsca uszkodzenia szlaków metabolicznych, prowadzące do ekspresji fenotypu octan minus (oct⁻) mogą być usytuowane w obrębie genów kodujących: enzymy cyklu Krebsa i cyklu glioksalowego, enzymy szlaku glukoneogenezy, acetylo-CoA syntetaz(y?), białka odpowiedzialne za wnikanie octanu do komórki – transport octanu, białka szlaku wewnątrzkomórkowej komunikacji między poszczególnymi organelami. Możliwe jest także uszkodzenie na innym trudnym dziś do określenia, nieznanym poziomie.

W przypadku badanych szczepów *Y. lipolytica* nie wykazano różnic w obrębie oznaczanych aktywności enzymów cyklu Krebsa oraz liazy izocytrynianowej. Wykluczono także defekt w obrębie genów kodujących enzymy glukoneogenezy, ponieważ mutanty rosną na glicerolu i niektórych kwasach tłuszczowych. Można jedynie przypuszczać, że istnieje defekt w obrębie genu(ów) kodujących podjednostkę enzymów współdziałających z lipoamidem. Brak mógłby dotyczyć E₃-dehydrogenazy dihydroliipoamidowej [E.C. 1.8.1.4], podjednostki enzymatycznej obecnej w kompleksie dehydrogenazy pirogronianowej, karboksylazy pirogronianowej [E.C.6.4.1.1] dekarboksylazy pirogronianowej, 2-oksodehydrogenazy, 2-okso dehydrogenazy rozgałęzionych kwasów organicznych oraz innej podjednostce dehydrogenazy pirogronianowej, E₂: S-acetylotransferazy dihydroliipoamidowej [E.C.2.3.1.12]. Wszystkie te enzymy mają budowę podjednostkową i współdziałają z lipoamidem. Można zatem przypuszczać, że właśnie podjednostka wiążąca ten koenzym jest nieprawidłowa lub nawet nieobecna, ponieważ mutanty nie wykorzystują: krótkołańcuchowych kwasów (jabłkowego, octowego, pirogronowego, glikolowego, bursztynowego i izocytrynowego) oraz glicyny i seryny. Dotychczas nie opisano żadnego z ww. enzymów u *Y. lipolytica*. Natomiast

w przypadku *S. cerevisiae* opisanych jest 7 z 8 prawdopodobnie istniejących [http://www.expasy.ch; Ross i wsp. 1988, Dickinson i wsp. 1986]

W pracy nie badano genów RTG odpowiedzialnych za wewnątrzkomórkowy przepływ informacji pomiędzy jądrem, cytoplazmą, mitochondriami i peroksisomami opisany przez Jia, Rothermel'a, Butow'a i Thornton'a [Jia i wsp. 1996, 1997, Liao i Butow 1993, Rothermel i wsp. 1997]. Natomiast wykazano, że prezentowany przez mutanty octanowe fenotyp nie jest wynikiem mutacji w obrębie genów kodujących białka odpowiedzialne za transport octanu. Octan bowiem wnika do komórki (i w warunkach dostępności innego źródła węgla – glukozy – jest metabolizowany). Powinowactwo komórek szczepu A-101 i mutantów octanowych do octanu jest podobne, aczkolwiek stosunkowo niskie. Wyznaczona stała Michaelisa (K_M) wynosi 152–158 mM. Wartość ta dla komórek *Zygosaccharomyces bailli* rosnących na glukozie jest ponad trzykrotnie niższa (45 mM), a dla komórek rosnących na octanie dużo niższa (2,6 mM) [Sousa i wsp. 1996]. Nie można wyznaczyć stałej powinowactwa ($1/K_M$) do octanu dla komórek drożdży *S. cerevisiae* wyrastających na glukozie, gdyż jak przedstawili Casal i wsp. [1998], obserwuje się liniową zależność między szybkością wchłaniania octanu i jego stężeniem. Octan swobodnie dyfunduje do komórek wyrosniętych w obecności glukozy. Jednak ci sami autorzy stwierdzili także obecność symportu protono-octanowego w komórkach *S. cerevisiae* wyrosniętych na octanie, mleczanie czy etanolu. Zatem obie teorie dotyczące wnikania octanu do komórki eukariotycznej przedstawione we wstępie są prawdziwe dla *S. cerevisiae*. Mogą one także być prawdziwe w przypadku *Y. lipolytica*. Obserwowane przez Tzschope i wsp. [1999] zahamowanie wzrostu szczepów na glukozie przez 0,03 M octan świadczy raczej o swobodnej dyfuzji kwasu, podczas gdy obserwowany dla szczepu A-101 i mutantów wzrost na glukozie w obecności powyżej 0,1 M octanu (10g/L) i szybkie znikanie octanu z podłoża dowodzą o istnieniu systemu transportu. Niewiele jest prac dotyczących systemów transportu kwasów u drożdży i innych organizmów eukariotycznych. Casal i Leao [1995] scharakteryzowali dwa niezależne systemy transportu krótkołańcuchowych monokarboksylowych kwasów u *Torulasporea delbrueckii*. Jeden dla trzech kwasów: octanu, propionianu i mrówczanu, a drugi dla pięciu kwasów: mleczanu, pirogronianu, octanu, propionianu i mrówczanu. Rao i Debusk [1977] opisali indukowany system transportu u *Neurospora crassa*, a Chaure i Connerton [1995] otrzymali mutanty o przyspieszonym wzroście na octanie.

Podczas wzrostu na podłożu minimalnym zawierającym glukozę i octan mutanty oct A-101.1.31 i A-101.1.31.K1 wykorzystały octan niezależnie od jego wyjściowej ilości. Zatem szlak metabolizmu octanu jest w tych warunkach aktywny. Głównym enzymem umożliwiającym wykorzystanie octanu przez grzyby strzępkowe i drożdże jest acetylo-CoA syntetaza [E.C.6.2.1.1] (ACS) (rys. 1, punkt 3) [De Virgilio i wsp. 1992, Van den Berg i Steensma 1995]. Jest ona kodowana w komórce *S. cerevisiae* przez dwa geny ACS1 i ACS2. Jeden z nich jest konstytutywny, a drugi podlega indukcji [Kratzer i Schuller 1995, 1997]. Gen ACS1 jest niezbędny do wzrostu drożdży nawet na glukozie, choć nic nie wiadomo o indukcji jego transkrypcji. Dla *Y. lipolytica* opisano tylko jeden gen syntetazy acetylo-CoA: ICL2 (wcześniej opisany jako gen izocytrynianowej liazy) [Kujau i wsp. 1992]. Jest jednak możliwe występowanie dwóch genów również

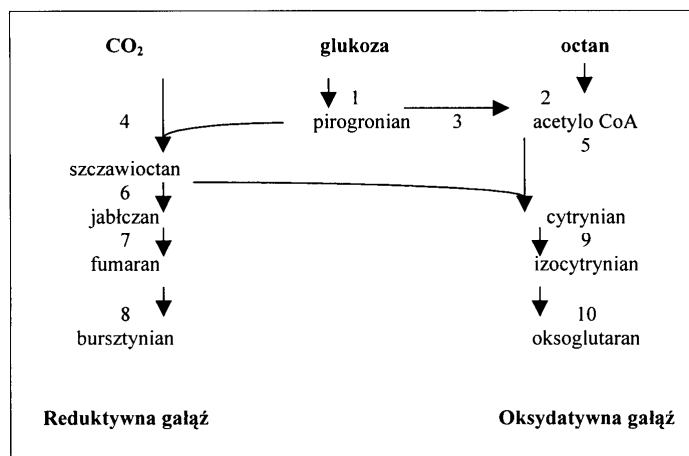
u *Y. lipolytica*. Istnieje duże prawdopodobieństwo, że właśnie jeden z genów ACS jest uszkodzony, a drugi ulega ekspresji, gdy w podłożu jest inne źródło węgla (np. glukoza). Dwie syntetazy, AMP-ACS i ADP-ACS, wykazano u halofilnych archebakterii *Halococcus saccharolyticus* [Johnsen i wsp. 2001], *Haloferax volcanii* i *Halorubrum saccharovororum* [Brasen i Schonheit, 2001]. Pierwszy enzym tworzy acetylo-CoA z octanu i CoA i jest aktywny podczas wzrostu na octanie, a drugi uwalnia octan z acetylo-CoA. Jest on obecny w komórce podczas wykładniczej fazy wzrostu na glukozie. Nie oznaczano aktywności tych enzymów w szczepach *Y. lipolytica*.

Obserwowany przyrost biomasy badanych drożdży na podwójnym źródle węgla może być wynikiem kooperacji w użyciu glukozy i octanu. Prawdopodobnie zachodzi tutaj indukcja karboksylazy pirogronianowej przez octan. Indukcję taką wykazali u *S. cerevisiae* Pronk i wsp. [1996] oraz De Jong-Gubbels i wsp. [1995]. Nadmiar utworzonego w ten sposób szczawiooctanu może być redukowany przez dehydrogenazę jabłczanową indukując powstanie NAD^+ i jabłczanu. Ten ostatni może być metabolizowany do fumaranu przez hydratazę fumarową. W przypadku badanych mutantów *Y. lipolytica* kwas ten jest akumulowany w podłożu w prostej zależności od wyjściowej ilości octanu. Ponadto kwas fumarowy jest znanym potencjalnym akceptorem elektronów oraz protonów i w komórkach tych szczepów może dochodzić do rozdzielenia cyklu Krebsa na gałąź oksydacyjną i redukcyjną. Tak zaproponowany obieg metabolizmu podczas jednoczesnego wykorzystania octanu i glukozy przedstawiono na rysunku 14. Podobne rozgałęzienie opisano dla *Helicobacter pylori* [Pitson i wsp. 1999] i dla anaerobowo wzrastających komórek *E. coli* [Prohl i wsp. 1998]. Być może również w przypadku *Y. lipolytica*, a w szczególności mutantów, dla których obserwowano zwiększony poziom bursztynianu i fumaranu w płynie pohodowlanym, występuje podczas wzrostu na podwójnym źródle węgla taka sytuacja. Należy zwrócić uwagę, że wszystkie niezbędne dla komórki prekursorzy są w przebiegu proponowanego rozgałęzienia dostępne (szczawiooctan, bursztynian, oksoglutaran, zredukowane i utlenione nukleotydy).

Podobny schemat zaproponowali De Jong-Gubbels i wsp. [1995]. Badali oni jednoczesne wykorzystanie glukozy i etanolu przez *S. cerevisiae* i w zależności od stosunku etanolu do glukozy w podłożu rozważali sześć wariantów obiegu przemian. Przy niskim stężeniu etanolu zahamowaniu ulegałaby aktywność dehydrogenazy pirogronianowej, a indukcji aktywność karboksylazy pirogronianowej prowadząc do utworzenia szczawiooctanu uzupełniającego obieg CKT.

Na podstawie zaobserwowanych różnic w szybkości wzrostu na glukozie, czy to z dodatkiem octanu, czy bez, jednoznacznie można wnioskować o odmienności szczepu A-101.1.22 i szczepu rodzicielskiego, mimo że prezentują podobny fenotyp. Może to być związane z inną szybkością pobierania glukozy uwarunkowaną aktywnością permeaz. W komórkach badanych szczepów *Y. lipolytica* wykazano bowiem obecność co najmniej dwóch systemów transportu. Wyznaczono K_M wynoszące $\sim 20\text{mM}$ i $0,64\text{-}1,9\text{ mM}$. Podobne systemy transportu glukozy o niskim i wysokim powinowactwie opisano dla *S. cerevisiae*, *Hansenula nonfermentas*, *Kluyveromyces marxianus*, *Torulopsis glabrata*, *Schizosaccharomyces pombe* i *Brettanomyces intermedius*. [Van Urk i wsp. 1989, Marchal-Carlson i wsp. 1990, Ko i wsp. 1993, Lagunas 1993]. U *S. cerevisiae* oraz

w komórkach ssaków zidentyfikowano 5 genów kodujących białka odpowiedzialne za wnikanie glukozy do komórki [Lewis i Bisson 1991, Muechler i Holman 1995]. Glukoza jest głównym paliwem komórkowym i ograniczenie jej ilości, jako jedyne źródła węgla i energii, prowadzi do reorganizacji metabolizmu komórki. Nie reguluje ona szlaków metabolicznych poprzez hamowanie lub uaktywnianie enzymów, lecz wpływa na ilość transkryptu genu kodującego dane białko lub enzym, np. na ilość transkryptu genu kodującego związaną z błoną H^+ -ATPazę u *Aspergillus nidulans*, a nie wpływa na aktywność enzymu [Abdallah i wsp. 2000]. Represja procesu transkrypcji może mieć miejsce przy dodatku zaledwie 0,005% glukozy [za Dennis i McCammon, 1999]. Natomiast u *Candida tropicalis* i *Candida utilis* nie stwierdzono represji glukozowej [Berry i Brown, 1987]. Jak wykazali Ferea i wsp. [1999], brak glukozy lub jej ograniczenie jako jedyne źródła węgla powoduje ewolucyjną adaptację szczepów drożdży *S. cerevisiae*, prowadząc do licznych mutacji pojawiających się z częstotliwością 1 na 20–50 generacji.



- 1) Enzymy glikolizy, Enzymes of glycolyse
- 2) Acetyl CoA syntetaza, acetyl CoA synthetase [E.C.6.2.1.1],
- 3) Dehydrogenaza pirogronianowa, Pyruvate dehydrogenase [E.C. 1.2.4.1]
- 4) Karboksylaza pirogronianowa. Pyruvate carboxylase [E.C.6.4.1.1]
- 5) Syntaza cytrynianowa, Citrate synthase [E.C. 4.1.3.7]
- 6) Dehydrogenaza jabłczanowa, malate dehydrogenase [E.C.1.1.1.37] – oksydacyjny lub redukcyjny kierunek, oxydative or reductive direction
- 7) Hydrataza fumarowa (fumaraza), Fumarase [E.C.4.2.1.2]
- 8) Dehydrogenaza bursztynianowa, Succinic dehydrogenase [E.C. 1.3.99.1] – redukcyjny kierunek reductive direction; lub Reduktaza fumarowa, or fumarate reductase [E.C. 1.3.99.1]
- 9) Akonitaza, Aconitase [E.C.4.2.1.3]
- 10) Dehydrogenaza izocytrynianowa, Isocitrate dehydrogenase [E.C.1.1.1.41], [E.C.1.1.1.42]

Rys. 14. Proponowany schemat jednoczesnego wykorzystania octanu i glukozy przez *Y. lipolytica*
 Fig. 14. Proposed metabolic way for the simultaneous utilisation of acetate and glucose by *Y. lipolytica*

W niniejszej pracy wykazano, że glukoza indukuje utylizację octanu przez mutanty *Y. lipolytica*. Indukcja ta może być spowodowana bezpośrednio glukozą, ale jest bardziej prawdopodobne, że induktorem jest metabolit powstający podczas wzrostu szczepów, np. acetylo-CoA, fosfoenolopirogronian lub fosfooctan. U drożdży *Schizosaccharomyces pombe* i *Zygosaccharomyces bailli* dochodzi do podobnej indukcji wykorzystania L-jabłczanu [Saayman i wsp. 2000]. Metabolizują one L-jabłczan tylko w obecności innego przyswajalnego źródła węgla. Równoczesne wykorzystanie octanu i glukozy opisywano dla *Z. bailli* [Sousa i wsp. 1996], *Corynebacterium glutamicum* [Wendisch i wsp. 2000], a ostatnio nawet dla *Y. lipolytica* [Rodrigues i Pais 2000]. W niniejszej pracy mutanty oct⁻ (A-101.1.31 i A-101.1.31.K1) i rodzic (A-101) jednocześnie wykorzystują glukozę i octan. Nie obserwowano zjawiska diauksji podczas wzrostu jak w przypadku jednego z tych szczepów na mieszaninie glukozy i fruktozy [Wojtatowicz i wsp. 1997]. Bardzo interesujący był natomiast brak indukcji etanolem wykorzystania octanu przez *Y. lipolytica* i zahamowanie wzrostu drożdży zarówno z octanu, jak i z etanolu, gdy były one jednocześnie obecne w podłożu. Wygląda to tak jakby szlaki asymilacji (przemian ?) octanu i etanolu wzajemnie się wykluczały. Hamowanie transportu octanu przez etanol (i butanol) wykazali Casal i wsp. [1998] w komórkach *S. cerevisiae*. Sugerują oni, że pod wpływem alkoholu zmienia się konfiguracja nie tylko białek transportujących octan, ale wielu innych permeaz. Hamowanie etanolem transportu octanu wykazali również Sousa i wsp. [1996] dla drożdży *Z. bailii*. Wcześniej De Jong-Guebbers i wsp. [1995] opisali jednoczesne wykorzystanie glukozy i etanolu przez *S. cerevisiae* podczas wzrostu w chemostacie w warunkach limitacji źródłem węgla. Regulacja metabolizmu glukozy, octanu i etanolu jest odmienna w zależności od gatunku drożdży, szczepu oraz warunków hodowli.

Z dotychczasowych badań nad procesem biosyntezy kwasu cytrynowego przez drożdże z gatunku *Y. lipolytica* wiadomo, że czynnikiem warunkującym rozpoczęcie wydzielania tego metabolitu jest wyczerpanie azotu ze środowiska, chociaż możliwa jest także nadprodukcja kwasu w warunkach limitacji wzrostu drożdży poziomem siarki lub fosforu [Wojtatowicz, 1991]. Zmiany zachodzące na szlakach metabolicznych komórki na skutek niedostatecznej ilości azotu w podłożu według Evansa i Ratledge'a [1984] są spowodowane zmniejszeniem ilości dostępnego AMP. Powoduje to obniżenie aktywności ICDH (zależnej od poziomu tego nuklotydu) i nagromadzenie CA w podłożu hodowlanym [Evans i Ratledge 1985]. Opisane powyżej zmiany metaboliczne prowadzą prawdopodobnie do wydzielania kwasu cytrynowego przez badane szczepy *Y. lipolytica* w hodowli stacjonarnej na glukozie oraz zasilanej na mieszaninie glukozy i fruktozy (zhydrolizowana melasa) w warunkach dobrego natlenienia brzeczki fermentacyjnej. Natomiast, jak wynika z przeprowadzonych doświadczeń, duży wpływ na aktywność ICDH oraz rozpoczęcie wydzielania kwasu cytrynowego do podłoża miał poziom natlenienia środowiska hodowlanego. Słabe natlenienie indukowało sekrecję CA do podłoża już od pierwszych godzin hodowli pomimo obecności azotu w ilościach zapewniających dalszy rozwój populacji. Stwierdzona w tych warunkach dwukrotnie niższa aktywność ICDH, w porównaniu do aktywności tego enzymu w procesach dobrze natlenionych, leży u podstaw zmian metabolicznych warunkujących wydzielanie kwasu. Już wcześniej wielu

badaczy stwierdziło, że warunkiem wydzielania CA przez drobnoustroje jest obniżenie aktywności ICDH [Atkinson 1977, Bartel i Jensen 1979, Legisa i Kidric 1989, Torres 1996], a zatem deficyt tlenu jest kolejnym czynnikiem wpływającym na aktywność tego enzymu i ostatecznie na gromadzenie CA przez drożdże. Ponadto, jeżeli w komórkach *Y. lipolytica* występuje cytoplazmatyczny izoenzym syntazy cytrynianowej, cały proces może przebiegać poza mitochondrium, wykazując zmniejszone zapotrzebowanie tlenowe.

Pozostaje to w sprzeczności z wynikami Rymowicza [1998], który stwierdził, że wyższe natlenienie umożliwia większą produkcję kwasu. Jednak autor w tych badaniach nie mierzył natlenienia, a tylko szybkość obrotów mieszadła przy takiej samej, stosunkowo niskiej podaży powietrza (0,2 v.v.m). Mogła zatem zaistnieć sytuacja, w której dochodzi do szybszej dyfuzji tworzonego kwasu podczas intensywnego mieszania poprzez szybsze ustalenie się równowagi pomiędzy stężeniami tego kwasu wewnątrz i na zewnątrz komórek. We wcześniejszych badaniach Moresi i wsp. [1980] wykazali najefektywniejszą produkcję CA z udziałem drożdży przy równie małej podaży powietrza (0,2 v.v.m) i intensywnym mieszaniu. Nie ma prostej korelacji szybkości obrotów i natlenienia, nie tylko ze względu na opory dyfuzji gazów, ale także ze względu na zmieniające się w czasie zapotrzebowanie tlenowe komórek lub zastosowany typ procesu (Rymowicz prowadził proces typu – chemostat). Ponadto intensywne mieszanie, w przypadku szczepu A-101.1.31, w krótkim czasie prowadzi do degeneracji populacji, pojawiają się segreganty znacznie słabiej wydzielające kwas cytrynowy [Rymowicz 1998, Wojtatowicz i wsp. 1997]. Dodatkowo dynamika zarówno wykorzystania glukozy, jak i szybkości właściwej produkcji kwasu cytrynowego z udziałem *Y. lipolytica* nie jest jednakowa podczas całego procesu. Obserwowana fazowość, dla procesu na hydrolu glukozowym, może świadczyć o przynajmniej trzech punktach kontroli metabolicznej zależnych od stężenia cytrynianu i przypuszczalnie glukozy. Natomiast wyższy stopień czystości procesu biosyntezy CA z udziałem drożdży obserwowany dla mutantów octanowych może być powiązany z brakiem zdolności do wykorzystania izocytrynianu jako źródła węgla. Jest on zależny od niskiej aktywności ICDH, a nie od niskiej aktywności akonitazy, czego oczekiwali inni badacze. Akiyama i wsp. [1973] w pierwszych pracach nad szczepami *Y. lipolytica* zdolnymi do wydzielania kwasu cytrynowego niesłusznie zasugerowali się, że szczepy o obniżonej aktywności akonitazy powinny nagromadzać więcej tego kwasu, bez udziału kwasu izocytryniowego. Dawno już bowiem wiadano, że równowaga reakcji katalizowanej przez akonitazę jest znacznie przesunięta w kierunku tworzenia cytrynianu¹ [Krebs i Johnson 1937]. Wielu innych badaczy poszło w tym samym kierunku i także próbowali otrzymać na drodze mutacji szczepy o obniżonej aktywności akonitazy [Behrens i wsp. 1977, Matsuoka i wsp. 1977, Marchal i wsp. 1977]. Jednak Treton i Heslot [1978] wykazali, że nie można obniżyć aktywności akonitazy *in vivo*, słabe inhibitory nie skutkują (np. fluorooctan), a silne prowadzą do śmierci komórki. Dopiero w późniejszych latach okazało się, że akonitaza obok funkcji jaką pełni

¹ Równowaga reakcji ustala się następująco: 90,9-2,9-6,2, odpowiednio cytrynian-akonitan-izocytrynian [Krebs i Johnson 1937].

w cyklu Krebsa, posiada także funkcję regulatorową w ekspresji genów. Jest tak zwanym palcem cynkowym [Frishman i Hentze 1996]. Ponadto w komórce istnieją dwa izoenzymy akonitazy [Gangloff i wsp. 1990, Velot i wsp. 1996].

Badając aktywność SC nie stwierdzono bezpośredniej korelacji pomiędzy wysoką jej aktywnością a szybkością wydzielania cytrynianu [I]. Natomiast zaobserwowano wzrost aktywności tego enzymu wraz ze zwiększaniem stężenia azotu w podłożu zasilającym, w hodowli ciągłej na glukozie w warunkach chemostatu [V]. Ciągły dodatek niewielkich ilości azotu aktywuje syntazę cytrynianową i tym samym częściowo tłumaczy korzystny wpływ dozowania jonu amonowego na proces biosyntezy CA. Dozowanie azotu może także wpływać na system transportu glukozy. U *S. cerevisiae* wchłanianie glukozy jest zahamowane, gdy komórki są pozbawione azotu [Busturia i Lagunas, 1986].

Pomimo wyodrębnienia syntazy cytrynianowej z drożdży *Y. lipolytica* [Morgunov i wsp. 1994, IV] dotychczas nieznana jest struktura pierwszorzędowa tego enzymu. Na podstawie różnic aktywności w zależności od pH można jedynie przypuszczać, że u *Y. lipolytica* istnieje kilka izoenzymów syntazy podobnie jak u *S. cerevisiae* [Jia i wsp. 1997, Kispal i wsp. 1987, Lewin i wsp. 1990, Lia i wsp. 1991, Rosenkrantz i wsp. 1986, Rickey i Lewin, 1986]. Obecność 5 genów SC w genomie *Y. lipolytica* wynika także z przeprowadzonych badań z zastosowaniem PCR. Pojawienie się pięciu swoistych produktów amplifikacji fragmentu genu syntazy może leżeć u podstaw zdolności tych drożdży do biosyntezy kwasu cytrynowego. Być może niektóre z nich występują w cytoplazmie, powodując łatwiejsze wydzielenie kwasu z komórki (przejście tylko przez jedną membranę plazmatyczną, a nie przez trzy przy wychodzeniu z mitochondrium). Istnienie kilku izoenzymów syntazy cytrynianowej u *Y. lipolytica* może utrudniać kontrolę procesu biosyntezy kwasu cytrynowego poprzez regulację jej aktywności. Może to też tłumaczyć niezgodność między szybkością syntezy tego kwasu a jej aktywnością. Poszczególne izoenzymy mogą przecież różnić się nie tylko optimum pH, ale wrażliwością np. na cytrynian, jony NH_4^+ , ATP czy inne inhibitory syntazy cytrynianowej. Dotychczas wyizolowane SC różnią się zarówno optimum pH, jak i wrażliwością na znane inhibitory tego enzymu [Robak 2000].

W przypadku pleśni z gatunku *Aspergillus niger*, na podstawie komputerowych badań modelowych wyznaczono, że wydajność procesu biosyntezy CA zależy przynajmniej od siedmiu enzymów [Torrs 1996]. Trudno jest zatem ingerować na poszczególnych etapach CKT czy glikolizy. Szczególnie, że często istnienie poszczególnych białek enzymatycznych czy transkryptów mRNA jest krótkotrwałe. W przypadku *S. cerevisiae* transkrypt genu permeazy mleczanowej znika w ciągu 10 minut po dodaniu glukozy do logarytmicznie rosnących komórek, a aktywność permeazy zanika po 50 minutach [Andrade i Casal 2001]. Równie szybkie zmiany w poziomie transkryptów genów (mRNA) obserwowali Brown i wsp. [2001] w badaniach nad genami kodującymi białka o nieznannej funkcji u *S. cerevisiae*. Dlatego poznanie regulacji danego procesu poprzez badanie aktywności enzymatycznych komórek wyrosniętych w różnych warunkach hodowlanych i czasowych nie zawsze jest w pełni możliwe do interpretacji. Czasami prowadzi nawet do sprzecznych wniosków. Także prace nad optymalizacją składu podłoża nie prowadzą do w pełni zadowalających wyników mogących mieć bezpośrednie

praktyczne zastosowanie [Rymowicz W. 1995, Rywińska 1998, Żarowska 1999]. Należy szukać innej drogi optymalizacji procesu biosyntezy CA. Takim szlakiem może być próba stymulacji nadprodukcji poprzez dodanie dodatkowego źródła węgla, np. octanu. We wstępnych badaniach, nie prezentowanych w tej pracy [Robak i wsp. 2002], dodatek octanu wydaje się korzystnie wpływać na proces biosyntezy CA. Octan w obecności glukozy może prowadzić do reorganizacji przemian poprzez indukcję kolejnych enzymów (np. karboksylazy pirogronianowej). Glukoza byłaby wtedy metabolizowana tylko do kwasu pirogronianego, który pod wpływem karboksylazy pirogronianowej byłby następnie przekształcany do szczawiooctanu. Natomiast acetylo-CoA powstawałby pod wpływem acetylo-CoA syntetazy z dostępnego w podłożu octanu. Z obu tych produktów SC utworzy cytrynian, który zostanie wydzielony z komórki, czyli ostatecznie z jednej cząsteczki glukozy i dwóch cząsteczek octanu powstawałaby jedna cząsteczka cytrynianu. Stymulację 5mM octanem przepływu metabolitów przez CKT stwierdzili w nerce królika Dugelay i wsp. [1999]. Natomiast Chen i Blaschek [1999] stwierdzili pozytywny wpływ dodatku octanu na produkcję butanolu przez *Clostridium beijerinckii* oraz zahamowanie szybkości degeneracji szczepu. Dodatek niecukrowego źródła węgla w komórkach *S. cerevisiae* zapobiegał też inaktywacji systemów transportu glukozy [Busturia i Lagunas, 1986].

Na podstawie porównania wewnątrzkomórkowego stężenia CA wykazano aktywne jego wydzielanie przez szczepy *Y. lipolytica* (A-101, A-101.1.31, A-101.1.22). Prowadzi to do nadprodukcji kwasu, warunkuje bowiem zdolność szczepów do całkowitego metabolizowania glukozy. Szczep ATCC 32338A nie nagromadzający kwasu nie był zdolny do całkowitego wykorzystania glukozy. Podobnie nie były do tego zdolne niewydzielające CA szczepy YB423 i K12 opisane odpowiednio przez McKay i wsp. [1994] i Finogenova i wsp. [1989]. Można tutaj dopatrzeć się pewnej analogii z pleśniową fermentacją cytrynową, która uwarunkowana jest niewrażliwością na cytrynian fosfofruktokinazą. W przypadku drożdży aktywne wydzielanie cytrynianu utrzymywałoby jednakowe wewnątrzkomórkowe stężenie kwasu, nigdy nie doprowadzając do inhibicji tego enzymu.

Badania poznawcze z zakresu metabolizmu mogą być prowadzone na wielu płaszczyznach, a otrzymane wyniki nie zawsze są jednoznaczne i tym trudniej jest ostatecznie wyjaśnić badany problem. Niemniej otrzymane wyniki są ciekawe i mogą posłużyć jako punkt wyjścia dla nowych tematów poznawczych. Jeden z nich może dotyczyć badań nad dotychczas nie poznaną u *Y. lipolytica* sekwencją genu (ów?) syntazy cytrynianowej. Przypuszczalna obecność intronów, a być może, że nawet transposomów w obrębie powielanych fragmentów genów zwiększa jeszcze atrakcyjność tego tematu badawczego. Kolejne badania mogą obejmować zagadnienie indukcji utylizacji octanu innymi źródłami węgla, sprawdzenia występującej u badanych szczepów ilości genów acetylo-CoA syntetazy oraz poznania wpływu octanu na acetylację białek histonowych. Acetylacja reszt lizyny w histonach w procesie regulacji replikacji DNA jest niedawno ujawnionym ogniwem kontroli metabolizmu komórki. Jest ona pierwszym etapem regulacji, to znaczy umożliwia replikację genów [Gregory i wsp. 2001, Wittschieben i wsp. 1999]. W przypadku *Y. lipolytica* interesujące byłyby badania nad wpływem acetylacji histonów na procesy biotechnologiczne prowadzone z udziałem tego gatunku drożdży, np. biosyntezy CA czy produkcji biomasy z surowców odpadowych.

5. WNIOSKI

Na podstawie otrzymanych i przedstawionych wyników dotyczących wykorzystania octanu i badań defektu genetycznego warunkującego fenotyp octan minus wyciągnięto następujące wnioski:

1. Szczepy A-101.1.31 i A-101.1.31.K1 nie były zdolne do wzrostu na octanie, gdy był on jedynym źródłem węgla. Natomiast przy jednoczesnej obecności glukozy w środowisku octan zwiększał plon ich biomasy. Octan zwiększał także plon biomasy szczepu A-101 (rodzica) oraz wywierał zróżnicowany wpływ na zdolność namnażania się szczepu A-101.1.22 (rewertanta) i szczepu ATCC 32 338A.

2. Wykorzystanie octanu przez szczepy: A-101.1.31 oraz A-101.1.31.K1 (mutanty oct⁻) było możliwe ze względu na jednoczesną obecność glukozy w środowisku hodowlanym. Minimalna dawka glukozy niezbędna do wywołania indukcji wykorzystania octanu przez mutanty octanowe wynosiła 0,01%. Natomiast etanol w stężeniu 0,1; 0,5 i 1%, obecny jako drugie źródło węgla w podłożu octanowym, nie indukował wykorzystania octanu przez mutanty oct⁻. Ponadto, w warunkach jednoczesnej obecności octanu i etanolu szczepy: A-101, A-101.1.31 oraz A-101.1.31.K1 nie wzrastały pomimo zdolności do utylizacji przynajmniej jednego z tych substratów.

3. Wszystkie badane szczepy metabolizowały octan, gdyż nie wykazano jego obecności w biomase badanych szczepów, a pozostałość w płynie pohodowlanym stanowiła od 0 do 2,5% wyjściowo dodanej ilości w przypadku szczepów wywodzących się ze szczepu A-101 i od 2,8 do 9,6% dla szczepu ATCC 32 338A.

4. Dodatek octanu, w zależności od badanego szczepu, wywierał zróżnicowany wpływ na stopień wykorzystania glukozy z podłoża. W przypadku trzech szczepów: rodzica i mutantów octanowych glukoza została wykorzystana w 98,4–98,9%. Szczep A-101.1.22 wykorzystał 81,0–97,7% dodanej glukozy, a szczep ATCC 32 338A tylko w 38,3–50,4%.

5. Przebieg metabolizmu drożdży *Y. lipolytica* w zależności od zastosowanego źródła węgla: glukozy, octanu lub glukozy z octanem jest odmienny. Octan obecny jako dodatkowy substrat węglowy zwiększał zawartość jabłczanu, bursztynianu i fumaranu w komórkach mutantów oct⁻ oraz rodzica, wpływał na stężenie kwasów CKT w płynie pohodowlanym, a także podwyższał ilość wyrastającej biomasy.

6. Pomędzy szczepem rodzicielskim: A-101 oraz rewertantem: A-101.1.22 wykazano zdecydowane różnice we właściwej szybkości wzrostu w podłożu z glukozą, z octanem oraz z glukozą i octanem. Różnice te świadczą o odmienności metabolicznej, a więc i genotypowej tych dwóch szczepów.

7. Zbliżona dla badanych szczepów wartość K_M dla octanu wskazująca na brak różnic w powinowactwie komórek do tego źródła węgla oraz podobny skład cukrów i kwasów tłuszczowych w komórkach poszczególnych szczepów należących do „rodziny” szczepu A-101 potwierdzają, że mutanty octanowe nie są upośledzone we wchłanianiu octanu. Posiadają funkcjonujący system transportu tego substratu węglowego.

8. Defekt genetyczny warunkujący fenotyp mutantów oct⁻ dotyczył szlaków asymilacji alkanów, olejów, krótkołańcuchowych kwasów: jabłkowego, octowego, pirogromowego, glikolowego, bursztynowego i izocytrynowego, a także L-arabinozy, betainy, glicyny, seryny, leucyny i lizyny, a w przypadku szczepu A-101.1.31.K1 również mezoinozytolu. Brak utylizacji przez mutanty przynajmniej części z niewykorzystywanych źródeł węgla (krótkałańcuchowe kwasy, glicyna oraz seryna) może być związany z mutacją dotyczącą pojedynczego genu. Chodzi o gen kodujący podjednostkę E_3 enzymów współdziałających z kwasem liponowym, takich jak: dehydrogenaza pirogromianowa, karboksylaza pirogromianowa czy 2-okso-dehydrogenaza rozgałęzionych kwasów tłuszczowych.

9. Pomędzy szczepami należącymi do „rodziny” szczepu A-101 nie wykazano znaczących różnic w aktywności SC, ICDH, HA oraz ICL. Świadczy to o innym miejscu mutacyjnego uszkodzenia genomu niż geny kodujące powyższe enzymy CKT i cyklu glioksalowego.

Natomiast na podstawie wyników badań dotyczących podstaw i regulacji sekrecji kwasu cytrynowego przez szczepy *Y. lipolytica* należące do „rodziny” szczepu A-101 sformułowano następujące wnioski:

10. Obniżenie aktywności ICDH następowało w fazie produkcji CA. Natomiast istotne zmniejszenie aktywności tego enzymu, które doprowadziło do wydzielania CA już w fazie wzrostu drożdży, otrzymano przez ograniczenie natlenienia hodowli do 20% nasycenia tlenem. Zmniejszenie aktywności ICDH korelowało także ze zmniejszonym udziałem kwasu izocytrynowego w sumie wydzielanych kwasów. Nie było korelacji pomiędzy niską aktywnością HA a niską zawartością izocytrynianu w sumie wydzielanych kwasów.

11. Aktywność syntazy cytrynianowej zależała od ilości jonu amonowego obecnego w środowisku. Ilość jonu amonowego dozowanego do układu ciągłej biosyntezy CA powinna wynosić około 1 mmol/L/h. Jednak nie zapewnia to dostatecznej, długotrwałej stabilności kwasotwórczej komórek drożdży. Przyczyną obserwowanego obniżenia aktywności produkcyjnej może być zmieniający się w czasie udział w metabolizmie komórki poszczególnych izoenzymów syntazy występujących w mitochondriach oraz w peroksosomach. W komórkach *Y. lipolytica* występuje

kilka genów powielanych przy zastosowaniu oligonukleotydów oskrzydlaających centrum aktywne CIT 1, genu jednego z izoenzymów SC występujących u *S. cerevisiae*.

12. Zdolność do utylizacji glukozy i zdolność do biosyntezy CA są bezpośrednio ze sobą związane. Dla początkowych godzin procesu biosyntezy CA zależność ta została opisana następującym równaniem: $y = 1,509x + 2,338$ (y = zużyta glukoza, x = wydzielony CA, w przeliczeniu na 1 g biomasy)

13. Szczep ATCC 32 338A, nie produkujący CA, charakteryzował się odmiennym składem komórki od szczepów z „rodziny” A-101: posiadał dwukrotnie więcej glukozy i nie zawierał galaktozy we frakcji cukrowej.

14. Wyznaczone wartości powinowactwa komórek do glukozy $-K_{Mglu}$ są zbliżone dla wszystkich badanych szczepów niezależnie czy są one zdolne, czy nie do całkowitego wykorzystania glukozy obecnej w podłożu (ponad 90%) i nagromadzenia CA. Otrzymane wyniki wskazują na obecność w komórkach *Y. lipolytica* dwóch systemów asymilacji glukozy.

15. W komórkach szczepu ATCC 32 338A nie posiadającego uzdolnień do wydzielania CA wykazano ponad 5-krotne wyższe stężenie cytrynianu niż w komórkach producentów kwasu. Na tej podstawie jednoznacznie stwierdzono, że zdolność do wydzielania CA leży u podstawy zdolności drożdży do aktywnego metabolizowania glukozy. Niezależnie od wyjściowego stężenia glukozy w podłożu szczep ATCC 32 338A nie wykorzystał jej więcej niż 50%.

6. ANEKS – MATERIAŁY I METODY

6.1. Szczepy

Dziki szczep *Y. lipolytica* A-101, dwa mutanty octanowe (oct): A-101.1.31, A-01.1.31.K1, i rewertant octanowy A-101.1.22 pochodziły z kolekcji drożdży Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności AR we Wrocławiu [Wojtatowicz i wsp. 1993]. Mutant octanowy A-101.1.31 K1 jest segregantem szczepu A-101.1.31 i posiada fenotyp wykazujący gładką morfologię kolonii. Szczepy ATCC 20 320, ATCC 20324 oraz ATCC 32338A pochodziły z Amerykańskiej Kolekcji Szczepów Wzorcowych (American Type Culture Collection). Szczep ATCC 32338A jest auktotrofem adeninowym, nie nagromadzającym kwasu cytrynowego podczas hodowli na glukozie [II].

Szczep *Saccharomyces cerevisiae* PCM 2103 stanowił swoistą kontrolę w badaniach nad genem syntazy cytrynianowej. Pochodził on z kolekcji Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu.

6.2. Podłoża i warunki hodowli

6.2.1. Podłoża

W pracy stosowano dwa podłoża.

a. Podłoże produkcyjne:

P1 w procesie stacjonarnym [I]

P2 w procesie ciągłym [Rymowicz i Wojtatowicz 1999]

b. Podłoże Minimalne Mineralne – **MMT** zawierające jako źródło węgla glukozę, octan, heksadekan, kombinację dwóch z nich lub inne substraty węglowe [V]. Ilość dodawanego źródła węgla najczęściej wynosiła 1%, a w innych przypadkach zależała od założonego celu i została sprecyzowana w tabeli lub na rysunku.

Minimalne mineralne podłoże (MMT) w 1L zawiera: 5 g $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$; 2,5 g KH_2PO_4 ; 1g $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$; 300 μg tiamine; 20mg $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$; 2 mg $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$; 500 μg H_3BO_3 ; 100 μg o $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$; 400 μg $\text{Mn}_2\text{SO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$; 400 μg $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$; 200 μg Na_2MoO_4 ; 100 μg CoCl_2 ; 100 μg KJ i jako źródło węgla 10 g glukozy i / lub 1–10 g octanu sodu. PH wynosiło 6,5.

6.2.2. Warunki hodowli

Hodowle inokularne prowadzono w 250 mL kolbach zawierających 25 mL podłoża przez 48 h w 28°C na wytrząsaczu przy 150 rpm. Hodowle właściwe w zależności od potrzeb prowadzono w tych samych warunkach przez 24 godziny, w bioreaktorze w warunkach opisanych w cytowanych pracach i z pomocą automatycznego analizatora hodowli – Bioscreen C przez 72 godziny w 28°C. W testach asymilacyjnych stosowano 1 mL podłoża inokulacyjnego zawierającego 1–10 x 10⁸ komórek w mL, w bioreaktorze stosowano tę samą hodowlę jako 10% objętości końcowej, a w analizatorze Bioscreen C – inokularne hodowle przed zaszczepieniem standaryzowano tak, aby 1 mL zawierał około 5x10⁶ komórek.

6.2.3. Hodowla w Analizatorze Bioscreen C

Analizator Bioscreen C jest całkowicie zautomatyzowanym urządzeniem pracującym w oprogramowaniu BioLink. Urządzenie składa się z (1) automatycznego układu dozującego poszczególne składniki oraz zapewniającego sterylność dozowania przez odpowiednio dobrany wariant płukania etanolem lub podłożem; (2) inkubatora z wytrząsaniem; (3) układu optycznego umożliwiającego pomiar zmętnienia lub natężenia barwy. Wszystkie parametry są sterowane komputerowo, odczyt gęstości optycznej odbywa się automatycznie. W pracy stosowano temperaturę inkubacji 28°C, maksymalne wytrząsanie oraz odczyt zmętnienia przy 610 nm co 15 minut. Wykresy przedstawione w pracy wykonano za pomocą programu Excel. Każdy wariant doświadczenia był przeprowadzony w 5 powtórzeniach, automatycznie dozowane były wszystkie składniki podłoża oraz szczepy. Inokulum zawierające około 5x10⁶ komórek stanowiło 50 µL, podłoże wraz z dozowanymi osobno źródłami węgla – 350µL. Otrzymano dużą powtarzalność wyników, a maksymalne odchylenie standardowe wynosiło 15%. Szybkość wzrostu wyliczono na podstawie różnicy logarytmów naturalnych gęstości optycznej podzielonych przez różnicę czasu wg Wilson i wsp. [1982]:

$$\begin{aligned} & \text{Równanie 2} \\ & \mu = \ln OD_2 - \ln OD_1 / t_2 - t_1 \end{aligned}$$

6.3. Metody analityczne

6.3.1. Oznaczanie biomasy, kwasu cytrynowego, kwasu izocytrynowego, glukozy oraz aktywności enzymów

Sposób oznaczania biomasy, CA, ICA, glukozy, aktywności enzymatycznych podano w opublikowanych pracach autorki [I, II, III].

6.3.2. Oznaczanie kwasów organicznych

Oznaczanie octanu oraz kwasów cyklu Krebsa wykonano na kolumnie Animex HPX 80 wg zmodyfikowanej metody Ampe i Lindley w HPLC [Ampe i Lindley 1995]. Rozdział prowadzono w temperaturze pokojowej na kolumnie Aminex HPX 87H (300x7,8 mm) z 0,01 N H₂SO₄ jako eluentem przy szybkości przepływu 0,6 mL/min, i detekcją spektrofotometryczną przy długości fali 210 nm. W tabeli 21 podano czas retencji (RT) dla poszczególnych kwasów obecnych w badanych próbach. Identyfikacji analizowanych kwasów organicznych dokonano metodą dodania wewnętrznego standardu.

Tabela 21

Table 21

Czas retencji (RT) rozdzielanych kwasów
Retention (RT) time of separated acids

Czas retencji Retention time RT	Kwas organiczny Organic acid
7,62	Cytrynian, Citrate
8,35	Pirogronian, Pyruvate
9,21	Jabłczan, Malate
11,52	Bursztynian, Succinate
10,45	Akonitan, Aconitate
15,50	Fumaran, Fumarate

6.3.3. Ekstrakcja i oznaczanie kwasów tłuszczowych i cukrów

Biomasę po hodowli na podłożu MMT z dodatkiem glukozy (1%) lub heksadekanu (1%) zebrano przez wirowanie i poddano ekstrakcji :

- mieszaniną fenol-woda wg Galanos i wsp. [1969]
- mieszaniną metanol-chloroform wg Kates [1972].

W pierwszym przypadku do ekstrakcji pobierano 2 gramy suchej masy i po ekstrakcji otrzymane preparaty analizowano w kierunku składników cukrowych według Taylor i wsp. [1976] i w kierunku składników tłuszczowych według Gamian i wsp. [1995]. W drugim przypadku ekstrakcji poddawano 50 mg suchej masy, a otrzymany preparat analizowano wyłącznie w kierunku składników tłuszczowych. Oba typy analizy przeprowadzono przy użyciu chromatografu gazowego sprzężonego ze spektroskopem masowym GC-SM typu Hewett-Packard 5971A. Rozdziały przeprowadzono na kolumnie kapilarnej HP-1 o średnicy 0,2 mm, długości 12 m w temperaturze programowej 150–270⁰C (przrost temperatury 8⁰C/min). Jako gazu nośnego użyto helu.

W tabeli 22 wyszczególniono obecne w preparatach kwasy tłuszczowe według ich nazwy systematycznej i zwyczajowej oraz czasu retencji (RT).

Tabela 22

Table 22

Kwasy tłuszczowe obecne w komórkach *Y. lipolytica*

Fatty acids present in *Y. lipolytica* cells

Ilość atomów węgla i ilość nienasyconych wiązań Carbon atom number and number of insaturated bonds	Nazwa systematyczna kwasu Systematic name of acid	Nazwa zwyczajowa Commun name	RT Czas retencji Retention time
C14:0	Tetradekanowy Tetradecanoic	Mirystynowy Miristic	5,23
C16:0	Heksadecanowy Hexadecanoic	Palmitynowy Palmitic	7,93
C16:1	Heksadekenowy Hexadecenoic	Palmitooleinowy Palmitooleic	7,59
C18:0	Octadekanowy Octadecanoic	Stearynowy Stearic	10,4
C18:1	Oktadekenowy Octadecenoic	Oleinowy Oleic	10,05
C18:2	Octadienowy Octadienoic	Linolowy Linoic	9,96
C20:0	Eikozanowy Eicozanoic	Arachidonowy Arachinoic	12,67
C20:1	Eikozenowy Eicozenoic	Gadoleinowy Gadoleic	12,32
C24:0	Tetrakozanowy, Tetracozanoic	Lignocerowy Li- gnoceroic	16,6

6.4. Graficzne wyznaczenie powinowactwa do glukozy i octanu

Powinowactwa ($1/K_M$) komórek drożdży do glukozy i octanu wyznaczono z graficznej prezentacji równania (3) Lineweavera –Burka :

Równanie 3

$$1/v = (K_M/VS) + 1/V$$

gdzie: $1/K_M = -1/[S]$ przy $1/v = 0$, a $1/V_{max} = 1/v$ przy $1/S = 0$

v = ilość biomasy oznaczona jako OD_{610nm} , $[S]$ = stężenie źródła węgla (glukozy lub octanu) w mM. W przypadku oznaczania ilości biomasy dla mutantów oct⁻ była to różnica OD_{610nm} pomiędzy próbkami właściwymi (hodowla na glukozie z octanem) a kontrolą (hodowla na samej glukozie).

6.5. Metody biologii molekularnej

6.5.1. Ekstrakcja DNA

Ekstrakcję DNA przeprowadzono według metody Hoffmana [Barth i Gaillardin 1996].

6.5.2. Odczynniki

Odczynniki wykorzystane w PCR-reakcji łańcuchowej polimerazy: DyNAzyme™ II DNA polimeraza (firmy Finnzymes Oy): 125 µL o stężeniu 2 U/ µL; DyNAzyme™ bufor 10x (firmy Finnzymes Oy); dNTP Mix po 12,5 mM dATP, dTTP, dCTP i dGTP ich soli sodowych (firmy SIGMA): roztwór w wodzie destylowanej pH = 7; olej mineralny dla biologii molekularnej (firmy SIGMA).

6.5.3. Primery

W celu zwiększenia prawdopodobieństwa odnalezienia genu (-ów) syntazy cytrynianowej budowę primerów oparto o fragmenty genów CIT1, CIT2, CIT3 (*S. cerevisiae*) wykazujące największą homologię nukleotydową. Największa homologia zaobserwowana była we fragmentach otwartych ramek odczytu (ORF) pomiędzy 777 a 813, oraz 1233 a 1264 nukleotydem, czyli maksymalna konserwatywność sekwencji dotyczy obszaru bezpośrednio przed i tuż za centrum aktywnym enzymu. Na podstawie sekwencji genu CIT1 w tych obszarach – zaprojektowano parę primerów do amplifikacji centrum aktywnego syntazy cytrynianowej. Amplifikowany fragment zawiera miejsce restrykcji *Eco* RI. Bezpośrednio w projektowaniu primerów wykorzystano informacje zawarte w bazie danych [<http://genome-www.stanford.edu>]. Zaprojektowano następujące oligonukleotydy (primery):

FmtCS1: 5' – CAA GGA TTT TAT TGA CTT AAT GAG ACT AT–3'

(ORF CIT 1 od 777 do 805 pz)

Długość = 29 pz; CG% = 31; $T_m = 52^\circ\text{C}$; $T_{m\text{PCR}} = 49^\circ\text{C}$

delta G = -29,59 kcal/mol; delta H = -207,1 kcal/mol; delta S = -572,5 eu

tworzenie dimerów – 4 pz; komplementarność wewnętrzna – 3 pz;

stabilizacja końców – średnia

RmtCS1: 5' – CAA TAA AAC ACC GGA ATG TGA ATC AAC – 3'

(komplementarny do ORF CIT1 od 1234 do 1260 pz po odwróceniu sekwencji)

Długość = 27 pz; CG% = 37; $T_m = 55^\circ\text{C}$; $T_{m\text{PCR}} = 52^\circ\text{C}$

delta G = -30,34 kcal/mol; delta H = -202,6 kcal/mol; delta S = -553,5 eu

tworzenie dimerów – 4 pz; komplementarność wewnętrzna – 3 pz; stabilizacja końców – średnia

W tabeli 23 zebrano dane produkcyjne zamówionych oligonukleotydów.

Tabela 23

Table 23

Dane produkcyjne primerów (Bionovo™ – Legnica, MACHERY NAGEL)
Primer description

Właściwość – Characteristic	FmtCS1	RmtCS1
Długość, Length [pz]	29	27
%CG	27,6	37,0
Ilość, Quantity [nmol]	130,9	124,1
Ilość, Quantity [µg]	1168,6	1027,2
Masa molekularna, molecular mass [g/mol]	8930	8278
T _m [°C]	52,0	58,7
Objętość wody dla otrzymania stężenia 100 pmol/µL [µL]	1308,7	1240,9
Water volume to the obtention of the concentration of 100 pmol/µL [µL]		

6.5.4. Parametry PCR

W tabeli 24 zamieszczono ilości składników mieszaniny PCR. W mieszaninie reakcyjnej zastosowano primery RmtCS1 i FmtCS1 o stężeniu 50 pmol/ µL oraz mieszaninę nukleotydów (dNTPs) o stężeniu poszczególnych składników 12,5 mM.

Tabela 24

Table 24

Skład mieszaniny PCR
PCR reaction compounds

Bufor* Buffer* [µL]	RmtCS1 [µL]	Fmt- CS1 [µL]	dNTPs [µL]	pol [µL]	mat [µL]	H ₂ O [µL]	Olej Oil [µL]
5	1	1	1	1	1	40	50

* – DyNAzyme™ bufor 10x, DyNAzyme™ buffer 10x

pol – DyNAzyme™ II DNA polimeraza; DyNAzyme™ II DNA polymerase

mat – matrycowe DNA, template DNA

Sprawdzano również obecność powtarzających się sekwencji DNA, komplementarnych do primerów dla *Y. lipolytica*. W tym celu przeprowadzono PCR z pojedynczymi primerami (FmtCS1 lub RmtCS1) i kontrolne PCR bez primerów oraz bez matrycy (stężenie primerów i dNTPs jak w PCR właściwym). Ilości składników PCR zostały zmienione i zapisane w tabeli 25. Czas i temperaturę reakcji łańcuchowej polimerazy wybrano w odniesieniu do wcześniejszych prac dotyczących drożdży *Y. lipolytica* [Lopez i wsp. 1994, Esteban i wsp. 1999, Merkulov i wsp. 2000]. Zastosowano następujące parametry:

- denaturacja matrycy – 95°C, 5 min
 - przerwa na dodanie polimerazy – 94°C
 - denaturacja – 94°C, 1 min
 - asocjacja primerów – 49°C, 1 min
 - ekspresja – 72°C, 2 min
3 powyższe etap powtarzane są 30 razy
 - końcowa ekspresja – 72°C, 4 min
 - wychłodzenie 1°C/min do 4°C
- Całość przeprowadzono w aparacie UNO – Thermoblock™ firmy Biometra® .

6.5.5. Elektroforetyczna identyfikacja produktów PCR

Elektroforezę otrzymanych produktów PCR przeprowadzono w 1% żelu agarozowym (firmy Gibco BRL) w buforze TAE lub w 1% żelu agarozowym o niskiej temperaturze upłynnienia („low melting agarose” firmy Gibco BRL) w buforze TAE z dodatkiem 2 µL bromku etydyny o stężeniu 10 mg/ mL. Stosowano zmienne natężenie prądu: 80-100mA, napięcie 90V i prowadzono rozdziały przez 120 min w przypadku sprawdzenia obecności genomowego DNA i przez 90 min w przypadku rozdziały produktów PCR.

Tabela 25

Table 25

Skład mieszaniny PCR dla sprawdzenia zaprojektowanych primerów
PCR reaction compounds for control of primers designe

PCR	Bufor Buffer [µL]	RmtCS1 [µL]	Fmt-CS1[µL]	dNTPs [µL]	pol [µL]	mat [µL]	H ₂ O [µL]	Olej Oil [µL]
YbpF1	5	1	0	1	1	1	41	50
YbpF2	5	1	0	1	1	1	41	50
YbpR1	5	0	1	1	1	1	41	50
YbpR2	5	0	1	1	1	1	41	50
ObpF1	5	1	0	1	1	1	41	50
ObpF2	5	1	0	1	1	1	41	50
ObpR1	5	0	1	1	1	1	41	50
ObpR2	5	0	1	1	1	1	41	50
BM	5	1	1	1	1	0	41	50
Ybp	5	0	0	1	1	1	42	50
Obp	5	0	0	1	1	1	42	50

Oznaczenia – description:

Y – DNA szczepu *Y. lipolytica* A-101, DNA of *Y. lipolytica* A-101 strain

O – DNA szczepu *Y. lipolytica* A-101.1.31, DNA of *Y. lipolytica* A-101.1.31 strain

R – primer RmtCS1

F – primer RmtCS1

BM – PCR bez matrycy DNA; PCR without DNA template

bp – PCR bez primerów, PCR without primers

1, 2 – numer powtórzenia próby, number of sample repetition

Przykładowy odczyt, example of sample description :

ObpF2 = PCR dla *Y. lipolytica* A-101.1.31 bez primera FmtCS1, drugie powtórzenie

= PCR of *Y. lipolytica* A-101.1.31 without primerFMTCS1, second repetition

6.5.6. Analiza Restrykcyjna Produktów PCR

Analizę restrykcyjną produktu amplifikacji DNA drożdży *S. cerevisiae* przeprowadzono dla 20 µL roztworu DNA po PCR, a dla produktów amplifikacji DNA z *Y. lipolytica* A-101 dla poszczególnych frakcji rozdzielonych w elektroforezie. Ze względu na zbyt małą ilość materiału z pojedynczej elektroforezy materiał do analizy poddano zagęszczeniu, poprzez wytrącanie DNA z powtórzeń PCR, a następnie rozdzielano na żelu o niskiej temperaturze upłynnienia.

Składniki do analizy restrykcyjne: – *Eco* RI – 1 µL (firmy BOEHRINGER MAINHAMER, 10U/ µL); *SuRE/Cut Buffer H* – 2,3 µL (firmy BOEHRINGER MAINHAMER, 10U/ µL); roztwór DNA do restrykcji – 20 µL. Inkubację prowadzono w 37°C przez 2,5 godziny. Produkty trawienia wizualizowano elektroforetycznie.

6.5.7. Oznaczenie sekwencji genu

Seqwencja fragmentu genu SC została oznaczona w Pracowni Sekwencjonowania DNA i Syntezy Oligonukleotydów, Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie. Sekwencjonowanie przeprowadzono w aparacie Genetic Analyzer ABI 310 firmy Perkin-Elmer. Wyniki sekwencjonowania otrzymano w postaci plików komputerowych odczytanych przy pomocy programu Chromas.

6.5.8. Bazy danych i oprogramowanie komputerowe

W badaniach korzystano z następujących baz danych PDB, Swiss Prot, Stanford Genomic Center oraz z dostępnych na ich stronach programów (np. BioEdit, Fasta, Blast).

7. PIŚMIENICTWO

- [1] Abbot A.: 1999a. A post-genomic challenge: learning to read patterns of protein synthesis, *Nature* 402, 715–720.
- [2] Abbot A.: 1999b. Proteomics, transcriptomics: what's in a name? *Nature* 402, 715–717.
- [3] Abdallah B.M., Somoos T., Fernandes A.R., Strauss J., Seiboth B., Sa-Correia I., Kubicek C.P.: 2000. Glucose does not activate the plasma-membrane-bound H⁺ATPase but affects *pmaA* transcript abundance in *Aspergillus nidulans*, *Arch.Microbiol.* 174: 340–345.
- [4] Alberts B., Bray D., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P.: 1999. *Struktura i funkcja białek*. W: *Podstawy biologii komórki. Wprowadzenie do biologii molekularnej*. Przekład pod redakcją Michejda J., Augustyniak J., PWN, Warszawa, 133–181.
- [5] Akiyama S-J., Suzuki T., Sumino Y., Nakao Y., Fukuda H.: 1973. Relationship between aconitase hydratase activity and citric acid productivity in fluoroacetate – sensitive mutant strain of *Candida lipolytica*, *Agric.Biol. Chem.* 37(4), 879–884.
- [6] Ampe F., Lindley N.D.: 1995. Acetate utilization is inhibited by benzoate in *Alcaligenes eutrophus*: evidence for transcriptional control of the expression of *acoE* coding for acetylcoenzym A synthetase, *J. Bacteriol.* 177, 5826–5833.
- [7] Anderson A.J., Williams D.R., Dawes E.A., Ewing D.F.: 1995. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in *Rhodococcus ruber*, *Can. J. Microbiol.* 41 (Suppl.1), 4–13.
- [8] Andrighetto C., Psomas E., Tzanetakis N., Suzzi G., Lombardi A.: 2000. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) PCR for the identification of yeasts isolated from dairy products, *Letters in Applied Microbiology* 30, 5–9.
- [9] Andrade R.P., Casal M.: 2001. Expression of the lactate permease gene JEN 1 from yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Fungal Genetics and Biology.* 32(2), 105–111.
- [10] Arzumanov T.E., Shishkanova N.V., Finogenova T.V.: 2000. Biosynthesis of citric acid by *Yarrowia lipolytica* repeat-batch culture on ethanol, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53, 525–529.
- [11] Atkinson D.E.: 1977. *Cellular energy metabolism and its regulation*. Academic Press. New York, San Francisco, London.
- [12] Banat I.M., Makkar R.S., Cameotra S.S.: 2000. Potential commercial application of microbial surfactants, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53, 495–508

- [13] Barbalace D.S., Chambliss G.H., Brady R.J.:1971. Some differences in pyruvate kinase regulation in selected yeast. *Biochem. Biophys. Research Commun.* 42, 287–292
- [14] Barnett J.A., Payne R.W., Yarrow D.: 1983. *Yeast: characteristics and identification*, Cambridge University Press. Cambridge.
- [15] Barns S.M., Lane D.J., Sogin M.L., Bibeau C., Weisburg W.G.: 1991. Evolutionary Relationships among pathogenic *Candida* species and relatives., *J. Bacteriol.* 173, 2250–2255.
- [16] Bartels P., Jensen P.K.: 1979. Role of AMP in regulation of the citric acid cycle in mitochondria from baker yeast. *Biochim. Biophys. Acta* 582, 246–249.
- [17] Barth G., Gaillardin C.: 1996. *Yarrowia lipolytica*. In: *Nonconventional Yeast Biotechnology*. Wolf K.(ed), Springer-Verlag, Berlin, 313–338.
- [18] Barth G., Gaillardin C.: 1997. Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*, *FEMS Microbiology Review* 19, 219–237.
- [19] Barth G., Weber H.: 1987. Genetic analysis of the gene *ICL1* of the yeast *Yarrowia lipolytica*, *Yeast* 3: 255–262.
- [20] Benetti P H., Kim S I., Cononge M., Chardot T., Meunier J.C.: 1997. Cloning of the gene encoding the catalytic subunit of casein kinase II from yeast *Yarrowia lipolytica*, *Mol. Gen. Genet.* 256, 355–364.
- [21] Behrens U., Hirzel K., Schultze E.: 1977. Enzymatische Untersuchungen zur Citrat-Isocitrat-Akkumulation bei Hefen. *Die Nahrung* 21. 6, 525–533.
- [22] Behrens U., Thiersch A., Weissbrodt E., Stottmeister U.: 1987. Particularities in the Kinetics of growth and citric-acid accumulation by *Saccharomycopsis lipolytica*, *Acta Biotechnol.* 7(2), 179–183.
- [23] Berry D.R., Brown C.: 1987. Physiology of yeast growth. In : *Yeast Biotechnology*. Berry D.R., Russel I., Stewart G.G.(Eds), Allen & Unwin, London.
- [24] Bloch K, Vance D.: 1977. Control mechanisms in the synthesis of saturated fatty acids, *Annual Reviews of Biochemistry* 46, 263–268.
- [25] Brasen C., Schonheit P.: 2001. Mechanisms of acetate formation and acetate activation in halophilic archaea. *Arch.microbiol* 175, 360–368.
- [26] Brown A.J.P. i 21 wsp.: 2001. Transcript analysis of 1003 novel yeast genes using high-throughput northern hybridizations, *EMBOJ*, 20(12), 3177–3186.
- [27] Brown T.W., Titorenko V.I., Rachubiński R.A.: 2000. Mutants of the *Yarrowia lipolytica* PEX23 gene encoding an integral peroxisomal membrane peroxin mislocalize matrix proteins and accumulate vesicles containing peroxisomal matrix and membrane proteins, *Molecular Biology of the Cell* 11, 141–152.
- [28] Busturia A., Lagunas R.: 1986. Catabolite inactivation of the glucose transport system in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Gen. Microbiol.* 132, 379–385.
- [29] Casal M., Cardoso H., Leao C.: 1998. Effects of ethanol and other alkanols on transport of acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae*, *Appl. Environ. Microbiol.* 64(2), 665–668.

- [30] Casal M., Leao C.: 1995. Utilization of short-chain monocarboxylic acids by the yeast *Torulaspora delbrueckii*: specificity of the transport systems and their regulation, *Biochim. Biophys. Acta* 1267, 122–130.
- [31] Casaregola S., Feynerol C., Diez M., Fournier P., Gaillardin C.: 1997. Genomic organisation of the yeast *Yarrowia lipolytica*, *Chromosoma* 106, 380–390.
- [32] Casaregola S., Diez M., Fournier P.: 1999. Characterisation of the genome *Yarrowia lipolytica* yeast. Second *Yarrowia lipolytica* international meeting, 15–18 wrzesień, Peniscola, Hiszpania.
- [33] Chang D-E., Shin S., Rhee J-P., Pan J-G.: 1999. Acetate metabolism in a pta mutant of *Escherichia coli* W3110: importance of maintaining acetyl coenzyme flux for growth and survival, *J. Bacteriol.* 181, 6656–6663.
- [34] Chang C.L., Park T.H., Lee E.Y., Lim Y.T., Son H.C.: 2001. Recurrent self-limited fungemia caused by *Yarrowia lipolytica* in a patient with acute myelogenous leukemia, *J. Clin. Microbiol.* 39(3), 1200–1201.
- [35] Chaure P.T., Connerton I.F.: 1995. Derepression of the glyoxylate cycle in mutants of *Neurospora crassa* accelerated for growth on acetate, *Microbiology* 141, 1315–1320.
- [36] Chen D-C., Beckerich J-M., Gaillardin C.: 1997. One step transformation of the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 48, 232–235.
- [37] Chen C-K., Blaschek H.P.: 1999. Acetate enhances solvent production and prevents degeneration in *Clostridium beijerinckii* BA101, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52, 170–173.
- [38] Chernyavskaya O.G., Shishkanova N.V., Il'chenko A.P., Finogenova T.V.: 2000. Synthesis of α -ketoglutaric acid by *Yarrowia lipolytica* yeast grown on ethanol, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53, 152–158.
- [39] Chohnan S., Furukawa H., Fujio T., Nishihara H., Takamura Y.: 1997. Changes in the size and composition of intracellular pools of nonesterified coenzyme A and coenzyme A thioesters in aerobic and facultatively anaerobic bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 553–560.
- [40] Connaris H., Chaudhuri J.B., Danson M.J., Hough D.W.: 1999. Expression, reactivation, and purification of enzymes from *Haloferax volcanii* in *Escherichia coli*, *Biotechnol. Bioengin.* 64(1), 38–45.
- [41] Connaris H., West S. M., Hough D.W., Danson M.J.: 1998. Cloning and overexpression in *Escherichia coli* of gene encoding citrate synthase from the hyperthermophilic Archaeon *Sulfolobus solfataricus*, *Extremophiles* 2, 61–66.
- [42] Cordeo R.O., Gaillardin C.: 1996. Dominant mutation affecting expression of pH-regulated genes in *Yarrowia lipolytica*, *Mol. Gen. Genet.* 252, 311–319.
- [43] Cress W.D., Seto E.: 2000. Histone deacetylases, transcriptional control, and cancer, *J. Cell. Physiol.* 184(1), 1–16.
- [44] Dahlmann B., Ruppert T., Kuehn L., Merforth S., Kloetzel P-M.: 2000. Different proteasome subtypes in a single tissue exhibit different enzymic properties, *JMB* 303(5), 643–653.

- [45] D'Antonio D., Romano F., Pontieri E., Fioritoni G., Caracciolo C., Bianchini S., Oliosio P., Staniscia T., Sferra R., Boccia S., Vetuschi A., Federico G., Gaudio E., Carruba G.: 2002. Catheter-related candidemia caused by *Candida lipolytica* in a patient receiving allogeneic bone marrow transplantation, *J. Clin. Microbiol.* 40, 1381–1386.
- [46] Deak T.: 2001. Identification of yeasts isolated from poultry meat, *Acta. Biol. Hung.* 52 (2–3), 195–200.
- [47] De Jong-Gubbels P., Vanrolleghem P., Heijnen S., Van Dijken J.P., Pronk J.T.: 1995. Regulation of carbon metabolism in chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae* grown on mixture of glucose and ethanol, *Yeast* 11, 407–418.
- [48] de Koning G.: 1995. Physical properties of bacterial poly [(R)-3-hydroxyalkanoates], *Can. J. Microbiol.* 41 (Suppl. 1), 303–309.
- [49] Dell'Angelica E.C., Ermacacora M.R., Santome J.A.: 1996. Purification and partial characterisation of a fatty acid-binding protein from the yeast, *Yarrowia lipolytica*, *Biochemistry and Molecular Biology International* 39(3), 439–445.
- [50] Dennis R.A., McCammon M.T.: 1999. Acn9 is a novel protein of gluconeogenesis that is located in the mitochondrial intermembrane space, *Eur. J. Biochem.* 261, 236–243.
- [51] Dennis R.A., Rhodey M., McCammon M.T.: 1999. Yeast mutants of glucose metabolism with defects in the co-ordinate regulation of carbon assimilation, *Arch. Biochem. Biophys.* 365, 279–288.
- [52] De Virgilio C., Burckert N., Barth G., Neuhaus J.M., Boller T., Wiemken A.: 1992. Cloning and disruption of a gene required for growth on acetate but not on ethanol: the acetyl-coenzyme A synthetase gene of *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast* 8(12), 1043–1051.
- [53] Dickinson J.R., Roy D.J., Dawes I.W.: 1986. A mutation affecting lipoamide dehydrogenase, pyruvate dehydrogenase and 2-oxoglutarate dehydrogenase activities in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Gen. Genet.* 204, 103–107.
- [54] Diez-Gonzalez F., Russell J.B.: 1997. The ability of *Escherichia coli* O157:H7 to decrease its intracellular pH and resist the toxicity of acetic acid, *Microbiology* 143, 1175–1180.
- [55] Dugelay S., Chauvin M.F., Megnin-Chanet F., Martin G., Lareal M.C., Lhoste J.M., Baverel G.: 1999. Acetate stimulates flux through the tricarboxylic acid cycle in rabbit renal proximal tubules synthesizing glutamine from alanine: a ¹³C NMR study, *Biochem. J.* 342(3), 555–566.
- [56] Dunham I. i 48 wsp.: 1999. The DNA sequence of human chromosome 22, *Nature* 402, 489–495.
- [57] Eberharter A., Sterner D.E., Schieltz D., Hassan A., Yates J.R. 3rd, Berger S.L., Workman X.: 1999. The ADA complex is a distinct histone acetyltransferase complex in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Cell. Biol.* 19(10), 6621–6631.
- [58] Eggeling L., Sahm H.: 1999., L-Glutamate and L-lysine: Traditional products with impetuous developments, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52, 146–153.

- [59] Eitzen G.A., Aitchison J.D., Szilard R.K., Veenhuis M., Nuttley W.M., Rachubinski R.A.: 1995. The *Yarrowia lipolytica* gene PAY2 encodes a 42-kDa peroxisomal integral membrane protein essential for matrix protein import and peroxisome enlargement but not for peroxisome membrane proliferation, *J.Biol.Chem.* 270(3), 1429–1436.
- [60] Eitzen G.A., Titorenko V.I., Smith J.J., Veenhuis M., Szilard R.K., Rachubinski R.A.: 1996. The *Yarrowia lipolytica* gene PAY5 encodes peroxisomal integral membrane protein homologous to the mammalian peroxisome assembly factor PAF-1, *J.Biol. Chem.* 271(34), 20300–20306.
- [61] Endrizzi A., Pagot Y., Le Clainche A., Nicaud J-M, Belin J-M.: 1996. Production of lactones and peroxisomal beta-oxidation in Yeasts, *Critical Reviews in Biotechnology* 16(4), 301–329.
- [62] Esteban P.F., Casaregola S., Vazquez de Aldama C.R., Del Ray F.: 1999. Cloning and characterisation of the EXG1 gene from the yeast *Yarrowia lipolytica*, *Yeast* 15(15), 1631–1644
- [63] Evans C.T., Ratledge C.: 1984. Phosphofructokinase and the regulation of the flux of carbon from glucose to lipid in the oleaginous yeast *Rhodospirium toruloides*, *J. Gen. Microbiol.* 130, 3251–3264.
- [64] Evans C.T., Ratledge C.: 1985. The physiological significance of citric acid in the control of metabolism in lipid-accumulating yeasts, *Biotechnol. Genetic. Engin. Review* 3, 349–375.
- [65] Ferea T.L., Botstein D., Brown P.O., Rosenzweig R.F.: 1999. Systematic changes in gene expression patterns following adaptive evolution in yeast, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 9721–9726.
- [66] Finogenova T.V., Shishkanova N.V., Ermakova I.T., Kataeva I.A.: 1986. Properties of *Candida lipolytica* mutants with the modified glyoxylate cycle and their ability to produce citric acid and isocitric acid. II. Synthesis of citric and isocitric acid by *C. lipolytica* mutants and peculiarities of their enzyme systems, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 23, 378–383.
- [67] Finogenova T.V., Shishkanova N.V., Kataeva I.A.: 1989. Comparative study of *Candida lipolytica* with differing ability to produce citrate, *Mikrobiol.* 58. 3, 387–392.
- [68] Fournier P., Gaillardin C., Persuy M.A., Klootwijk J., van Heerikhuizen H.: 1986. Heterogeneity in the ribosomal family of the yeast *Yarrowia lipolytica*: genomic organization and segregation studies, *Gene* 42, 273–282.
- [69] Fournier P., Guyaneux L., Chasles M., Gaillardin C.: 1991. Scarcity of ars sequences isolated in a morphogenesis mutant of the yeast *Yarrowia lipolytica*, *Yeast* 7, 25–36.
- [70] Franke-Rinker D., Behrens U., Nockel E.: 1983. Enzymatische Untersuchungen zur Citrat-Isocitrat-Akkumulation bei Hefen mit Glucose als C-Quelle, *Z. Allg. Mikrobiol.* 23(2), 75–80

- [71] Frishman D., Hentze M. W.: 1996. Conservation of aconitase residues revealed by multiple sequence analysis Implications for structure/function relationships, *Eur. J. Biochem.* 239, 197–200.
- [72] Furukawa T., Ogino T., Matsuyoshi T.: 1982. Fermentative Production of citric acid from n-paraffins by *Saccharomycopsis lipolytica*, *J. Ferment. Technol.* 60(4), 281–286
- [73] Gadde D.M., McCammon M.T.: 1997. Mutations in the IDH2 gene encoding the catalytic sub-unit of the yeast NAD⁺-dependent isocitrate dehydrogenase can be suppressed by mutations in the CIT1 gene encoding citrate synthase and other genes of oxidative metabolism, *Arch. Biochem. Biophys.* 344, 139–149.
- [74] Galanos C., Luderitz O., Westphal O.: 1969. A new method for the extraction of R lipopolysaccharides, *Eur. J. Biochem.* 9, 245–249.
- [75] Galushko A. S., Schink B.: 2000. Oxidation of acetate through reactions of the citric acid cycle by *Geobacter sulfurreducens* in pure culture and in syntrophic co-culture, *Arch. Microbiol.* 174, 314–321.
- [76] Gamian A., Katzenellenbogen E., Romanowska E., Fernandez J.M.G., Pedersen C., Ulrich J., Defaye J.: 1995. Structure of the *Hafnia alvei* strain PCM 1188 O-specific polysaccharide, *Carbohydrate Research* 277, 245–255.
- [77] Gangloff S.P., Marguet D., Lauquin G.J.: 1990. Molecular cloning of the yeast mitochondrial aconitase gene (ACO1) and evidence of a synergistic regulation of expression by glucose plus glutamate, *Mol. Cell. Biol.* 10, 3551–3561.
- [78] Gellisen G.: 2000. Heterologous protein production in methylotrophic yeasts, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54, 741–750.
- [79] Gimenez M.I., Studdert C.A., Sanchez J.J., De Castro R.E.: 2000. Extracellular protease of *Natrialba magadii*: purification and biochemical characterisation, *Extremophiles* 4, 181–188.
- [80] Glazunova L.M., Finogienova T.V.: 1976. Enzyme activity of citrate, glyoxylate and pentose phosphate cycles during synthesis of citric acids by *Candida lipolytica*, *Mikrobiol.* 45(3), 444–449.
- [81] Glover D.J., McEwen R.K., Thomas C.R.: 1997. pH-regulated expression of the acid and alkaline extracellular proteases of *Yarrowia lipolytica*, *Microbiology* 143, 3045–3054.
- [82] Gregory P.D., Wagner K., Horz W.: 2001. Histone acetylation and chromatin remodeling. *Experimental Cell Research*, 265(2), 1090–2422.
- [83] Hattori M i 61 wsp.: 2000. The DNA sequence of human chromosome 21, *Nature* 405, 311–319.
- [84] Hettema E.H., van Roermund C.W., Distel. B, van den Berg M., Vilela G., Rodrigues-Pousada C., Wanders R.J., Tabak H.F.: 1995. The ABC transporter proteins Pat1 and Pat2 are required for import of long-chain fatty acids into peroxisomes of *Saccharomyces cerevisiae*, *EMBOJ* 15, 3813–3822.
- [85] Heslot H.: 1990. Genetics and genetic engineering of the industrial yeast *Yarrowia lipolytica*, *Adv. Biochem. Engin. Biotechnol.* 43, 43–73.

- [86] Hube B., Stehr F., Bossenz M., Mazur A., Kretschmar M., Schafer W.: 2000. Secreted lipases of *Candida albicans*, cloning, characterisation and expression analysis of a new gene family with at least ten members, *Arch. Microbiol.* 174, 362–374.
- [87] Hurtado C.A., Rachubiński R.A.: 1999. *MHY1* encodes a C₂H₂-Type Zinc Finger Protein that promotes dimorphic transition in the yeast *Yarrowia lipolytica*, *J. Bacteriol.* 181(10), 3051–3057.
- [88] Ismail S.A., Dea T., Abd el-Rahman H., Yassien M.A., Beuchat L.R.: 2001. Effectiveness of immersion treatments with acids, trisodium phosphate, and herb decoctions in reducing populations of *Yarrowia lipolytica* and naturally occurring aerobic microorganisms on raw chicken, *Int. J. Food Microbiol.* 64(1–2), 13–19.
- [89] Jaklitsch W.M., Kubicek C.P., Scrutton M.C.: 1991. Intracellular location of enzymes involved in citrate production by *Aspergillus niger*, *Can. J. Microbiol.* 37, 823–827.
- [90] Jia Y.K., Becam A-M., Herbert C.J.: 1997. The CIT3 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a second mitochondrial isoform of citrate synthase, *Molecular Microbiology* 24, 53–59.
- [91] Jia Y., Rothermel B.A., Butow R.A.: 1996. The bHLH/Z Rtg1p/Rtg3p heterodimer functions in inter-organelle signal transduction in *S. Cerevisiae*, *Yeast Genetics and Molecular Biology*, Madison, Wisconsin.
- [92] Jia Y., Rothermel B., Thornton J., Butow R.A.: 1997. A basic helix-loop-helix-leucine zipper transcription complex in yeast functions in a signaling pathway from mitochondria to the nucleus, *Mol. Cell. Biol.* 17(3), 1110–1117.
- [93] Johnsen U., Selig M., Xavier K.B., Santos H., Schonheit P.: 2001. Different glycolytic pathways for glucose and fructose in halophilic archaeon *Halococcus saccharolyticus*, *Arch. Microbiol.* 175, 52–61.
- [94] Katajeva I.A., Finogenova T.V.: 1987. Activity of enzymes of the main pathways of glucose metabolism in the cells of thiamine-deficient yeast *Candida lipolytica* during keto-acid synthesis, *Biochimija* 52(5), 850–855.
- [95] Kates M.: 1972. *Techniques of lipidology: isolation, analysis and identification of lipids.* (Eds), North-Holland Publishing Company, Amsterdam, London.
- [96] Kautola H., Rymowicz W., Linko Y-Y. Linko P.: 1992. The utilization of beet molasses in citric acid production with yeast, *Sci. Aliments* 12(3), 383–392.
- [97] Kim E.K., Roberts R.S.: 1991. Rate equations for the vigorous stationary phase fermentation of citric acid by *Saccharomycopsis lipolytica*, *Biotechnol. Bioengin.* 37, 985–988.
- [98] Kispal G., Rosenkrantz M., Guarente L., Srere P.A.: 1987. Metabolic changes in *Saccharomyces cerevisiae* strains lacking citrate synthases, *J. Biol. Chem.* 263(23), 11145–11149.
- [99] Ko C.H., Liang H., Gaber R.F.: 1993. Roles of multiple glucose transporters in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Cel. Biol.* 13, 638–648.
- [100] Koizumi S., Yonetani Y., Maruyama A., Teshiba S.: 2000. Production of riboflavin by metabolically engineered *Corynebacterium ammoniagenes*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53, 674–679.

- [101] Kratzer S., Schuller H.J.: 1995. Carbon source-dependent regulation of the acetyl-coenzyme A synthetase-encoding gene ACS1 from *Saccharomyces cerevisiae*, *Gene* 161(1), 75–79.
- [102] Kratzer S., Schuller H.J.: 1997. Transcriptional control of the yeast acetyl-CoA synthetase gene, ACS1, by the positive regulators CAT8 and ADR1 and the pleiotropic repressor UME6, *Mol. Microbiol.* 26, 631–641.
- [103] Krebs H.A., Johnson W.A.: 1937. The role of citric acid in intermediate metabolism in animal tissues, *Enzymologia* 4, 148–156.
- [104] Kreger van Rij N.J.W.: 1984. *The yeast, a taxonomic study*. Elsevier, Amsterdam.
- [105] Krings U., Berger R.C.: 1998. Biotechnological production of flavours and fragrances, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49, 1–8.
- [106] Kubicek C.P., Rohr M.: 1980. Regulation of citrate synthase from the citric acid-accumulating fungus, *Aspergillus niger*, *Biochim. Biophys. Acta* 615 (2) 449–457.
- [107] Kubicek C.P., Rohr M.: 1986. Citrate acid fermentation, *Critical Review in Biotechnol.* 3(4), 331–373.
- [108] Kujau M., Weber H., Barth G.: 1992. Characterisation of mutants of the Yeast *Yarrowia lipolytica* defective in acetyl-coenzyme A synthetase, *Yeast* 8, 193–203.
- [109] Lagunas R.: 1993. Sugar transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews* 104, 229–242.
- [110] Lasko D.R., Zamboni N., Sauer U.: 2000. Bacterial response to acetate challenge: a comparison of tolerance among species. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54(2), 243–247.
- [111] Le Dall M.-T., Nicaud J.-M., Gaillardin C.: 1994. Multiple-copy integration in the yeast *Yarrowia lipolytica*, *Curr. Genet.* 26, 38–44.
- [112] Legisa M., Kidric J.: 1989. Initiation of citric acid accumulation in the early stages of *Aspergillus niger* growth, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 31, 453–457.
- [113] Lewin A.S., Hines V., Small G.M.: 1990. Citrate synthase encoded by the CIT 2 gene of *Saccharomyces cerevisiae* is peroxisomal, *Mol. Cell. Biol.* 10, 1399–1405.
- [114] Lewis D.A., Bisson L.F. 1991. The HXT1 gene product of *Saccharomyces cerevisiae* is a new member of the family of hexose transporters, *Mol. Cell. Biol.* 11(7), 3804–3813.
- [115] Liao X., Butow R.A.: 1993. RTG1 and RTG2: two yeast genes required for a novel path of communication from mitochondria to the nucleus, *Cell* 72 (1), 61–71.
- [116] Liao X., Small W.C., Srere P.A., Butow R.A.: 1991. Intramitochondrial functions regulate nonmitochondrial citrate synthase (CIT2) expression in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Cell. Biol.* 11(1), 38–46.
- [117] Lin R., Cao Z., Zhu T., Zhang Z.: 2000. Secretion in long-chain dicarboxylic acid fermentation, *Bioprocess. Eng.* 22, 391–396.
- [118] Lopez M.C., Nicaud J.-M., Skinner H.B., Vergnolle C., Kader J.C., Bankaitis V., Gaillardin C., A.: 1994. Phosphatidylinositol/phosphatidicholine transfer protein is required for differentiation of the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica* from the yeast to mycelial form, *J. Cell Biol.* 124, 113–127.

- [119] Maddox I.S., Kingston P.: 1983. Use of immobilized cells of the yeast *Saccharomycopsis lipolytica* for the production of citric acid, *Biotechnol. Lett.* 5,795–798.
- [120] Marchal-Carlson L., Celenza J.L., Laurent B.C., Carlson M.: 1990. Mutational analyse of the SNF3 glucose transporter of *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Cell. Biol* 10(3), 1105–1115.
- [121] Marchal R., Metche M., Vandecasteele J.P.: 1980. Intracellular concentration of citric and isocitric acids in cultures of the citric acid-secreting yeast *Saccharomycopsis lipolytica* grown on alkanes, *J. Gen. Microbiol.* 116, 535–538.
- [122] Marchal R., Vandecasteele J.P., Metche M.: 1977. Regulation of the central metabolism in relation to citric acid production in *Saccharomycopsis lipolytica*, *Arch. Microbiol.* 113, 99–104.
- [123] Matsuoka M., Ueda Y., Aiba S.: 1977. Role and control of isocitrate lyase in *Candida lipolytica*, *J. Bacteriol.* 144(2), 692–697.
- [124] Mauersberger S., Schunck W-H., Barth G.: 1995. Alkane non-utilizing in *Yarrowia lipolytica* isolation and first characterization. First *Yarrowia lipolytica* International meeting, 18–21. July, Thiverval-Grinon, France.
- [125] Mayilvahanan D., Annadurai G., Raju V., Chellapandian M., Krishnan MRV., Jayaraman K.: 1996. Citric acid production. part 1: Strategies for reduction in cycle time for targeted yields, *Bioprocess. Eng.* 15,323–326.
- [126] McCammont M.T.: 1996. Mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with defects in acetate metabolism: isolation and characterisation of Acn⁻ mutants, *Genetic* 144(1), 57–69.
- [127] McKay I.A., Maddox I.S., Brooks J.D.: 1994. High specific rates of glucose utilisation under conditions of restricted growth are required for citric acid accumulation by *Yarrowia lipolytica* IMK2, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41, 73–78.
- [128] Merkulov S., Van Assema F., Springer J., Fernandez del Carmen A. Mooibroek H.: 2000. Cloning and characterization of the gene *Yarrowia lipolytica* squalene synthase (SQS1) gene and functional complementation of the *Saccharomyces cerevisiae* erg9 mutation, *Yeast* 16(3), 197–206.
- [129] Merle M., Martin M., Villegier A., Canioni P.: 1996. Mathematical modelling of the citric acid cycle for the analysis of glutamine isotopomers from cerebellar astrocytes incubated with [1-¹³C] glucose, *Eur. J. Biochem.* 239, 742–751.
- [130] Moresi M.: 1994. Effect of glucose concentration on citric acid production by *Yarrowia lipolytica*, *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 60, 387–395.
- [131] Moresi M., Gimarelli D., Gasparrin G., Liuzzo G., Martinelli R.: 1980. Kinetics of citric acid fermentation from n-paraffins by yeasts, *J.Chem.Technol. Biotechnol.* 30, 266–277.
- [132] Morgunov I.G., Sharyshev A.A., Mikulinskaya O.V., Sokolov D.M., Finogenova T.V.: 1994. Isolation, purification and some properties of citrate synthase from citric acid-accumulating yeast *Yarrowia (Candida) lipolytica*, *Biochimia* 58(9), 1320–1329.
- [133] Mueckler M., Holman G.: 1995. Homeostasis without a GUT, *Nature* 377, 100–101.

- [134] Naumova E., Naumov G., Fournier P., Nguyen H-V., Gaillardin C.: 1993. Chromosomal polymorphism of the yeast *Yarrowia lipolytica* and related species: electrophoretic karyotyping and hybridization with cloned genes, *Curr. Genet.* 23, 450–454.
- [135] Nakanishi T., Yamamoto M., Kimura K., Tanaka K.: 1972. Fermentative production of citric acids from n-paraffin by yeasts, *J. Ferm. Technol.* 50(12), 855–867.
- [136] Nicaud J-M., Belin J.M., Lauruffe N.: 1993. Les peroxysomes, un compartiment en pleine expansion. *Regard sur la Biochimie*, 2, 24–30.
- [137] Nicaud J-M., Fabre E., Gaillardin C.: 1989. Expression of invertase activity in *Yarrowia lipolytica* and its use as a selective marker, *Curr. Genet.* 16, 253–260.
- [138] Nuttley W.M., Brade A.M., Eitzen G.A, Veenhuis M., Aitchison J.D., Szilard R., Glover J.R., Rachubinski R.A.: 1994. PAY 4, a gene required for peroxisome assembly in the yeast *Yarrowia lipolytica*, encodes a novel member of a family of putative ATP-ases, *J. Biol. Chem.* 269, 556–566.
- [139] O’Beirne D., Hamer G.: 2000. The use of glucose/acetate mixture by *Escherichia coli* W3110 under aerobic growth conditions, *Bioprocess. Eng.* 23, 375–380.
- [140] O’Hagan D., Parker A.H.: 1998. Enzyme mediated polyester synthesis with the lipase from *Candida rugosa*, *Polymer Bulletin* 41, 519–524.
- [141] Oliver S.: 2000. Guilty-by-association goes global, *Nature* 404, 601–603.
- [142] Pagot Y., Endrizzi A., Nicaud J-M., Belin J-M: 1997. Utilization of an auxotrophic strain of the yeast *Yarrowia lipolytica* to improve γ -decalactone production yields, *Lett. Appl. Microbiol.* 25, 1–4.
- [143] Pazouki M., Felse P.A., Sinha J., Panda T.: 2000. Comparative studies on citric acid production by *Aspergillus niger* and *Candida lipolytica* using molasses and glucose. *Bioprocess Eng.* 22, 353–361.
- [144] Perez-Martin J., Johnson A.D.: 1998. Mutations in chromatin components suppress a defect of Gen5 protein in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Cell. Biol.* 18(2), 1049–1054.
- [145] Perez J.A. Rodriguez J., Ruiz T., Rodriguez L.: 2001. Expression of *Pichia anomala* INV 1 gene in *Saccharomyces cerevisiae* results in two different active forms of hypoglycosylated invertase, *Arch. Microbiol.* 175, 189–197.
- [146] Picataggio S., Rohrer T., Deanda K., Lanning D., Reynolds R., Mielenz J., Eirich L.D.: 1992. Metabolic engineering of *Candida tropicalis* for the production of long-chain dicarboxylic acids, *Biotechnology* 10, 894–898.
- [147] Pijanowski E., Dłużewski M., Dłużewska A., Jarczyk A.: 1996. Utrwalanie żywności przez zakwaszania i metodą chemiczną, w: *Ogólna technologia żywności*, Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa.
- [148] Pitson S.M., Mendz G.L., Srinivasan S., Hazell S.L.: 1999. The tricarboxylic acid cycle of *Helicobacter pylori*, *Eur. J. Biochem.* 260, 258–267.
- [149] Prohl C., Wackwitz B., Vlad D., Unden G.: 1998. Functional citric acid cycle in an *arcA* mutant of *Escherichia coli* during growth with nitrate under anoxic conditions, *Arch. Microbiol.* 170, 1–7.

- [150] Pronk J.T., Steensma Y.H., Van Dijken J.P.: 1996. Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast* 12, 1607–1633.
- [151] Przybyła-Zawislak B., Gadde D.V., Ducharme K., McCammon M.T.: 1999. Genetic and biochemical interaction involving tricarboxylic acid cycle (TCA) function using a collection of mutants defective in all TCA cycle genes, *Genetic* 152, 153–166.
- [152] Rao T.K., Debusk A.G.: 1977. An inducible acetate transport system in *Neurospora crassa* conidia, *Biochim. Biophys. Acta.* 470, 475–483.
- [153] Rane K.D., Sims K.A.: 1993. Production of citric acid by *Candida lipolytica* Y1095: effect of glucose concentration on yield and productivity, *Enzyme Microb. Technol* 15, 646–651.
- [154] Ratledge C.: 1997. Microbial lipids, in *Biotechnology: Products of secondary metabolism*, H. Kleinkauf and H. von Dohren (eds), VCH, Weinheim, 7, 131–197.
- [155] Rickey T., Lewin H.S.: 1986. Extramitochondrial citrate synthase activity in bakers' yeast, *Mol. Cell. Biol.* 3, 488–493.
- [156] Robak M.: 1995, Acetate mutants of *Yarrowia lipolytica*. Materiały Zjazdowe: First *Yarrowia lipolytica* International Meeting., Thiverval-Grignon, Francja, 18–21 lipiec, 27.
- [157] Robak M.: 2000. Syntaza cytrynianowa-zasadniczy enzym metabolizmu każdej komórki, *Biotechnologia*, 2(49), 103–111.
- [158] Robak M., Rymowicz W., Filipkowski P.: 2002. Effect of sodium acetate on citric acid production from glucose by *Yarrowia lipolytica*, *Materiały Zjazdowe: TYLIM 2002*, Drezno, Niemcy, 17–20 lipiec, 124.
- [159] Rodriguez C., Domingez A.: 1984. The growth characteristic of *Saccharomycopsis lipolytica*: morphology and induction of mycelium formation, *Can. J. Microbiol.* 30, 605–612.
- [160] Rodrigues G., Pais C.: 2000. The influence of acetic and other weak carboxylic acids on growth and cellular death of the yeast *Yarrowia lipolytica*, *Food Technol. Biotechnol.* 38(1), 27–32.
- [161] Rosenberg E., Ron E.Z.: 1999. High- and low-molecular-mass microbial surfactants, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52, 154–162.
- [162] Rosenkrantz M., Alam T., Kim K-S., Clarc B.J., Srere P.A., Guarente L.P.: 1986. Mitochondrial and nonmitochondrial citrate synthase in *Saccharomyces cerevisiae* are encoded by distinct homologous genes, *Mol. Cell. Biol.* 6, 4509–4515.
- [163] Ross J., Reid G.A., Dawes I.W.: 1988. The nucleotide sequence of the LPD1 gene encoding lipoamide dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae* : comparison between eukaryotic and prokaryotic sequences for related enzymes and identification of potential upstream control sites, *J. Gen. Microbiol.* 134, 1131–1139.
- [164] Rothermel B.A., Thornton J.L., Butow R.A.: 1997. Rtg3p, a basic helix-loop-helix/leucine zipper protein that functions in mitochondrial-induced changes in gene expression, contains independent activation domains, *J. Biol. Chem.* 272, 19801–19807.

- [165] Ruijter G.J., Panneman H., Xu D., Visser J.: 2000. Properties of *Aspergillus niger* citrate synthase and effects of citA over expression on citric acid production, FEMS Microbiol. Lett. 184(1), 35–40.
- [166] Ruiz-García A.B., Sendra R., Galiana M. Pamblanco M., Perez-Ortín J.E., Tordera V.: 1998. HAT1 and HAT2 proteins are components of a yeast nuclear histone acetyltransferase enzyme specific for free histone H4, J.Biol.Chem. 273(20), 12599–12605.
- [167] Rundlet S., Carmen A.A., Kobayash R., Bavykin S., Turner B.M., Grunstein M.: 1996. HDA1 and RPD3 are members of distinct yeast histone deacetylase complexes that regulate silencing and transcription, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 14503–14508.
- [168] Rupčić J., Marić V.: 1998. Isolation and chemical composition of the ceramide of the *Candida lipolytica* yeast, Chemistry and Physics of Lipids 91, 153–161.
- [169] Rymowicz W.: 1995. Optymalizacja procesu biosyntezy kwasu cytrynowego z glukozy przez szczep *Y. lipolytica* A-101, Zesz. Nauk. AR Wroc.Techol. Żyw. 273, 7–20.
- [170] Rymowicz W.: 1998. Biosynteza kwasu cytrynowego z glukozy przez wolne i immobilizowane komórki drożdży *Yarrowia lipolytica* w systemach ciągłych, Rozpr. Hab. Wyd. AR. Wrocław 1998.
- [171] Rymowicz W., Wojtatowicz M.: 1996. Wykorzystanie sztucznie flokulujących *Yarrowia lipolytica* do biosyntezy kwasu cytrynowego, Biotechnologia 3, 155–165.
- [172] Rymowicz W., Wojtatowicz M.: 1999. Zastosowanie reaktora membranowego do biosyntezy kwasu cytrynowego przez drożdże *Yarrowia lipolytica*, Zeszyt. Nauk. Politechniki Łódzkiej Inżynieria Chemiczna i Procesowa z. 26, Nr 822, 159–164.
- [173] Rymowicz W., Kautola H., Wojtatowicz M., Linko Y.-Y., Linko P.: 1993a. Studies on citric acid production with immobilized *Yarrowia lipolytica* in repeated batch and continuous air-lift bioreactors, Appl. Microbiol. Biotechnol 39, 1–4.
- [174] Rymowicz W., Wojtatowicz M., Robak M., Jurgielewicz W.: 1993b. The use of immobilized *Yarrowia lipolytica* cells in Ca-alginate for citric acid production, Acta Microbiol. Polon. 42(2), 63–170.
- [175] Rymowicz W., Wojtatowicz M., Robak M., Jurgielewicz W.: 1993c. Wpływ natlenienia na dynamikę wzrostu i tworzenia kwasu cytrynowego przez drożdże *Yarrowia lipolytica* A-101-1.22 w hodowlach na melasie, Materiały XXIV Sesji Naukowej Komitetu Technologii i Chemii Żywności PAN, Wrocław, czewiec, Referaty, 302–306.
- [176] Rymowicz W., Wojtatowicz M., Rywińska A., Kita A.: 1996. Ciągła biosynteza kwasu cytrynowego z udziałem mutantów octanowych *Yarrowia lipolytica*, Materiały VI Ogólnopolskiej Konferencji Naukowej, Postępy Inżynierii Bioreaktorowej, Łódź 96, Referat 13, 1–6.
- [177] Rywińska A.: 1998. Biosynteza kwasu cytrynowego przez drożdże *Yarrowia lipolytica* przy deficycie różnych makroskładników pożywki. XXIX Sesja Nauko-

- wa Komitetu Technologii i Chemii Żywności PAN, 21–23 wrzesień, Olsztyn, poster II/97.
- [178] Saayman M., van Vuuren H.J.J., van Zyl W.H., Viljoen-Bloom M.: 2000. Differential uptake of fumarate by *Candida utilis* and *Schizosaccharomyces pombe*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54, 792–798.
- [179] Sanchez A., Ferrer P., Serrana A., Pernas M.A., Valero F., Rua M.L., Casas C., Sola C.: 1999. Characterization of the lipase and esterase multiple forms in an enzyme preparation from a *Candida rugosa* pilot-plant scale fed-batch fermentation, *Enzyme and Microbial Technology* 25, 214–223.
- [180] Schagger H., Pfeiffer K.: 2000. Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria, *EMBO* 19(8), 1777–1783.
- [181] Shimokawa O., Nakayama H.: 2000. Estimation of minimum sterol 14-alpha-demethylation-inhibitory concentration of azoles in *Candida* yeasts using acetate-mediated growth inhibition potential utility in susceptibility testing, *J. Clin. Microbiol.* 38(8), 2893–2896.
- [182] Sinigaglia M., Lanciotti R., Guerzoni M.E.: 1994. Biochemical and physiological characteristics of *Yarrowia lipolytica* strains in relation to isolation source, *Can. J. Microbiol.* 40, 54–59.
- [183] Smaczyńska I., Skoneczny M.: 1993. Funkcja i biogeneza peroksysomów w drożdżach *Saccharomyces cerevisiae*, *Postępy Biochemii* 39(3), 165–173.
- [184] Small W.C., Brodeur R.D., Sandor A., Fedorova N., Li G., Butow R.A., Srere P.A.: 1995. Enzymic and metabolic studies on retrograde regulation mutants of yeast. *Biochemistry* 34, 5569–5576.
- [185] Sousa M.J., Miranda L., Corte-Real M., Leao C.: 1996. Transport of acetic acid in *Zygosaccharomyces bailii*: effects of ethanol and their implications on the resistance of the yeast to acidic environments, *Appl. Environ. Microbiol.*, 62(9), 3152–3157.
- [186] Srere P.A.: 1965. The molecular physiology of citrate, *Nature* 205, 766–770.
- [187] Srere P.A.: 1972. The citrate enzymes: their structures, mechanisms and biological functions. *Current Topic in Cellular Regulation* 5, 229–283.
- [188] Stahmann K-P., Revuelta J.L., Seulberger H.: 2000. Three biotechnical processes using *Ashbya gossypii*, *Candida famata* or *Bacillus subtilis* compete with chemical riboflavin production, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53, 509–516.
- [189] Stryer L.: 1999. *Biochemia. Przekład zbiorowy pod redakcją Michejda J., Augustyniak J., Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.*
- [190] Szczodrak J.: 1981., Biosynthesis of citric acid in relation to the activity of selected enzymes of Krebs cycle in *Aspergillus niger* mycelium, *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 13, 107–112.
- [191] Szutowicz A., Bielarczyk H., Kisielewski Y., Jankowska A., Madziar B., Tomaszewicz M.: 1998a. Effects of aluminium and calcium on acetylCoA metabolism in rat brain mitochondria, *J. Neurochem.* 71, 24447–2453.

- [192] Szutowicz A., Tomaszewicz M., Bielarczyk H., Jankowska A.: 1998b. Putative significance of shifts in acetyl-CoA compartmentalization in nerve terminals for disturbance of cholinergic transmission in brain, *Dev. Neurosci.* 20, 485–492.
- [193] Szutowicz A., Jankowska A., Blusztajn J.K., Tomaszewska M.: 1999. Acetylcholine and acetyl-CoA metabolism in differentiating SN56 septal cell line, *J. Neurosci. Research* 0, 1–6.
- [194] Taylor R.L., Shively J.E., Conrad H.E.: 1976. Stoichiometric reduction of uronic acid carboxyl groups in polysaccharides, *Methods Carbohydr. Chem.* 7, 149–151.
- [195] Titorenko V.I., Eitzen G.A., Rachubinski R.A.: 1996. Mutation in the PAY5 gene of the *Yarrowia lipolytica* cause the accumulation of multiple subpopulation of peroxisomes *J. Biol. Chem.* 271(34), 20307–20314.
- [196] Todd R.B., Kelly J.M., Davis M.A., Hynes M.J.: 1997. Molecular characterisation of mutants of the acetate regulatory gene *facB* of *Aspergillus nidulans*, *Fungal Genetic and Biology* 22, 92–102.
- [197] Torres N.V.: 1996. Modelling and optimization of citric acid production by *Aspergillus niger*, *Advances in Citric Acid Technology-International Conference*. LikoSpol Ltd, Bratislava, Słowacja, 1–14.
- [198] Treton B., Heslot H.: 1978. Etude de quelques proprietes de l'aconitase de la levure *Saccharomyces lipolytica*, *Agri. Biol. Chem.* 42(6), 1201–1206.
- [199] Turner P.C., McLennan A.G., Bates A.D., White M.R.H.: 2000. *Biologia molekularna, Krótkie wykłady. Przekład zbiorowy pod redakcją Augustyniak J. i Michejda J.*, PWN, Warszawa.
- [200] Tzschoppe K., Augstein A., Bauer R., Kohlwein S.D., Barth G.: 1999. *trans*-dominant mutations in the GPR1 gene cause high sensitivity to acetic acid and ethanol in the yeast *Yarrowia lipolytica*, *Yeast* 15, 1645–1656.
- [201] van den Berg M.A., Steensma H.Y.: 1995. ACS2, a *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding acetyl-coenzyme A synthetase, essential for growth on glucose, *Eur. J. Biochem.* 231(3), 704–713.
- [202] Van Urk H., Postma E., Scheffers W.A., van Dijken J.P.: 1989. Glucose transport in Crabtree-positive nad Crabtree-negative yeasts, *J. Gen. Microbiol.* 135, 2399–2406.
- [203] Velot C., Haviernik P., Lauquin G.J.: 1996. The *Saccharomyces cerevisiae* RTG2 gene is a regulator of aconitase expression under catabolite repression conditions, *genetics* 144(3), 893–903.
- [204] Wakil S.J., Stoops J.K., Joshi V.C.: 1983. Fatty acids synthesis and its regulation, *Annual Review of Biochem* 52: 537–579.
- [205] Wang H., le Clainche A., Le Dall M.T., Wache Y., Pagot Y., Belin J.M., Gaillardin C., Nicaud J.-M.: 1998. Cloning and characterisation of the peroxisomal acyl-CoA oxidase ACO3 gene from the alkane-utilizing Yeast *Yarrowia lipolytica*, *Yeast* 14, 1373–1386.
- [206] Wendisch V.F., de Graaf A.A., Sahm H., Eikmanns B.J.: 2000. Quantitative determination of metabolic fluxes during cointegration of two carbon sources:

- comparative analyses with *Corynebacterium glutamicum* during growth on acetate and/or glucose, J. Bacteriol. 182(11),3088–3096.
- [207] Wilson J.J., Khachatourians G.G., Ingledew W.M.: 1982. Schwanniomycetes: SCP and ethanol from starch, Biotechnol. Letters 4(5): 333–338.
- [208] Wittschieben B.O., Otero D., de Bizemont T., Fellows J., Erdjument-Bromage H., Li Y., Allis C.D., Tempst P., Svejstrup J.Q.: 1999. A novel histone acetyl transferase is an integral subunit of elongation polymerase II holoenzyme, Mol. Cell. 4(1), 123–128.
- [209] Wojtatowicz M.: 1991. Studia nad biosyntezą kwasów cytrynowych przez szczep *Yarrowia lipolytica* A-101 i jego mutanty, Rozpr. Hab. Wyd. AR. Wrocław 1991.
- [210] Wojtatowicz M., Rymowicz W.: 1990. Kinetyka okresowej fermentacji cytrynowej na glukozie i hydrolu glukozowym przy udziale drożdży *Yarrowia lipolytica*, Przem. Ferment. Owoc. Warzyw. 5, 26–28.
- [211] Wojtatowicz M., Rymowicz W.: 1991. Biosynteza kwasu cytrynowego na melasie przez szczep *Y. lipolytica* A-101 i jego mutanty, Przem. Ferment. Owoc. Warzyw. 11, 18–21.
- [212] Wojtatowicz M., Rymowicz W.: 1994. Produktywność i wydajność drożdżowej fermentacji cytrynowej w różnych systemach hodowlanych, Biotechnologia 2(29), 123–129.
- [213] Wojtatowicz M., Rywińska A.: 1999. Utrwalanie drożdży *Yarrowia lipolytica* przez suszenie, Zeszyty Naukowe AR Wrocław , Technologia Żywności 364, 111–124.
- [214] Wojtatowicz M., Marchin G.L., Erickson L.E.: 1993. Attempts to improve strain A-101 of *Yarrowia lipolytica* for citric acid production from n-paraffins, Process. Biochem. 28, 453–460.
- [215] Wojtatowicz M., Rymowicz W., Robak M.: 1995. Stability of the mutant *Yarrowia lipolytica* A-101.-1.31 during continuous production of citric acid, 7 European Congress on Biotechnology, Nice, 19–23. February, poster MAP 204.
- [216] Wojtatowicz M., Rymowicz W., Robak M., Żarowska B., Nicaud J-M.: 1997. Kinetics of cell growth and citric acid production by *Yarrowia lipolytica* Suc⁺ transformants in sucrose media, Pol. J. Food Nutri. Sci. 6/47, 49–54.
- [217] Wojtatowicz M., Chrzanowska J., Juszczyk P., Skiba A., Gdula A.: 2001. Identification and biochemical characteristic of yeast microflora of Rokpol cheese, International. J. Food Microbiol. 69, 135–140.
- [218] Wright G., Terada K., Yano M., Sergeev I., Mori M.: 2001. Oxidative stress inhibits the mitochondrial import of preproteins and leads to their degradation, Exp. Cell Res. 263, 107–117.
- [219] Yamagami S., Iida T., Ohta A., Takagi M.: 2001. Isolation and characterization of acetoacetyl CoA thiolase gene essential for n-decane assimilation in yeast *Yarrowia lipolytica*, Biochem. Biophys. Research Commun. 282, 832–838.
- [220] Yoshida M., Hashimoto K.: 1986. Assessment of the pathogenicity of yeasts used in the production of single cell protein, Agric. Biol. Chem. 50(8), 2117–2118.

- [221] Young W. T., Wadeson A., Glover J. D., Quincey V. R.: 1996. The extracellular acid protease gene of *Yarrowia lipolytica*: sequence and pH-regulated transcription, *Microbiology*, 142, 21913–2921.
- [222] Zitomer R.S., Lowry C.V.: 1992. Regulation of gene expression by oxygen in *Saccharomyces cerevisiae*, *Microbiological Reviews* 56(1), 1–11.
- [223] Żarowska B.: 1999. Produkcja kwasu cytrynowego na melasie przez drożdże *Yarrowia lipolytica*, Praca doktorska. AR Wrocław.

STUDY OF ACETATE UTILISATION AND CITRATE SECRETION BY YARROWIA LIPOLYTICA YEAST

S u m m a r y

The studies of the metabolism of *Yarrowia lipolytica* yeast have emerged as a consequence of researches conducted for over ten years at the Department of Biotechnology and Food Microbiology. It mainly concerned the application of that species for citric acid (CA) production. From technological point of view, strains A-101.1.31 and A-101.1.31.K1 are the most adequate because of their ability to accumulate CA almost without isocitric acid. They are stable during storage process as well. Both strains are acetate mutants (*acu*⁻), not able to utilise acetate as a sole carbon source. Those strains, as well as the parent strain (A-101) and another mutant (A-101.1.22), were not an object of any previous studies of the activity of the key enzymes of CA biosynthesis and genes encoding those enzymes. No experiments were conducted with those strains on another metabolic aspect, namely the acetate utilisation by yeast cells.

The purpose of that work was to elucidate the defect leading to the expression of acetate minus phenotype of *Y. lipolytica* mutants: A-101.1.31 and A-01.1. 31.K1, and to examine the metabolic interaction allowing to control and influence the CA biosynthesis by those yeast species.

At the beginning of that work, utilisation of acetate by all tested strains was observed. The utilisation of the mentioned carbon source by strains A-101.1.31 and A-1010.1.31.K1 (*acu*⁻ mutants) was possible because of the addition of glucose to acetate containing growth medium. A minimal dose of glucose needed for the induction of acetate utilisation by *acu*⁻ mutants was 0,01%. Ethanol as the supplementary carbon source had not only any induction effect on acetate consumption but also stopped the yeast growth. The clear differences in the specific growth rate in the medium with glucose, with glucose and acetate or with acetate shown for the parent strain A-101 and for the revertant A-101.1.22 confirm the metabolic and also genetic difference between those two strains.

In subsequent studies, it was shown that the genetic defect leading to the phenotype of *acu*⁻ mutants was connected with non-utilisation of alkanes, oils, short chain carboxylic acids, L-arabinose, betaine, glycine, serine, leucine, lysine and, in case of the strain A-101.1.31.K1, with mesoinositol. The defect did not concern : the acetate uptake,

enzymes of gluconeogenesis, citrate synthase (SC), isocitrate dehydrogenase (ICDH), aconitase (HA), and isocitrate lyase (ICL). Hence, the genetic damage is situated outside the genes encoding the enzymes cited above.

Results concerning the ICDH activity demonstrated that the highest degree of purity of CA biosynthesis by *acu* mutants was connected with low activity of that enzyme. ICDH activity was influenced by the oxygenation level of culture medium: at low oxygenation two times lower activity of ICDH was observed. Low ICDH activity was not only the cause of the lower isocitrate concentration, but also of the metabolic changes determining the beginning of CA secretion by the cell at the first stage of process.

Concerning the activity of key enzyme of CA biosynthesis: citrate synthase (SC), it was shown its activity depends on the concentration of ammonium ion present in the medium. The process of continuous biosynthesis of CA should be supplemented by approximately 1mmol/L/h of ammonium. However, that enrichment does not assure a good and long term stability of acid secretion activity of yeast cells. One of the reason of observed productivity diminution could be connected with the change of the metabolic contribution of isoenzymes of SC occurring in the mitochondria and peroxysomes. In *Y. lipolytica* cells five fragments of genes were amplified with primers flanking the active site of SC encoded by CIT1, the gene encoding one of three SC isoenzymes present in *Saccharomyces cerevisiae*.

Further results analysis, concerning CA concentration inside and outside the cell, demonstrated an active secretion of that acid, what directly lead to its overproduction. This active secretion determines the ability of the strains to a total uptake of glucose from the medium. The strain ATCC 32 338A, which is not able to accumulate CA, was not capable to use more than 50% of glucose contained in the culture medium. A linear correlation between the amount of secreted CA and the amount of utilised glucose by 1 g of yeast biomass was shown. However, the example of biosynthesis of CA by the mutant A-101.1.31 showed that the dynamics of glucose consumption and the specific citric acid production rate changed during the long-time process.

The presence of two glucose transport systems was observed in the cells of studied strains of *Y. lipolytica*. One with high affinity ($K_m = 0,64-1,9\text{mM}$) and the second one with low affinity ($K_M \approx 20\text{mM}$). The affinity of cells for acetate utilisation was low as well ($K_m = 152-158\text{mM}$).

Summarising, the results obtained in the studies concerning both mutually connected and reciprocally supplementing problems formulated as the aim of that work, have led to a multilateral characterisation of four strains of *Y. lipolytica*: A-101, A-101.1.31, A-101.1.31.K1 and A-101.1.22.