

ACTA SCIENTIARUM POLONORUM

Czasopismo naukowe założone w 2001 roku przez polskie uczelnie rolnicze

Biotechnologia

Biotechnologia

Biotechnology

11 (3) 2012



Bydgoszcz Kraków Lublin Olsztyn
Poznań Siedlce Szczecin Warszawa Wrocław

Executive Board of *Acta Scientiarum Polonorum*

Jerzy Sobota (Wrocław) – chairman

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

Scientific Board of *Biotechnology*

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

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

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

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

Print edition is an original (reference) edition

Cover design
Daniel Morzyński

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

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

Printed: 150 + 16 copies Publishing sheets: 2,7 Printing sheets: 2,5

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

Szanowni Państwo,

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

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

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

Zespół Redakcyjny

Dear Readers,

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

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

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

Editorial Team

DOBÓR PODŁOŻA INOKULACYJNEGO DO PRODUKCJI KETOKWASÓW PRZEZ DROŻDŻE *YARROWIA LIPOLYTICA*

Krzysztof Cybulski, Ludwika Tomaszewska, Anita Rywińska

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Streszczenie. Celem pracy była ocena wpływu podłoża inokulacyjnego (YNB lub podłoże mineralne) oraz rodzaju wprowadzonego namoku kukurydzianego (syпки lub płynny) na biosyntezę kwasu pirogronowego i α -ketoglutazarowego z glicerolu odpadowego przez drożdże *Yarrowia lipolytica* A-10. Hodowle okresowe były prowadzone do wyczerpania substratu (100 g·dm⁻³ glicerolu) i trwały 68–118 godz. Drożdże produkowały od 30,4 do 35,8 g·dm⁻³ kwasu pirogronowego oraz od 14,4 do 17,9 g·dm⁻³ α -ketoglutazarowego. Przy zastosowaniu YNB jako podłoża inokulacyjnego uzyskano wyższe wartości szybkości objętościowej produkcji obu kwasów. Wydajność produkcji kwasu α -ketoglutazarowego była zbliżona we wszystkich wariantach hodowlanych, natomiast najwyższą wartość tego parametru dla kwasu pirogronowego, 0,35 g·g⁻¹, uzyskano przy wykorzystaniu mineralnego podłoża inokulacyjnego i namoku płynnego. Najwyższą procentową zawartość białka, około 38%, oznaczono w biomacie drożdży otrzymano, używając podłoża mineralnego.

Słowa kluczowe: *Yarrowia lipolytica*, kwas pirogronowy, kwas α -ketoglutazarowy, glicerol odpadowy

WSTĘP

Ketokwasy takie jak kwas α -ketoglutazarowy (KGA) i pirogronowy (PA) pełnią istotną rolę w metabolizmie komórkowym. Pięciowęglowy KGA powstaje jako produkt pośredni cyklu Krebsa w reakcji dekarboksylacji izocytrynianu z udziałem dehydrogenazy izocytrynianowej lub na drodze deaminacji kwasu glutaminowego. Jego rola w komórkach mikroorganizmów polega na swoistym łączeniu metabolizmu aminokwasów, węglowodanów, węglowodorów i tłuszczów [Sauer i in. 2008]. Natomiast PA, inaczej kwas 2-oksopropanowy, jest końcowym produktem glikolizy. Powstaje pośrednio z aldehydu 3-fosfoglicerynowego, który jest produktem metabolizmu węglowodanów i lipidów.

© Copyright by Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Adres do korespondencji – Corresponding author: Krzysztof Cybulski, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Wydział Nauk o Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, ul. Chełmońskiego 37/41, 51-630 Wrocław, adres e-mail: cybulski.krzysiek@gmail.com

Pirogronian jest również wykorzystywany w organizmie do syntezy glukozy jako podstawowy substrat w glukoneogenezie.

Oprócz pełnienia ważnych funkcji metabolicznych wymienione ketokwasy mają szerokie zastosowanie w przemyśle. KGA wykorzystuje się jako substrat w syntezie chemicznej związków heterocyklicznych, składnik suplementów diety oraz dodatek do odżywek dla kulturystów [Chernyavskaya i in. 2000]. KGA w połączeniu z 5-hydroksymetylenofurfurałem jest doskonałym antyoksydantem pozwalającym obniżyć tzw. stres oksydacyjny spowodowany wolnymi rodnikami [Moser i in. 2007]. Barrett i Yousaf [2008] opisali termiczną kondensację KGA z trójpodstawionymi cząsteczkami glicerolu: 1,2,4-butantriolem lub 1,2,6-heksantriolem. Powstający poli(triol- α -ketoglutaranu) okazał się elastomerem o zróżnicowanych właściwościach chemicznych oraz mechanicznych i może znaleźć zastosowanie w biomedycynie, inżynierii tkankowej, a także – ze względu na biogedradawalność – może być wykorzystywany jako nośnik leków. Żywiec chitozanowe modyfikowane KGA mogą służyć jako sorbent usprawniający usuwanie barwników oraz jonów Cu^{2+} z roztworów wodnych [Zhou i in. 2009, Gong i in. 2010]. PA jest używany przede wszystkim jako substrat przy syntezie chemicznej farmaceutyków, między innymi L-tyrozyny, 4-dihydroksyfenylo-L-alaniny, kwasu N-acetylo-D-neuraminowego i (R)-fenyloacetylokarabinolu [Yamada i in. 1972, Gunawan i in. 2007, Lee i in. 2007, Lütke-Eversloh i in. 2007]. Kwas ten znajduje również zastosowanie jako suplement diety wspomagający kontrolę masy ciała, antyoksydant i nutraceutyk w leczeniu cukrzycy typu drugiego [Stanko i in. 1992, McCarty 2000, Koh-Banerjee i in. 2005, Wang i in. 2007]. Roufs [1996] dowiódł, że stosowanie pirogronianu wapnia napędza metabolizm tłuszczów w ludzkim organizmie, przyspieszając tym samym proces odchudzania. PA jest również cennym substratem do produkcji polimerów, kosmetyków, dodatków do żywności, a w niedługim czasie być może przypraw nadających kwaśny smak potrawom [Li i in. 2001].

Obecnie KGA i PA produkowane są przemysłowo na drodze syntezy chemicznej. Proces charakteryzuje się niską wydajnością, wysokimi kosztami odczynników, dużym nakładem energii i powstawaniem niebezpiecznych dla środowiska naturalnego odpadów. Wykorzystanie w tym celu mikroorganizmów może spowodować, że proces produkcji tych kwasów okaże się dużo bardziej atrakcyjny, szczególnie w aspekcie zagospodarowania odpadowych produktów z przemysłu jako źródła węgla i energii w procesie. Liczne pozycje literaturowe donoszą o możliwości wykorzystania bakterii i drożdży w biosyntezie kwasu α -ketoglutazarowego i pirogronowego z glukozy lub węglowodorów [Li i in. 2001, Xu i in. 2008, Otto i in. 2011]. Najczęściej wymienianym producentem ketokwasów wśród drożdży jest *Torulopsis glabrata*. Warto jednak zaznaczyć, że gatunek ten jest auksotrofem aż czterech witamin, a proces nadprodukcji KGA i PA możliwy jest tylko w złożonej, dobrze zbilansowanej pożywce. Skromniejsze wymagania pokarmowe prezentują drożdże z gatunku *Y. lipolytica* będące auksotrofem wyłącznie w stosunku do tiaminy (witamina B₁) i posiadające zdolność do utylizacji szerokiego spektrum substratów [Coelho i in. 2010]. Dodatkowo, drożdże te odporne są na wysokie stężenie glukozy, glicerolu, NaCl oraz składników mineralnych i pierwiastków śladowych w środowisku, zwłaszcza manganu i żelaza, co jest ważne przy stosowaniu podłoży naturalnych.

Pierwsze wzmianki o zastosowaniu drożdży *Y. lipolytica* do produkcji KGA pojawiły się w roku 1969, kiedy Tsugawa i in. opracowali proces biosyntezy KGA, używając jako źródła węgla 8% n-parafin. Zastosowany szczep – *Candida lipolytica* AJ5004 (w 1980 r.

przemianowany na *Y. lipolytica* AJ5004) pozwalał na otrzymanie 46 g·dm⁻³ KGA w czasie 72 godz. Na początku lat 70. badano także zdolność do biosyntezy KGA z alkanów [Finogenova i in. 2005]. Uzyskano 108,7 g·dm⁻³ tego kwasu z wydajnością 1,2 g·g⁻¹. Do badania biosyntezy KGA i PA przez drożdże *Y. lipolytica* powrócono w na przełomie XX i XXI w. Otrzymano m.in. 49 g·dm⁻³ KGA z etanolu [Chernyavskaya i in. 2000], 39,2 g·dm⁻³ KGA z glicerolu [Zhou i in. 2010] oraz 61,3 g·dm⁻³ PA z glicerolu [Morgunov i in. 2004].

Celem pracy jest ocena wpływu stosowanego podłoża inokulacyjnego oraz postaci wprowadzonej do podłoża tiaminy na wydajność i efektywność produkcji PA i KGA z odpadowego glicerolu przy udziale drożdży *Y. lipolytica* A-10.

MATERIAŁ I METODY

Mikroorganizm. W badaniach zastosowano dziki (naturalny) szczep drożdży *Y. lipolytica* A-10 pochodzący z kolekcji własnej Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Szczep przechowywano na skosach z podłożem YM w temperaturze 4°C.

Podłoża. Zastosowano dwa podłoża inokulacyjne: na bazie gotowego podłoża YNB (Yeast Nitrogen Base) [Sigma-Aldrich 2012] oraz podłoże zawierające sole mineralne. Skład podłoża inokulacyjnego **YNB** obejmował (g·dm⁻³): glicerol kosmetyczny – 50; YNB – 0,67; woda destylowana do 1 litra. Podłoże inokulacyjne **mineralne** miało skład (g·dm⁻³): glicerol kosmetyczny – 50; (NH₄)₂SO₄ – 5; KH₂PO₄ – 1,0; MgSO₄·(7H₂O) – 0,7; NaCl – 0,5; Ca(NO₃)₂·(4H₂O) – 0,4; K₂HPO₄ – 0,1; chlorowodorek tiaminy – 0,5 µg·dm⁻³; woda destylowana do 1 litra. W skład podłoża produkcyjnego wchodziły (g·dm⁻³): glicerol odpadowy – 100; (NH₄)₂SO₄ – 10; KH₂PO₄ – 2; MgSO₄·(7H₂O) – 1,4; NaCl – 1,0; Ca(NO₃)₂·(4H₂O) – 0,8; jako źródło tiaminy zastosowano namok kukurydziany w formie sypkiej lub płynnej (Sigma-Aldrich) – 0,02; woda wodociągowa do 1 litra. Podłoża sterylizowano w 121°C przez 20 minut.

Surowiec. Do badań używano oczyszczonego glicerolu odpadowego pochodzącego z produkcji biodiesla (rafineria Trzebinia – Grupa Lotos) zawierającego 76% (v/w) glicerolu i 4% (v/w) NaCl. W badaniach używano 131,5 g glicerolu odpadowego jako ekwiwalent 100 g czystego glicerolu.

Warunki hodowli. Hodowle inokulacyjne prowadzono w 250 cm³ kolbach Erlenmayera zawierających 100 cm³ odpowiedniego podłoża. Namnażanie biomasy prowadzono przez 72 godziny w temperaturze 30°C na wstrząsarce typu CERTOMAT IS (Sartorius Stedim Biotech GmbH) przy 140 rpm. Do zaszczepienia podłoża produkcyjnego używano 200 cm³ medium inokulacyjnego. Biosynteza ketokwasów prowadzona była w 5-litrowym bioreaktorze Biostat B+ (Sartorius, Niemcy) przy objętości roboczej 2 dm³, napowietrzaniu 0,6 vvm, w temperaturze 30°C. Szybkość mieszania wynosiła 800 rpm, a odczyn podłoża w trakcie procesu utrzymywano automatycznie na poziomie pH = 3,5 poprzez dodatek 40% NaOH.

Metody analityczne. Biomase oznaczano metodą wagową – separowano na filtrze membranowym Millipore o porowatości 0,45 µm, przemywano wodą destylowaną i dosuszano do stałej masy w temperaturze 105°C. Stężenie białka w biomacie określano metodą biuretową [Stewart 1975]. Stężenie glicerolu, kwasu pirogronowego i α-ketoglutarowego

oznaczano metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) na kolumnie HyperRez XP carbohydrate H⁺ (Dionex, UltiMate 3000 Series) podłączonej do dwóch detektorów: UV ($\lambda = 210$ nm) i IR w temperaturze 65°C. Analiza prowadzona była przy szybkości przepływu fazy ciekłej (25 mM kwas trifluoroctowy; TFA) wynoszącej 0,6 cm³·min⁻¹.

SPIS UŻYTYCH SYMBOLI

PA – kwas pirogronowy, pyruvic acid

KGA – kwas α -ketoglutarynowy, α -ketoglutaric acid

Q_{KGA} – objętościowa szybkość produkcji kwasu α -ketoglutarynowego – volumetric α -ketoglutaric acid production rate (g·dm⁻³h⁻¹)

Q_{PA} – objętościowa szybkość produkcji kwasu pirogronowego – volumetric pyruvic acid production rate (g·dm⁻³h⁻¹)

Y_{KGA} – wydajność całkowita produkcji kwasu α -ketoglutarynowego – total yield of α -ketoglutaric acid (g·g⁻¹)

Y_{PA} – wydajność całkowita produkcji kwasu pirogronowego – total yield of pyruvic acid (g·g⁻¹)

WYNIKI I OMÓWIENIE

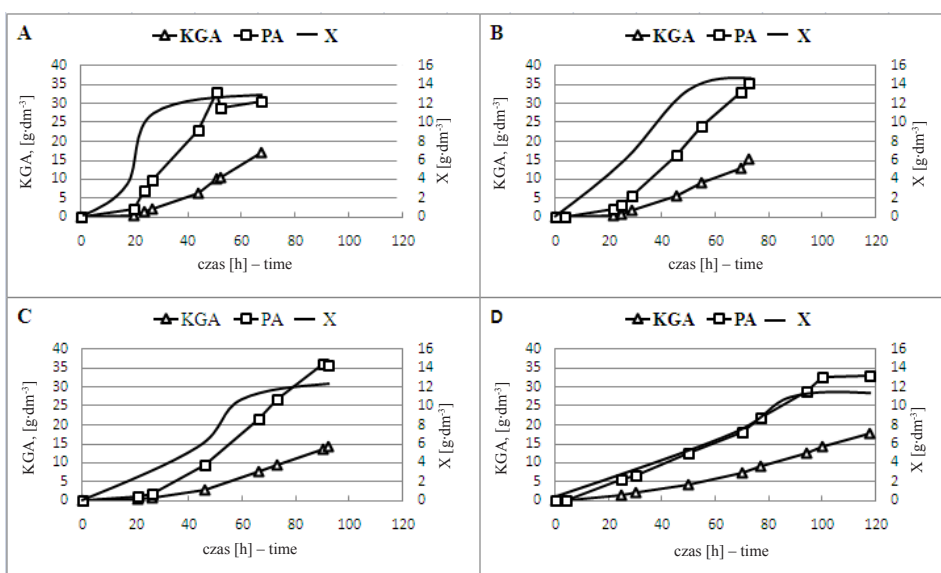
Nadprodukcja KGA i PA przez drożdże *Y. lipolytica* jest możliwa w warunkach limitacji wzrostu stężeniem tiaminy, przy nadmiarze źródła węgla i azotu. Tiamina jest kofaktorem kompleksu dehydrogenazy pirogronianowej oraz dehydrogenazy α -ketoglutarynowej enzymów, które odpowiadają za dalsze przemiany PA i KGA w komórce. Jako źródło tiaminy w niniejszej pracy zastosowano namok kukurydziany w formie płynnej oraz sypkiej. Przeprowadzono cztery hodowle okresowe w podłożu zawierającym 100 g·dm⁻³ glicerolu, różniące się postacią wprowadzonego namoku kukurydzianego oraz zastosowanym podłożem inokulacyjnym (YNB oraz podłoże mineralne) (tab. 1).

Tabela 1. Symbol hodowli, rodzaj zastosowanego podłoża inokulacyjnego i namoku kukurydzianego

Table 1. Symbol of culture, type of seed culture medium and corn steep used

| Symbol hodowli Batch symbol | Podłoże inokulacyjne Seed culture medium | Namok kukurydziany Corn steep |
|--------------------------------|---|----------------------------------|
| A | YNB | płynny liquor |
| B | YNB | sypki powder |
| C | mineralne mineral | płynny liquor |
| D | mineralne mineral | sypki powder |

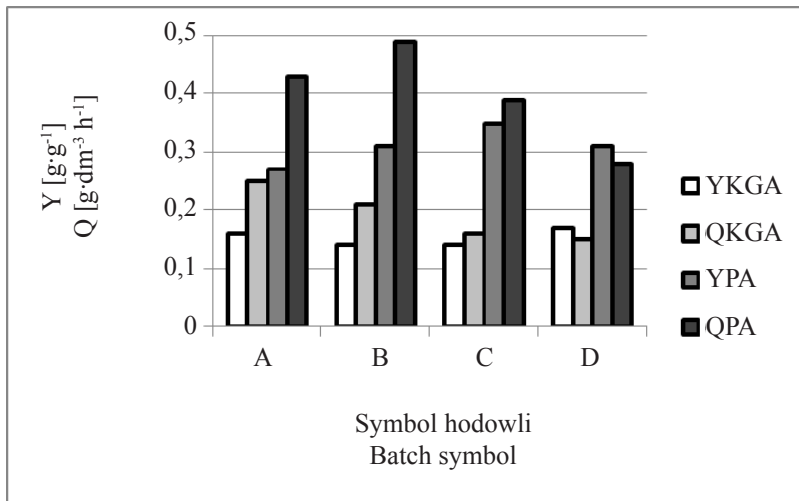
Hodowle prowadzono do całkowitego wyczerpania źródła węgla. Przy zastosowaniu podłoża inokulacyjnego z YNB całkowite wyczerpanie glicerolu w pożywce nastąpiło w 68.–73. godz., natomiast dla podłoża mineralnego czas ten wynosił 92–118 godz. (rys. 1). Warto zauważyć, że krótszy czas utylizacji substratu (68 i 92 godz.) był atrybutem hodowli zawierających w składzie namok kukurydziany w formie płynnej. Hodowle inokulowane komórkami wyrosłymi w podłożu YNB charakteryzowały się również wyższym stężeniem biomasy w fazie stacjonarnej – 13 i 14,2 g·dm⁻³ (A i B) w porównaniu z pozostałymi, w których stężenie komórek drożdży wynosiło odpowiednio 12,1 i 11,5 g·dm⁻³ (C i D) (rys. 1). Wyższe stężenie biomasy oraz krótszy czas hodowli A i B może wynikać z obecności w podłożu YNB wielu niezbędnych dla komórek drożdży substancji odżywczych i wzrostowych, podczas gdy w skład podłoża mineralnego wchodzi jedynie sole mineralne. Zbliżone końcowe stężenie biomasy, 11,73 g·dm⁻³, uzyskali Zhou i in. [2010] podczas biosyntezy KGA przez szczep drożdży *Y. lipolytica* WSH-Z06 w podłożu również zawierającym 100 g·dm⁻³ glicerolu, jednak proces trwał znacznie dłużej, bo aż 144 godz.



Rys. 1. Produkcja biomasy [X], kwasu α -ketoglutarycznego [KGA] i kwasu pirogronowego [PA] z glicerolu przez *Y. lipolytica* A-10 w hodowli okresowej z zastosowaniem podłoża inokulacyjnego YNB (wykres A, B) i mineralnego (wykres C, D). Jako źródła tiaminy użyto namoku kukurydzianego płynnego (wykres A, C) lub namoku kukurydzianego sypkiego (wykres B, D)

Fig. 1. Biomass [X], α -ketoglutaric acid [KGA] and pyruvic acid [PA] production from glycerol during batch culture of *Y. lipolytica* A-10 using YNB (chart A, B) and mineral (chart C, D) seed culture medium. As a source of thiamine a liquid corn steep liquor (chart A, C) or a powder of corn steep (chart B, D) was used

Produkcja PA i KGA przebiegała najwydajniej w hodowlach inokulowanych komórkami wyrosłymi w podłożu mineralnym. Najwyższe stężenie PA, $35,8 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$, oznaczono w 92. godz. hodowli z namokiem płynnym (hodowla C), natomiast najwięcej KGA, $17,9 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$, w hodowli D z namokiem sypkim w 118. godz. (rys. 1). Wydajność produkcji PA wynosiła $0,35 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$, zaś KGA $0,17 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$. Jednak w tych procesach ze względu na długi czas hodowli nie uzyskano zadowalających wartości szybkości objętościowej produkcji wymienionych kwasów (Q_{PA} , Q_{KGA}). Najwyższą wartość Q_{PA} , $0,49 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$, uzyskano w hodowli B, z kolei najwyższą wartość tego parametru dla KGA, $0,25 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$, w hodowli A (rys. 2).



Rys. 2. Wydajność i szybkość objętościowa produkcji kwasu pirogronowego i α -ketoglutazarowego z glicerolu odpadowego przez szczep *Y. lipolytica* A-10

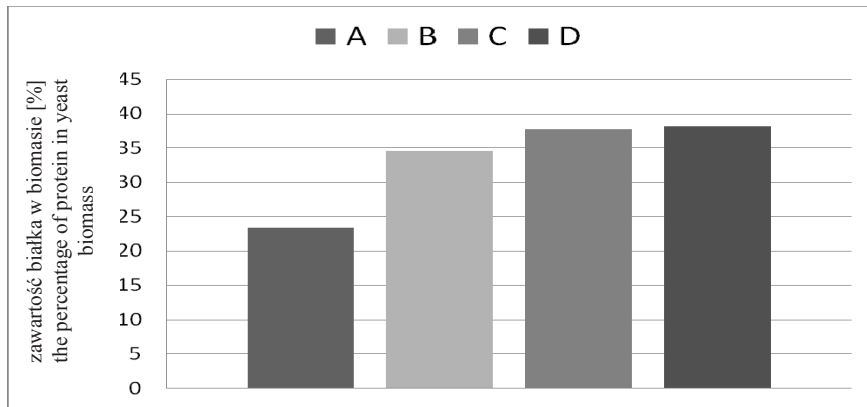
Fig. 2. Yield and volumetric production rate of PA and KGA by *Y. lipolytica* A-10 strain from crude glycerol

Drożdże *Y. lipolytica* są naturalnymi auktotrofami tiaminy, jak podają dane literaturowe, stężenie tej witaminy niezbędne do ich prawidłowego wzrostu wynosi $200 \mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$, podczas gdy biosynteza ketokwasów jest możliwa w obecności ilości tej witaminy nieprzekraczającej kilku mikrogramów w litrze [Chernyavskaya i in. 2000]. W niniejszej pracy w hodowlach A i B zastosowano podłoże inokulacyjne sporządzone na bazie gotowego podłoża YNB, które zawiera niezbędne mikroelementy i witaminy, w tym tiaminę. Wprowadzona do podłoża objętość inokulum (200 cm^3) generowała w podłożu produkcyjnym stężenie tiaminy na poziomie $4 \mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$, co w konsekwencji mogło być przyczyną niższych, w porównaniu z hodowlami C i D (z mineralnym podłożem inokulacyjnym), stężeń uzyskanych ketokwasów, tym bardziej, że podłoże produkcyjne dodatkowo wzbogacono w namok kukurydziany jako dodatkowe źródło tiaminy. Substancja ta używana jest zwykle w procesach biotechnologicznych jako źródło azotu, zawiera liczne aminokwasy, ale również mikroelementy oraz niektóre witaminy. Według danych literaturowych stężenie tiaminy w namoku kukurydzianym zawiera się w przedziale od $0,09$ do $0,3 \text{ mg}$ w 100 g namoku [Corn Refiners Association Inc. 1975, Zabriske i in. 1982]. W niniejszych badaniach namok dodawano jednak w niewielkim stężeniu, $0,02 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$, co oznacza, że dodatkowa ilość wprowadzo-

nej tiaminy nie przekraczała $0,06 \mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$. Całkowite stężenie tiaminy w hodowlach A i B wynosiło więc około $4,06 \mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$. Jest prawdopodobne, że zastosowanie mniejszej ilości inokulum (5%) lub bardziej rozcieńczonego podłoża YNB pozwoli na uzyskanie wyższych stężeń badanych kwasów. Mineralne podłoże inokulacyjne zawierało zaledwie $0,5 \mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ tej witaminy (hodowle C i D), co oznacza, że po wprowadzeniu 200 cm^3 inokulum do podłoża produkcyjnego ($1,8 \text{ dm}^3$) stężenie tiaminy wynosiło $0,05 \mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$. Po uwzględnieniu ilości tiaminy w namoku kukurydzianym całkowite stężenie tej witaminy w bioreaktorze było zdecydowanie niższe, około $0,11 \mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$, niż w hodowlach A i B. Jak wspomniano, niższe stężenie tiaminy w hodowlach C i D skutkowało wyższymi stężeniami PA i KGA. Uzyskane wyniki szybkości objętościowej produkcji KGA i PA jednoznacznie wskazują, że zdecydowanie korzystniejsze jest stosowanie płynnego namoku kukurydzianego (hodowle A i C) niż namoku w formie sypkiej (B i D). Użycie namoku sypkiego skutkowało dłuższą fazą wzrostu drożdży, a tym samym wydłużeniem czasu hodowli, co widoczne jest na rysunku 1. Może być to spowodowane faktem, iż podczas suszenia rozpyłowego namoku część witamin ulega rozkładowi i w konsekwencji jest ich mniej, ponadto namok płynny lepiej się rozpuszcza i w efekcie składniki w nim zawarte są łatwiej przyswajalne przez komórki drożdży.

Synteza i wydzielanie obu kwasów do środowiska, w przypadku glukozy jako źródła węgla, rozpoczynają się równolegle i trwają aż do wyczerpania źródła węgla, a kwasy produkowane są w proporcji 75–80% PA do 20–25% KGA [Finogenova i in. 2005]. Jak wynika z prezentowanych w niniejszej pracy wyników, w przypadku glicerolu i zastosowanych warunków hodowlanych stosunek ten nieznacznie się różni na korzyść KGA, którego udział w puli produkowanych kwasów wynosi od 30 do 36% (dane nieprezentowane). Optymalizacja warunków hodowlanych w kierunku nadprodukcji KGA z glicerolu przez *Y. lipolytica* WSH-Z06, przeprowadzona przez Zhou i in. [2010], pozwoliła na uzyskanie w optymalnych warunkach $39,2 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ KGA, podczas gdy stężenie PA wynosiło $16,84 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$. Warto zauważyć, że są to wyniki pochodzące z hodowli wstrząsarkowych, natomiast podczas biosyntezy prowadzonej w okresowej hodowli bioreaktorowej stężenie KGA wynosiło $35 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$, autorzy nie podali ilości PA. Znaczącą poprawę proporcji KGA do PA wymienieni wyżej autorzy otrzymali w wyniku nadekspresji genu kodującego karboksylazę pirogronianową ScPYC1 z *Saccharomyces cerevisiae* i RoPYC2 z *Rhizopus oryzae* w komórkach szczepu WSH-Z06 [Yin i in. 2012]. Podobny efekt został uzyskany wskutek regulacji metabolizmu acetylo-CoA poprzez ekspresję genu ACS1, kodującego syntetazę acetylo-CoA z *S. cerevisiae* oraz genu ACL, kodującego ATP-zależną wiązkę cytrynianową z *Mus musculus* w komórkach ww. szczepu *Y. lipolytica* [Zhou i in. 2012].

Biomasa drożdży z gatunku *Y. lipolytica* jest dopuszczona do obrotu w UE przez Europejską Federację Producentów Pasz, a o jej przydatności decyduje ilość białka komórkowego. Według normy PN-81/A-79006 procentowa zawartość białka w biomacie powinna wynosić od 40 do 52%. W pozostałej, po odwirowaniu podłoża, biomacie oznaczono stężenie białka metodą biuretową. Procentowe stężenie białka rzędu 37,7 i 38,1% zanotowano dla biomasy z hodowli C i D. Najniższą zawartość procentową białka miała biomasa z hodowli A i wynosiła ona 23,3% (rys. 3). Te stosunkowo wysokie stężenia białka wynikają z zastosowania dużej ilości azotu w pożywce – źródłem tego pierwiastka było $10 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Nieco niższą zawartość białka w biomacie drożdży *Y. lipolytica* wyprodukowanej z odpadowych tłuszczów uzyskali Musiał, Rymowicz i Kita [2004]. Ilość protein w biomacie *Y. lipolytica* A-101 wahała się w granicach 26–31%.



Rys. 3. Procentowa zawartość białka w biomacie drożdży *Y. lipolytica* A-10 po hodowli okresowej z wykorzystaniem podłoża inokulacyjnego YNB (A, B) lub mineralnego (C, D). Źródło tiaminy stanowił namok kukurydziany w formie płynnej (A, C) lub sypkiej (B, D)

Fig. 3. The percentage of protein in the *Y. lipolytica* A-10 biomass after a batch fermentation using YNB (A, B) or mineral (C, D) seed culture medium. The source of thiamine was liquid corn steep liquor (A, C) or powder of corn steep (B, D)

WNIOSKI

Uzyskane wyniki jednoznacznie wskazują, że rodzaj zastosowanego podłoża inokulacyjnego odgrywa istotną rolę w procesie biosyntezy KP i KGA. Podłoże YNB pozwala na skrócenie czasu hodowli nawet o 50,5 godz. w porównaniu z podłożem mineralnym, natomiast wprowadza zbyt duże ilości tiaminy do wydajnej produkcji ketokwasów. Podłoże mineralne z kolei, kosztem wydłużenia procesu, umożliwia uzyskanie zadowalających stężeń badanych kwasów oraz dodatkowo bogatej w białko biomasy. Na przebieg procesu wpływ miało także zastosowanie namoku kukurydzianego w dwóch formach. Użycie płynnego namoku kukurydzianego skutkowało wyższą szybkością objętościową produkcji KP i KGA. Pomimo że wartości wydajności produkcji KP i KGA nie są wysokie, uzyskane wyniki świadczą o przydatności szczepu *Y. lipolytica* A-10 jako potencjalnego producenta KP i KGA. Niezbędne są jednak dalsze badania zmierzające do poprawy parametrów ich produkcji, tym bardziej że wykorzystanie taniego i odnawialnego źródła węgla w procesie, czyli gliceryny odpadowej, może znacznie obniżyć koszty produkcji tych kwasów.

PIŚMIENNICTWO

- Barrett D.G., Yousaf M.N., 2008. Poly(triol α -ketoglutarate) as biodegradable, chemoselective, and mechanically tunable elastomers. *Macromolecules*, 41, 6347–6352.
- 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.

- Coelho M.A.Z., Amaral P.F.F., Belo I., 2010. *Yarrowia lipolytica*: an industrial workhorse. Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology, vol. 2, 930–944.
- Corn Refineries Associacion Inc., 1975. Properties and uses of feed products from corn wet-milling operations, Washington DC
- Finogenova T.V., Morgunov I.G., Kamzolova S.V., Chernyavskaya O.G., 2005. Organic acid production by the yeast *Yarrowia lipolytica*: a review of prospects. Appl. Biochem. Microbiol., vol. 41, 418–425.
- Gong R., Li N., Cai W, Liu Y., Jiang J., 2010. α -Ketoglutaric acid-modified chitosan resin as sorbent for enhancing methylene blue removal from aqueous solutions. Int. J. Environ. Heal. R., 4(1), 27–32.
- Gunawan C., Satianegara G., Chen A. K., Breuer M., Hauer B., Rogers P. L., Rosche B., 2007. Yeast pyruvate decarboxylases: variation in biocatalytic characteristics for (R)-phenylacetylcarbinol production. FEMS Yeast Res., 7, 33–39.
- Koh-Banerjee P.K., Ferreira M.P., Greenwood M., Bowden R.G., Cowan P.N., Almada A.L., Kreider R.B., 2005. Effects of calcium pyruvate supplementation during training on body composition, exercise capacity, and metabolic responses to exercise. Nutrition, 21, 312–319.
- Lee Y.C., Chien H.C., Hsu W.H., 2007. Production of N-acetyl-D-neuraminic acid by recombinant whole cells expressing *Anabaena* sp. CH1 N-acetyl-D-glucosamine 2-epimerase and *Escherichia coli* N-acetyl-D-neuraminic acid lyase. J. Biotechnol., 129, 453–460.
- Li Y., Chen J., Lun S.-Y., 2001. Biotechnological production of pyruvic acid. Appl. Microbiol. Biotechnol., 57, 451–459.
- Lütke-Eversloh T., Santos C.N., Stephanopoulos G., 2007. Perspectives of biotechnological production of L-tyrosine and its applications. Appl. Microbiol. Biotechnol., 77, 751–762
- McCarty M. F., 2000. Toward a wholly nutritional therapy for type 2 diabetes. Med. Hypotheses, 54, 483–487.
- Morgunov I., Kamzolova V., Perevoznikova O., Shishkanova N., Finogenova T., 2003. Pyruvic acid production by a thiamine auxotroph of *Yarrowia lipolytica*. Process Biochem., 39, 1469–1474.
- Moser P.M., Greilberger J., Maier A., Juan H., Bücherl-Harrer C., Kager E., 2007. Verwendung von α -Ketoglutarinsäure und 5-Hydroxy-methylfurfural zur Reduktion von oxidativem Stress. C. Y. L. P. GmbH. Patent EP1842536 A1.
- Musiał I., Rymowicz W., Kita A., 2004. Produkcja biomasy drożdży *Yarrowia lipolytica* z tłuszczów odpadowych po smażeniu produktów przekąskowych. ACTA Scient. Polon. Biotechnol., 3 (1–2), 75–83.
- Otto C., Yovkova V., Barth G., 2011. Overproduction and secretion of α -ketoglutaric acid by microorganisms. Appl. Microbiol. Biotechnol., 92, 689–695.
- PN-81/A-79006, Drożdże paszowe suszone.
- Roufs J.B., 1996. Pyruvate: does it amp endurance and burn more fat? Muscle Fitness, 57, 195–197.
- Sauer M., Porro D., Mattanovich D., Branduardi P., 2008. Microbial production of organic acids: expanding the markets. Trends Biotechnol., 26, 100–108.
- Sigma-Aldrich Product Information [online]. Sigma-Aldrich 2012, dostępny w Internecie: http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/y0626pis.Par.0001.File.tmp/y0626pis.pdf
- Stanko R.T., Tietze D.L., Arch J.E., 1992. Body composition, energy utilization, and nitrogen metabolism with a 4.25-MJ/d lowenergy diet supplemented with pyruvate. Am. J. Clin. Nutr., 56, 630–635.
- Stewart K., 1975. Methods in cell biology, Ed. Prescott D.M., New York, 12(8), 112–118.

- Tsugawa R., Nakase T., Kobayash T., Yamashita K., Okumura S., 1969. Fermentation of n-paraffins by yeast. III. α -ketoglutarate productivity of various yeast. *Agr. Biol. Chem.*, 33, 929–941.
- Wang X., Perez E., Liu R., Yan L.J., Mallet R.T., Yang S. H., 2007. Pyruvate protects mitochondria from oxidative stress in human neuroblastoma SK-N-SH cells. *Brain Res.*, 1132, 1–9.
- Xu, P., Qiu, J., Gao, C., Ma, C., 2008. Biotechnological routes to pyruvate production. *J. Biosci. Bioeng.*, vol. 1(3), 169–175.
- Yamada H., Kumagai H., Kashima N., Torii H., Enei H., Okumura S., 1972. Synthesis of L-tyrosine from pyruvate, ammonia and phenol by crystalline tyrosine phenol lyase. *Biochem. Biophys. Res. Co.*, 46, 370–374.
- Yin X., Madzak C., Du G., Zhou J., Chen J., 2012. Enhanced alpha-ketoglutaric acid production in *Yarrowia lipolytica* WSH-Z06 by regulation of the pyruvate carboxylation pathway. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, DOI: 10.1007/s00253-012-4192-z.
- Zabriskie D.W., Armiger W.B., Phillips D.H., Albano P.A., 1982. Traders guide to fermentation media formulation. Traders Protein.
- Zhou Y-T., Niea H-L., Branford-White C., Hea Z-Y., Zhua L-M., 2009. Removal of Cu^{2+} from aqueous solution by chitosan-coated magnetic nanoparticles modified with α -ketoglutaric acid. *J. Colloid Interf. Sci.*, 330, 29–37.
- Zhou J., Zhou H., Du G., Liu L., Chen J., 2010. Screening of a thiamine-auxotrophic yeast for α -ketoglutaric acid production. *Lett. Appl. Microbiol.*, 51, 264–271.
- Zhou J., Yin X., Madzak C., Du G., Chen J., 2012. Enhanced α -ketoglutarate production in *Yarrowia lipolytica* WSH-Z06 by alteration of the acetyl-CoA metabolism. *J. Biotechnol.*, 16, 257–264.

EVALUATION OF SEED CULTURE MEDIUM TO KETOACIDS PRODUCTION BY *YARROWIA LIPOLYTICA* YEAST

Abstract. The aim of the present study was to compare the influence of the seed culture medium (YNB or mineral) and the sort of corn steep (liquor or powder) on the biosynthesis of pyruvic and α -ketoglutaric acids from crude glycerol by *Yarrowia lipolytica* A-10 strain. Batch cultures were carried out until the substrate exhaustion ($100 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ of glycerol) and lasted 68–118 h. Yeast produced from 30.4 to $35.8 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ of pyruvic acid and from 14.4 to $17.9 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ of α -ketoglutaric acid. Higher values of volumetric production rate of both acids were achieved when YNB was used as a seed culture medium. The yield of ketoglutaric acid production was similar in all culture variants. However, for pyruvic acid the highest value of this parameter ($0,35 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$) was obtained when mineral medium and corn steep liquor were used. The highest percentage of protein, about 38%, was determined in yeast biomass derived after the culture with mineral seed culture medium.

Key words: *Yarrowia lipolytica*, pyruvic acid, α -ketoglutaric acid, crude glycerol

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 30.09.2012

Do cytowania – For citation: Cybulski K., Tomaszewska L., Rywińska A., 2012. Dobór podłoża inokulacyjnego do produkcji ketokwasów przez drożdże *Yarrowia lipolytica*. *Acta Sci. Pol. Biotechnol.*, 11 (3), 5–14.

MICROBIOLOGICAL CONVERSION OF PURE AND CRUDE GLYCEROL TO 1,3-PROPANEDIOL

Dorota Orczyk, Daria Szymanowska-Powałowska, Katarzyna Leja
Poznań University of Life Sciences

Abstract. 1,3-propanediol (1,3-PD) is the important product used in chemical industry. Microbiological synthesis of 1,3-PD from crude glycerol is a good solution, both from an economic and environmental point of view. The aim of this work was to investigate the effect of raw material (pure and crude glycerol) on the efficiency of the synthesis of 1,3-PD by the bacteria *Clostridium butyricum* DSP1 and *Clostridium butyricum* DO14 isolated from the samples taken from natural environment. Two strains of *C. butyricum* were simultaneously investigated. The obtained results showed that the concentration of 1,3-PD was slightly lower in the case of crude glycerol than in pure glycerol, for both strains. Moreover, waste glycerol was not completely utilized.

Key words: 1,3-PD, *Clostridium* spp., pure glycerol, crude glycerol

INTRODUCTION

The observed increase of biodiesel production involves a serious problem of disposal of by-product, which is a crude glycerol. One of the possibilities of further use of the crude glycerol is its use as a carbon source in the culture medium for microorganisms of industrial potential. A good example is the microbiological conversion of glycerol to 1,3-PD [Hao et al. 2008, Amaral et al. 2009, Leja et al. 2011a]. 1,3-PD, also known as trimethylene glycol, 1,3-dihydroxypropane, propylene glycol and propane-1,3-diol, is an alcohol which consists of two hydroxyl groups with the molecular formula $C_3H_8O_2$ [Amaral et al. 2009]. It is a valuable chemical intermediate used in the production of polymers, lubricants, cosmetics, medicines, and as an intermediate compound in the synthesis of heterocyclic compounds [Liu et al. 2007, Zhang et al. 2007, Kubiak et al. 2012]. The rapid development of biodiesel production leads to the formation large amounts of waste glycerol. Depending on the type of raw material and production technology, the by-product varies in its composi-

© Copyright by Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Corresponding author – Adres do korespondencji – Dorota Orczyk, Department of Biotechnology and Food Microbiology, Poznań University of Life Sciences, Wojska Polskiego 48, 60-627 Poznań, e-mail: dorota.orczyk@up.poznan.pl; darszy@up.poznan.pl; katileja@up.poznan.pl

tion. The crude glycerol besides glycerol can include various impurities [Chatzifragkou, Papanikolaou 2012]. The crude glycerol is a mixture of glycerol, alcohol, inorganic salts, free fatty acids, non-reacted mono-, di- and triacylglycerols, methyl esters, variety of other non-glycerol organic materials, and water [Pagliaro, Rossi 2010]. The pharmaceutical and cosmetic industries use only purified glycerol. The above mentioned industries require the crude glycerol to be refined, which means higher costs. An interesting alternative to the standard and commonly used methods of treatment and the use of glycerol is the bioconversion of glycerol to 1,3-PD. The significant advantage of this process is not only the use of untreated waste product, but also a low temperature of microbial synthesis, high selectivity and no toxic by-products [Kośmider et al. 2011].

The glycerol can be metabolized to 1,3-PD by means of microorganisms such as *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus welchia*, *Lactobacillus* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp., and *Clostridium* spp. [Liu et al. 2007, Leja et al. 2011b]. Unfortunately, most of 1,3-PD producers are pathogenic, which limited it in terms of industrial use. Therefore, non-pathogenic bacteria of the species *C. butyricum* seem attractive microorganisms which may be used in the microbial conversion of glycerol to 1,3-PD. Literature increasingly shows information about the synthesis of this diol from crude glycerol, because it is an important element of prospective industrial applications [Chatzifragkou, Papanikolaou 2012, Metsoviti et al. 2012a, Venkataramanan et al. 2012, Wilkens et al. 2012].

The aim of this work was to investigate the effect of raw material (pure and waste glycerol) on the efficiency of the synthesis of 1,3-PD by the bacteria *C. butyricum* DSP1 and *C. butyricum* DO14 isolated from the samples taken from natural environment.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Microorganisms

Bacteria of the species *C. butyricum* DSP1 and *C. butyricum* DO14 came from the collection of the Department of Biotechnology and Food Microbiology, University of Life Sciences in Poznań, Poland.

Raw material

The raw material was pure, anhydrous glycerol (POCH S.A.). In addition, a crude glycerol A (pharmaceutical II quality) and crude glycerol B (technical) were used. The characteristic of crude glycerol A and B is shown in Table 1.

Table 1. The characteristic of crude glycerol A and B
Tabela 1. Skład odpadowego glicerolu A i B

| Component Składniki | Concentration [%] – Stężenie | |
|--------------------------------|------------------------------|-------------------------|
| | Glycerol A – Glicerol A | Glycerol B – Glicerol B |
| Glycerol – Glicerol | 96,5 | 83,0 |
| Methanol – Metanol | 0,01 | 0,02 |
| M.O.N.G.* | 3,0 | 4,0 |
| Ash as NaCl – Popiół jako NaCl | 0,7 | 8,0 |
| Water – Woda | 1,0 | 8,0 |
| pH | 6,6 | 6,0 |

* M.O.N.G. – matter organic non-glycerin – związki organiczne z wyłączeniem glicerolu

Culture medium

Pre-cultures for glycerol utilization experiments were grown in Reinforced Clostridial Medium – RCM (BIOCORP Poland Sp.). Production medium was prepared as described by Himmi et al. [1999]. Compositions of the production medium is showed in Table 2.

Table 2. The compositions of fermentation medium [Himmi et al. 1999]

Tabela 2. Skład pożywki produkcyjnej [Himmi i in. 1999]

| Component – Składniki | Concentration [g/dm ³] – Stężenie |
|--|---|
| K ₂ HPO ₄ *3H ₂ O | 3,4 |
| KH ₂ PO ₄ | 1,3 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 2,0 |
| MgSO ₄ *7H ₂ O | 0,2 |
| CaCl ₂ | 0,02 |
| FeSO ₄ *7H ₂ O | 0,05 |
| Yeast extract – Ekstrakt drożdżowy | 2,0 |

Culture medium was supplemented with a pure or waste glycerol at the concentrations of 70 g/dm³. In addition, a mixture of the minerals was used in the form of the solution SL₇ [Papanikolaou et al. 2000], at amount 2 cm³/dm³ and indicator of pH – 0.1% bromocresol purple (2 cm³/dm³). The initial pH of culture medium was 7.05.

Culture media were sterilized at 121°C for 20 minutes.

Fermentation parameters

The inoculum was grown in the RCM medium. Precultivation was carried out in Hungate tube (10 ml). Precultured bacteria were inoculated to the fermentation medium containing either pure or crude glycerol. The pH (7.0) was controlled manually in certain time intervals (every 10 hours) using 20% NaOH and the pH indicator – 0.1% bromocresol purple. The fermentations were carried in Hungate tube (10 ml) in the culture chamber for anaerobes (Whitley MG500 by Scientific) at the temperature of 32°C. Samples were taken every 10 hours.

Analytical Methods

In order to obtain supernatants cultures of analyzed strains were centrifuged for 10 min at 10000 x g. The cell free supernatants was collected and used for estimation of 1,3-PD production and other by-products (butyric acid, acetic acid, formic acid, lactic acid, succinic acid, ethanol) production via high liquid performance chromatography (HPLC) technique. In the experiments Hewlett Packard system consisted of autosampler, pump, oven and refractive index detector was carried out. Analysis were performed isocratically at flow rate 0.6 ml/min. at 65°C, on column Aminex HPX-87H 300 mm x 7.8 mm (BIO-RAD), with 0.25 mM H₂SO₄ as a mobile phase. Standards were applied to identify peaks in chromatograms, and peak areas were used to determine the concentration (ChemStation, Agilent).

RESULTS AND DISCUSSION

Synthesis of 1,3-PD is one of the promising ways of biotechnological conversion of crude glycerol [Zeng, Sabra 2011, Posada et al. 2012]. The results presented in Table 3 showed that the efficient synthesis of 1,3-PD both from pure and crude glycerol was observed.

Table 3. The final products and the parameters of microbial synthesis of 1,3-PD from pure and crude glycerol

Tabela 3. Produkty końcowe i parametry mikrobiologicznej syntezy 1,3-propanodiolu z czystego i odpadowego glicerolu

| Raw material Surowiec | Pure glycerol Czysty glicerol | | Crude glycerol A Glicerol odpadowy A | | Crude glycerol B Glicerol odpadowy B | |
|--|----------------------------------|------------|---|------------|---|------------|
| | <i>C. butyricum</i> | | | | | |
| Strain Nazwa szczepu | DSP1 | DO14 | DSP1 | DO14 | DSP1 | DO14 |
| 1,3-PD [g/dm ³] | 36.2±1.22 | 34.63±1.32 | 31.07±1.07 | 26.23±1.02 | 21.89±0.92 | 23.72±1.01 |
| Butyric acid [g/dm ³] Kwas masłowy | 7.51±0.51 | 6.88±0.47 | 4.81±0.21 | 6.35±0.42 | 3.14±0.16 | 6.61±0.36 |
| Acetic acid [g/dm ³] Kwas octowy | 4.03±0.22 | 3.36±0.16 | 2.71±0.11 | 3.05±0.19 | 1.81±0.08 | 2.11±0.09 |
| Formic acid [g/dm ³] Kwas mrówkowy | 0.93±0.06 | 0.85±0.09 | 0.51±0.05 | 0.73±0.11 | 0.31±0.03 | 0.88±0.10 |
| Lactic acid [g/dm ³] Kwas mlekowy | 3.34±0.12 | 0.52±0.11 | 2.66±0.31 | 0.08±0.02 | 1.56±0.11 | 0.14±0.03 |
| Succinic acid [g/dm ³] Kwas bursztynowy | 0.31±0.01 | 0.20±0.03 | 0.19±0.02 | 0.96±0.11 | 0.13±0.01 | 0.43±0.06 |
| Ethanol [g/dm ³] Etanol | 1.87±0.09 | 1.15±0.04 | 0.76±0.02 | 1.97±0.08 | 0.55±0.03 | 3.02±0.09 |
| Total time of fermentation [h] Czas całkowity fermentacji | 92 | 72 | 79 | 72 | 71 | 72 |
| Utilization of glycerol [%] Wykorzystanie glicerolu | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 99.66 | 89.0 | 99.71 |
| Yield [mol _{1,3-PD} /mol _{glycerol}] Wydajność | 0.66 | 0.63 | 0.56 | 0.47 | 0.42 | 0.42 |

Both *C. butyricum* DSP1 and *C. butyricum* DO14 allowed to obtain high concentrations of 1,3-PD as well as the utilization of glycerol at nearly of 90–100%. The highest concentration of 1,3-PD 36.2 g/dm³ and 34.6 g/dm³ was achieved with pure glycerol for *C. butyricum* DSP1 and *C. butyricum* DO14, respectively. Lower values obtained for crude glycerol B, can be explained by higher content of impurities as compared to the crude glycerol A. In *Clostridium* strains two products are formed in addition to 1,3-PD. They are acetic and butyric acids. Butyric acid is formed after condensation of two molecules of acetyl-CoA in a reaction chain that involves two NADH-oxidizing steps and the generation of ATP. Kusharyoto et al. [2011], who investigated the utilization of both, pure and crude glycerol for the microbial conversion of glycerol to 1,3-PD used *C. butyricum* p50b1, and obtained 81% utilization of both materials. 1,3-PD concentration for pure and crude glycerol was equal to 33.9 and to 31.7 g/dm³, respectively. Wilkens et al. [2012] during fed-batch fermentation, in 1 dm³ scale, with *C. butyricum* AKR102a strain obtained for pure and crude glycerol 93.7 and 76.2 g/dm³ 1,3-PD, respectively. Metsoviti et al. [2012 b]

during fed-batch fermentation, using the strain of *Citrobacter freundii* FMCC-B 294 with pure and crude glycerol they achieved 68.1 and 66.3 g/dm³ of 1,3-PD, respectively. Venkataraman et al. [2012] used *C. pasteurianum* ATCC 6013 strain, and received a slightly lower concentration of 1,3-PD for crude glycerol as a substrate in comparison with the results obtained for pure glycerol.

Chatzifragkou et al. [2011] with the strain of *C. butyricum* VPI 1718, showed no differences in the 1,3-PD concentrations obtained with crude or pure glycerol 11.1 and 11.5 g/dm³, respectively. Jun et al. [2010] with bacterial strain *Klebsiella pneumoniae* DSM 4799 achieved a higher efficiency of 1,3-PD synthesis from crude glycerol as compared with pure glycerol. Inhibition effect of impurities from crude glycerol on microorganisms also seems to be strain-dependent phenomenon. It should also be noted that the composition of the crude glycerol varied and depended on both the technology in the production of biodiesel and the raw material used [Moon et al. 2010].

The type and concentration of impurities present in crude glycerol have a significant influence on the metabolism of microorganisms and on a final concentration of 1,3-PD (Table 3). Impurities, such as methanol, salts, fatty acids, and heavy metal ions, had a negative effect on the course of biochemical reactions in microorganisms [Chatzifragkou, Papanikolaou 2012]. Alcohol affected the cell microorganism membranes by increasing membrane's liquidity. The intensity of interaction depended on the length of the carbon chain and the concentration of aliphatic alcohol. Despite the fact that the bacteria possessed defense mechanism (involving the adjustment of the ratio of saturated and unsaturated fatty acids in the tail of the lipid bilayer of the membrane) when the limit of alcohol concentration exceed, that will have a negative influence on the growth and metabolism of the bacterial cells [Venkataraman et al. 2012]. Impurities in the form of high concentration of monovalent salts caused swelling of the membrane by the weakening the Van der Waals forces in the tail of the lipid membrane. The salts effect on the energy barrier in the lipid layer lead to a change in biochemical processes [Petrache et al. 2006].

Biosynthesis of 1,3-propanediol from crude glycerol was current and an important issue in the valuation of raw material so as to use it in industry. Biotechnological production of 1,3-PD in by-product of biodiesel production, namely crude glycerol is a promising and encouraging alternative to the traditional chemical synthesis.

CONCLUSIONS

The strains *C. butyricum* DSP1 and *C. butyricum* DO14 were enabled to convert efficiently crude glycerol to 1,3-propanediol. The next step should be study on the effects of impurities present in the crude glycerol on synthesis of 1,3-PD to a greater extent.

ACKNOWLEDGEMENTS

The work was prepared within the framework of project PO IG 01.01.02-00-074/09, co-funded by The European Union from The European Regional Development Fund within the framework of the Innovative Economy Operational Programme 2007–2013.

REFERENCES

- Amaral P.F.F., Ferreira T.F., Fontes G.C., Coelho M.A.Z., 2009. Glycerol valorization: New biotechnological routes. *Food Bioprod. Process.*, 87(2), 179–186.
- Chatzifragkou A., Papanikolaou S., Dietz D., Doulgeraki A.I., Nychas G.J.E., Zeng A.P., 2011. Production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* growing on biodiesel-derived crude glycerol through a non-sterilized fermentation process. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 91(2), 101–112.
- Chatzifragkou A., Papanikolaou S., 2012. Effect of impurities in biodiesel-derived waste glycerol on the performance and feasibility of biotechnological processes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 95(1), 13–27.
- Hao J., Wei W., Jiesheng T., Jilun L., Dehua L., 2008. Decrease of 3-hydroxypropionaldehyde accumulation in 1,3-propanediol production by over-expressing dhaT gene in *Klebsiella pneumoniae* TUAC01. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 35, 735–741.
- Himmi E.L., Bories A., Barbirato F., 1999. Nutrient requirements for glycerol conversion to 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum*. *Biores. Tech.*, 67(2), 123–128.
- Jun S.A., Moon Ch., Kang Ch.H., Kong S.W., Sang B.I., Um Y., 2010. Microbial Fed-batch Production of 1,3-Propanediol Using Raw Glycerol with Suspended and Immobilized *Klebsiella pneumoniae*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 161 (1–8), 491–501.
- Kośmider A., Leja K., Czaczyk K., 2011. Improved utilization of crude glycerol by-product from biodiesel production. G. Montero, M. Stoytcheva (Eds.), *Biodiesel – quality, emissions and by-products*, InTech, Rijeka, 341–578.
- Kubiak P., Leja K., Myszka K., Celińska E., Spychała M., Szymanowska-Powałowska D., Czaczyk K., Grajek W., 2012. Physiological predisposition of various *Clostridium* species to synthesize 1,3-propanediol from glycerol. *Proc. Biochem.*, 47(1), 1308–1319.
- Kusharyoto W., Andriani D., Sari M., Sulistinah N., Sunarko B., 2011. Production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* p50b1 using commercial and raw glycerol from biodiesel production. *International Seminar Biotechnology 1–11*.
- Leja K., Czaczyk K., Myszka K., 2011a. The use of microorganisms in 1,3-propanediol production. *AJMR*, 5(26), 4652–4658.
- Leja K., Myszka K., Kubiak P., Wojciechowska J., Olejnik-Schmidt A.K., Czaczyk K., Grajek W., 2011b. Isolation and identification of *Clostridium* spp. from natural samples that performs effective conversion of glycerol to 1,3-propanediol. *Acta Sci. Pol. Biotechnologia*, 10(2), 25–34.
- Liu H.J., Zhang D.J., Xu Y.H., Mu Y., Sun Y.Q., Xiu Z.L., 2007. Microbial production of 1,3-propanediol from glycerol by *Klebsiella pneumoniae* under micro-aerobic conditions up to a pilot scale. *Biotechnol. Lett.*, 29, 1281–1285.
- Metsoviti M., Paramithiotis S., Drosinos E.H., Galiotou-Panayotou M., Nychas G.J. E., Zeng A.P., Papanikolaou S., 2012. Screening of bacterial strains capable of converting biodiesel-derived raw glycerol into 1,3-propanediol, 2,3-butanediol and ethanol. *Eng. Life Sci.*, 1, 57–68.
- Metsoviti M., Zeng A.P., Koutinas A.A., Papanikolaou S., 2013. Enhanced 1,3-propanediol production by a newly isolated *Citrobacter freundii* strain cultivated on biodiesel-derived waste glycerol through sterile and non-sterile bioprocesses. *J. Biotechnol.*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.11.018>.
- Moon Ch., Ahn J.H., Kim S.W., Sang B.I., Um Y., 2010. Effect of Biodiesel-derived Raw Glycerol on 1,3-Propanediol Production by Different Microorganisms. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 161(1–8), 502–510.
- Pagliaro M., Rossi M., 2010. Glycerol, properties and production. In, Pagliaro M., Rossi M. (eds) *The future of glycerol*, 2nd edn. The Royal Society of Chemistry, RCS, UK, 1–28.

- Papanikolaou S., Ruiz-Sanchez P., Pariest B., Blanchard F., Fick M., 2000. High production of 1,3-propanediol from industrial glycerol by a newly isolated *Clostridium butyricum* strain. *J. Biotechnol.*, 77, 191–208.
- Petrache H.I., Tristram-Nagle S., Harries D., Kucerka N., Nagle J.F., Parsegian V.A., 2006. Swelling of phospholipids by monovalent salt. *J. Lipid. Res.*, 47, 302–309.
- Posada J.A., Rincón L.E., Cardona C.A., 2012. Design and analysis of biorefineries based on raw glycerol, addressing the glycerol problem. *Biores. Tech.*, 111, 282–293.
- Venkataramanan K.P., Boatman J.J., Kurniawan Y., Taconi K.A., Bothun G.D., Scholz C., 2012. Impact of impurities in biodiesel-derived crude glycerol on the fermentation by *Clostridium pasteurianum* ATCC 6013. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 93(3), 1325–1335.
- Wilkens E., Ringel A.K., Hortic D., Willke T., Vorlop K.D., 2012. High-level production of 1,3-propanediol from crude glycerol by *Clostridium butyricum* AKR102a. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 93(3), 1057–1063.
- Zeng A.P., Sabra W., 2011. Microbial production of diols as platform chemicals, Recent progresses. *Curr. Opin. Biotech.*, 22(6), 749–757.
- Zhang G.L., Maa B.B., Xua X.L., Chun L., Wang L., 2007. Fast conversion of glycerol to 1,3-propanediol by a new strain of *Klebsiella pneumonia*. *Biochem. Eng. J.*, 37, 256–260.

MIKROBIOLOGICZNA KONWERSJA CZYSTEGO I ODPADOWEGO GLICEROLU DO 1,3-PROPANODIOLU

Streszczenie. 1,3-propanediol (1,3-PD) jest ważnym związkiem chemicznym stosowanym w przemyśle chemicznym. Mikrobiologiczna synteza 1,3-PD z wykorzystaniem odpadowego glicerolu jest atrakcyjnym rozwiązaniem zarówno z ekonomicznego, jak i ekologicznego punktu widzenia. Celem niniejszej pracy było zbadanie wpływu surowca (czystego i odpadowego glicerolu) na efektywność syntezy 1,3-PD przez bakterie *Clostridium butyricum* DSP1 i DO14. Bakterie wyizolowano ze środowiska naturalnego. Końcowe stężenia 1,3-PD były zbliżone dla obydwu badanych szczepów. W przypadku odpadowych gliceroli stężenie 1,3-PD było nieco niższe niż dla czystego glicerolu. Zastosowanie odpadowych gliceroli nie pozwoliło na całkowitą utylizację glicerolu.

Słowa kluczowe: 1,3-PD, *Clostridium* spp., czysty glicerol, odpadowy glicerol

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 30.09.2012

For citation – Do cytowania: Orczyk D., Szymanowska-Powałowska D., Leja K., 2012. Microbiological conversion of pure and crude glycerol to 1,3-propanediol. *Acta Sci. Pol. Biotechnol.*, 11 (3), 15–22.

SELEKCJA UV MUTANTÓW DROŻDŻY *YARROWIA LIPOLYTICA* DO BIOSYNTETY ERYTRYTOLU Z GLICEROLU

Anita Rywińska, Monika Bąk, Magdalena Rakicka,
Ludwika Tomaszewska, Tomasz Boruczkowski, Zbigniew Lazar,
Izabela Musiał, Waldemar Rymowicz

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Streszczenie. Na drodze mutagenazy indukowanej promieniowaniem UV uzyskano 24 mutanty w szczepie *Yarrowia lipolytica* Wratislavia K1. Selekcja na podstawie analizy wzrostu na podłożu YNB z erytrytolem wskazała 9 szczepów, których powierzchnia kolonii była zbliżona do powierzchni kolonii szczepu wyjściowego. W 7-dobowych hodowlach wstrząsarkowych, w podłożach z glicerolem, drożdże produkowały od 10,3 do 16,6 g dm⁻³ erytrytolu oraz od 11,5 do 17,9 g dm⁻³ mannitolu. Do hodowli bioreaktorowych wybrano szczep K1-UV20 oraz K1-UV21. Najwyższe stężenie erytrytolu uzyskano przy wykorzystaniu glicerolu odpadowego oraz z dodatkiem NaCl, z udziałem szczepu K1-UV21, który produkował 78,7 g dm⁻³ tego związku z wydajnością 0,49 g g⁻¹ i z szybkością objętościową produkcji równą 0,68 g dm⁻³h⁻¹. Badania podobieństwa filogenetycznego, z wykorzystaniem metody RAPD-PCR, wykazały wysokie podobieństwo mutantu Wratislavia K1-UV21 z wyjściowymi szczepami *Y. lipolytica*.

Słowa kluczowe: *Yarrowia lipolytica*, glicerol, erytrytol, mutanty UV

WSTĘP

W ostatnich latach udział biopaliw, w tym biodiesla, w ogólnoświatowym przemyśle naftowo-paliwowym konsekwentnie wzrasta. Produkcja biodiesla na świecie w 2008 r. wyniosła nieco ponad 14 mln ton i była o przeszło 50% wyższa niż w roku 2007. W samej Unii Europejskiej w 2008 r. wyprodukowano ponad 7,7 mln ton tego paliwa (35,7% więcej niż rok wcześniej) (tab. 1). W Polsce produkcja biodiesla wyniosła 268 tys. ton

© Copyright by Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

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

i wzrosła 2,5-krotnie w porównaniu z rokiem 2007, co oznacza 2% udział w rynku światowym [Lipińska i in. 2010].

Tabela 1. Produkcja biodiesla w Polsce i Unii Europejskiej w latach 2002–2011 [www.ebb-eu.org]
Table 1. Biodiesel production in Poland and European Union in the years 2002–2011

| Lata – Years Kraj – Country | 2002 | 2003 | 2004 | 2005 | 2006 | 2007 | 2008 | 2009 | 2010 | 2011* |
|--------------------------------|---|------|--------|------|------|------|------|------|------|-------|
| | Ilość wyprodukowanego biodiesla [tys. ton] The amount of biodiesel produced [thousands of tones] | | | | | | | | | |
| Polska | – | – | – | 100 | 116 | 80 | 275 | 332 | 370 | 864 |
| UE | 1065 | 1434 | 1933,4 | 3184 | 4890 | 5713 | 7755 | 9046 | 9570 | 22117 |

* dane z roku 2011 mają charakter szacunkowy – data from 2011 are based on estimates

Według najświeższych danych, opublikowanych przez portal European Biodiesel Board (EBB), w 2011 r. w Polsce wyprodukowano 864 tys. ton biodiesla – ponad dwa razy więcej niż w roku 2010 [http://www.ebb-eu.org].

Podczas produkcji biopaliw powstają produkty uboczne, tj. słoma, makuchy i frakcja glicerynowa, której głównym składnikiem jest glicerol (około 50%). Warto nadmienić, że z tony przerobionego oleju powstaje około 100 kg glicerolu [Kijora i in. 1995, Hanczakowski 2008]. Optymalne wykorzystanie tych odpadów może obniżyć koszty produkcji biodiesla i sprawić, że będą one porównywalne z kosztami produkcji paliwa konwencjonalnego [Dzieniażewski 2009].

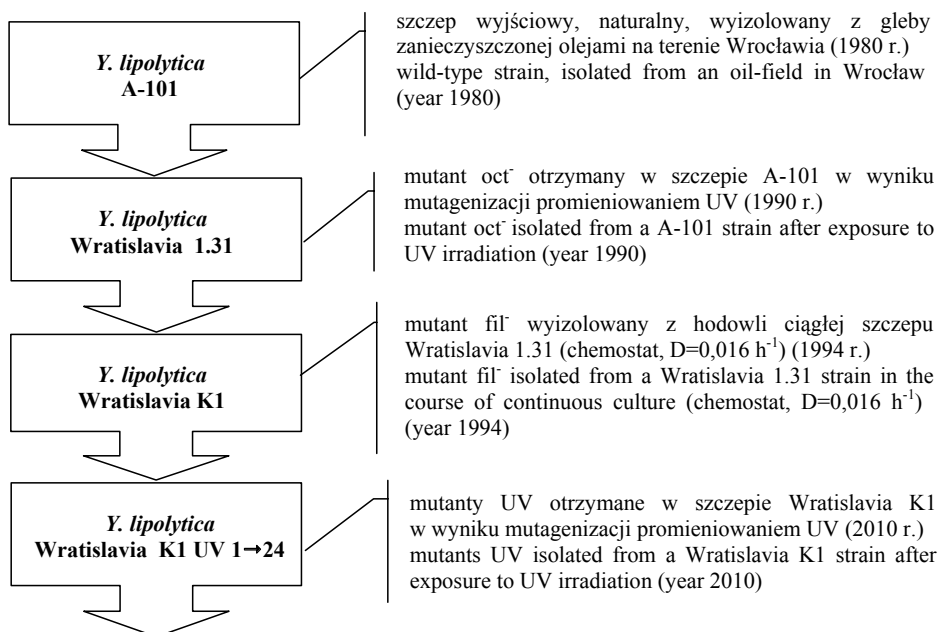
Zagospodarowanie glicerolu w procesach biotechnologicznych cieszy się w ostatnich latach dużym zainteresowaniem wielu ośrodków naukowych [Abad i in. 2012, Johnson i in. 2007, Meher i in. 2006]. Nowym kierunkiem badawczym jest biosynteza erytrytoli z glicerolu przez drożdże *Y. lipolytica* [Rymowicz i in. 2009, Tomaszewska i in. 2011, Tomaszewska i in. 2012]. Produkcja erytrytoli jest opłacalna tylko w procesach z udziałem mikroorganizmów, ale jak dotąd w tej biosyntezie jako substraty stosowane były jedynie węglowodany [Moon i in. 2010]. Wykorzystanie produktów odpadowych, takich jak glicerol, może być interesujące z ekonomicznego punktu widzenia, natomiast zaletą użycia w tym procesie drożdży *Y. lipolytica* jest przede wszystkim fakt, że erytrytol produkowany jest z glicerolu w prostym podłożu mineralnym oraz w warunkach obniżonego pH środowiska hodowlanego [Rymowicz i in. 2009].

Celem pracy było otrzymanie mutantów w szczepie drożdży *Y. lipolytica* Wratislavia K1 za pomocą mutagenyzy indukowanej promieniowaniem UV, ich selekcja pod kątem zwiększonej produkcji erytrytoli z glicerolu oraz próba ustalenia podobieństwa filogenetycznego pomiędzy badanymi szczepami.

MATERIAŁ I METODY

Mikroorganizmy. Przedmiotem badań były 24 szczepy drożdży *Yarrowia lipolytica* uzyskane w wyniku mutagenizacji promieniowaniem UV szczepu *Y. lipolytica* Wratislavia K1 oraz szczepy *Y. lipolytica* Wratislavia K1, *Y. lipolytica* Wratislavia 1.31 i *Y. lipolytica* A-101 [Rymowicz i in. 1996, Wojtatowicz 1991]. Pochodzenie oraz historię wykorzystanych szczepów przedstawia rysunek 1. Wszystkie badane w pracy szczepy przecho-

wywano na skosach z podłożem YM (podłoże z ekstraktem drożdżowym i słodowym), w temperaturze 4°C, w kolekcji własnej Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu.



Rys. 1. Historia wykorzystanych w pracy szczepów drożdży *Y. lipolytica*

Fig. 1. The history of the *Y. lipolytica* strains used in this work

Procedura mutagenizacji. Materiał komórkowy do procesu mutagenizacji pochodził ze zmywu z 48-godz. skosów. Biomasa standaryzowano w 1 M buforze fosforanowym (pH 6,0) do gęstości 10⁶ kom·cm⁻³, a następnie przeniesiono po 10 cm³ zawiesiny komórek do krystalizatorów o średnicy 0,05 m. Jako czynnik mutageny stosowano promieniowanie UV pochodzące z lampy rtęciowej o mocy 30 W, przy odległości od źródła promieniowania wynoszącej 0,5 m. Podczas procesu naświetlania zawiesina była poddana ciągłemu mieszaniu na mieszadle magnetycznym MS11 (Wigo). Czas mutagenizacji wynosił: 20, 30, 40, 50, 60 i 70 sekund. Po tym czasie zawiesinę przetrzymywano w ciemności przez 1 godz., aby nie dopuścić do fotoreaktywacji. Następnie wykonano posiewy z kolejnych dziesiętnych rozcieńczeń na podłoże YM z glicerolem. Po 72 godz. inkubacji w 30°C zliczono wyrosłe kolonie i obliczono przeżywalność.

Substrat. W badaniach wykorzystano czysty glicerol (98%) oraz glicerol odpadowy z produkcji biodiesla, o zawartości 873 g·dm⁻³ glicerolu i 43 g·dm⁻³ NaCl (Wratislavia-BIO, Wrocław).

Podłoże. Podłoże do testów płytkowych zawierało (g·dm⁻³): YNB (wyjściowe podłoże azotowe) – 0,67; erytrytol – 100; agar – 20,0. Podłoże inokulacyjne do hodowli bioreaktorowych zawierało (g·dm⁻³): glicerol (98%) – 50,0; ekstrakt drożdżowy – 3,0; ekstrakt słodowy – 3,0; bactopecton – 5,0; woda destylowana do 1 dm³. Podłoże produkcyjne do hodowli wstrząsanych zawierało (g·dm⁻³): glicerol (98%) – 100,0; (NH₄)₂SO₄ – 2,5;

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 1,0; ekstrakt drożdżowy – 1,0; CaCO_3 – 2,5; woda destylowana do 1 dm³. Podłoże produkcyjne do hodowli w bioreaktorach miało skład (g·dm⁻³): glicerol (98% lub 87,3%) – 150,0; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 2,25; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 1,0; KH_2PO_4 – 0,22; ekstrakt drożdżowy – 1,0; NaCl – 26,4; woda wodociągowa – do 1 dm³. Podłoża sterylizowano w 121°C przez 20 minut.

WARUNKI PROWADZENIA HODOWLI

Testy płytkowe. Wykonano serie pasaży, gdzie badany materiał był przesiewany ze skosu YM na podłoża stałe na płytkach Petriego: YM z glukozą, a następnie YNB z erytrytolem. W ostatnim etapie za pomocą sterylnej igły wykonano punktowy posiew na świeże podłoże YNB z erytrytolem. Po każdym pasażu zaszczepione płytki inkubowano przez 72 godz. w temperaturze 30°C.

Hodowle produkcyjne wstrząsane. Hodowle szczepiono materiałem komórkowym pochodzącym ze skosów. Hodowle prowadzono na wstrząsarce rotacyjnej jw. w 0,3 dm³ kolbach stożkowych zawierających 0,03 dm³ podłoża produkcyjnego, przez 7 dni. Próby do analiz pobierano po zakończeniu hodowli.

Hodowle inokulacyjne. Hodowle inokulacyjne prowadzono na wstrząsarce rotacyjnej typu CERTOMAT IS (Sartorius Stedim Biotech GmbH), w 0,3 dm³ kolbach stożkowych zawierających 0,1 dm³ podłoża inokulacyjnego, przez 72 godz. w temperaturze 29,5°C, przy 140 rpm. Do zaszczepienia podłoża produkcyjnego w bioreaktorze używano 0,2 dm³ zawiesiny komórek namnożonych w hodowli inokulacyjnej.

Hodowle produkcyjne bioreaktorowe. Proces biosyntezy erytrytolu prowadzono w 5-litrowym bioreaktorze Biostat B Plus (Sartorius) przy objętości roboczej 2 dm³. Szybkość przepływu powietrza wynosiła 0,6 vvm, szybkość obrotowa mieszadła 800 rpm, temperatura 30°C. W czasie procesu pH = 3,0 utrzymywano automatycznie za pomocą 20% NaOH.

METODY ANALITYCZNE

Biomasę oznaczano metodą wagową.

Stężenie glicerolu, erytrytolu, mannitolu, arabitolu, kwasu cytrynowego oraz kwasu α -ketoglutarynowego oznaczano metodą HPLC na kolumnie HyperRez XP carbohydrate H⁺ (Thermo Scientific) o wymiarach 300 x 7,7 mm, połączonej z detektorami UV ($\lambda=210$ nm) i RI (detektor refraktometryczny), w temperaturze 65°C, przy szybkości przepływu fazy ciekłej (25 mM kwasu trifluorooctowego; TFA) przez kolumnę równej 0,6 cm³·min⁻¹.

Metody biologii molekularnej

Izolacja genomowego DNA. Czyste kultury każdego szczepu namnażano w podłożu YM, w 30°C przez 24 godz. W celu uzyskania genomowego DNA wykorzystano handlowy zestaw do izolacji genomowego DNA drożdży (GeneMARTIX Yeast DNA Purification Kit firmy Eru_x). Lizę ściany komórkowej prowadzono przy użyciu enzymu litykazy (z *Arthrobacter luteus*) o stężeniu 20 mg·cm⁻³, przez 30 min, w temperaturze 30°C w termobloku HLC model MKR13 (Ditabis, Niemcy) z ciągłym wytrząsaniem. Ekstrakcję przeprowadzono zgodnie z załączonym do zestawu protokołem.

Reakcja RAPD-PCR. Reakcję RAPD-PCR przeprowadzono z wykorzystaniem 3 starterów: (GAC)₅ (5'-GACGACGACGACGAC-3'), (GTG)₃ (5'-GTGGTGGTG-3') i (GTG)₄ (5'-GTGGTGGTGGTG-3'). Reakcje prowadzono w termocyklerze T-personal (Biometra, Niemcy). Parametry prowadzenia reakcji RAPD-PCR: 1) 95°C – 3 min; 2) 30 x: 94°C – 30 s, 48°C – 1 min, 72°C – 30 s; 3) 72°C – 5 min; 4) 4°C pauza.

Elektroforeza w żelu agarozowym. Obecność produktów amplifikacji sprawdzono metodą elektroforetyczną w żelu agarozowym o stężeniu 1% (TopVisiona Agarose LE, Fermentas, Litwa). Elektroforezę prowadzono w buforze przewodzącym 1 x TAE przez 45 min przy napięciu 105 V. DNA wizualizowano przez dodatek bromku etydyny o stężeniu 10 mg·cm⁻³ w dawce 7 µl na 100 cm³ żelu. Jako marker stosowano GenRuler 1 kb DNA Ladder o zakresie 250–10000 bp. Próbkę nanoszono na żel wraz z buforem obciążającym w stosunku 5:1. Elektroforezę przeprowadzono z użyciem zestawu do elektroforezy horyzontalnej Midi SubCell – GT z zasilaczem PowerPack Basic (Bio-Rad, USA).

Analiza statystyczna i wykorzystane programy komputerowe. Pole powierzchni kolonii mierzono przy użyciu programu ImageJ 1.45s (National Institutes of Health, USA). Analizę danych wykonano przy wykorzystaniu oprogramowania Statistica 9.1 (StatSoft Incorporated, Tulsa, OK).

Do określenia pokrewieństwa filogenetycznego badanych szczepów drożdży wykorzystano program Wilgosz Excel Pstryczek Application, przy współczynniku istotności 5%.

Spis symboli. X – biomasa (biomass), GLY – glicerol (glycerol), ERY – erytrytol (erythritol), MAN – mannitol (mannitol), AR – arabitol (arabitol), CA – kwas cytrynowy (citric acid), KA – kwas α-ketoglutarynowy (α-ketoglutaric acid), Q – szybkość produkcji erytrytolu (erythritol volumetric productivity), q – szybkość właściwa produkcji erytrytolu (erythritol specific production rate), Y – wydajność erytrytolu (g wytworzonego ERY/g zużytego substratu) (erythritol yield; g of produced erythritol/g of used substrate).

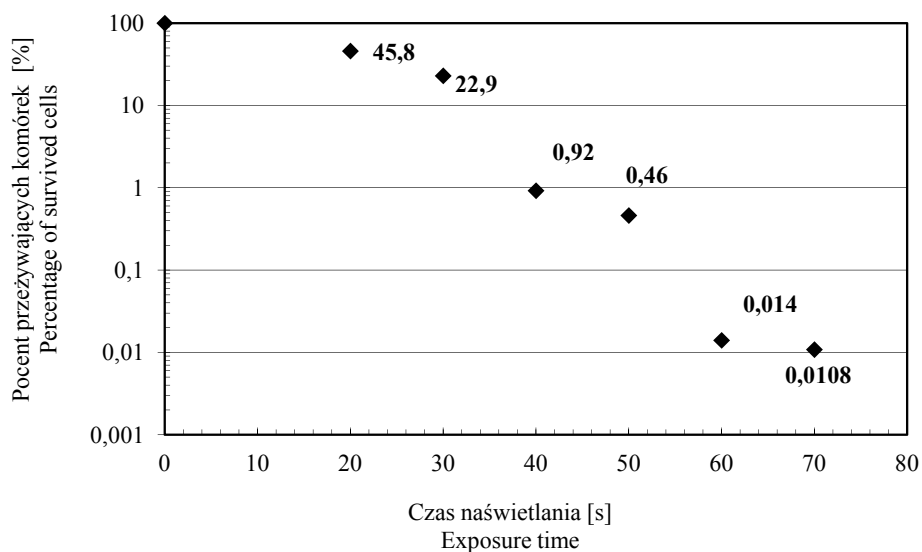
WYNIKI I OMÓWIENIE

Wykorzystany w prezentowanej pracy szczep *Y. lipolytica* Wratislavia K1 jest mutantem octanowym, wyizolowanym z hodowli prowadzonej w warunkach chemostatu drożdży *Y. lipolytica* Wratislavia 1.31 [Rymowicz i in. 1996], natomiast *Y. lipolytica* A-101 jest szczepem wyjściowym dla Wratislavia 1.31, co obrazuje rysunek 1. W pierwszym etapie badań szczep Wratislavia K1 poddano mutagenizie za pomocą promieniowania UV. Wpływ czasu naświetlania na przeżywalność szczepu przedstawiono na rysunku 2. Po 20 sekundach naświetlania stopień redukcji populacji wynosił 54,2% (rys. 2). W podobnym doświadczeniu, przeprowadzonym dla szczepu Wratislavia 1.31, po 10 sekundach naświetlania stopień redukcji wynosił 76%, co oznacza, że szczep rodzicielski był bardziej wrażliwy na działanie promieniowania UV [Rywińska i in. 2003]. Po 70 sekundach w naświetlanej zawieszynie pozostało tylko około 0,01% żywych komórek (rys. 2).

W niniejszej pracy zdecydowano naświetlać komórki szczepu Wratislavia K1 w czasie dającym około 1% na przeżycie komórek (40 sekund). Po mutagenizacji wyizolowano 30 kolonii, a po procesie oczyszczania do postaci czystej kultury uzyskano 24 szczepy.

W kolejnym etapie badań wykonano 3-etapowy skrining uzyskanych szczepów do biosyntezy erytrytolu z glicerolu. Selekcja obejmowała testy płytkowe, hodowle wstrząsarkowe i okresowe hodowle bioreaktorowe.

Wcześniejsze badania wskazały, że szczep *Wratislavia* K1 nie wykorzystywał erytrytolu jako źródła węgla, co jak dotąd było cechą wyróżniającą go spośród innych szczepów drożdży *Y. lipolytica* [Rywińska i in. 2010]. W pierwszym etapie selekcji, w testach płytkowych, poszukiwano szczepu charakteryzującego się słabym wzrostem na podłożu z erytrytolem. Uzyskano kolonie o średnicy od 1,127 do 9,063 mm², co oznacza, że żaden z badanych szczepów nie utworzył mniejszych kolonii niż *Wratislavia* K1, dla którego średnica kolonii wynosiła 1,077 mm² (tab. 2). Słaby wzrost drożdży w podłożu zawierającym erytrytol był krytycznym warunkiem, na podstawie którego zredukowano ilość badanych mutantów z 24 do 9.



Rys. 2. Krzywa przeżywalności szczepu *Y. lipolytica* *Wratislavia* K1 pod działaniem promieniowania UV

Fig. 2. Survival curve of *Y. lipolytica* *Wratislavia* K1 strain exposed to UV irradiation

Drugim etapem selekcji była biosynteza erytrytolu z glicerolu w 7-dniowych hodowlach wstrząsanych. Końcowe stężenie biomasy kształtowało się na podobnym poziomie, od 8 do 10,5 g dm⁻³. Wyniki te były zbliżone do stężenia biomasy (5,7–10,9 g dm⁻³) otrzymanego w hodowlach wstrząsanych z glicerolu kosmetycznego przez inne szczepy drożdży *Y. lipolytica* [Tomaszewska i in. 2011, 2012]. Wszystkie badane w niniejszej pracy szczepy produkowały erytrytol, którego końcowe stężenie wynosiło od 10,3 do 16,6 g dm⁻³, przy czym najwięcej tego związku produkował szczep *Y. lipolytica* *Wratislavia* K1-UV21. W badaniach Tomaszewskiej i in. [2011, 2012], drożdże produkowały znacznie więcej erytrytolu, od 20,0 do 33,6 g dm⁻³, ale doświadczenia prowadzono w 10-dniowych hodowlach wstrząsanych oraz w innym podłożu produkcyjnym, sporządzonym w buforze fosforanowym. W doświadczeniach przeprowadzonych przez Ueda i Yamagishi [1997] szczep *Y. lipolytica* ATCC 8661, w podłożu zawierającym 20% glicerolu oraz 1% ekstraktu drożdżowego, produkował 43,2 g dm⁻³ erytrytolu. W prezentowanych w niniejszej pracy badaniach wszystkie mikroorganizmy oprócz erytrytolu wytwarzały również produkty uboczne: arabitol, kwas α -ketoglutarynowy, kwas cytrynowy i w zdecydowanie największych ilościach mannitol (tab. 3). Jego końcowe stężenie w płynach pochodzących

było zróżnicowane i wynosiło od 11,5 g dm⁻³ (szczep K1-UV1) do 17,9 g dm⁻³ (szczep K1-UV27). Warto zauważyć, że cztery szczepy: K1-UV1, K1-UV7, K1UV-25 oraz K1-UV27 produkowały więcej mannitolu niż erytrytolu i być może zostaną wykorzystane w kolejnych badaniach do doskonalenia procesu biosyntezy tego związku.

Tabela 2. Analiza statystyczna powierzchni kolonii segregantów szczepu *Y. lipolytica* Wratislavia K1 na podłożu YNB z erytrytolem

Table 2. Statistical analysis of the size of colony surface of *Y. lipolytica* Wratislavia K1 segregants grown on YNB medium with erythritol

| Szczep Strain | Powierzchnia kolonii [mm ²] Size of colony surface | Grupy jednorodne Homogenous groups | | | | | | | |
|------------------|--|---------------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| K1 | 1,077 | █ | | | | | | | |
| UV21 | 1,127 | █ | | | | | | | |
| UV20 | 1,138 | █ | | | | | | | |
| UV7 | 1,150 | █ | | | | | | | |
| UV27 | 1,315 | █ | █ | | | | | | |
| UV26 | 1,342 | █ | █ | | | | | | |
| UV12 | 1,373 | █ | █ | | | | | | |
| UV25 | 1,394 | █ | █ | | | | | | |
| UV29 | 1,411 | █ | █ | | | | | | |
| UV1 | 1,820 | █ | █ | | | | | | |
| UV11 | 1,987 | █ | █ | █ | | | | | |
| UV28 | 2,501 | █ | █ | █ | █ | | | | |
| UV15 | 2,661 | █ | █ | █ | █ | | | | |
| UV13 | 2,811 | █ | █ | █ | █ | | | | |
| UV6 | 3,119 | █ | █ | █ | █ | | | | |
| UV18 | 3,122 | █ | █ | █ | █ | | | | |
| UV24 | 3,491 | █ | █ | █ | █ | | | | |
| UV4 | 3,768 | | █ | █ | █ | █ | | | |
| UV17 | 3,877 | | █ | █ | █ | █ | █ | | |
| UV3 | 4,417 | | | █ | █ | █ | █ | | |
| UV23 | 4,742 | | | | █ | █ | █ | █ | |
| UV30 | 6,084 | | | | | █ | █ | █ | █ |
| UV14 | 6,202 | | | | | | █ | █ | █ |
| UV22 | 7,547 | | | | | | | █ | █ |
| UV9 | 9,062 | | | | | | | | █ |

ANOVA; Test Duncana; $\alpha=0,05$; zmienna: pole powierzchni kolonii; grupy jednorodne
ANOVA; Duncan's Test; $\alpha=0,05$; variable: size of the colony surface; homogenous groups

Tabela 3. Charakterystyka biosyntezy erytrytoli z glicerolu przez segreganty szczepu *Y. lipolytica* Wratislavia K1 w 7-dniowych hodowlach wstrząsanych

Table 3. Characteristic of the erythritol biosynthesis from glycerol by segregants of *Y. lipolytica* Wratislavia K1 strain in 7-day flask cultures

| Szczep Strain | X [g·dm ⁻³] | ERY [g·dm ⁻³] | MAN [g·dm ⁻³] | AR [g·dm ⁻³] | CA [g·dm ⁻³] | KA [g·dm ⁻³] | Y [g·g ⁻¹] |
|------------------|----------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------------------|
| K1-UV1 | 8,9 | 10,4 | 11,5 | 6,0 | 0,9 | 4,0 | 0,11 |
| K1-UV7 | 8,5 | 10,3 | 16,7 | 5,0 | 1,1 | 4,3 | 0,11 |
| K1-UV12 | 10,0 | 15,6 | 12,8 | 5,2 | 0,7 | 3,6 | 0,16 |
| K1-UV20 | 10,3 | 16,3 | 14,6 | 3,7 | 0,7 | 3,2 | 0,16 |
| K1-UV21 | 8,7 | 16,6 | 15,7 | 3,9 | 0,7 | 2,7 | 0,17 |
| K1-UV25 | 8,1 | 14,0 | 15,8 | 5,0 | 1,1 | 3,9 | 0,17 |
| K1-UV26 | 9,3 | 15,7 | 14,7 | 3,7 | 0,8 | 2,8 | 0,16 |
| K1-UV27 | 8,0 | 15,5 | 17,9 | 4,5 | 0,4 | 3,6 | 0,15 |
| K1-UV29 | 10,5 | 16,3 | 12,3 | 4,0 | 0,9 | 2,3 | 0,17 |

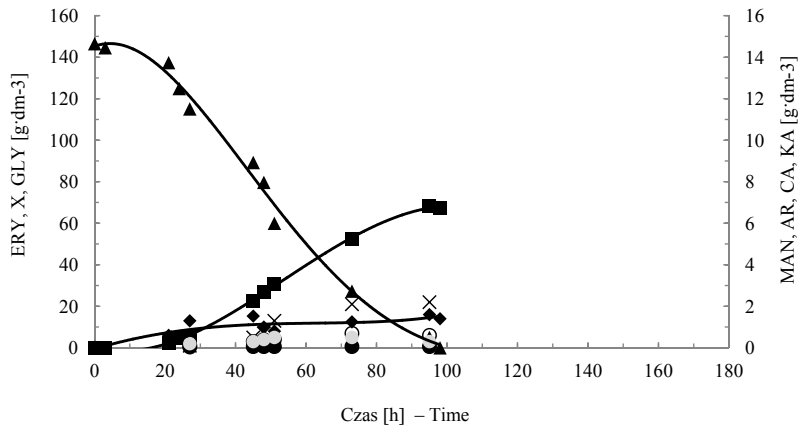
Uwzględniając wzrost badanych szczepów na podłożu stałym zawierającym erytrytol jako źródło węgla i wyniki otrzymane w hodowlach wstrząsanych, do hodowli w bioreaktorze wytypowano szczepy Wratislavia K1-UV21 oraz Wratislavia K1-UV20. W procesach tych zastosowano glicerol kosmetyczny (rys. 3A, 4A) oraz odpadowy (rys. 3B, 4B). Procesy biosyntezy erytrytoli prowadzono do całkowitego wykorzystania glicerolu, co trwało, w zależności od szczepu i substratu, od 97 do 175 godz. (rys. 3, 4). Fazę stacjonarną drożdże osiągały w około 30 godz. w przypadku glicerolu kosmetycznego, natomiast nieco dłużej rosły w procesach z glicerolem odpadowym, osiągając jednocześnie wyższe stężenie biomasy w fazie stacjonarnej. Stężenie biomasy po zakończeniu wzrostu w przypadku glicerolu odpadowego wynosiło 15,2 i 19,4 g·dm⁻³, odpowiednio dla szczepu K1-UV21 i K1-UV20. W hodowlach z czystym substratem plon biomasy był podobny w przypadku obu szczepów i wynosił około 14 g·dm⁻³.

Końcowe stężenie erytrytoli było podobne w obu szczepach (65,5 oraz 67,3 g·dm⁻³) w przypadku czystego substratu (rys. 3A, 3B), natomiast różniło się znacznie w hodowlach z glicerolem odpadowym. W tych procesach uzyskano najwyższe stężenie erytrytoli przy wykorzystaniu szczepu K1-UV21, gdzie wyniosło ono 78,7 g·dm⁻³ (rys. 4B) oraz najniższe, 54,3 g·dm⁻³ (rys. 3B), dla drugiego z badanych szczepów. Porównując, szczep wyjściowy Wratislavia K1 produkował 84,1 i 80,0 g·dm⁻³ erytrytoli, odpowiednio z czystego i odpadowego glicerolu [Tomaszewska i in. 2012].

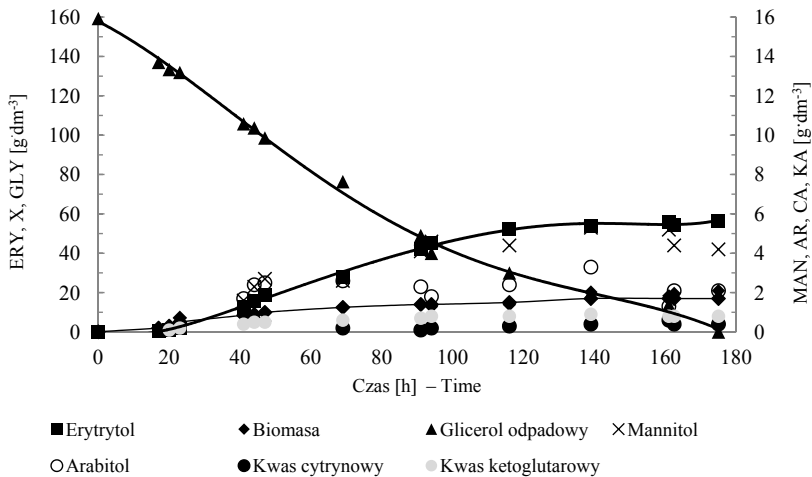
Na końcu poszczególnych hodowli stężenie kwasów organicznych, cytrynowego i α -ketoglutazarowego, było śladowe ($\leq 1,0$ g·dm⁻³). Dla obu szczepów w płynie pohodowlanym oprócz erytrytoli oznaczono niewielkie ilości innych alkoholi wielowodorotlenowych. Stężenie arabitolu nie przekroczyło 2,1 g·dm⁻³. Końcowe stężenie mannitolu było zdecydowanie niższe niż w hodowlach wstrząsarkowych i nie przekroczyło 4,0 g·dm⁻³ (rys. 3, 4). Przyczyną tego zjawiska jest dodatek chlorku sodu do podłoża w hodowlach bioreaktorowych, który zwiększa selektywność procesu produkcji erytrytoli [Hattori,

Suzuki 1974, Kim i in. 1997, Lin i in. 2001]. Jak podają Yun i Song [1968], dodatek NaCl do podłoża skutkował obniżeniem produkcji mannitolu z sacharozy przez *Aureobasidium pullulans*. Również w badaniach przeprowadzonych przez Tomaszewską i in. [2012], zaobserwowano obniżenie produkcji mannitolu po suplementacji podłoża hodowlanego w NaCl. Cho i in. [1999] prowadzili badania nad wpływem stężenia NaCl w podłożu hodowlanym na produkcję erytrytolu przez *Pichia* sp. w hodowlach wstrząsanych. Najwyższe stężenie tego polioliu ($17 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$) otrzymali w podłożu zawierającym $60 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ NaCl, natomiast w podłożu niezawierającym NaCl stężenie erytrytolu było dwukrotnie niższe.

A

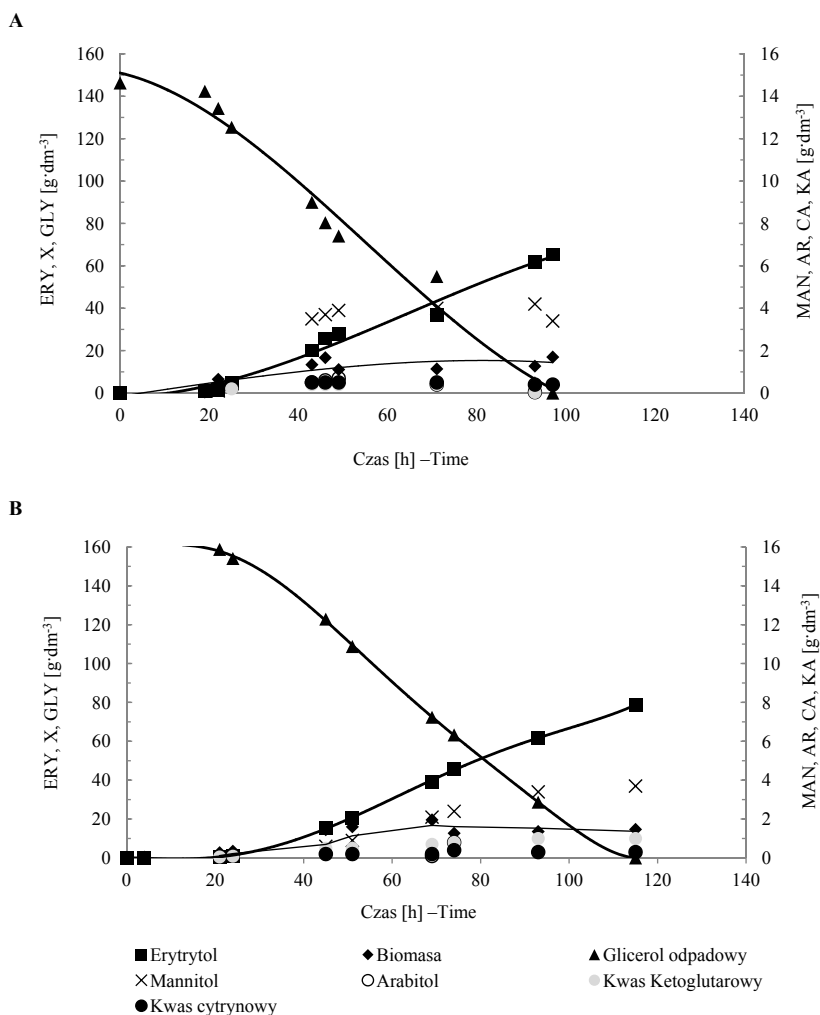


B



Rys. 3. Produkcja biomasy, alkoholi cukrowych oraz kwasów organicznych z glicerolu przez szczep *Y. lipolytica* Wratislavia K1-UV20 w hodowli okresowej w bioreaktorze. Substrat: glicerol kosmetyczny (A), glicerol odpadowy (B)

Fig. 3. Production of biomass, sugar alcohols and organic acids from glycerol by *Y. lipolytica* Wratislavia K1-UV20 in bioreactor batch culture. Substrate: pure glycerol (A), crude glycerol (B)



Rys. 4. Produkcja biomasy, alkoholi cukrowych, kwasów organicznych z glicerolu przez szczep *Y. lipolytica* Wratislavia K1-UV21 w hodowli okresowej w bioreaktorze. Substrat: glicerol kosmetyczny (A), glicerol odpadowy (B)

Fig. 4. Production of biomass, sugar alcohols, organic acids from glycerol by *Y. lipolytica* Wratislavia K1-UV21 in bioreactor batch culture. Substrate: pure glycerol (A), crude glycerol (B)

Parametry produkcji erytrytolu, takie jak wydajność, szybkość objętościowa i właściwa przedstawiono w tabeli 4. Najwyższą wartość wydajności produkcji erytrytolu, $0,49 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$, stwierdzono w hodowli szczepu K1-UV21 z glicerolem odpadowym. Taką samą wydajność produkcji tego związku prezentował szczep Wratislavia K1 w hodowlach z glicerolem odpadowym [Tomaszewska i in. 2012]. Wyższą wartość tego parametru, $0,56 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$, uzyskano przy wykorzystaniu szczepu Wratislavia K1 w hodowli okresowej zasilanej, w której stężenie glicerolu wynosiło $300 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ [Rymowicz i in. 2009]. Natomiast najwyższą jak dotąd wydajność produkcji erytrytolu, $0,63 \text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$, osiągnięto w hodowli

z udziałem szczepu *Moniliella* sp. 440 N61188-12 [Lin i in. 2010]. Obecnie, w procesie przemysłowym wykorzystywane są drożdże *Trichosporonoides megachiliensis* SN-G42, produkujące 335 g·dm⁻³ erytrytolu z wydajnością 0,47 g·g⁻¹ i szybkością objętościową produkcji równą 2 g·dm⁻³h⁻¹ [Sawada i in. 2009].

Z wyjątkiem hodowli szczepu K1-UV20 w podłożu z substratem odpadowym, drożdże produkowały erytrytol z podobną szybkością objętościową, jak i właściwą (tab. 4).

Tabela 4. Charakterystyka okresowej biosyntezy erytrytolu z glicerolu przez szczepy *Y. lipolytica* Wratislavia K1-UV20 i K1-UV21 w hodowlach bioreaktorowych

Table 4. Characteristic of the erythritol biosynthesis from glycerol in batch bioreactor cultures by strains Wratislavia K1-UV20 and K1-UV21 of *Y. lipolytica*

| Substrat Substrate | <i>Y. lipolytica</i> Wratislavia K1-UV20 | | | <i>Y. lipolytica</i> Wratislavia K1-UV21 | | |
|---------------------------------------|---|---|---|---|---|---|
| | Y [g·g ⁻¹] | Q [g·L ⁻¹ h ⁻¹] | q [g·g ⁻¹ h ⁻¹] | Y [g·g ⁻¹] | Q [g·L ⁻¹ h ⁻¹] | q [g·g ⁻¹ h ⁻¹] |
| Glicerol kosmetyczny Pure glycerol | 0,46 | 0,69 | 0,048 | 0,45 | 0,68 | 0,05 |
| Glicerol odpadowy Crude glycerol | 0,36 | 0,31 | 0,016 | 0,49 | 0,68 | 0,044 |

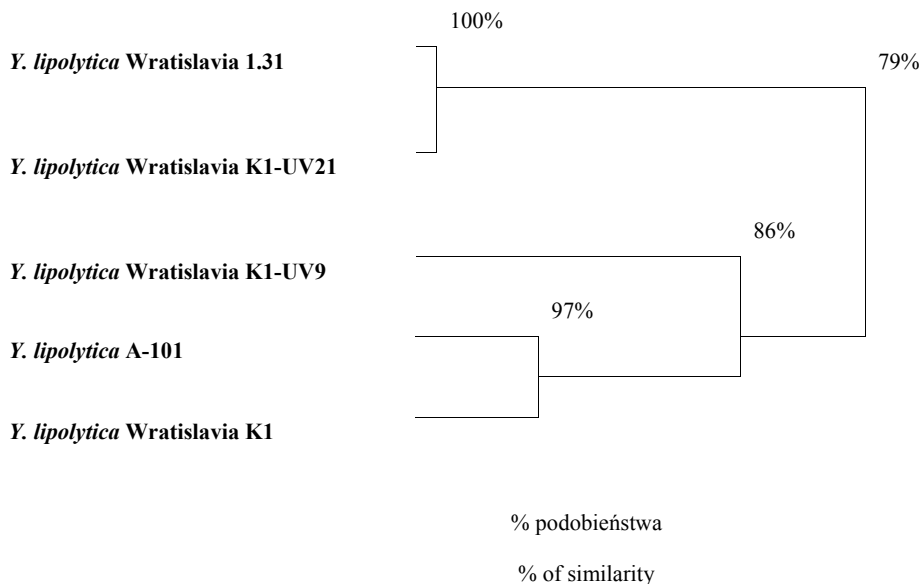
Dla szczepów *Y. lipolytica* Wratislavia K1-UV21 oraz K1-UV9, które w selekcyjnych testach płytkowych na podłożu z erytrytolem (tab. 2) wykazywały odpowiednio najmniejszą i największą powierzchnię kolonii, wykonano testy identyfikacyjne API ID 32 C (tab. 5), które miały na celu porównanie profili asymilacyjnych badanych mikroorganizmów i ewentualne zweryfikowanie ich przynależności gatunkowej. Porównawcze testy wykonano dla szczepów Wratislavia K1, Wratislavia 1.31 oraz A-101. Badane szczepy asymilowały tylko osiem spośród 30 źródeł węgla. Cztery z nich były wykorzystywane przez wszystkie szczepy i są to: N-acetylo-glukozamina, glicerol, glukonian potasu oraz D-glukoza. Drożdże różniły się zdolnością asymilacji alkoholi wielowodorotlenowych, erytrytolu nie wykorzystywały tylko Wratislavia K1. Szczep Wratislavia K1-UV9 w wyniku mutagenizacji promieniowaniem UV jako jedyny uzyskał zdolność wzrostu w podłożu zawierającym sorbitol. Szczep Wratislavia K1-UV21 posiadał taki sam profil asymilacyjny jak szczep Wratislavia 1.31. Wszystkie szczepy okazały się być odporne na cykloheksymid (tab. 5).

W celu ustalenia podobieństwa filogenetycznego badanych szczepów wykonano reakcję RAPD-PCR, czyli losową amplifikację polimorficznego DNA, prostą metodę w której nie jest konieczna znajomość sekwencji DNA [Robak i in. 2005] – z tego względu jest powszechnie stosowana do różnicowania nieznanych gatunków drożdży.

W niniejszej pracy drożdże różnicowano z wykorzystaniem trzech różnych starterów: (GAC)₅, (GTG)₃ i (GTG)₄. Na podstawie wyników RAPD-PCR wykonano dendrogram podobieństwa badanych szczepów do szczepów wyjściowych *Y. lipolytica*, który ujawnił dwie odseparowane grupy, wykazujące między sobą 79% podobieństwo (rys. 5). Do pierwszej zaliczały się szczepy Wratislavia 1.31 i Wratislavia K1-UV21, które wykazywały 100% podobieństwo. Do drugiej grupy zaliczały się szczepy Wratislavia K1, A-101 i Wratislavia K1-UV9. W obrębie tej grupy największe podobieństwo (97%) zostało zaobserwowane pomiędzy Wratislavia K1, a A-101.

Tabela 5. Profil uzdolnień asymilacyjnych szczepów *Y. lipolytica*, uzyskany w teście API ID 32 C
 Table 5. Assimilation ability profiles of *Y. lipolytica* strains obtained after API ID 32 C test

| Źródło węgla Carbon source | <i>Y. lipolytica</i> A-101 | <i>Y. lipolytica</i> Wratislavia | | | |
|--|-------------------------------|----------------------------------|----|---------|--------|
| | | 1.31 | K1 | K1 UV21 | K1 UV9 |
| Kontrola (brak substratu) Control (without substrate) | - | - | - | - | - |
| D-galaktoza – D-galactose | - | - | - | - | - |
| Cykloheksymid (aktydion) Cycloheximide (actidione) | + | + | + | + | + |
| D-sacharoza – D-saccharose | - | - | - | - | - |
| N-acetylo-glukozamina N-acetyl-glucosamine | + | + | + | + | + |
| Kwas mlekowy – Lactic acid | + | - | - | - | + |
| L-arabinoza – L-arabinose | - | - | - | - | - |
| D-celobioza – D-celiobiose | - | - | - | - | - |
| D-rafinoza – D-raffinose | - | - | - | - | - |
| D-maltoza – D-maltose | - | - | - | - | - |
| D-trehaloza – D-trehalose | - | - | - | - | - |
| 2-ketoglukonian potasu Potassium 2-ketogluconate | - | - | - | - | - |
| Metylo-D-glukopiranoza Methyl-D-glucopiranoside | - | - | - | - | - |
| D-mannitol – D-mannitol | + | - | - | - | + |
| D-laktoza – D-lactose | - | - | - | - | - |
| Inozytol – Inositol | - | - | - | - | - |
| D-sorbitol – D-sorbitol | - | - | - | - | + |
| D-ksyloza – D-xylose | - | - | - | - | - |
| D-ryboza – D-ribose | - | - | - | - | - |
| Glicerol – Glycerol | + | + | + | + | + |
| L-ramnoza – L-rhamnose | - | - | - | - | - |
| Palatynoza – Palatinose | - | - | - | - | - |
| Erytrytol – Erythritol | + | + | - | + | + |
| D-melibioza – D-melibiose | - | - | - | - | - |
| Glukuronian sodu Sodium glucuronate | - | - | - | - | - |
| D-melezytoza D-melezitose | - | - | - | - | - |
| Glukonian potasu Potassium gluconate | + | + | + | + | + |
| Kwas lewulinowy Levulinic acid | - | - | - | - | - |
| D-glukoza – D-glucose | + | + | + | + | + |
| L-sorboza – L-sorbose | - | - | - | - | - |
| Glukozamina – Glucosamine | - | - | - | - | - |
| Eskulina, Cytrynian żelaza Esculin, Ferric citrate | + | - | - | - | - |



Rys. 5. Dendrogram podobieństwa szczepów drożdży *Y. lipolytica* wykreślony na podstawie wyników uzyskanych metodą RAPD-PCR ze starterami $(GAC)_5$, $(GTG)_3$ i $(GTG)_4$

Fig. 5. Dendrogram of similarity of *Y. lipolytica* strains analyzed based on RAPD-PCR with $(GAC)_5$, $(GTG)_3$ i $(GTG)_4$ primers

WNIOSKI

W wyniku mutagenizacji promieniowaniem UV szczepu *Y. lipolytica* Wratislavia K1, a następnie selekcji 24 uzyskanych mutantów, jako najlepszego producenta erytrytolu wskazano szczep *Y. lipolytica* Wratislavia K1-UV21. Badania RAPD-PCR wykazały wysokie podobieństwo tego mutantu ze szczepami wyjściowymi. W bioreaktorowych hodowlach okresowych szczep Wratislavia K1-UV21 produkował erytrytol z wydajnością zbliżoną do uzyskiwanej dla szczepu rodzicielskiego w nieco dłuższym czasie. Konieczne są dalsze badania potwierdzające stabilność i przydatność tego szczepu podczas ciągłej biosyntezy erytrytolu.

PODZIĘKOWANIA

Badania realizowano w ramach projektu nr POIG.01.01.02-00-074/09 „Biotechnologiczna konwersja glicerolu do polioli i kwasów dikarboksylowych”.

PIŚMIENNICTWO

- Abad S, Turon X., 2012. Valorization of biodiesel derived glycerol as a carbon source to obtain added-value metabolites: Focus on polyunsaturated fatty acids. 30 (3), 733–741.
- Cho C.H., Kim S.Y., Noh B.S., Oh D.K., 1999. Effect of osmotic pressure of salt on erythritol production by *Pichia* sp. Food Science Biotechnol. 8, 73–77.
- Dzieniszewski G., 2009. Wybrane aspekty ekologiczne i ekonomiczne zasilania silników Diesla paliwami roślinnymi. Inż. Rol. 6, 45–52.
- Hanczakowski P., 2008. Wykorzystanie glicerolu pozostałego po produkcji biopaliw w żywieniu zwierząt gospodarskich. Wiad. Zoot. 2, 17–20.
- Hattori K., Suzuki T., 1974. Production of erythritol by *n*-alkane grown yeasts. Agr. Biol. Chem. 38, 581–586.
- Johnson D.T., Taconi K.A., 2007. The glycerin glut: options for the value-added conversion of crude glycerol resulting from biodiesel production. Environ Prog 26(4), 338–348.
- Kijora C., Bergner H., Kupsch R.D., Hagemann L., 1995. Glycerin als Futterkomponente in der Schweinemast. Arch. Tierernähr. 47, 345–360.
- Kim S.Y., Lee K.H., Kim J.H., Oh D.K., 1997. Erythritol production by controlling osmotic pressure in *Trigonopsis variabilis*. Biotechnol. Lett. 19 (8), 727–729.
- Lin S.J., Wen C.Y., Liao J.C., Chu W.S., 2001. Screening and production of erythritol by newly isolated osmophilic yeast-like fungi. Proc. Biochem. 36, 1249–1258.
- Lin S.J., Wen C.J., Wang P.M., Huang J.C., Wei C.L., Chang J.W., Chu W.S., 2010. High-level production of erythritol by mutants of osmophilic *Moniliella* sp. Proc. Biochem. 45 (6), 973–979.
- Lipińska E., Błazejak S., Markowski K., 2010. Koncepcja wykorzystania gliceryny odpadowej z produkcji biodiesla jako źródła węgla dla drożdży *Candida utilis* w kulturze mieszanej z bakteriami octowymi. Acta Scient. Polon., Biotechnol. 9, 3–14.
- Meher L.C., Vidya Sagar D., Naik S.N., 2006. Technical aspects of biodiesel production by transesterification – a review. Ren. Sust. Energy Rev. 10, 248–268.
- Moon H.J., Jeya M., Kim I.W., Lee J.K., 2010. Biotechnological production of erythritol and its applications. Appl. Microbiol. Biotechnol., 86, 1017–1025.
- Robak M., Baranowska K., Barszczewski W., Wojtatowicz M., 2005. RAPD jako metoda różnicowania i identyfikacji drożdży. Biotechnologia. 4, 142–155.
- Rymowicz W., Rywińska A., Marcinkiewicz M., 2009. High-yield production of erythritol from raw glycerol in fed-batch cultures of *Yarrowia lipolytica*. Biotechnol. Lett. 31, 377–380.
- Rymowicz W., Wojtatowicz M., Rywińska A., Kita A., 1996. Ciągła biosynteza kwasu cytrynowego z udziałem mutantów octanowych *Yarrowia lipolytica*. VI Ogólnokrajowa Konferencja Naukowa; Postępy inżynierii bioreaktorowej, Łódź, 24–26 września 1996.
- Rywińska A., Rymowicz W., Żarowska B., Skrzypiński A., 2009. Comparison of citric acid production from glycerol and glucose by different strains of *Yarrowia lipolytica*. World J Microbiol Biotechnol 26, 1217–1224.
- Rywińska A., Wojtatowicz M., Wielebińska A., 2003. Otrzymywanie mutantów fil' drożdży *Yarrowia lipolytica* do produkcji kwasu cytrynowego. Acta Scient Polon., Biotechnol. 2 (1–2), 11–20.
- Sawada K., Taki A., Yamakawa T., Seki M., 2009. Key role for transketolase activity in erythritol production by *Trichosporonoides megachiliensis* SN-G42. J. Biosci. Bioeng. 108, 385–390.
- Tomaszewska L., Rywińska A., Gładkowski W., 2012. Production of erythritol and mannitol by *Yarrowia lipolytica* yeast in media containing glycerol. J. Ind. Microbiol Biotechnol. 39(9), 1333–1343.
- Tomaszewska L., Rywińska A., Musiał I., Utecht M., Juszczyk P., Rymowicz W., Wojtatowicz M., Połomska X., 2011. Skrining szczepów drożdży *Yarrowia lipolytica* do biosyntezy erytrytolu z glicerolu. Acta Scient. Polon. Biotechnol. 10, 15–28.

- Ueda M., Yamagishi K., 1997. Method for producing erythritol. European Patent Application EP0770683.
- Yun J.W., Song S.K., 1994. Production of extracellular polyols in *Aureobasidium pullulans*. Biotechnol. Let. 16, 949–954.
- Wojtatowicz M., 1991. Studia nad biosyntezą kwasów cytrynowych przez szczep *Yarrowia lipolytica* A-101 i jego mutanty. Rozpr. Hab. 96, Wyd. AR Wrocław.
www.ebb-eu.org

SELECTION OF THE UV MUTANTS OF *YARROWIA LIPOLYTICA* YEAST FOR ERYTHRITOL BIOSYNTHESIS FROM GLYCEROL

Abstract. Twenty-four mutants in strain *Yarrowia lipolytica* Wratislavia K1 were obtained after mutagenesis induced by UV irradiation. The selection, on the basis of the growth ability on YNB medium containing erythritol, indicated nine strains with the size of colony surface similar to parent strain. In the 7-day shake-flasks experiment, in glycerol media, yeast produced from 10.3 to 16.6 g dm⁻³ of erythritol and from 11.5 to 17.9 g dm⁻³ of mannitol. For further studies in bioreactor cultures strains K1-UV20 and K1-UV21 were chosen. The highest concentration of erythritol was obtained by strain K1-UV21 on crude glycerol medium, where 78.7 g dm⁻³ of erythritol was produced corresponding to 0.49 g·g⁻¹ yield and 0.68 g dm⁻³h⁻¹ volumetric productivity. The analysis of phylogenetic similarity of based on RAPD-PCR method showed high similarity of the mutant strain Wratislavia K1-UV21 to parental strains of *Y. lipolytica*.

Key words: *Yarrowia lipolytica*, glycerol, erythritol, UV mutants

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 30.09.2012

Do cytowania – For citation: Rywińska A., Bąk M., Rakicka M., Tomaszewska L., Boruczkowski T., Lazar Z., Musiał I., Rymowicz W., 2012. Selekcja UV mutantów drożdży *Yarrowia lipolytica* do biosyntezy erytrytolu z glicerolu. Acta Sci. Pol. Biotechnol., 11 (3), 23–38.

SPIS TREŚCI CONTENTS

| | |
|---|--|
| Krzysztof Cybulski, Ludwika Tomaszewska, Anita Rywińska Dobór podłoża inokulacyjnego do produkcji ketokwasów przez drożdże <i>Yarrowia lipolytica</i> 5 Evaluation of seed culture medium to ketoacids production by <i>Yarrowia lipolytica</i> yeast | |
| Dorota Orczyk, Daria Szymanowska-Powałowska, Katarzyna Leja Microbiological conversion of pure and crude glycerol to 1,3-propanediol 15 Mikrobiologiczna konwersja czystego i odpadowego glicerolu do 1,3-propanodiolu | |
| Anita Rywińska, Monika Bąk, Magdalena Rakicka, Ludwika Tomaszewska, Tomasz Boruczkowski, Zbigniew Lazar, Izabela Musiał, Waldemar Rymowicz Selekcja UV mutantów drożdży <i>Yarrowia lipolytica</i> do biosyntezy erytrytolu 23 Selection of the UV mutants of <i>Yarrowia lipolytica</i> yeast for erythritol biosynthesis from glycerol | |