

ANITA RYWIŃSKA
 PIOTR JUSZCZYK
 ANNA KANCELISTA
 AGNIESZKA BIESIADECKA
 MAŁGORZATA ROBAK
 JOANNA NIEDBALSKA

Wydział Nauk o Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy, Wrocław

Produkcja lipaz i kwasu cytrynowego z glicerolu odpadowego przez drożdże *Yarrowia lipolytica*

Wstęp

Ze względu na niezwykle właściwości, drożdże *Yarrowia lipolytica* wykorzystywane są w wielu dziedzinach biotechnologii [1, 2]. Jednak ich praktyczne wykorzystanie obejmuje produkcję lipaz, które dzięki swojej różnorodności oraz stabilności (pH, temperatura, podłoża organiczne) są szeroko stosowane w różnych gałęziach przemysłu, między innymi w przemyśle chemicznym, kosmetycznym i spożywcym [3].

Dynamiczny rozwój przemysłu dostarcza dużych ilości odpadów oraz produktów ubocznych, z zagospodarowaniem których wiąże się wiele problemów gospodarczo-ekologicznych. Rozpoznanie zdolności enzymatycznych drożdży podczas biosyntezy kwasu cytrynowego (KC) może przyczynić się do poszerzenia gamy substratów stosowanych w tym procesie.

Celem niniejszej pracy była ocena aktywności lipolitycznej szczepu *Y. lipolytica* *Wratislavia 1.31* podczas biosyntezy KC z surowców odpadowych pochodzących z produkcji biodiesla.

Materialy i metody

Mikroorganizm. Szczep *Yarrowia lipolytica* *Wratislavia 1.31* pochodzący z kolekcji *Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego* we Wrocławiu.

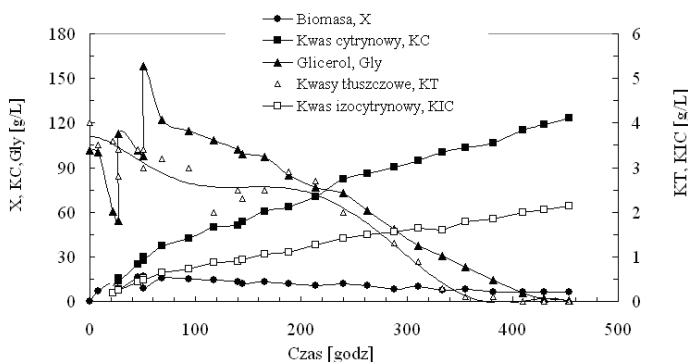
Podłoża. Podłoże inokulacyjne: podłoże YM z glicerolem. Podłoże produkcyjne GO (g/L): glicerol odpadowy – 233, NH_4Cl – 3, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 1, KH_2PO_4 – 0,2, ekstrakt drożdżowy – 1, woda wodociągowa. Podłoże produkcyjne GO+F [g/L]: glicerol odpadowy – 227, frakcja glicerynowa – 20, pozostałe składniki jak w podłożu GO. Surowce odpadowe pochodziły z produkcji biodiesla: glicerol odpadowy (SG BODDINS GmbH, Niemcy) oraz frakcja glicerynowa zawierająca 240 g/L glicerolu oraz około 680 g/L kwasów tłuszczowych.

Warunki prowadzenia hodowli. Hodowle inokulacyjne oraz produkcyjne w systemie *fed-batch* prowadzono zgodnie z metodyką według *Rywińskiej* i wsp. [4].

Metody analityczne. Kwasu izocytrynowy (KIC), glicerol (Gly), kwas cytrynowy (KC) oznaczano według *Rywińskiej* i wsp. [4]. Biomase i tłuszcz resztkowy oznaczano metodą wagową za *Musiał* i wsp. [5]. Aktywność lipolityczną zewnątrz- (U_Z) i wewnątrzkomórkową (U_W), wobec substratów: oliwy z oliwek (U_{ZO} , U_{WO}) oraz (w wybranych próbach) wobec syntetycznego trimaślanu glicerolu – tributyriny (U_{ZT}) oznaczano wg metodyki opisanej w pracy *Rywińskiej* i wsp. [6]. Reakcję enzymatyczną wobec syntetycznego maślanu p-nitrofenolu (U_{ZpNPF}) przeprowadzono zgodnie z procedurą dla EALL-Sigma [7]. Białko oznaczano metodą *Lowry'ego*.

Omówienie i dyskusja wyników

Produkcję KC w podłożu GO i GO+F prowadzono do wyczerpania substratów w podłożu. W podłożu GO stężenie biomasy wynosiło 20 g/L, KC 122 g/L, a ubocznie tworzony KIC 6,2 g/L (Tabl. 1). W procesie prowadzonym w podłożu GO+F drożdże od początku wykorzystywały glicerol i w niewielkim stopniu kwasy tłuszczowe (Rys. 1).



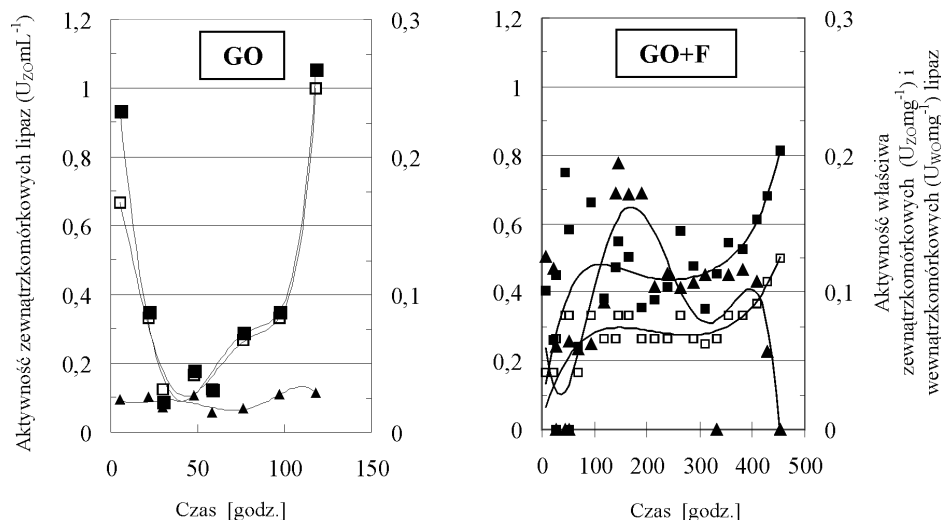
Rys. 1. Przebieg procesu biosyntezy kwasu cytrynowego przez szczep *Y. lipolytica* *Wratislavia 1.31* w hodowli *fed-batch* w podłożu z glicerolem odpadowym i frakcją glicerynową

Końcowe stężenie KC w hodowli z GO+F wynosiło 123,5 g/L. Wydajność KC (Y_{KC}) w obu hodowlach była podobna, i wynosiła około 0,62 g/g (Tabl. 1). Uzyskane w niniejszej pracy wartości tego parametru są wyższe od podawanych w literaturze, 0,42–0,56 g/g, dla procesów biosyntezy KC z glicerolu przez różne szczepy drożdży [8, 9].

Tablica 1
 Charakterystyka procesu biosyntezy kwasu cytrynowego z glicerolu odpadowego (GO) oraz glicerolu odpadowego z dodatkiem frakcji glicerynowej (GO+F) przez *Y. lipolytica* *Wratislavia 1.31*

Podłoże	Czas [h]	Biomasa X [g/L]	Kwas cytrynowy [g/L]	Kwas izocytrynowy [g/L]	Y_{KC} [g/g]	Q_{KC} [g/Lh]
GO	120	20	122	6,2	0,61	1,02
GO + F	453	6	123,5	2,13	0,62	0,27

Wzrost aktywności lipaz, oznaczanych wobec oliwy z oliwek, do wartości $1 U_{ZO} \text{ mL}^{-1}$ i $0,264 U_{ZO} \text{ mg}^{-1}$ obserwowano w hodowli GO po drugim zasileniu podłoża glicerolem (Rys. 2). Wewnątrzkomórkowa aktywność właściwa lipaz utrzymywała się przez cały czas procesu na podobnym poziomie, około $0,025 U_{WO} \text{ mg}^{-1}$.



Rys. 2. Biosynteza zewnątrzkomórkowych, $U_{ZO} \text{ mL}^{-1}$ (□), $U_{ZO} \text{ mg}^{-1}$ (■) i wewnątrzkomórkowych $U_{WO} \text{ mg}^{-1}$ (▲) lipaz przez szczep *Y. lipolytica Wratislavia 1.31* w hodowli (GO) i z glicerolem odpadowym z dodatkiem frakcji glicerynowej (GO+F)

ności względem tributyriny w zależności od zastosowanego w podłożu źródła węgla (od $2,1 U_{ZT} \text{ mL}^{-1}$ dla cytrynianu do $31,9 U_{ZT} \text{ mL}^{-1}$ dla oleju kukurydzianego). Zewnątrzkomórkowa aktywność właściwa w hodowli GO również była wysoka ($1,23 U_{ZT} \text{ mg}^{-1}$) (Tabl. 2). Dla porównania Corzo i Revah [11] uzyskali w swoich badaniach wartości od $1,1 U \text{ mg}^{-1}$ dla oleju sojowego, do $3,9 U \text{ mg}^{-1}$ dla glukozy. Aktywność oznaczana wobec maślanu p-nitrofenolu w hodowli GO wynosiła $2,8 \cdot 10^{-4} U_{ZpNPB} \text{ mL}^{-1}$ (Tabl. 2).

Podsumowując, należy stwierdzić, że glicerol odpadowy i glicerol odpadowy z dodatkiem frakcji glicerynowej miał istotny wpływ na biosyntezę kwasu KC jak i lipaz. Wykazano, że w podłożu z GO szczep *Wratislavia 1.31* produkuje lipazy o wyższej preferencji do hydrolizy wiązań estrowych utworzonych przez krótko łańcuchowy kwas masłowy obecny w tributyrinie i maślanie p-nitrofenolu, niż przez długłańcuchowe kwasy tłuszczowe obecne w oliwie z oliwek.

LITERATURA

Porównanie aktywności zewnątrzkomórkowych lipaz oznaczanych wobec pNPB (U_{ZpNPB}) oraz tributyriny (U_{ZT}) w hodowlach *fed-batch* prowadzonych w podłożach GO i GO + F

Podłoże	Aktywność zewnątrzkomórkowych lipaz oznaczana wobec:					
	Maślanu p-nitrofenolu		Trimaślanu glicerolu		Oliwy z oliwek	
	$U_{ZpNPB} \text{ mL}^{-1}$	$U_{ZpNPB} \cdot \text{mg}^{-1}$	$U_{ZT} \cdot \text{mL}^{-1}$	$U_{ZT} \cdot \text{mg}^{-1}$	$U_{ZO} \cdot \text{mL}^{-1}$	$U_{ZO} \cdot \text{mg}^{-1}$
GO	$2,8 \cdot 10^{-4}$	$7,4 \cdot 10^{-5}$	4,7	1,23	1	$0,26 \cdot 10^{-2}$
GO+F	0	0	0,7	$0,28 \cdot 10^{-2}$	0,33	$0,14 \cdot 10^{-2}$

Jak można zobaczyć na rys. 2, podczas hodowli GO+F, od około 100 do 350 h, zewnątrzkomórkowa aktywność lipolityczna utrzymywała się na stałym poziomie, po czym obserwowano jej wzrost do $0,5 U_{ZO} \text{ mL}^{-1}$ i $0,2 U_{ZO} \text{ mg}^{-1}$ na końcu procesu. Najwyższe aktywności enzymów związanych z komórką stwierdzono pomiędzy 140 a 188 h procesu, około $0,18 U_{WO} \text{ mg}^{-1}$. Fickers i wsp. [10] oraz Corzo i Revah [11] wykazały, że glicerol obecny w podłożu hamuje produkcję lipaz przez szczepy naturalne (dzikiego typu). Dla porównania, podczas biosyntezy KC w podłożu zawierającym olej rzepakowy, aktywność lipaz szczepu *Y. lipolytica* 187/1 utrzymywała się w przedziale $1000\text{--}1500 \mu\text{mol mL}^{-1}\text{h}^{-1}$ (co odpowiada $16,7\text{--}25 U_{ZO} \text{ mL}^{-1}$) [12]. Aktywność zewnątrzkomórkowych lipaz wobec tributyriny w ostatniej próbie z hodowli GO wynosiła $4,7 U_{ZT} \text{ mL}^{-1}$, a dla hodowli GO+F (355 h) była na poziomie $0,7 U_{ZT} \text{ mL}^{-1}$ (Tabl. 2). Jak wykazały badania Corzo i Revah [11], szczep *Y. lipolytica* 681 produkował lipazy o różnej aktyw-

1. G. Barth, C. Gaillardin: FEMS Microbiol. Rev. **19**, 219 (1997).
2. J. Spencer, A. Ragout de Spencer, C. Lalue: Appl. Microbiol. Biotechnol. **58**, 147 (2002).
3. J. Destain, D. Roblain, P. Thonart: Biotechnol. Lett. **19**, 2, 105 (1997).
4. A. Rywińska, W. Rymowicz, B. Żarowska, M. Wojtatowicz: Food Tech. Biot. **47**, 1 (2009).
5. I. Musiał, W. Rymowicz, A. Kita: Acta Sci. Pol. Biotechnol. **3**, 1-2, 75 (2004).
6. A. Rywińska, M. Piegza, D. Witkowska: Acta Sci. Pol. Biotechnol. **4**, 1-2, 43 (2005).
7. Enzymatic Assay of LIPOPROTEIN LIPASE, www.sigmaaldrich.com.
8. W.E. Levinson, C.P. Kurtzman, T.M. Kuo: Enzyme Microb. Technol. **41**, 292 (2007).
9. S. Papanikolaou, S. M. I. M., M. Komaitis, I. Marc, G. Aggelis: Bio-mass Bioeng. **32**, 1, 60 (2008).
10. P. Fickers, J. Nicaud, J. Destain, P. Thonart: Appl. Microb. Biotechnol. **63**, 136 (2003).
11. G. Corzo, S. Revah: Bioresource Technology **70**, 173 (1999).
12. S. Kamzolova, I. Morgunou, A. Aurich, O. Perevoznikova, N. Shishkanova, U. Stottmeister, T. Fionogenova: Food Technol. Biotechnol. **43**, 2, 113 (2005).