

## WSTĘPNY DOBÓR STĘŻENIA KOMPONENTÓW PODŁOŻA Z SACHAROZĄ DO BIOSYNTETY CYTRYNIANU ORAZ INWERTAZY PRZEZ *YARROWIA LIPOLYTICA* A-101-B56-5

Dariusz Żubrowski, Zbigniew Lazar, Robak Małgorzata

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

**Streszczenie.** Przeprowadzono próbę doboru stężenia składników podłoża sacharozowego w celu otrzymania cytrynianu i inwertazy z wykorzystaniem szczepu *Y. lipolytica* A-101-B56-5. Skład podłoży zaprojektowano w programie Design Expert 8. Hodowle w poszczególnych podłożach przeprowadzono systemem stacjonarnym w aparacie Bioscreen C. Najlepszy plon biomasy ( $OD_{420-580\text{ nm}} = 1,9$ ) uzyskano w podłożu z dużą ilością ekstraktu drożdżowego, najwyższą aktywność inwertazy zewnątrzkomórkowej (63,9 U/l) w podłożu o najwyższym stężeniu sacharozy, natomiast najwyższe stężenie cytrynianu (0,288 g/l) w podłożu o niskim stężeniu zarówno chlorku amonu, jak i ekstraktu drożdżowego (najwyższy stosunek węgla do azotu – C:N). Wykonane badania nie pozwoliły na wybór wspólnego podłoża do jednoczesnej biosyntezy wszystkich produktów, jednakże wskazały optymalne składy podłoży, które mogą być zastosowane w procesie biosyntezy wyżej wymienionych związków w hodowlach bioreaktorowych z wykorzystaniem szczepu *Y. lipolytica* A-101-B56-5 i sacharozy jako taniego substratu.

**Słowa kluczowe:** *Yarrowia lipolytica*, inwertaza, kwas cytrynowy, wzrost, drożdże, Bioscreen

### WSTĘP

Obecnie jednym z tańszych substratów o potencjalnym zastosowaniu przy planowaniu procesów przemysłowych jest sacharoza. Jest to główny składnik melasy, produktu odpadowego z jego rafinacji cukru [<http://pl.wikipedia.org/wiki/Melasa>]. Dzięki szczepu drożdży *Yarrowia lipolytica* nie mają zdolności do wykorzystywania sacharozy jako źródła węgla [Nicaud 2012]. Żeby ominąć ten limitujący czynnik, metodami inżynierii gene-

---

© Copyright by Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

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

tycznej skonstruowano szczepy produkujące invertazę – enzym hydrolizujący sacharozę do glukozy i fruktozy [Nicaud i in. 1989, Förster i in. 2007, Walczak i in. 2007]

Szczepy drożdży *Y. lipolytica* mogą być wykorzystane w wielu procesach biotechnologicznych. W przeszłości przemysłowo wykorzystywano je do produkcji SCP (białek pochodzenia mikrobiologicznego) i cytrynianu [Groenewald i in. 2013]. Obecnie firma Skotan produkuje, opierając się na *Y. lipolytica*, preparaty żywieniowe dla zwierząt [<http://www.skotansa.pl>], a chińska firma Baolinbao Biology Co., Ltd. z Shandong, erytrytol [<http://www.importgenius.com/shipments/baolinbao-biology.html>]. Drożdże te mogą także znaleźć zastosowanie w produkcji serów [Żarowska i in. 2004, Groenewald i in. 2013], w bioremediacji [Bankar i in. 2009, Żogała i in. 2013] oraz jako producenci heterologicznych białek [De Pourcq i in. 2012, Gasmi i in. 2011]. Intensywnie jest także badany proces biosyntezy cytrynianu i innych kwasów cyklu Krebsa oraz alkoholi wielowodorotlenowych (polioli) i lipidów [Papanikolaou i in. 2009, Rymowicz i in. 2009, Thevenieau i in. 2009, Rywińska i in. 2010, Tomaszewska i in. 2013]. Nie prowadzono natomiast badań nad intensyfikacją biosyntezy invertazy, cennego enzymu wykorzystywanego w cukiernictwie. Nie optymalizowano również procesów opierających się na transformantach *Y. lipolytica* z wklonowanym genem invertazy w produkcji cytrynianu czy biomasy z sacharozy lub melasy. Wzrost drożdży i biosynteza cytrynianu z hydrolizowanej i niehydrolizowanej melasy przez różne szczepy *Y. lipolytica* były już przedmiotem badań [Kautola i in. 1992, Wojtatowicz i in. 1997, Moeller i in. 2012, 2013]. Autorzy, pomimo prowadzenia badań ze szczepami *Y. lipolytica* mającymi gen invertazy z *S. cerevisiae*, nie analizowali tych procesów pod kątem biosyntezy invertazy. Z kolei w innych badaniach wykazano, że szczep *Y. lipolytica* A-101-B56-5 cechuje się zdolnością do biosyntezy invertazy (i cytrynianu) w podłożu zawierającym sacharozę, glicerol, glukozę lub fruktozę [Lazar i in. 2011, 2013]. Jednak do dziś nie podjęto badań nad optymalizacją składu podłoża sacharozowego do biosyntezy cytrynianu, invertazy i biomasy przez rekombinowane szczepy *Y. lipolytica* cechujące się zdolnością do hydrolizy sacharozy.

Celem badań, których wyniki zaprezentowano w niniejszej pracy, była ocena wpływu zmiany stężenia pięciu składników podłoża z sacharozą na wzrost biomasy invertazo-dodatniego szczepu *Y. lipolytica* A-101-B56-5 oraz biosyntezę cytrynianu i invertazy. Celem zminimalizowania kosztów wstępną optymalizację składu podłoża przeprowadzono w warunkach hodowli stacjonarnych w analizatorze mikrobiologicznym Bioscreen C.

## MATERIAŁY I METODY

**Szczep** *Y. lipolytica* A-101-B56-5 uzyskano poprzez transformację dzikiego szczepu *Y. lipolytica* A-101 kasetą drożdżową, zawierającą gen invertazy *suc2* (z *Saccharomyces cerevisiae*) pod kontrolą promotora XPR2 z fragmentami genu *ura3* na obu końcach i przygotowaną na podstawie plazmidu pINA302 [Walczak i in. 2007].

**Mikrohodowle** prowadzono w analizatorze Bioscreen C (Labsystems, Helsinki, Finlandia), umożliwiającym wykonanie równolegle 200 mikrohodowli oraz analizę wzrostu poprzez pomiar gęstości optycznej ( $OD_{420-580\text{ nm}}$ ). Do mikrostudzienek kasety wprowadzono 300  $\mu\text{l}$  podłoża (zateżonego 1,18 razy) o składzie podanym w tabeli 1.

Tabela 1. Skład podłoża do hodowli stacjonarnej w aparacie Bioscreen C  
 Table 1. Composition of media used for microcultures in Bioscreen C apparatus

Nr podłoża Medium No	Sacharoza [g/l] Saccharose	NH <sub>4</sub> Cl [g/l]	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> [g/l]	MgSO <sub>4</sub> × 7H <sub>2</sub> O [g/l]	YE* [g/l]
1.	100,00	7,50	0,10	5,00	0,30
2.	250,00	7,50	0,10	0,10	0,30
3.	250,00	0,50	5,00	5,00	0,30
4.	175,00	4,00	2,55	2,55	1,65
5.	100,00	0,50	5,00	0,10	0,30
6.	175,00	4,00	2,55	2,55	4,86
7.	250,00	7,50	0,10	5,00	3,00
8.	250,00	0,50	0,10	0,10	3,00
9.	250,00	0,50	5,00	5,00	3,00
10.	175,00	4,00	8,38	2,55	1,65
11.	100,00	7,50	0,10	0,10	3,00
12.	100,00	7,50	5,00	0,10	0,30
14.	100,00	0,50	5,00	5,00	3,00
17.	100,00	7,50	5,00	0,10	3,00
23.	100,00	0,50	0,10	5,00	3,00
24.	175,00	4,00	2,55	8,38	1,65
25.	250,00	0,50	0,10	0,10	0,30
26.	100,00	0,50	0,10	0,10	3,00
27.	250,00	0,50	5,00	0,10	0,30
28.	100,00	0,50	5,00	5,00	0,30
29.	100,00	7,50	0,10	0,10	0,30
30.	250,00	7,50	5,00	0,10	3,00
31.	250,00	7,50	0,10	0,10	3,00
32.	100,00	7,50	0,10	5,00	3,00
33.	250,00	0,50	5,00	0,10	3,00
34.	100,00	0,50	5,00	0,10	3,00
35.	250,00	7,50	5,00	0,10	0,30
36.	100,00	7,50	5,00	5,00	3,00
37.	250,00	7,50	5,00	5,00	3,00
38.	175,00	12,32	2,55	2,55	1,65
40.	100,00	0,50	0,10	0,10	0,30
43.	250,00	7,50	0,10	5,00	0,30
46.	250,00	0,50	0,10	5,00	0,30
47.	100,00	0,50	0,10	5,00	0,30
48.	250,00	7,50	5,00	5,00	0,30
49.	100,00	7,50	5,00	5,00	0,30
50.	250,00	0,50	0,10	5,00	3,00

\*YE ekstrakt drożdżowy – yeast extract

Na podstawie zaplanowanych dla każdego składnika wartości stężeń wyznaczono skład podłoża. Do wyznaczenia składu poszczególnych podłoży wykorzystano specjalistyczny program Design Expert 8 [[www.hearne.com.au/Software/Design-Expert](http://www.hearne.com.au/Software/Design-Expert)].

Podłoża zaszczerpiono 50  $\mu$ L hodowli inokulacyjnej szczepu *Y. lipolytica* A-101-B56-5 o wartości OD<sub>600 nm</sub> równej 0,25. Mikrokultura była prowadzona przez 96 godzin w 28°C przy intensywnym wstrząsaniu, a pomiar gęstości optycznej (OD<sub>420-580 nm</sub>) prowadzono co 20 min. Każdy wariant hodowli wykonano w pięciu powtórzeniach. Kontrolę czystości stanowiło 300  $\mu$ l podłoża bez inokulum. Do obserwacji krzywych wzrostu w trakcie prowadzenia hodowli zastosowano program BioLink (Labsystems, Helsinki, Finlandia).

### Oznaczanie zawartości cukrów i kwasu cytrynowego

Stężenie sacharozy, fruktozy, glukozy i kwasu cytrynowego oznaczano metodą HPLC w aparacie UltiMate3000 (Dionex) na kolumnie Animex HPX 87H połączonej z detektorem RI (detekcja cukrów) i UV (210 nm, detekcja kwasów) w temperaturze 35°C. Szybkość przepływu fazy ciekłej (0,01N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) wynosiła 0,6 ml/min. Zawartość kwasu cytrynowego, ubytek substratu (sacharozy) oraz przyrost i ubytek produktów (glukozy i fruktozy) obliczono z powierzchni pików, w odniesieniu do powierzchni standardów (tab. 2).

Tabela 2. Standardy użyte w HPLC  
Table 2. HPLC standards used in this study

Związek Substance	Stężenie Concentration [g/l]	Czas retencji Retention time [min]	Powierzchnia pików Peak area [ $\mu$ m <sup>2</sup> ]
Glukoza Glucose	5	8,330	271,25
Fruktoza Fructose	5	9,081	296,74
Sacharoza Saccharose	10	7,094	530,91
Cytrynian Citrate	10	7,701	364,22

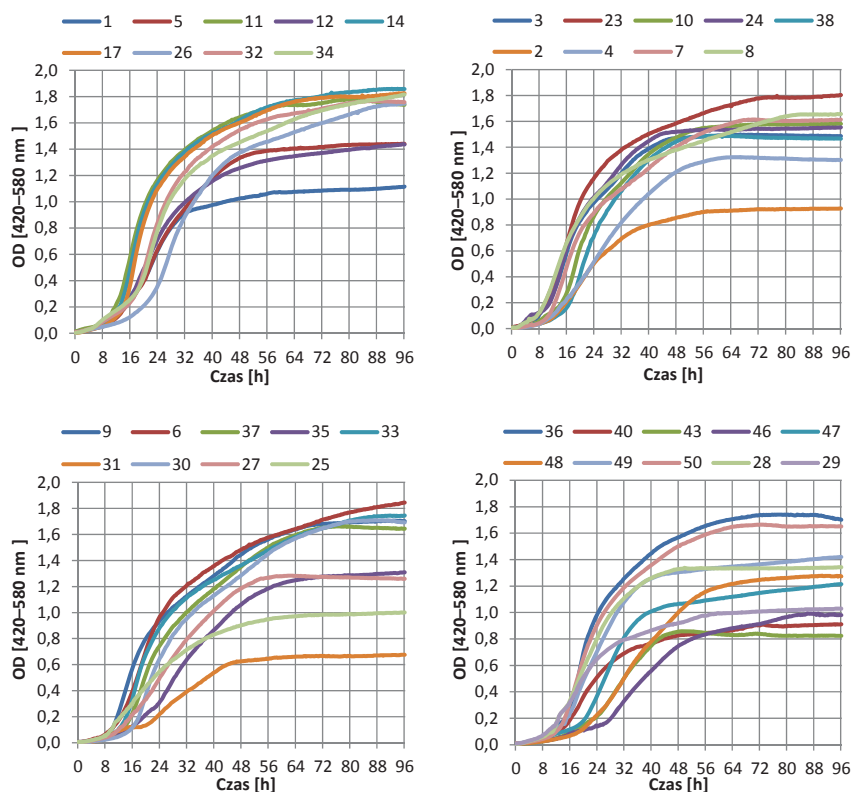
### Oznaczanie aktywności inwertazy

Przed przystąpieniem do oznaczenia aktywności zewnątrzkomórkowej inwertazy próbki dializowano w celu usunięcia pozostałości cukrów redukujących. Dializę prowadzono wobec 0,1 M buforu octanowego o pH = 5,0 w temperaturze 4°C przez 24 godziny. Aktywność inwertazy oznaczano wobec 0,1 M roztworu sacharozy jako substratu w sposób opisany przez Lazar i in. [2011]. Jednostkę aktywności enzymatycznej (U) zdefiniowano jako ilość enzymu powodującą uwolnienie 1  $\mu$ mola cukru redukującego w czasie 1 minuty w warunkach reakcji.

## WYNIKI I DYSKUSJA

W badaniach wykorzystano szczep *Y. lipolytica* A-101-B56-5, który na dwa geny inwertazy z drożdży *S. cerevisiae* [Lazar i in. 2011]. Szczep ten ma wysoką aktywność inwertazy, co uzasadnia podjęte badania nad optymalizacją składu podłoża w celu otrzymania cytrynianu i preparatu enzymu z tanich substratów sacharozowych, np. melasy czy cukru spożywczego.

Korzystając z programu Design Expert 8, zaprojektowano 50 podłoży, z których 37 wybrano w celu przeprowadzenia badań. Podłoża różniły się zawartością: sacharozy (100, 175 lub 250 g/l), chlorku amonu (0,5; 4; 7,5 lub 12,32 g/l), diwodorofosforanu potasu (0,1; 2,55; 5 lub 8,32 g/l), uwodnionego siarczanu magnezu (0,1; 2,55; 5 lub 8,38 g/l) oraz ekstraktu drożdżowego (0,3; 1,65; 3 lub 4,86 g/l) (tab. 1). Posłużyły one do analizy wzrostu szczepu *Y. lipolytica* A-101-B56-5 oraz biosyntezy przez niego cytrynianu i zewnątrzkomórkowej inwertazy z wykorzystaniem w mikrohodowlach stacjonarnych w analizatorze Bioscreen C. Krzywe wzrostu biomasy badanego szczepu w 37 różnych podłożach przedstawiono na rysunku 1. Uzyskane wartości gęstości optycznej ( $OD_{420-580\text{ nm}}$ ), będące miarą zawartości biomasy, wynosiły od 0,67 do 1,9. W 17 podłożach ilość biomasy była podobna ( $OD_{420-580\text{ nm}} = 1,6-1,9$ ). Podłoża te różniły się zawartością substratu, chlorku amonu, diwodorofosforanu potasu, uwodnionego siarczanu magnezu oraz ekstraktu drożdżowego. Niemniej wszystkie podłoża zawierały duże stężenie tego ostatniego składnika (od 1,65 do 4,86 g/l). Zatem głównym czynnikiem ograniczającym wzrost okazał się być ekstrakt drożdżowy. Natomiast nie był to jedyny czynnik. Analizując bowiem skład podłoży, w których uzyskano najniższy wzrost drożdży, stwierdzono, że we wszystkich jest niskie stężenie  $KH_2PO_4$  (0,1 g/l).

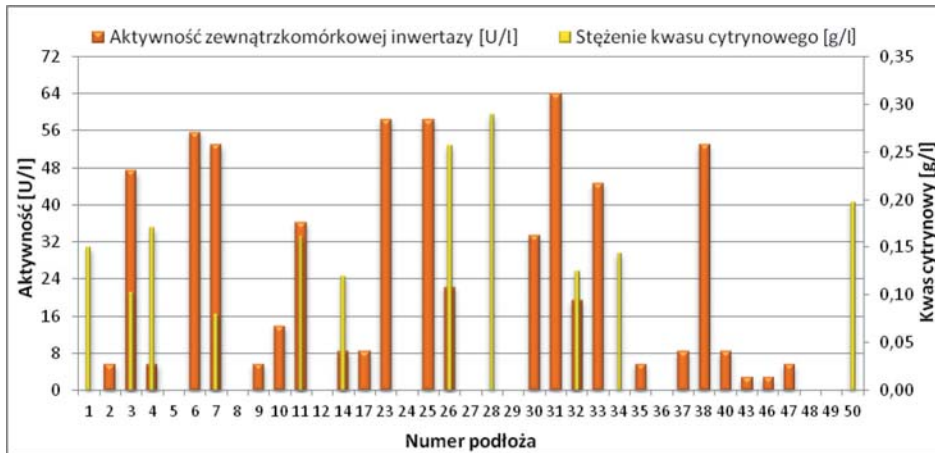


Rys. 1. Krzywe wzrostu *Y. lipolytica* A-101-B56-5 w aparacie Bioscreen C w 37 różnych podłożach

Fig. 1. Growth curves of *Y. lipolytica* A-101-B56-5 growing in 37 different media analyzed in Bioscreen C

Uzyskane wartości OD porównano z otrzymanymi w podobnych hodowlach różnymi szczepami *Y. lipolytica*. Dla badanego szczepu *Y. lipolytica* A-101-B56-5 najwyższą wartość tego parametru ( $OD_{420-580nm} = 1,9$ ) uzyskano w podłożu nr 14. Niewiele niższą wartość ( $OD_{420-580nm} = 1,78$ ) uzyskano dla szczepu *Y. lipolytica* A-101 KLON 10 w podłożu MMT z 1% glukozy [Walczak, Robak 2009]. Natomiast Śnieżewski i in. [2012] najwyższe OD ( $OD_{420-580nm} = 1,64$ ) otrzymali dla niemieckiego szczepu *Y. lipolytica* H222-S4, a dla szczepu *Y. lipolytica* A-101-B56-5, czyli badanego także w tej pracy, zanotowali niskie OD ( $OD_{420-580nm} = 1,59$ ). Należy jednak pamiętać, że podłoże MMT jest dobrze zdefiniowane, ale z dodatkiem 1% źródeł węgla służy raczej do analizy zdolności utylizacji danego substratu lub wpływu pH czy induktorów wzrostu (witamin, peptonu itp.) i nie umożliwia obfitego wzrostu biomasy drożdży [Robak 2007]. Jednak również w tej pracy w wielu podłożach uzyskano niski plon biomasy. Wartości  $OD_{420-580nm}$  poniżej 1,0 uzyskano w 4 podłożach (nr 2, 31, 40, 43). Zawierały one niskie stężenie  $KH_2PO_4$  (0,1 g/l). Najmniej biomasy ( $OD_{420-580nm} = 0,67$ ) uzyskano w hodowli *Y. lipolytica* A-101-B56-5 w podłożu nr 31, w którym jednocześnie zanotowano najwyższą aktywność inwertazy (rys. 2). Wyniosła ona 63,9 U/l. Tylko nieznacznie niższe aktywności (48–58 U/l) odnotowano w 6 podłożach (nr 3, 6, 7, 23, 25, 38), dla których wszystkie wartości stężeń składników były różne. Porównując stężenia składników dwóch podłoży (nr 23 i 25), w których aktywność enzymu była identyczna, wydaje się, że niskie stężenie substratu w pierwszym z nich (100 g/l) jest rekompensowane wyższym stężeniem  $MgSO_4 \times 7H_2O$  (odpowiednio 5 i 0,1 g/l, w podłożu nr 23 i 25) i ekstraktu drożdżowego (odpowiednio 3 i 0,3 g/l). Z kolei w 13 podłożach (nr 1, 5, 8, 12, 24, 27, 28, 29, 34, 36, 48, 49 i 50) nie zanotowano aktywności inwertazy zewnątrzkomórkowej pomimo zadowalającego wzrostu drożdży. Zatem minimalna aktywność (nieudająca się zmierzyć) była wystarczająca do hydrolizy sacharozy w podłożu. Porównując dwa podłoża o podobnym składzie (nr 8 i 23), z wyjątkiem ekstraktu drożdżowego, w których odpowiednio nie wykazano i wykazano aktywność inwertazy, można przypuszczać, że to czynniki wzrostu obecne w ekstrakcie drożdżowym wpłynęły na poziom aktywności enzymu. Nie jest to jednak jednoznaczne, bowiem porównując dwa kolejne podłoża (nr 8 i 25), które różniły się tylko zawartością YE (odpowiednio 3 i 0,3 g/l), wykazano aktywność inwertazy w podłożu o niskim stężeniu ekstraktu. Niestety, z powodu małej ilości biomasy powstającej w hodowlach typu Bioscreen C, nie oznaczano aktywności inwertazy wewnątrzkomórkowej. W hodowlach bioreaktorowych tego szczepu Lazar i in. [2011] uzyskali zdecydowanie wyższą aktywność inwertazy (3253 U/l).

W niektórych podłożach nie wykazano aktywności inwertazy zewnątrzkomórkowej, drożdże nagromadziły jednak kwas cytrynowy (podłoża nr 1, 28, 34, 50). Stężenie wyprodukowanego przez drożdże kwasu w poszczególnych podłożach było bardzo niskie. Najwyższy wynik – 0,288 g/l zanotowano w hodowli nr 28. Ilość cytrynianu powyżej 0,15 g/l odnotowano w 5 podłożach (nr 4, 11, 26, 28, 50). Podłoża różniły się zawartością wszystkich badanych składników. Natomiast w większości podłoży po zakończonej hodowli nie odnotowano obecności kwasu cytrynowego (podłoża nr 2, 6, 9, 17, 23, 25, 30, 31, 35, 37, 38, 40, 43, 46, 47). W każdym przypadku, z wyjątkiem podłoży nr 25 i 40, stężenie co najmniej dwóch składników (poza substratem) było wysokie. Nie jest to jednak jednoznaczna zależność. W podłożach nr 28 i 40, w których drożdże odpowiednio nagromadziły lub nie KC, różnice dotyczyły zawartości  $MgSO_4 \times 7H_2O$  i  $KH_2PO_4$ . Wysokie stężenie tych składników (5 g/l) było w podłożu, w którym stwierdzono obecność kwasu cytrynowego.



Rys. 2. Biosynteza cytrynianu i inwertazy przez *Y. lipolytica* A-101-B56-5 w warunkach hodowli w aparacie Bioscreen C w 37 różnych podłożach

Fig. 2. Biosynthesis of citric acid and invertase by *Y. lipolytica* A-101-B56-5 growing in 37 different media cultivated in Bioscreen C

Dużo wyższe wartości stężenia cytrynianu uzyskano w hodowlach bioreaktorowych tego samego szczepu [Lazar i in. 2011]. Badacze uzyskali 57,15 g/l kwasu cytrynowego z wydajnością 0,60 g/g substratu. Wysokie stężenie cytrynianu zanotowali również Förster i in. [2007] w podłożu z sacharozą, z użyciem niemieckiego szczepu *Y. lipolytica* H222-S4 T5 z wklonowanym genem inwertazy. W hodowli z okresowym zasilaniem uzyskali 140 g/l kwasu cytrynowego z wydajnością równą 0,820 g/g. Także Moeller i in. [2012] w podobnym procesie, bazującym na szczepie *Y. lipolytica* H222-S4(p67ICL1) T5, uzyskali 80 g/l cytrynianu z wydajnością 0,57 g/g i przy wysokiej produktywności 1,1 g/l/h. Różnice w ilości nagromadzonego kwasu cytrynowego w mikrohodowli i systemach hodowli w bioreaktorze są najprawdopodobniej związane z niemożliwością uzyskania identycznych warunków podczas prowadzenia procesu. Szczególnie w odniesieniu do natlenienia i stabilizacji pH. Uzyskane w tej pracy wyniki będą przydatne przy doborze podłoża w badaniach prowadzonych w bioreaktorach. Niekorzystne podłoża (warunkujące niski wzrost, niską produkcję cytrynianu i inwertazy) mogą na tym etapie zostać wyeliminowane z badań, co znacznie ograniczy liczbę podłoży do przetestowania w skali bioreaktorowej, istotnie zmniejszając koszty badań i przyspieszając ustalenie optymalnego składu podłoża.

Mikroorganizmy, które szeroko stosuje się do otrzymywania inwertazy, to drożdże *S. cerevisiae*. Szczep *S. cerevisiae* GCA-II (modyfikowany genetycznie) cechuje się aktywnością równą 107 400 U/l [Ul-Haq, Ali 2005, 2007]. Wysoką aktywność inwertazy wykazują także niektóre gatunki grzybów strzępkowych. Stosując powtórzeniową hodowlę okresową z immobilizowanymi komórkami *Aspergillus japonicus*, otrzymano 42 860 U/l inwertazy [Mussatto i in. 2009]. Inny szczep wyizolowany z plastrów miodu – *Aspergillus* ssp. M1, według badań Patil i in. [2012] w podłożu z sacharozą, ma wysoką aktywność inwertazy, równą 182 250 U/l. Natomiast dodanie do pożywki azotanu sodu (1%) powoduje wzrost aktywności do wartości 233 270 U/l. W przypadku szczepu *Y. lipolytica* A-101-B56-5 zagęszczony preparat inwertazy uzyskany z hodowli bioreak-

torowej cechował się jeszcze wyższą aktywnością inwertazy, równą 1 849 210 U/l [Lazar i in. 2011]. Zatem różnice w ilości nagromadzonego enzymu, podobnie jak kwasu cytrynowego, są najprawdopodobniej związane z niemożliwością uzyskania identycznych warunków hodowli w mikroanalizatorze Bioscreen C i w bioreaktorze.

Interesujące mogą okazać się wyniki dotyczące aktywności inwertazy oraz nagromadzonego kwasu cytrynowego przez szczep *Y. lipolytica* A-101-B65-5 w hodowlach bioreaktorowych opierających się na podłożach zdefiniowanych w tej pracy jako optymalne dla poszczególnych produktów. Najwyższy plon biomasy uzyskano w podłożu nr 14 ( $OD_{420-580\text{ nm}} = 1,9$ ), najwyższą aktywność inwertazy zewnątrzkomórkowej w podłożu nr 31 (63,9 U/l), natomiast najwyższe stężenie cytrynianu w podłożu nr 28 (0,288 g/l). Warto także zaznaczyć, że próbę optymalizacji podłoża z wykorzystaniem programu Design Expert 8 w kierunku jednoczesnej biosyntezy inwertazy i cytrynianu podjęto po raz pierwszy.

## PIŚMIENNICTWO

- Bankar A.V., Kumar A.R., Zinjarde S.S., 2009. Environmental and industrial applications of *Yarrowia lipolytica*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 84: 847–865.
- De Pourcq K., Tiels P., Van Hecke A., Geysens S., Vervecken W., Callewaert N., 2012. Engineering *Yarrowia lipolytica* to produce glycoproteins homogeneously modified with the universal Man3GlcNAc2 N-Glycan core. PLoS ONE 7(6), e39976.
- Förster A., Aurich A., Mauersberger S., Barth G., 2007. Citric acid production from sucrose using a recombinant strain of the yeast *Yarrowia lipolytica*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 75 (6), 1409–1417 (doi:10.1007/s00253-007-0958-0).
- Gasmi N., Fudalej F., Kallel H., Nicaud J.M., 2011. A molecular approach to optimize hIFN  $\alpha 2b$  expression and secretion in *Yarrowia lipolytica*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 89 (1), 109–119 (doi:10.1007/s00253-010-2803-0).
- Groenewald M., Boekhout T., Neuveglise C., Gaillardin C., van Dijck W.W., Wyss M., 2013. *Yarrowia lipolytica*: safety assessment of an oleaginous yeast with a great industrial potential. Crit. Rev. Microbiol. Early Online, 1–20 (doi: 10.3109/1040841X.2013.770386).
- <http://pl.wikipedia.org/wiki/Melasa>
- <http://www.importgenius.com/shipments/baolinbao-biology.html>
- <http://www.skotansa.pl>
- Kautola H., Rymowicz W., Linko Y.Y., Linko P., 1992. The utilisation of beet molasses in citric acid production with yeast. Sci. Aliments 12(3), 383–392.
- Lazar Z., Rossignol T., Verbeke J., Crutz-Le Coq A.M., Nicaud J.M., Robak M., 2013. Optimized invertase expression and secretion cassette for improving *Yarrowia lipolytica* growth on sucrose for industrial applications. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. (doi: 10.1007/s10295-013-1323-1).
- Lazar Z., Walczak E., Robak M., 2011. Simultaneous production of citric acid and invertase by *Yarrowia lipolytica* SUC + transformants. Biores. Technol., 102 (13), 6982–6989.
- Möeller L., Zehnsdorf A., Aurich A., Barth G., Bley T., Strehlitz B., 2013. Citric acid production from sucrose by recombinant *Yarrowia lipolytica* using semicontinuous fermentation. Eng. Life Sci., 13, 163–171.
- Möeller L., Zehnsdorf A., Aurich A., Bley T., Strehlitz B., 2012. Substrate utilization by recombinant *Yarrowia lipolytica* growing on sucrose. Appl. Microbiol. Biotechnol., 93 (4), 1695–1702 (doi:10.1007/s00253-011-3681-9).



- Mussatto S.I., Aguilar C.N., Rodrigues L.R., Teixeira J.A., 2009. Fructooligosaccharides and b-fructofuranosidase production by *Aspergillus japonicus* immobilized on lignocellulosic materials. *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, 59, 76–81.
- Nicaud J.M., 2012. *Yarrowia lipolytica*. *Yeast*. 29(10), 409–418 (doi:10.1002/yea.2921).
- Nicaud J.M., Fabre E., Gaillardin C., 1989. Expression of invertase activity in *Yarrowia lipolytica* and its use as a selective marker. *Curr. Genet.*, 16 (4), 253–260.
- Patil M., Bhamre R., Patil U., 2012. Invertase production from *Aspergillus ssp* M1 isolated from honeycomb. *Intern. J. Appl. Biores.*, 4, 1–5.
- Papanikolaou S., Chatzifragkou A., Fakas S., Galiotou-Panayotou M., Komaitis M., Nicaud J.M., Aggelis G., 2009. Biosynthesis of lipids and organic acids by *Yarrowia lipolytica* strains cultivated on glucose. *Eur. J. Lip. Sci. Technol.*, 111(12), 1221–1232 (doi:10.1002/ejlt.200900055).
- Robak M., 2007. *Yarrowia lipolytica* specific growth rate on acetate medium supplemented with glucose, glycerol or ethanol. *Acta Sci. Pol. Biotechnol. Biotechnologia*, 6(1), 23–31.
- Rymowicz W., Rywinska A., Marcinkiewicz M., 2009. High-yield production of erythritol from raw glycerol in fed-batch cultures of *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol. Lett.*, 31(3), 377–380 (doi:10.1007/s10529-008-9884-1).
- Rywinska A., Rymowicz W., Żarowska B., Skrzypinski A., 2010. Comparison of citric acid production from glycerol and glucose by different strains of *Yarrowia lipolytica*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 26(7), 1217–1224 (doi:10.1007/s11274-009-0291-0).
- Śnieżewski L., Walczak E., Lazar Z., Robak M., 2012. Low Peptone Dose as Inductor of Alkaline Protease Promoter Used for Invertase Gene Expression in *Yarrowia lipolytica*. *J. Life Sci.*, 6, 1100–1108.
- Thevenieau F., Gaillardin C., Nicaud J.M., 2009. Applications of the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*. In *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications*, Satyanarayana T., Kunze G. (eds). Springer, Netherlands, 589–613.
- 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 (doi:10.1007/s10295-012-1145-6).
- Ul-Haq I., Ali S., 2005. Invertase production from a hyperproducing *Saccharomyces cerevisiae* strain isolated from dates. *Pak. J. Bot.*, 37, 749–759.
- Ul-Haq I., Ali S., 2007. Kinetics of invertase production by *Saccharomyces cerevisiae* in batch culture. *Pak. J. Bot.*, 39, 907–912.
- Walczak E., Robak M., 2009. Growth on sucrose of *Yarrowia lipolytica* yeasts clones with invertase gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Acta Sci. Pol. Biotechnol. Biotechnologia*, 8(4), 25–36.
- Walczak E., Robak M., Mauersberger S., 2007. Gene disruption, transformants selection and physiologic properties of *Yarrowia lipolytica* A101 clones. 8<sup>th</sup> International Symposium on Biocatalysis and Biotransformations – BIOTRANS 2007. 08-13.07.2007b, Oviedo, Hiszpania.
- Wojtatowicz M., Rymowicz W., Robak M., Żarowska B., Nicaud J.M., 1997. Kinetics of cell growth and citric acid production by *Yarrowia lipolytica* Suc<sup>+</sup> transformants in sucrose media. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 6(4), 49–54.
- Żarowska B., Wojtatowicz M., Połomska X., Juszczyk P., Chrzanowska J., 2004. Factors affecting killer activity of some yeast species occurring in Rokpol cheese. *Folia Microbiol.*, 49, 713–717.
- Żogała B., Mendecki M.J., Zuberek W.M., Robak M., 2012. Application of self potential method in the area contaminated with oil derivatives. *Acta Geodyn. Geomater*, 9, 179–189.
- www.hearne.com.au/Software/Design-Expert.

## PRELIMINARY CHOISE OF COMPONENTS CONCENTRATION OF SACHAROSE MEDIUM FOR BIOSYNTHESIS OF CITRATE AND INVERTASE BY *YARROWIA LIPOLYTICA* A-101-B56-5

**Abstract.** Influence of media components concentration was carried out for the evaluation of biosynthesis of citrate and invertase by *Y. lipolytica* strain A-101-B56-5 from sucrose as a cheap substrate. The concentration of components was designed in the Design Expert 8 software. All experiments were performer as batch cultures using microtiter plates in Bioscreen C apparatus. Among 37 media of different composition (1) the highest amount of biomass ( $OD_{420-580\text{ nm}} = 1.9$ ) was obtained in the medium with high amount of yeast extract, (2) the highest extracellular invertase activity (63.9 U/l) in the medium with the highest sucrose concentration, (3) the highest concentration of citrate (0.288 g/l) in medium where low concentration of both ammonium chloride and yeast extract were used (the highest carbon to nitrogen ratio – C/N). No common medium was selected for simultaneous biosynthesis of all analyzed products. However, the optimum compositions of media for separate processes were obtained and may be used during biosynthesis of the compounds of interest in the bioreactor cultures using *Y. lipolytica* A-101-B56-5 strain and sucrose as a cheap substrate.

**Key words:** *Yarrowia lipolytica*, invertase, citric acid, growth, yeasts, Bioscreen

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 30.09.2013

Do cytowania – For citation: Żubrowski D., Lazar Z., Robak M., 2013. Wstępny dobór stężenia komponentów podłoża z sacharozą do biosyntezy cytrynianu oraz inwertazy przez *Yarrowia Lipolytica* A-101-B56-5. Acta Sci. Pol. Biotechnol., 12 (3), 31–40.