

WPŁYW PH PODŁOŻA HODOWLANEGO ORAZ GLICEROLU JAKO ŹRÓDŁA WĘGLA NA BIOSYNTEZĘ POLIMERÓW ŚCIANY KOMÓRKOWEJ DROŻDŻY *CANDIDA UTILIS* I *KLUYVEROMYCES FRAGILIS*

Anna Bzducha-Wróbel, Stanisław Błażejczak,
Lidia Stasiak-Różańska

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Streszczenie. Celem badań było określenie możliwości wykorzystania glicerolu w hodowli drożdży *Candida utilis* oraz *Kluyveromyces fragilis* ukierunkowanej na biosyntezę β -glukanu i/lub mannoprotein tworzących strukturę ściany komórkowej tych grzybów. Preparaty ścian uzyskiwano na drodze autolizy komórek drożdży. Poddawano je następnie frakcjonowaniu w warunkach alkalicznych na poszczególne polisacharydy.

Stwierdzono zróżnicowanie zawartości $\beta(1,3)$ -/ $\beta(1,6)$ -glukanów i mannoprotein w ścianach badanych drożdży, zależne od szczepu, stężenia glicerolu oraz pH podłoża hodowlanych. Istotne zwiększenie zawartości cukrów ogółem i $\beta(1,3)$ -/ $\beta(1,6)$ -glukanów w ścianie drożdży *Candida utilis* ATTC 9950 odnotowano po hodowli w podłożu o pH 4,0 zawierającym 2% glicerolu. W preparatach ścian omawianego szczepu stwierdzono wówczas około 75% cukrów ogółem i około 53% $\beta(1,3)$ -/ $\beta(1,6)$ -glukanu. Drożdże *Kluyveromyces fragilis* R11 okazały się lepszym źródłem mannoprotein. W preparatach komórek z podłoża o pH 7, zawierających 3 lub 5% glicerolu, odnotowano około 30,5% tych polimerów.

Słowa kluczowe: ściana komórkowa drożdży, β -glukany, mannoproteiny, glicerol, *Candida*, *Kluyveromyces*

WSTĘP

Ściana komórkowa drożdży stanowi przeciętnie ok. 20–30% s.s. biomasy komórkowej. Jest to uzależnione od gatunku drożdży, warunków wzrostu i wieku hodowli [Nguyen i in. 1998, Kim i Yun 2006]. Zbudowana jest z kompleksu kowalencyjnie połączonych polisacharydów, do których należą: rozpuszczalny w wodzie i zasadach α -mannan, występujący w połączeniu z białkami (mannoproteiny), rozpuszczalny w zasadach β -glukan oraz nierozpuszczalny w alkaliach β -glukan związany z chityną [Kapteyn i in. 1999]. Mannoproteiny stanowią 20–50% s.s. ściany komórkowej drożdży, podczas gdy β -glukan 30–60% [Nguyen i in. 1998, Kapteyn i in. 1999, Kath i Kulicke 1999, Křížková i in. 2001, Klis i in. 2002, Bowman i Free 2006]. W ścianie drożdży dominuje $\beta(1,3)$ -glukan. Udział tego polimeru w całkowitej zawartości glukanów wynosi 65–90% [Kath i Kulicke 1999, Bowman i Free 2006]. Niskocząsteczkowy, ale silnie rozgałęziony i rozpuszczalny w wodzie $\beta(1,6)$ -glukan stanowi ok. 10–20% polimerów glukozy [Bowman i Free 2006]. W ścianie drożdży występuje również chityna, której udział wynosi około 1–2%. Zawartość poszczególnych polimerów ściany, stopień polimeryzacji cząsteczek i ich struktura chemiczna są cechą indywidualną każdego szczepu, zależną od warunków wzrostu i wieku hodowli [Aguilar-Uscanga i François 2003, Kim i Yun 2006].

Polisacharydy oraz glikoproteiny pozyskiwane ze ścian komórkowych drożdży wykazują wiele właściwości bioaktywnych w organizmie ludzi i zwierząt. Podkreśla się ich rolę w stymulacji odpowiedzi immunologicznej, działanie przeciwdrobnoustrojowe, prebiotyczne, przeciwtoksyczne, przeciwmutagenne, przeciwrakowe, przeciwutleniające, obniżające poziom cholesterolu i trójglicerydów we krwi oraz stymulację syntezy kolagenu [Křížková i in. 2001, Thanardkit i in. 2002, Chen i Seviour 2007, Kogan i Kocher 2007, Soltanian i in. 2007, Ganner i in. 2010]. Ze względu na właściwości emulgujące, zdolność żelowania, wiązania wody i tłuszczu, prebiotyczność i właściwości powłokotwórcze polimery strukturalne ściany drożdży znajdują również zastosowanie technologiczne [Laroche i Michaud 2007, Novák i in. 2012].

Aguilar-Uscanga i François [2003] potwierdzili, że zawartość β -glukanów i mannanu w ścianie grzybów jednokomórkowych jest silnie związana z warunkami wzrostu. Na biosyntezę polisacharydów ściany drożdży wpływają między innymi rodzaj źródła węgla i azotu, pH środowiska, temperatura, stopień natlenienia pożywki, a także faza wzrostu komórek oraz sposób prowadzenia hodowli.

Właściwości prozdrowotne i technologiczne polisacharydów drożdży skłaniają do prowadzenia badań nad biosyntezą składników ściany komórkowej tych mikroorganizmów, co jest istotą możliwości ich pozyskiwania na skalę przemysłową.

Preparaty β -glukanu oraz mannoprotein otrzymywane są głównie z odpadowych drożdży browarniczych [Thanardkit i in. 2002, Salamon i in. 2011]. Polimery izolowane ze ścian komórkowych innych drożdży mogą charakteryzować się różnym stopniem polimeryzacji i rozgałęzienia cząsteczki. Są to determinanty właściwości chemicznych, fizycznych i biologicznych β -glukanów i mannoprotein [Bohn i BeMiller 1995]. Z tego powodu praktyczne wykorzystanie elementów strukturalnych ścian komórkowych drożdży zależy od gatunku, a nawet szczepu grzybów. Poszukiwanie nowych źródeł tych składników ściany komórkowej oraz próby zwiększania ich zawartości w biomase drożdży są zatem uzasadnione.

Celem przeprowadzonych badań było określenie możliwości wykorzystania glicerolu jako źródła węgla w zależności od pH podłoża w hodowli drożdży *Candida utilis* oraz *Kluyveromyces fragilis* ukierunkowanej na biosyntezę polimerów strukturalnych ściany komórkowej (β -glukanu i/lub mannoprotein). Glicerol jest głównym produktem ubocznym powstającym podczas produkcji biodiesla. Wzrost produkcji biopaliwa przyczynia się do powstawania coraz większych ilości frakcji glicerolowej i wiąże się z potrzebą poszukiwania alternatywnych metod jej utylizacji [Da Silva i in. 2009, Lipińska i in. 2010].

MATERIAŁ I METODY

Materiał biologiczny

Materiałem badawczym były dwa szczepy drożdży: *Candida utilis* ATTC 9950 i *Kluyveromyces fragilis* R11 pochodzące z kolekcji czystych kultur Zakładu Biotechnologii i Mikrobiologii SGGW w Warszawie.

Podłoża i warunki wzrostu

Hodowle doświadczalne badanych drożdży prowadzono w podłożu kontrolnym YPD, o składzie [$\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$]: pepton – 20, glukoza – 20 i ekstrakt drożdżowy – 10 oraz w podłożach modelowych, w których glukozę zastąpiono glicerolem w stężeniach 2, 3 i 5%. Wszystkie podłoża przygotowywano w trzech wariantach pH: 4,0; 5,0 i 7,0. Inoculum drożdży namnażano w podłożu YPD o pH 5,0 przez 20 godzin w temperaturze 28°C. Po tym czasie hodowlę wirowano (3200 g/21°C/10 min), otrzymaną biomasę drożdży dwukrotnie przepłukiwano jałową wodą destylowaną (za każdym razem wirując), a następnie zawieszano w 80 cm^3 jałowej wody. Hodowle drożdży rozpoczynano dodając do podłoża (90 cm^3) po 10 cm^3 inoculum drożdży. Namnażanie biomasy prowadzono przez 24 godziny w temperaturze 28°C w wytrząsarce o posuwisto-zwrotnym trybie pracy (200 cykli/min). Wszystkie hodowle przeprowadzono w trzech seriach badań.

Oznaczenie plonu biomasy drożdży z hodowli doświadczalnych

Plon biomasy drożdży oznaczano po 24 godzinach hodowli w podłożach doświadczalnych. W tym celu odwirowywano 10 cm^3 hodowli (15 500 g/10 min), uzyskaną biomasę płukano dwukrotnie wodą dejonizowaną, po czym suszono w temperaturze 105°C do uzyskania stałej masy. Plon biomasy wyrażano w gramach suchej substancji drożdży w przeliczeniu na dm^3 podłoża hodowlanego [$\text{g}_{\text{s.s.}}\cdot\text{dm}^{-3}$].

Otrzymywanie preparatów ścian komórkowych badanych drożdży

Preparaty ścian komórkowych badanych drożdży z hodowli doświadczalnych uzyskiwano na drodze 24-godzinnej autolizy komórek w temperaturze 55°C [Thanardkit i in. 2002]. Zdezintegrowane komórki odwirowywano (15 500 g/4°C/15 min) i pięciokrotnie przemywano jałową wodą dejonizowaną, intensywnie mieszając na worteksie w celu wypłukania składników cytozolu. Przyjęto założenie, że odwirowane osady

zawierały fragmenty ścian komórkowych drożdży, które w kolejnym etapie suszono (80°C/24 h). W otrzymanych preparatach ścian komórkowych oznaczano zawartość cukrów ogółem, β -glukanów i mannoprotein.

Oznaczanie zawartości cukrów ogółem, β -glukanu i mannoprotein w preparatach ścian komórkowych badanych drożdży

Otrzymane preparaty ścian komórkowych drożdży poddawano frakcjonowaniu na poszczególne polisacharydy strukturalne, tj. $\beta(1,3)$ -glukan, $\beta(1,6)$ -glukan oraz mannoproteiny zgodnie z procedurą opisaną przez Bzduchę-Wróbel i innych [2013]. W skrócie, pierwszym etapem procedury było wydzielenie polimerów rozpuszczalnych w zasadach – frakcja 1 zawierająca mannoproteiny oraz $\beta(1,3)$ -/ $\beta(1,6)$ -glukan niezwiązany z chityną. Równocześnie uzyskiwano frakcję 2 składającą się z polisacharydów nierozpuszczalnych w zasadach: $\beta(1,3)$ - i $\beta(1,6)$ -glukan związane z chityną. W tym celu przeprowadzano trzykrotną ekstrakcję w warunkach alkalicznych (3% NaOH) w temperaturze 75°C [Liu i in. 2008]. Glukany rozpuszczalne w zasadach wydzielano z supernatantu otrzymanego po ekstrakcji zasadowej (15 500 g/15 min), stosując neutralizację lodowym kwasem octowym – frakcja 3 [Fleet i Manners 1976, Magnelli i in. 2002]. Następnie z supernatantu wytrącono mannoproteiny (frakcja 4), stosując 96-procentowy etanol (4°C/24 h), po czym osad odwirowywano [Magnelli i in. 2002]. Frakcje polimerów nierozpuszczalne w zasadach poddawano trawieniu enzymatycznemu preparatem Zymoliazy 20T (MP Biomedicals LLC) [Magnelli i in. 2002, Orłowski i in. 2007]. Trawienie enzymatyczne prowadzono w temperaturze 37°C przez 24 godziny, stosując roztwór enzymu o stężeniu 5 mg·cm⁻³ przygotowany w 0,01 M buforze TRIS-HCl o pH 7,4. Po hydrolizie osad (frakcja 5) odwirowywano (15 500 g/15 min), a supernatant poddawano 24-godzinnej dializie (SIGMA-ALDRICH: dialysis tubing, high retention seamless cellulose tubing, MWCO 12400, 99,99% retention) wobec wody dejonizowanej. Celem tego postępowania było oddzielenie $\beta(1,6)$ -glukanu (supernatant po dializie – frakcja 6) od zhydrolizowanego $\beta(1,3)$ -glukanu. Potwierdzenie obecności poszczególnych polimerów w otrzymywanych frakcjach 1–6 oparto na danych literaturowych [Magnelli i in. 2002]. Zawartość $\beta(1,3)$ -glukanu we frakcji nierozpuszczalnej w zasadach wyznaczano z różnicy zawartości cukrów we frakcji 3 i sumy zawartości $\beta(1,6)$ -glukanu we frakcjach 5 i 6. W przypadku osadu pozostałego po trawieniu enzymatycznym (frakcja 5) w obliczeniach przyjęto założenie, że nie zawiera on chityny, a jedynie $\beta(1,6)$ -glukan [Orłowski i in. 2007]. W przypadku frakcji 3 i 4 założono, że nie są zanieczyszczone odpowiednio mannoproteinami i β -glukanem [Bzducha-Wróbel i in. 2013].

Zawartość cukrów ogółem w ścianie komórkowej drożdży oznaczano, w przeliczeniu na glukozę, bezpośrednio w preparatach ścian komórkowych. W tym celu prowadzono hydrolizę kwasową polimerów ściany przy użyciu 72% H₂SO₄ (100°C/4 h), po uprzedniej 3-godzinnej inkubacji próbek w temperaturze pokojowej. Zawartość cukrów redukujących analizowano metodą kolorymetryczną ($\lambda = 540$ nm) z kwasem 3,5-dinitrosalicylowym [Magnelli i in. 2002]. Do obliczeń wykorzystano krzywą wzorcową, przedstawiającą zależność absorbancji od stężenia roztworów glukozy, w postaci: $y = 2,7369x - 0,0594$, $R^2 = 0,9981$.

Zawartość frakcji polisacharydów uzyskanych na drodze ekstrakcji zasadowej, trawienia enzymatycznego oraz dializy (frakcje 1–6) również wyrażano w przeliczeniu na zawartość cukrów redukujących, po wcześniejszej hydrolizie kwasowej. Uzyskane wyniki, w celu ich porównania, przedstawiono w przeliczeniu na 100% wydajność ekstrakcji w warunkach alkalicznych.

Metody statystyczne

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej w programie STATISTICA V.10. Przeprowadzono jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA, test HSD Tukeya). Testowanie prowadzono przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$. Uśrednione wyniki zestawiono w tabelach 1 i 2, wyrażając je jako: średnia \pm odchylenie standardowe (SD).

WYNIKI I DYSKUSJA

Plon biomasy badanych drożdży z hodowli doświadczalnych

Oznaczenie plonu biomasy badanych drożdży pozwoliło określić zasadność prowadzenia hodowli w podłożach z dodatkiem glicerolu (2, 3 lub 5%) i o zróżnicowanym pH (4,0; 5,0; 7,0). Ilość uzyskiwanej biomasy, jako źródła $\beta(1,3)/(1,6)$ -glukanów i/lub mannoprotein ściany komórkowej, jest jednym z czynników wpływających na wydajność produkcji polimerów ściany drożdży. Wyniki zestawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Plon biomasy badanych drożdży z 24-godzinnych hodowli doświadczalnych

Table 1. The cell biomass yield of investigated yeasts cultivated 24 h in experimental mediums

Podłoże – Medium	pH	Plon biomasy drożdży [$\text{g}_{\text{s.s.}} \cdot \text{dm}^{-3}$] \pm SD Yeast cell biomass yield [$\text{g}_{\text{d.w.}} \cdot \text{dm}^{-3}$] \pm SD	
		Szczep – Strain	
		<i>Candida utilis</i> ATTC 9950	<i>Kluyveromyces fragilis</i> R11
YPD	4	7,3 \pm 0,2 ^b	5,5 \pm 0,1 ^a
	5	10,4 \pm 0,5 ^c	6,2 \pm 0,1 ^{b,c}
	7	10,1 \pm 1,0 ^c	8,6 \pm 0,1 ^c
2% glicerol	4	8,2 \pm 0,2 ^{a,b}	Brak wzrostu
2% glycerol	5	8,3 \pm 1,5 ^{a,b}	4,8 \pm 0,1 ^d
	7	10,3 \pm 0,7 ^c	6,0 \pm 0,1 ^b
3% glicerol	4	8,4 \pm 0,2 ^{a,b}	Brak wzrostu
3% glycerol	5	9,3 \pm 0,6 ^{a,c}	5,3 \pm 0,1 ^a
	7	9,1 \pm 0,1 ^{a,c}	6,1 \pm 0,1 ^b
5% glicerol	4	7,4 \pm 0,2 ^b	Brak wzrostu
5% glycerol	5	8,5 \pm 0,2 ^{a,b}	5,2 \pm 0,2 ^a
	7	9,1 \pm 0,2 ^{a,c}	6,4 \pm 0,1 ^c

Wartości średnie oznaczone tymi samymi literami ^{a, b, c, ...} w ramach jednego szczepu drożdży nie różnią się istotnie (test HSD Tukeya, $\alpha = 0,05$)/Means values with the same letters ^{a, b, c, ...} considering one strain of yeasts are not significantly different (acc. HSD Tukey test, $\alpha = 0,05$).

W przypadku drożdży paszowych *Candida utilis* ATTC 9950 najwyższy plon biomasy (ok. $10,5 \text{ g}_{\text{s.s.}} \cdot \text{dm}^{-3}$) uzyskiwano w podłożach z dodatkiem 2% glicerolu i pH 7,0 oraz w pożywkach YPD o pH 5,0 i 7,0. W pozostałych podłożach była to wydajność na poziomie $7,3\text{--}9,3 \text{ g}_{\text{s.s.}} \cdot \text{dm}^{-3}$ (tab. 1). Możliwość wykorzystania glicerolu jako źródła węgla w hodowli drożdży *Candida utilis* potwierdzili również inni autorzy [Moraes i in. 1996, Lipińska i in. 2010].

Podobnie jak w przypadku drożdży z rodzaju *Candida*, czynnikami decydującymi o możliwości i wydajności wzrostu szczepu drożdży z rodzaju *Kluyveromyces* w podłożach z glicerolem było stężenie tego związku w podłożu oraz kwasowość czynna hodowli. We wszystkich podłożach modelowych z dodatkiem glicerolu, w których początkowe pH było na poziomie 4,0, drożdże *Kluyveromyces fragilis* R11 nie wykazywały wzrostu. Były zdolne do wykorzystywania glicerolu jako źródła węgla i energii jedynie w pożywkach o pH 5,0 i 7,0. W podłożach tych wydajność plonu biomasy *Kluyveromyces fragilis* R11 wynosiła między $4,8\text{--}6,4 \text{ g}_{\text{s.s.}} \cdot \text{dm}^{-3}$ i była porównywalna do osiąganą w podłożach YPD o pH 4,0 i 5,0. Najkorzystniejsze warunki do namnażania biomasy tych drożdży panowały w pożywce YPD o pH 7,0, w której plon osiągał poziom ok. $8,6 \text{ g}_{\text{s.s.}} \cdot \text{dm}^{-3}$.

Drożdże wykazują wzrost w zakresie pH 4,5–6,5, aczkolwiek prawie wszystkie są zdolne do wzrostu w środowisku bardziej kwaśnym lub bardziej alkalicznym [Jalcin i Ozbas 2008]. Jak wynika z przeprowadzonych doświadczeń, w podłożach, w których źródłem węgla była glukoza, drożdże z rodzaju *Kluyveromyces* wykazywały wzrost niezależnie od zastosowanego pH. W przypadku podłoży zawierających glicerol, omawiany szczep nie wykazywał wzrostu przy pH na poziomie 4,0. Taką zależność można tłumaczyć specyfiką transportu glicerolu do wnętrza komórek drożdży [Kayingo i in. 2009]. Glicerol, dzięki lipofilnej naturze, transportowany jest przez błony cytoplazmatyczne komórek drożdży na drodze dyfuzji prostej. Skład lipidów błony, zależny od warunków hodowli, może wpływać na tempo transportu pasywnego. Drożdże mogą syntetyzować białka transportu aktywnego glicerolu (np. Stl1p, Gup1p), dzięki którym to źródło węgla szybciej przenoszone jest przez membrany lipidowe [Sutherland i in. 1997, Kayingo i in. 2009]. Ekspresja genów kodujących omawiane proteiny regulowana jest przez rodzaj źródła węgla w pożywce. Białka transportu aktywnego syntetyzowane są w komórkach hodowanych w pożywkach zawierających źródło węgla niepodlegające fermentacji (m.in. glicerol), podczas gdy glukoza wpływa inhibującą na ten proces [Kayingo i in. 2009]. Być może niskie pH pożywki mogło hamować ekspresję białek niezbędnych drożdżom *Kluyveromyces* do przeprowadzania transportu aktywnego glicerolu.

Podsumowując, glicerol może stanowić źródło węgla w hodowli drożdży z rodzajów *Candida* i *Kluyveromyces*, jednak możliwość jego wykorzystania jest cechą indywidualną każdego szczepu, zależną od pH środowiska i stężenia źródła węgla w podłożu hodowlanym. Ze względu na osiągnięcie przez drożdże *Candida utilis* wyższych plonów biomasy w opracowanych podłożach doświadczalnych są one potencjalnie wydajniejszym źródłem polimerów ściany komórkowej izolowanych z biomasy.

Zawartość cukrów ogółem, $\beta(1,3)/\beta(1,6)$ -glukanów i mannoprotein w preparatach ścian komórkowych badanych drożdży z hodowli doświadczalnych

Preparaty ścian komórkowych badanych drożdży przygotowano, przeprowadzając autolizę komórek drożdży, która jest powszechną procedurą stosowaną w tym celu [Thanardkit i in. 2002, Supphantharika i in. 2003, Soltanian i in. 2007, Zechner-Krpan i in. 2010]. Sposób otrzymywania preparatów ścian komórkowych drożdży wpływa na stopień ich oczyszczenia ze składników cytozolu [Bzducha-Wróbel i in. 2013].

Badane szczepy drożdży charakteryzowały się zróżnicowaną zawartością cukrów ogółem i poszczególnych polimerów strukturalnych ściany komórkowej w suchej substancji otrzymanych preparatów (tab. 2 i 3), co wskazywało na odmienną budowę ściany tych grzybów. W preparatach ścian drożdży *Candida utilis* po hodowli w optymalnych warunkach wzrostu, tj. w podłożu YPD o pH 5,0, cukry ogółem stanowiły około 61% badanego organellum (tab. 2), podczas gdy preparaty ścian drożdży z rodzaju *Kluyveromyces* z tych samych warunków hodowli zawierały około 47% cukrów (tab. 3). Można zatem stwierdzić, że wydajniejszym źródłem $\beta(1,3)/\beta(1,6)$ -glukanów okazały się drożdże *Candida utilis*. Różnicowanie w zawartości polisacharydów ściany w zależności od gatunku, a nawet szczepu drożdży, potwierdzono również w innych badaniach [Nguyen i in. 1998, Thanardkit i in. 2002, Supphantharika i in. 2003, Bzducha-Wróbel i in. 2013].

Hodowla drożdży z rodzajów *Candida* i *Kluyveromyces* w podłożach zróżnicowanych pod względem pH, rodzaju źródła węgla w pożywce oraz jego stężenia indukowała zmiany w zawartości polimerów strukturalnych analizowanego organellum. Dochodziło do wzrostu lub obniżenia zawartości cukrów w ścianie komórkowej, zależnie od szczepu drożdży i zastosowanego układu doświadczalnego. Drożdże *Candida utilis* syntetyzowały najwięcej polisacharydów ściany komórkowej po hodowli w podłożach o pH 4,0 zawierających 2% glicerolu oraz w podłożach o pH 7 z dodatkiem 3 i 5% omawianego źródła węgla (tab. 2). W porównaniu z preparatami ściany komórek z podłoża YPD o pH 5,0 była to zawartość wyższa o około 11–14 g w przeliczeniu na 100 g s.s. ściany. Biosynteza składników ściany komórkowej przez badane drożdże mogła być odpowiedzią na warunki stresowe w środowisku wzrostu [Smits i in. 2001, Lesage i Bussey 2006]. Najwyższą sumaryczną zawartość $\beta(1,3)/\beta(1,6)$ -glukanów w ścianie omawianego szczepu (ok. 53%) stwierdzono po hodowli w podłożu o pH 4,0 z dodatkiem 2% glicerolu. Wyniki przeprowadzonych badań potwierdzają możliwość intensyfikacji biosyntezy $\beta(1,3)$ - $\beta(1,6)$ -glukanów w ścianie komórkowej drożdży *Candida utilis* ATTC 9950 w podłożach z glicerolem jako źródłem węgla. Jednocześnie drożdże *Candida utilis* ATTC 9950, w zależności od podłoża hodowlanego, zawierały ok. 2–4 razy więcej β -glukanów w porównaniu z gatunkiem *Kluyveromyces fragilis* R11 (tab. 3). Na podstawie zawartości $\beta(1,6)$ -glukanu w preparatach ścian można także przypuszczać, że polimery β -glukanu obu szczepów różniły się stopniem rozgałęzienia cząsteczek, a przez to budową przestrzenną. Drożdże *Kluyveromyces fragilis* okazały się lepszym źródłem mannoprotein, których zawartość sięgała około 30,5% s.s. preparatów ścian po hodowli komórek w podłożach o pH 7 z dodatkiem 3 i 5% glicerolu (tab. 3). Wzrost zawartości mannoprotein mógł wynikać

Tabela 2. Zawartość cukrów ogółem, $\beta(1,3)/\beta(1,6)$ -glukanów i mannoprotein w preparatach ścian komórkowych drożdży *Candida utilis* ATTC 9950 z hodowli doświadczalnych

Table 2. The content of total carbohydrates, $\beta(1,3)/\beta(1,6)$ -glucans and mannoproteins in cell wall preparations of *Candida utilis* ATTC 9950 cultivated in experimental mediums

Składnik [g/100 g.s.s. ściany komórkowej] ±SD	<i>Candida utilis</i> ATTC 9950											
	Podłoże hodowlane – Cultivation medium											
Components [g/100 g.d.w. of cell wall preparation] ±SD	YPD pH 4	YPD pH 5	YPD pH 7	2% glycerol/ glycerol pH 4	2% glycerol/ glycerol pH 5	2% glycerol/ glycerol pH 7	3% glycerol/ glycerol pH 4	3% glycerol/ glycerol pH 5	3% glycerol/ glycerol pH 7	5% glycerol/ glycerol pH 4	5% glycerol/ glycerol pH 5	5% glycerol/ glycerol pH 7
Cukry ogółem	62,9	61,3	59,5	54,2	54,2	68,5	56,1	66,0	71,9	60,2	66,4	72,2
Total carbohydrates	±6,5 ^{a,b,c}	±1,5 ^{a,b,c}	±5,5 ^{a,b,c}	±7,9 ^b	±7,9 ^b	±6,7 ^{a,b,c}	±8,2 ^{b,c}	±2,2 ^{a,b,c}	±2,9 ^{a,c,d}	±6,7 ^{a,b,c}	±6,3 ^{a,b,c}	±0,8 ^{a,d}
$\Sigma\beta(1,3)/\beta(1,6)$ - glukan	41,8	42,4	41,0	37,4	37,4	48,4	39,6	46,6	49,3	39,7	44,6	48,8
$\beta(1,3)/\beta(1,6)$ - glukan	±4,4 ^{a,b}	±0,4 ^{a,b}	±4,3 ^a	±5,3 ^a	±5,3 ^a	±5,1 ^{a,b}	±6,9 ^a	±2,8 ^{a,b}	±3,6 ^{a,b,c}	±4,8 ^a	±5,3 ^{a,b}	±1,1 ^{a,b,c}
$\beta(1,6)$ -glukan (nierozpuszczalny w zasadach)	24,5	24,7	21,8	17,7	17,7	21,2	18,4	22,0	21,7	19,5	20,6	24,3
$\beta(1,6)$ -glukan (alkali inosuble)	±2,2 ^a	±1,0 ^a	±0,5 ^{a,b}	±2,7 ^b	±2,7 ^b	±2,1 ^{a,b}	±2,0 ^{a,b}	±1,0 ^{a,b}	±2,5 ^{a,b}	±3,3 ^{a,b}	±4,5 ^{a,b}	±0,1 ^{a,b}
Mannoproteiny	21,0	18,9	18,5	16,8	16,8	20,1	16,5	19,4	22,6	20,5	21,8	23,4
Mannoprotein	±2,3 ^{a,b,c}	±1,2 ^{a,b,c}	±2,1 ^{a,b,c}	±2,6 ^{b,c}	±2,6 ^{b,c}	±2,2 ^{a,b,c}	±1,4 ^b	±0,8 ^{a,b,c}	±1,4 ^a	±2,0 ^{a,b,c}	±1,1 ^a	±0,4 ^a

Wartości średnie oznaczone tymi samymi literami ^{a, b, c, ...} (w wierszu) nie różnią się istotnie (test HSD Tukeya, $\alpha = 0,05$)/Means values with the same letters ^{a, b, c, ...} (in line) are not significantly different (acc. HSD Tukey test, $\alpha = 0,05$).

Tabela 3. Zawartość cukrów ogółem, $\beta(1,3)\beta(1,6)$ -glukanów i mannoprotein w preparatach ścian komórkowych drożdży *Kluyveromyces fragilis* R11 z hodowli doświadczalnych

Table 3. The content of total carbohydrates, $\beta(1,3)\beta(1,6)$ -glucans and mannoproteins in cell wall preparations of *Kluyveromyces fragilis* R11 cultivated in experimental mediums

Składnik [g/100 g _{s.s.} ściany komórkowej] ±SD	<i>Kluyveromyces fragilis</i> R11									
	Podłoże hodowlane – Cultivation medium									
Components [g/100 g _{d.w.} of cell wall preparation] ±SD	YPD pH 4	YPD pH 5	YPD pH 7	2% glycerol/ glycerol pH 5	2% glycerol/ glycerol pH 7	3% glycerol/ glycerol pH 5	3% glycerol/ glycerol pH 7	5% glycerol/ glycerol pH 5	5% glycerol/ glycerol pH 7	5% glycerol/ glycerol pH 7
Cukry ogółem Total carbohydrates	32,4 ±3,2 ^d	47,1 ±2,0 ^{a,b,c}	35,1 ±3,5 ^d	41,9 ±1,9 ^a	50,5 ±2,0 ^b	43,3 ±1,2 ^{a,c}	51,1 ±2,4 ^b	42,1 ±0,2 ^a	49,2 ±0,6 ^b	49,2 ±0,6 ^b
$\Sigma\beta(1,3)\beta(1,6)$ - glukan	14,2 ±1,4 ^a	19,1 ±1,6 ^{b,c}	15,3 ±2,2 ^a	17,8 ±2,2 ^{a,b}	22,9 ±2,5 ^c	18,7 ±1,3 ^{a,b,c}	20,9 ±1,9 ^{a,b,c}	15,1 ±0,4 ^a	18,8 ±1,2 ^{a,b,c}	18,8 ±1,2 ^{a,b,c}
$\beta(1,6)$ -glukan (nie- rozpuszczalny w zasadach)	5,8 ±0,1 ^{a,b}	8,5 ±1,1 ^d	5,6 ±0,9 ^a	6,0 ±0,2 ^{a,b,c}	7,5 ±0,1 ^{b,c,d}	6,1 ±0,2 ^{a,b,c}	9,3 ±1,0 ^d	5,4 ±0,2 ^a	7,8 ±0,7 ^{c,d}	7,8 ±0,7 ^{c,d}
$\beta(1,6)$ -glukan (alkali inosoluble)	18,2 ±2,0 ^d	28,0 ±1,4 ^{a,c}	19,8 ±1,3 ^d	24,0 ±0,2 ^b	27,6 ±0,9 ^{a,b}	24,7 ±0,6 ^{b,c}	30,2 ±2,2 ^a	27,0 ±0,3 ^{a,b,c}	30,5 ±1,3 ^a	30,5 ±1,3 ^a

Wartości średnie oznaczone tymi samymi literami ^{a, b, c, ...} (w wierszu) nie różnią się istotnie (test HSD Tukeya, $\alpha = 0,05$). Means values with the same letters ^{a, b, c, ...} (in line) are not significantly different (acc. HSD Tukey test, $\alpha = 0,05$).

z syntezy glikoprotein niezbędnych komórkom w procesie metabolizmu glicerolu oraz regulacji zmian ciśnienia osmotycznego w pożywce wywołanego tym źródłem węgla. Mannoproteiny stanowią m.in. ochronę komórek drożdży przed stresem osmotycznym [Kopecká i in. 1991]. Badania nad właściwościami funkcjonalnymi mannoprotein i β -glukanów drożdży z rodzaju *Kluyveromyces* prowadzili m.in. Yoshida i inni [2005].

WNIOSKI

1. Glicerol może stanowić źródło węgla i energii w hodowlach drożdży z rodzajów *Candida* i *Kluyveromyces* ukierunkowanych na intensyfikację biosyntezy polimerów budujących ścianę komórkową tych grzybów.

2. W ścianie drożdży *Candida utilis* ATTC 9950, w zależności od warunków wzrostu, stwierdzono 2–4 razy wyższy udział $\beta(1,3)$ - $\beta(1,6)$ -glukanów w porównaniu ze szczepem *Kluyveromyces fragilis* R11, podczas gdy drugi ze szczepów zawierał więcej mannoprotein.

3. Zastosowane podłoża hodowlane z glicerolem jako źródłem węgla wpływały na zmianę zawartości polimerów w ścianie komórkowej badanych grzybów. Odpowiedź komórek na warunki hodowli okazała się pod tym względem cechą indywidualną danego szczepu, zależną od stężenia glicerolu i zastosowanego pH środowiska.

4. Badane drożdże mogą stanowić źródło polisacharydów i glikoprotein o właściwościach funkcjonalnych. Dalsze badania powinny być ukierunkowane na przeprowadzenie dokładniejszej charakterystyki izolowanych polimerów i określenie ich właściwości.

LITERATURA

- Aguilar-Uscanga B., François J.M., 2003. A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. *Lett. Appl. Microbiol.* 37, 268–274.
- Bohn J.A., BeMiller J.N., 1995. (1→3)- β -D-Glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. *Carbohydr. Polym.* 28, 3–14.
- Bowman S.M., Free S.J., 2006. The structure and synthesis of the fungal cell wall. *BioEssays* 28, 799–808.
- Bzducha-Wróbel A., Kieliszek M., Błażejczak St., 2013. Chemical composition of the cell wall of probiotic and brewer's yeast in response to cultivation medium with glycerol as a carbon source. *Eur. Food Res. Technol.* 237, 489–499.
- Chen J., Seviour R., 2007. Medicinal importance of fungal $\beta(1\rightarrow3)$, $\beta(1\rightarrow6)$ -glucans. *Mycol. Res.* 111(6), 635–652.
- Da Silva G.P., Mack M., Contiero J., 2009. Glycerol: a promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnol. Adv.* 27(1), 30–39.
- Fleet G.H., Manners A.D.J., 1976. Isolation and composition of an alkali-soluble glucan from the cell walls of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* 94(1), 180–192.
- Ganner A., Stoiber C., Wieder D., Schtzmayer G., 2010. Capability of yeast derivatives to adhere enteropathogenic bacteria and to modulate cells of the innate immune system. *J. Microbiol. Methods* 83, 168–174.

- Jalcin S.K., Ozbas Z.Y., 2008. Effects of pH and temperature on growth and glycerol production kinetics of two indigenous wine strains of *Saccharomyces cerevisiae* from Turkey. *Braz. J. Microbiol.* 39, 325–332.
- Kapteyn J.C., Van Den Ende H., Klis F.M., 1999. The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall. *Biochim. Biophys. Acta* 1426, 373–383.
- Kath F., Kulicke W.M. 1999. Mild enzymatic isolation of mannan and glucan from yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Die Angewandte Macromolekulare Chemie* 268, 59–68.
- Kayingo G., Martins A., Andrie R., Neves L., Lucas C., Wong B. 2009. A permease encoded by *STL1* is required for active glycerol uptake by *Candida albicans* *Microbiol.* 155, 1547–1557.
- Kim K.S., Yun H.S., 2006. Production of soluble β -glucan from the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme. Microb. Technol.* 39, 496–500.
- Klis F.M., Pieterella M., Hellingwerf K., Brul S., 2002. Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* 26, 239–256.
- Kogan G., Kocher A., 2007. Role of yeast cell wall polysaccharides in pig nutrition and health protection. *Livestock Sci.* 109, 161–165.
- Kopecká M., Gabriel M., Nečas O., Svoboda A., Venkov P.V., 1991. Cell surface structures in osmotically fragile mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* 137, 1263–1270.
- Križková L., Ďuračková Z., Šandula J., Sasinková V., Krajčovič J., 2001. Antioxidative and Antimutagenic Activity of Yeast Cell Wall Mannans *in Vitro*. *Mut. Res.* 497, 213–222.
- Laroche C., Michaud P., 2007. New development and prospective applications for $\beta(1,3)$ -glucans. *Recent Pat. Biotechnol.* 1, 59–73.
- Lesage G., Bussey H., 2006. Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70(2), 317–343.
- Lipińska E., Błażej St., Markowski K., 2010. Possibility of using glycerol from biodiesel production as a source of carbon in mixed culture *Candida utilis* yeast and acetic acid bacteria. *Acta Sci. Polon. – Biotechnol.* 9(3), 3–4.
- Liu X.Y., Wang Q., Ciu S.W., Liu H.Z., 2008. A new isolation method of beta-D-glucans from spent yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Hydrocoll.* 22, 239–247.
- Magnelli P., Cipollo J.F., Abeijon C., 2002. A refined method for the determination of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall composition and beta-1,6-glucan fine structure. *Anal. Biochem.* 301, 136–150.
- Moraes D.A., Aquaron F., Borzani W., 1996. Influence of the initial glycerol concentration on the specific growth rate of *Candida utilis* cultivated on a synthetic medium containing glycerol as the main carbon source. *Biotechnol. Lett.* 18(8), 943–946.
- Nguyen T.H., Fleet G.H., Rogers P.L., 1998. Composition of the cell walls of several yeast species. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50, 206–212.
- Novák M., Snytytsya A., Gedeon O., Slepíčka P., Procházka V., Snytytsya A., Blahovec J., Hejlová A., Čopíková J., 2012. Yeast $\beta(1,3)$, $(1,6)$ -D-glucan films: preparation and characterization of some structural and physical properties. *Carbohydr. Polym.* 87, 2496–2504.
- Orłowski J., Machula K., Janik A., Zdebska E., Palamarczyk G., 2007. Dissecting the role of dolichol in cell wall assembly in the yeast mutants impaired in early glycosylation reactions. *Yeast* 24, 239–252.
- Salamon A., Baca E., Zielińska K., Cybulska J., Michałowska D., Baranowski K., 2011. Sposoby zagospodarowania odpadów poprodukcyjnych przemysłu piwowarskiego. *ZPPNR* 558, 239–251.
- Smits G.J., Van den Ende H., Klis F.M., 2001. Differential regulation of cell wall biogenesis during growth and development in yeast. *Microbiology* 147, 781–794.

- Soltanian S., Dhont J., Sorgeloos P., Bossier P., 2007. Influence of different yeast cell wall mutants on performance and protection against pathogenic bacteria (*Vibrio campbellii*) in gnotobiotically-grown *Artemia* Fish Shellfish Immunol. 23, 141–153.
- Supphantharika M., Khunrae P., Thanardkit P., Verduyn C., 2003. Preparation of spent brewer's yeast β -glucans with a potential application as an immunostimulant for black tiger shrimp, *Penaeus monodon*. Bioresour. Technol. 88, 55–56.
- Sutherland F.C., Lages F., Lucas C., Luyten K., Albertyn J., Hohmann S., Prior P.A., Kilian S.G., 1997. Characteristics of Fps1-dependent and -independent glycerol transport in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. 179(24), 7790–7795.
- Thanardkit P., Khunrae P., Supphantharika M., Verduyn C., 2002. Glucan from spent brewer's yeast: preparation, analysis and use as a potential immunostimulant in shrimp feed. World J. Microbiol. Biotechnol. 18, 527–539.
- Yoshida Y., Yokoi W., Ohishi K., Ito M., Naito E., Sawada H., 2005. Effect of the cell wall of *Kluyveromyces marxianus* YIT 8292 on the plasma cholesterol and fecal sterol excretion in rats fed on a high-cholesterol diet. Biosci. Biotechnol. Biochem. 69(4), 714–723.
- Zechner-Krpan V., Petravić-Tominac V., Gospodarić I., Sajli L., Daković S., Filipović-Grčić J., 2010. Characterization of β -Glucans Isolated from Brewer's Yeast and Dried by Different Methods. Food Technol. Biotechnol. 48(2), 189–197.

THE INFLUENCE OF GLYCEROL AS A CARBON SOURCE AND PH OF CULTIVATION MEDIUM ON BIOSYNTHESIS OF CELL WALL POLYMERS OF *CANDIDA UTILIS* AND *KLUYVEROMYCES FRAGILIS* YEASTS

Summary. The structure of yeast cell wall is mainly composed of polymers such as β -glucans and α -mannan (present as mannoprotein). It is well known that yeast β -glucans and mannoprotein exhibit a range of bioactive properties in humans and animals, like anti-toxic, anti-mutagenic, anticancerous and anti-oxidative activity, stimulation of immunological response as well as antibacterial properties. The content of β -glucans and mannoprotein in cell wall of unicellular fungi is connected to growth conditions. This work reports on the influence of glycerol as a carbon source and pH of the medium on structural cell wall polymers (β -glucan and mannoprotein) biosynthesis of *Candida utilis* ATTC 9950 and *Kluyveromyces fragilis* R11. The experimental cultivations of investigated yeast strains were performed in control YPD medium and in a model mediums where glucose was replaced with glycerol in the amount of 2, 3 and 5% (w/v). All mediums were prepared in three pH variants i.e. 4.0, 5.0 and 7.0.

The preparations of cell walls of yeasts from the experimental cultivations were achieved via 24-h cell autolysis. The obtained cell wall preparations were subjected to fractionation on particular structural polysaccharides, i.e. $\beta(1,3)$ -glucan, $\beta(1,6)$ -glucan and mannoprotein, by extraction in alkaline conditions. The content of reducing carbohydrates (as glucose) was analyzed using colorimetric method ($\lambda = 540$ nm) with 3,5-dinitrosalicylic acid after hydrolysis of particular fractions in acidic conditions.

Results of the investigation demonstrated that cultivation of *Candida utilis* ATTC 9950 and *Kluyveromyces fragilis* R11 on glycerol, low-cost substrates from biodiesel production, may intensify the biosynthesis of cell wall polymers. The tendency depended on cultivation medium and strain. For yeast of genus *Candida* the portion of polysaccharides in total, as well as $\beta(1,3)/(1,6)$ -glucan content were highest after cultivation on medium containing 2% of glycerol and pH 4.0. It was 75% and 53% respectively. Depending on growth conditions,

the *Candida utilis* ATTC 9950 strain contained from 2 to 4 times more $\beta(1,3)/(1,6)$ -glucan in cell wall structure comparing with *Kluyveromyces fragilis* yeasts. At the same time, *Kluyveromyces fragilis* R11 strain was more efficient source of mannoprotein comparing with *Candida* yeast. Preparations of cell walls of *Kluyveromyces fragilis* after yeast cultivation in mediums with 3 and 5% of glycerol pH 7.0 contained app. 30.5% of mannoproteins.

The results confirmed that cultivation in medium with glycerol as a carbon source contributed to obtaining the biomass of *Candida utilis* and *Kluyveromyces fragilis* with increased portion of functional cell wall polymers. Further studies should be oriented towards an optimization of cultivation conditions for efficient biosynthesis of β -glucans or mannoprotein and to establish their functional properties.

Key words: yeast cell wall, β -glucan, mannoprotein, glycerol, *Candida*, *Kluyveromyces*