

AGATA LEWICKA, STANISŁAW BŁAŻEJAK, MICHAŁ MIGDAL

TRADYCYJNE I NOWE KIERUNKI BIOTECHNOLOGICZNEGO WYKORZYSTANIA DROŹDŻY Z RODZAJU *RHODOTORULA*

Streszczenie

Drożdże z rodzaju *Rhodotorula* występują powszechnie w środowisku. Do niedawna postrzegane były głównie jako psujące lub zanieczyszczające żywność saprofity. Jednak odkrycie przez naukowców wielu nowych możliwości ich wykorzystania pozwala sądzić, że mogą stać się w przyszłości znaczącą grupą drobnoustrojów przemysłowych. W niniejszym opracowaniu przedstawiono niektóre kierunki zastosowania drożdży z rodzaju *Rhodotorula*. Karotenoidy, egzopolisacharydy oraz enzymy produkowane przez biomasę komórkową tych drożdży mogą być wykorzystywane w wielu branżach przemysłu. Równie ważnym aspektem, uwzględnianym przy ocenie przydatności drożdży, jest wykorzystanie ich biomasy komórkowej w procesach wiązania jonów metali bądź biodegradacji odpadów.

Słowa kluczowe: *Rhodotorula*, karotenoidy, enzymy, egzopolisacharydy, biopaliwa, adsorpcja

Wprowadzenie

W ostatnich latach naukowcy zwrócili uwagę na liczne zalety mikroorganizmów wcześniej uważanych za saprofity psujące żywność. Jednym z przykładów są drożdże z rodzaju *Rhodotorula*. Zaliczane są one do rodziny *Sporidiobolaceae*, rzędu *Sporidiales*, klasy *Urediniomycetes* i gromady podstawczaków (*Basidiomycota*) w królestwie grzybów (*Fungi*) [14]. Są to w większości organizmy mezofilne, o optymalnej temp. wzrostu 20 - 40 °C [14, 23], jednak niektóre z nich rozwijają się dobrze również w warunkach chłodniczych [31]. Powszechnie występują w glebie, w wodzie, na roślinach i zwierzętach, a także w powietrzu. Tworzą kuliste, jajowate albo wydłużone komórki z otoczką. Rozmnażają się wegetatywnie przez pączkowanie [14]. Grzyby z rodzaju *Rhodotorula* charakteryzują się różowym zabarwieniem kolonii, co spowodowane jest ich zdolnością do biosyntezy karotenoidów takich, jak β -karoten, torulen oraz torularodyna [4, 23, 27].

Mgr inż. A. Lewicka, dr hab. S. Błażej, inż. Michał Migdal, Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Oceny Żywności, Wydz. Nauk o Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, ul. Nowoursynowska 159 C, 02-776 Warszawa

W celu przybliżenia znaczenia omawianych drożdży, w niniejszej pracy przedstawiono perspektywy ich biotechnologicznego zastosowania.

Biosynteza karotenoidów przez drożdże z rodzaju *Rhodotorula*

Karotenoidy są grupą polienowych związków naturalnych (polimery izoprenu), charakteryzujących się barwą żółtą, pomarańczową bądź czerwoną [42]. Występują w owocach, warzywach, oleju, jajach i rybach. Są również syntetyzowane przez różne drobnoustroje. Należą do nich bakterie z rodzajów *Flavobacterium* i *Micrococcus*, algi z rodzajów *Dunaliella* i *Haematococcus*, drożdże z rodzajów *Rhodotorula*, *Sporobolomyces*, *Phaffia*, *Rhodospiridium* i *Sporidiobolus* oraz pleśnie z gatunku *Blakeslea trispora* [2, 4, 42].

Karotenoidy znalazły wszechstronne zastosowanie w wielu dziedzinach, a szczególnie w medycynie, chemii, przemyśle kosmetycznym oraz spożywczo-paszowym. Szeroki zakres ich reaktywności chemicznej sprawia, że mogą wywierać bioochronny efekt na organizm ludzki. Niektóre z nich wykazują aktywność witaminy A (β -karoten), a jako antyoksydanty mają zdolność do wygaszania tlenu singletowego ($^1\text{O}_2$) oraz do eliminacji organicznych wolnych rodników. W rezultacie mogą być skuteczne w profilaktyce nowotworów oraz chorób układu sercowo-naczyniowego [20, 37, 41].

Ze względu na właściwości prozdrowotne karotenoidów, ciągle wzrasta zainteresowanie metodami ich pozyskiwania i wzbogacania nimi przede wszystkim produktów spożywczych. Wysoko wydajna produkcja tych związków stała się możliwa dzięki wykorzystaniu drobnoustrojów do ich otrzymywania. Proces ten uznawany jest za efektywniejszą metodę ich pozyskiwania w porównaniu z ekstrakcją z warzyw lub syntezy chemicznej. Główną jego zaletą jest możliwość obniżania kosztów mikrobiologicznej biosyntezy karotenoidów dzięki zastosowaniu ulepszonych szczepów lub tanich źródeł węgla i azotu jako składników podłoża hodowlanego [2, 3].

Karotenoidy mogą być syntetyzowane przez różne grupy drobnoustrojów. Jednak biorąc pod uwagę wydajność procesu biosyntezy oraz czynniki ekonomiczne na szczególną uwagę zasługują drożdże z rodzaju *Rhodotorula*. Nie bez znaczenia dla mikrobiologicznej produkcji karotenoidów jest możliwość hodowli tych drożdży na tanich i powszechnie dostępnych podłożach, takich jak: syrop glukozowy, melasa, ekstrakt sojowy, kukurydziany, torfowy lub filtrat serwatki [42].

Z licznych badań [2, 15, 16, 17, 42] wynika, że zawartość oraz jakość wyprodukowanych przez biomasę drożdżową związków karotenoidowych zależy od wielu czynników środowiskowych i genetycznych.

O wydajności biosyntezy związków karotenoidowych decyduje dobór odpowiedniego podłoża oraz parametrów procesu. W badaniach prowadzonych w tym kierunku

uwzględniano przede wszystkim rodzaj i stężenie źródła węgla oraz azotu w podłożu, pH i temperaturę hodowli, a także czas inkubacji i napowietrzenie [1, 3, 17, 42]. Pierwsze dwa czynniki mają decydujący wpływ na koszty, dlatego też wciąż poszukuje się jak najbardziej opłacalnych ekonomicznie substratów, które można wykorzystać do produkcji karotenoidów metodą mikrobiologiczną [3, 28, 42].

W roku 2000 Buzzini [3] prowadził badania nad wykorzystaniem zagęszczonych odpadów po produkcji syropu winogronowego jako jedyne źródła węgla do produkcji karotenoidów przez szczep *R. glutinis* DBVPG 3853. Ustalono, że pH 5,8 oraz stężenie ekstraktu drożdżowego na poziomie 4,67g/dm³ prowadziło do otrzymania całkowitej zawartości karotenoidów w ilości 6,9 mg/dm³ oraz β-karotenu na poziomie 1100 µg/dm³ podczas 120-godzinnej hodowli. Tinoi i wsp. [42] sprawdzili natomiast przydatność zhydrolizowanego odpadu po produkcji mąki z fasoli mung do hodowli drożdży *R. glutinis*, w celu syntezy karotenoidów. Odpad stanowił główne źródło azotu w podłożu hodowlanym, natomiast źródłem węgla był ekstrakt ziemniaczany. W efekcie po 94 h hodowli otrzymano 10,35 g s.s. biomasy drożdży oraz 3,48 mg karotenoidów na dm³ podłoża.

Kolejnym surowcem wykorzystanym do produkcji karotenoidów przez szczep *R. glutinis* DM28 był odpad z rzodkiewek. Po zoptymalizowaniu warunków prowadzenia hodowli uzyskano przyrost biomasy rzędu 2,7 g s.s./dm³ oraz 201 µg/dm³ β-karotenu po 24 h hodowli [28]. Inny zespół pod kierownictwem Aksu [1] zaobserwował, że podczas 240-godzinnej hodowli w podłożu melasowym drożdże *Rhodotorula* produkowały maksymalnie 125 mg karotenoidów ogółem na dm³, co potwierdzało znacząco użyteczność surowca do otrzymywania tych związków. Z kolei Davoli i wsp. [17] badali produkcję karotenoidów przez drożdże dzikie *R. glutinis* ATCC 26085. Z ich obserwacji wynikało, że znaczącą rolę przy biosyntezie karotenoidów miało odpowiednie napowietrzanie hodowli. Zauważono, że przy zwiększonym dostępie powietrza następował szybszy przyrost biomasy drożdży oraz wzrastała intensywność produkcji karotenoidów. Maksymalnie uzyskano 206 µg karotenoidów na g s.s. w ciągu 108 h hodowli. Zastosowana metoda nie wpływała na zmianę składu karotenoidów produkowanych przez ten szczep.

Do badań nad intensyfikacją produkcji związków karotenoidowych przez różne szczepy z rodzaju *Rhodotorula* wykorzystuje się również techniki mutagenizacji. Obiecujące wyniki uzyskano, przeprowadzając mutagenizację szczepu *R. glutinis* NCIM 3353 za pomocą promieni UV [2], uzyskując w ten sposób kolonie żółto zabarwionych mutantów. Szczep niepoddany działaniu promieni UV syntetyzował karotenoidy jedynie w ilości 17 µg/g s.s. w ciągu 72 h hodowli (z czego 14 % stanowił β-karoten). Zmutowany szczep syntetyzował po 36 h hodowli 120 razy więcej β-karotenu (2048 µg/g s.s.), co stanowiło 82 % ogólnej ilości wyprodukowanych karotenoidów. Jednocześnie zaobserwowano, że dodatek do podłoża dwuwartościowych

jonów metali powodował zwiększenie zawartości karotenoidów w biomacie komórkowej badanego szczepu drożdży. W hodowli drożdży na podłożu kontrolnym zawartość karotenoidów wynosiła 33 mg/dm³, po wzbogaceniu podłoża jonami cynku 68,8 mg/dm³, a przy suplementacji jonami wapnia i żelaza odpowiednio 67,0 mg/dm³ i 66,4 mg/dm³. Li i wsp. [25] zajmowali się mutagenizacją morskiego szczepu *Rhodotorula* sp. *hidai* za pomocą EMS (estru metylowego kwasu metanosulfonowego), NTG (nitrozoguanidyny) oraz promieniowania UV. Uzyskany w ten sposób mutant wykazał się większą wydajnością w procesie biosyntezy związków karotenoidowych (603,93 µg/g s.s.) w porównaniu z dzikim szczepem (213,18 µg/g s.s.), w tym samym przedziale czasowym 5 dni. Wyniki tych badań pozwoliły stwierdzić, że stosowane wobec szczepów z rodzaju *Rhodotorula* techniki mutagenizacji były efektywną drogą do poprawy wydajności produkcji karotenoidów [2, 25].

Innym ciekawym przykładem metody intensyfikacji produkcji karotenoidów jest wykorzystanie symbiozy drożdży z rodzaju *Rhodotorula* z mikroorganizmami mającymi zdolność hydrolizy laktozy do glukozy i galaktozy [15, 16]. Zespół pod kierunkiem Frengova [15] badał w roku 1997 wzrost *R. glutinis* 22P w obecności *Lactobacillus helveticus* 12A, natomiast w 2003 roku wspólny wzrost kultury mieszanej bakterii i szczepów drożdży *Rhodotorula rubra* GED5 oraz *Kluyveromyces lactis* MP11 w podłożach zawierających serwatkę. W przeprowadzonych doświadczeniach komórki homofermentatywnych bakterii mlekowych i drożdży *K. lactis*, wykazujące aktywność β-D-galaktozydazy, dostarczały drożdżom z rodzaju *Rhodotorula* źródła węgla do wzrostu biomasy i produkcji związków karotenoidowych. Natomiast aminokwasy i witaminy produkowane przez drożdże stymulowały rozwój bakterii mlekowych. Współpraca ta zaowocowała zwiększoną biosyntezą karotenoidów, która w optymalnych warunkach hodowli *R. glutinis* 22P wyniosła 248 µg/g s.s., a *R. rubra* GED5 – 421 µg/g s.s.

Biomasa drożdży z rodzaju *Rhodotorula* jako potencjalne źródło enzymów

Drożdże z rodzaju *Rhodotorula* mogą wytwarzać wiele enzymów, z których znaczna część ma zastosowanie w biotechnologii i potencjalnie w przemyśle. Jednym z przykładów jest zdolność do syntezy amoniakolizazy fenyloalaninowej (PAL, EC 4.3.1.5), która jest enzymem katalizującym deaminację L-fenyloalaniny do kwasu trans-cynamonowego i amoniaku [8, 10]. W kontrolowanych warunkach możliwe jest również odwrócenie reakcji katalizowanej przez PAL i pozyskanie L-fenyloalaniny, która stanowi substrat do produkcji aspartamu [8, 40]. Badania nad pozyskiwaniem L-fenyloalaniny w hodowli omawianych drożdży prowadzone były w ostatnich latach przez wiele zespołów badawczych. Analizowano wpływ takich czynników, jak: skład podłoża, dodatek inokulum, pH, temperatura oraz czas hodowli. Ponadto sprawdzano

skuteczność czynników modyfikujących oraz metod intensyfikujących produkcję i aktywność otrzymywanego enzymu PAL [10, 11, 12, 40].

El-Batal [11] otrzymał bardzo dobre wyniki, stosując 20 % dodatek glicerolu, który stabilizował działanie enzymu PAL do pięciu cykli produkcyjnych, zwiększając w ten sposób ponad dwukrotnie ilość produkowanej L-feniloalaniny. W kolejnym badaniu ten sam autor [12] zoptymalizował warunki biokonwersji kwasu trans-cynamonowego do L-feniloalaniny, co zwiększyło wydajność reakcji oraz wydłużyło żywotność enzymu do ośmiu cykli produkcyjnych. Autor podjął też próbę immobilizacji enzymu, w wyniku której nastąpiło skrócenie procesu biokonwersji i dalsze zwiększenie wydajności produkcji L-feniloalaniny (240,1 mM, w ciągu 84 h).

Badania nad mikrobiologiczną metodą pozyskiwania L-feniloalaniny prowadzili także Takac i wsp. [40], wykorzystując drożdże *R. glutinis* NRRL Y-1091. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że dodatek glutaminianu sodu oraz penicyliny powodował zwiększenie aktywności i stabilności enzymu PAL w warunkach procesu biokonwersji. Z kolei obecność jonów chlorkowych w podłożu działała inhibującą na tę przemianę. W optymalnych warunkach procesu uzyskano 76,18 mM L-feniloalaniny.

D’Cunha i wsp. [9] próbowali opracować skuteczną metodę stabilizacji enzymu PAL pozyskanego z hodowli drożdży *Rhodotorula glutinis* NCYC 61. Zaobserwowano, że immobilizacja komórek drożdży zawierających frakcje enzymu PAL nie zapobiegała jego stopniowej deaktywacji, co ograniczało jego ponowne użycie. Na podstawie badań ustalono, że dodatek dwuwartościowych jonów magnezu oraz glicerolu do mieszaniny inkubacyjnej wpływał istotnie na poprawę stabilności enzymu PAL. Zaopropionowane procedury umożliwiły otrzymywanie L-feniloalaniny przez enzym PAL w ciągu 9 cykli produkcyjnych, przy czym immobilizowany enzym z grupy kontrolnej tracił aktywność już w czwartym cyklu produkcyjnym. Ten sam zespół pod kierownictwem D’Cunha [10] prowadził badania nad zwiększeniem aktywności enzymu PAL pozyskiwanego z hodowli drożdży z rodzaju *Rhodotorula*. Najskuteczniejszą metodą okazała się ultrasonifikacja, za pomocą której w przypadku szczepu *R. glutinis* NCYC61 ponad 10-krotnie zwiększono aktywność enzymu (19 mmoli przekształconej L-feniloalaniny/min/g suchej substancji) w porównaniu z próbą kontrolną (1,8 mmoli).

Kolejnym przykładem zastosowania drożdży z rodzaju *Rhodotorula* jest pozyskiwanie z ich biomasy komórkowej α -L-arabinofuranozydazy (arabinofuranohydrolazy α -L-arabinofuranozydów, EC 3.2.1.55). Jest to enzym katalizujący reakcję hydroлізу reszt L-arabinofuranozowych, niezbędny w procesie pełnej hydroлізу hemicelulozy. Ponadto wykorzystywany jest do uwalniania lotnych składników zapachowych z owoców w celu wzbogacenia aromatu soków oraz owocowych napojów fermentowanych [29]. Martínez i wsp. [29] zaobserwowali, że niektóre szczepy *R. glutinis* mają zdolność do produkcji α -L-arabinofuranozydazy. W celu zoptymalizowania warun-

ków hodowli, oceniano wpływ różnych czynników na produkcję tego enzymu (źródło węgla i azotu, pH oraz temperaturę hodowli). Po zoptymalizowaniu warunków hodowli otrzymano enzym o aktywności (82,4 U/mg) nawet 23-krotnie wyższej niż we wcześniejszych publikacjach, na które powołują się autorzy.

Drożdże z gatunku *R. glutinis* syntetyzują także endo-1,4- β -glukanazy (celulazy, EC 3.2.1.4), co zaobserwowali Oikawa i wsp. [31, 32]. Enzym ten katalizuje reakcję hydrolizy cząsteczki celulozy wewnątrz łańcucha do glukozy, celobiozy oraz celotriozy. Produkowany jest przez szereg mezofilnych i termofilnych bakterii oraz grzybów o właściwościach celulolitycznych. Jednak otrzymywana z tego źródła endo-1,4- β -glukanaza wykazuje niewielką aktywność w niskich temperaturach. Rozwiązaniem okazało się pozyskiwanie tego enzymu przy pomocy psychrotrofowego szczepu *R. glutinis* KUJ 2731. Autorzy szczegółowo scharakteryzowali otrzymany enzym [31] oraz przeprowadzili badania w kierunku zwiększenia jego aktywności [32], wykazując, że silnie kwaśne środowisko o temp. 40 °C oraz 40-procentowy dodatek acetonu wpływa na zwiększenie aktywności endo-1,4- β -glukanazy ponad dwukrotnie [32].

Następną bardzo ważną grupą enzymów wykorzystywanych w branży biotechnologicznej są lipazy. Enzymy te produkowane są przez wiele mikroorganizmów, w tym także przez *R. glutinis* [21]. Lipazy należą do klasy hydrolaz, które przede wszystkim odpowiedzialne są za hydrolizę acylogliceroli. Ich unikalną właściwością jest możliwość działania w wodnym i niewodnym środowisku, co odróżnia je od esteraz. Hydrolazy triacylogliceroli pochodzenia mikrobiologicznego charakteryzują się dużą stabilnością w szerokim zakresie pH i temperatury, wykazują chemo-, regio- i enancjoselektywność oraz zdolność do utylizacji wielu substancji. Hatzinikolaou i wsp. [21], stosując olej palmowy jako jedyne źródło węgla w podłożu hodowlanym, otrzymali za pomocą drożdży *R. glutinis* enzymy lipolityczne, które charakteryzowały się stabilnością w środowisku rozpuszczalników organicznych oraz aktywnością lipolityczną na poziomie około 0,5 U/cm³, w obecności maślanu *p*-nitrofenylu.

Drożdże z gatunku *R. glutinis* produkują także łososiowo-czerwoną melaninę i białko krystaliczne, które mają właściwości owadobójcze, co wykorzystać można m.in. do produkcji bioinsektycydu [33]. Inne szczepy wykazują natomiast zdolność do wytwarzania przeciwdrobnoustrojowych związków działających na *Pseudomonas fluorescens* i *Staphylococcus aureus* [30]. Z kolei He i wsp. [22] wskazali na zdolność niektórych szczepów z rodzaju *Rhodotorula* do wytwarzania kwasu rodotorulowego (kwas hydroksamowy), który wykazuje fungistyczne oddziaływanie wobec toksynotwórczych szczepów *Penicillium expansum* występujących na przechowywanych jabłkach.

Jak podają Gabler i wsp. [18], Fantinato i wsp. [13] oraz Pollegioni i wsp. [36], drożdże *R. gracilis* mają również zdolność do produkcji oksydazy D-aminokwasów (DAAO, EC 1.4.3.3), która jest stereoselektywnym enzymem z klasy flawoprotein.

Enzym ten katalizuje reakcję deaminacji D-aminokwasów do α -ketokwasów i amoniaku. DAAO jest wykorzystywana w farmacji do produkcji półsyntetycznych antybiotyków cefalosporynowych, wytwarzania α -ketokwasów oraz otrzymywania optycznie czystych roztworów L-aminokwasów [18, 36]. Stwierdzono również zależność pomiędzy stężeniem DAAO w komórkach nowotworowych, a ich rozwojem, co pozwoliło wysunąć wniosek, że DAAO może działać jako inhibitor wzrostu komórek rakowych [36]. Zależność tę powiązano z wydzielaniem się H_2O_2 w czasie utlenienia przenośnika FAD przez tlen molekularny. Powstający nadtlenek wodoru był toksyczny dla zdrowych komórek, ale równocześnie niszczył komórki rakowe [36]. Autorzy przypuszczają, że dalszy rozwój tej metody może pomóc w leczeniu schorzeń o charakterze nowotworowym.

Zagadnieniami związanymi z immobilizacją i stabilizacją enzymu DAAO zajmował się Kuan i wsp. [24]. Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano znaczny wzrost oporności DAAO na czynniki dezaktywujące po związaniu enzymu z tagiem histydynowym (His-Tag, oligopeptyd zbudowany z 6 cząsteczek histydyny) i immobilizacją na kulkach magnetycznych pokrytych agarozą. Immobilizowany enzym w porównaniu do wolnego charakteryzował się lepszą stabilnością w wysokich temperaturach, w obecności nadtlenu wodoru oraz w trakcie przechowywania.

Innym gatunkiem z omawianego rodzaju o interesującym potencjale biochemicznym jest *R. minuta*. Szczepy tego gatunku zdolne są do biokonwersji L-cytronelalu do L-cytronelolu. Związek ten, w zależności od stężenia, charakteryzuje się różnym bądź cytrusowym zapachem, dzięki czemu jest poszukiwanym surowcem w przemyśle perfumeryjnym [43] oraz kosmetycznym. Velankar i wsp. [43] w przeprowadzonym doświadczeniu zoptymalizowali warunki hodowli biomasy w celu uzyskania jak największego przyrostu komórek drożdży oraz stabilności reakcji biokonwersji. Zastosowane warunki pozwoliły na otrzymanie maksymalnej koncentracji L-cytronelolu na poziomie $3,5 \text{ g/dm}^3$.

Egzopolisacharydy pozyskiwane przy udziale drożdży z rodzaju *Rhodotorula*

Egzopolisacharydy to bardzo obszerna grupa związków, takich jak: pululan, dekstran, ksantan, gelan, zooglan czy kurdlan [6]. Ze względu na różnicowanie pod względem cech fizycznych, strukturalnych oraz składu chemicznego znalazły one zastosowanie w przemyśle spożywczym i farmaceutycznym [19]. Właściwości tych związków pozwalają przede wszystkim na stabilizację cech fizycznych i reologicznych produktów, do których są dodawane [34].

Egzopolisacharydy pochodzenia mikrobiologicznego są interesujące, gdyż szybciej podlegają biodegradacji niż te otrzymane metodami syntezy chemicznej, a produkty ich degradacji nie stanowią tak dużego zagrożenia dla środowiska [6]. Produkcja biopolimerów jest związana z metabolizmem komórek drobnoustrojów, więc ich skład

i właściwości zależą od warunków prowadzonej hodowli oraz od rodzaju zastosowanego podłoża. Modyfikacje mające na celu zwiększenie produkcji tych związków lub zmianę ich właściwości ograniczają się do manipulacji tymi czynnikami.

Stwierdzono, że duży wpływ na ilość wytworzonych biopolimerów przez drożdże *R. acheniorum* MC miał stopień napowietrzenia hodowli oraz częstotliwość wytrząsania [35]. Odnotowano również, że najwięcej egzopolisacharydów drożdże syntetyzowały po spadku pH z 5,0 do 2,0, co miało miejsce w trakcie pierwszych 24 h hodowli [19]. Natomiast najlepszym źródłem azotu do produkcji biopolimerów okazał się siarczan amonu [6, 19]. Zastosowane warunki hodowli pozwoliły uzyskać koncentrację egzopolisacharydów rzędu ponad 6 g/dm³ w przypadku szczepu *R. acheniorum* MC [19, 35], oraz 4 g/dm³, dla szczepu *R. glutinis* [6].

Zespół pod kierownictwem Chi [5] skupił się natomiast na syntezie pululanu, egzopolisacharydu syntetyzowanego przez *R. bacarum* Y68. Biopolimer ten jest rozpuszczalnym w wodzie homopolisacharydem, który należy do grupy D-glukanów. Jest to związek, który znajduje coraz powszechniejsze zastosowanie w przemyśle spożywczym, farmaceutycznym, chemicznym oraz w rolnictwie (produkcja cienkich błon nieprzepuszczalnych dla tlenu, zamiennik skrobi, właściwości antykoagulacyjne, przeciwwirusowe i przeciwzkrzepowe, ważny surowiec w przemyśle chemicznym) [5]. Zaobserwowana przez Chi i wsp. [5] synteza pululanu przez drożdże *R. bacarum* Y68 była pierwszym tego typu opisanym przypadkiem. Autorzy sprawdzali wpływ różnych czynników środowiskowych na syntezę tego biopolimeru. W optymalnych warunkach uzyskano 5,9 % pululanu (m/v) w ciągu 60-godzinnej hodowli.

Rola drożdży z rodzaju *Rhodotorula* w przemyśle i ochronie środowiska

Perspektywa wyczerpania się złóż paliw naturalnych oraz zanieczyszczenie środowiska gazami spalinowymi spowodowały, że poszukuje się innych, niezawodnych źródeł energii. Alternatywą może być wykorzystanie do tego celu mikroorganizmów. Fukuda i wsp. [17] wykazali, że drożdże z rodzaju *Rhodotorula*, a zwłaszcza szczep *R. minuta* var. *texensis* IFO 1102, mają zdolność do produkcji izobutyleny. Związek ten jest lotnym węglowodorem nienasyconym, który służy przede wszystkim do pozyskiwania ważnych składowych paliwa – eteru metylo-*tert*-butylowego (MTBE), eteru etylo-*tert*-butylowego (ETBE) oraz izooktanu. Z punktu widzenia ograniczonych zasobów ropy naftowej, zasadne staje się wykorzystanie procesu mikrobiologicznego do produkcji tego związku z odtwarzalnych surowców bądź odpadów. Izobutylen znajduje także zastosowanie do produkcji kauczuku butylowego, poliizobutyleny, metakrylanu metylu, antyoksydantów butylowanego hydroksytoluenu (BHT) i butylowanego hydroksyanizolu (BHA) oraz innych ważnych związków chemicznych. Szerokie spektrum zastosowań izobutyleny przemawia za tym, żeby kontynuować badania związane z optymalizacją procesu jego pozyskiwania. Fukuda i wsp. [17] od-

kryli, że obecność L-leucyny w podłożu hodowlanym wzmacnia produkcję izobutenu, natomiast L-fenylalanina oraz L-tyrozyna wykazują działanie synergistyczne z L-leucyną, dodatkowo zwiększając biosyntezę tego związku.

Innym sposobem wykorzystania drobnoustrojów jest produkcja z ich pomocą biodiesla, paliwa pochodzenia organicznego. Jest to produkt nietoksyczny, w pełni biodegradowalny, otrzymywany z surowców odpadowych oraz charakteryzujący się niską emisją spalin. Do wad biodiesla należy zaliczyć wysoki koszt produkcji (surowce stanowią 70 % wszystkich kosztów). Nie bez znaczenia pozostają również kwestie produkcji tego paliwa z płodów rolnych w kontekście rosnących cen żywności i problemu światowego głodu [39, 44]. Rozwiązanie tego problemu zaproponowali Xue i wsp. [45]. Jako podłoże do hodowli drożdży wykorzystano ścieki po produkcji glutaminianu sodu. Do badań wykorzystano szczepy *R. glutinis*, *Saccharomyces cerevisiae* oraz *Candida utilis* charakteryzujące się wysoką zawartością lipidów w biomasie. Najlepsze wyniki uzyskano przy pomocy drożdży *R. glutinis*. Biomasa wyprodukowana w optymalnych warunkach zawierała 9,5 % związków lipidowych w suchej substancji, o profilu kwasów tłuszczowych zbliżonym do tłuszczu pozyskiwanego z nasion roślin oleistych. Przeprowadzenie estryfikacji uzyskanych lipidów pozwoliło na otrzymanie 93 % estru metylowego, który można wykorzystywać jako biodiesel.

Istotnym czynnikiem dla środowiska naturalnego jest również zagospodarowanie odpadów po produkcji biopaliw. Na tym polu nieocenionym sprzymierzeńcem mogą być drożdże z rodzaju *Rhodotorula*, których silne właściwości lipolityczne pozwalają na skuteczną biodegradację tych związków [39]. Suehara i wsp. [39] udowodnili, że drożdże *R. mucilaginosa* mogą być wykorzystane do oczyszczania ścieków po produkcji biopaliw. W przeprowadzonym doświadczeniu badano wpływ czynników środowiskowych (pH, skład podłoża) na postęp biodegradacji odpadu. Najlepszym źródłem azotu w optymalnym pH 6,0 okazał się mocznik, gdyż w jego obecności obserwowano największy przyrost biomasy (5,25 g/dm³) i 95,5 % stopień degradacji olejów zawartych w ściekach.

Dynamicznemu rozwojowi przemysłu i techniki towarzyszy wzrost koncentracji i różnorodności zanieczyszczeń w biosferze. Skuteczna neutralizacja tych odpadów wymaga stosowania coraz nowocześniejszych i skuteczniejszych technik. Interesującym rozwiązaniem mogą okazać się mikrobiologiczne metody usuwania, bądź degradacji zanieczyszczeń, które skutecznością znacznie przewyższają te tradycyjnie stosowane [26]. Jednym z przykładów wykorzystania drobnoustrojów w tej dziedzinie jest wiązanie przez nie jonów metali ciężkich.

Dzięki wytrzymałości na wysokie stężenie jonów metali ciężkich oraz mechanizmom biosorpcji i chemisorpcji drożdże z rodzaju *Rhodotorula* mogą być stosowane do usuwania toksycznych pierwiastków [26, 38]. Przydatność drożdży *R. rubra* do oczyszczania roztworów zanieczyszczonych kationami ołowiu i kadmu sprawdzał

Salinas i wsp. [38]. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono również, że większą zdolność do wiązania jonów metali ciężkich wykazuje martwa biomasa komórkowa (12 mg/g s.s. w przypadku kadmu i 6 mg/g s.s. ołowiu). Zjawisko to związane jest z obecnością odsłoniętych grup funkcyjnych aminokwasów. Mają one ujemny ładunek oraz wolne pary elektronowe, które pozwalają na wiązanie większej ilości kationów [26, 38]. W doświadczeniu porównano także zdolność wiązania jonów metali ciężkich przez drożdże *S. cerevisiae* i *R. rubra*. Zaobserwowano, że drożdże z rodzaju *Rhodotorula* wiązały więcej tego typu kationów, co związane jest z różnicami w strukturze ściany komórkowej. Chityna, która jest jednym ze składników ściany komórkowej drożdży *R. rubra* jest bardzo dobrym sorbentem [38].

Li i wsp. [26] badali procesy usuwania jonów kadmu z wody przez biomasę drożdży *Rhodotorula* sp. Y11. Wykorzystany szczep Y11 charakteryzował się odpornością na wysokie stężenia kadmu (ponad 2000 mg/dm³) oraz dużą zdolnością wiązania tego kationu. Najwięcej kadmu (19,4 mg/g s.s.) związała biomasa drożdży poddana wcześniej gotowaniu. Ponadto zauważono, że zmodyfikowanie zewnętrznej warstwy ściany komórkowej drożdży poprzez wprowadzenie dodatkowych grup funkcyjnych acylowych lub karboksylowych zwiększało zdolność biomasy do chemisorpcji toksycznych kationów [26].

Podsumowanie

Na podstawie przytoczonych przykładów wykorzystania drożdży z rodzaju *Rhodotorula* można sądzić, że będą one stanowiły w przyszłości ważny element rozwoju biotechnologii. Szerokie spektrum właściwości daje szansę na zastosowanie ich w wielu dziedzinach życia. Biomasa komórek *Rhodotorula* lub produkty ich metabolizmu stanowią potencjalne źródło wielu ważnych związków, w tym enzymów, karotenoidów i biopolimerów oraz pozwalają na opracowanie nowych, innowacyjnych technologii wspomagających rozwój przemysłu oraz ochronę środowiska.

Literatura

- [1] Aksu Z., Eren A.T.: Production of carotenoids by the isolated yeast of *Rhodotorula glutinis*. Biochem. Eng. J., 2007, **35**, 107-113.
- [2] Bhosale P.B., Gadre R.V.: Production of β -carotene by a mutant of *Rhodotorula glutinis*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2001, **55**, 423-427.
- [3] Buzzini P.: An optimization study of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* DBVPG 3853 from substrates containing concentrated rectified grape must as the sole carbohydrate source. J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 2000, **24**, 41-45.
- [4] Buzzini P., Innocenti M., Turchetti B., Libkind D., Broock M., Mulinacci N.: Carotenoid profiles of yeasts belonging to the genera *Rhodotorula*, *Rhodospiridium*, *Sporobolomyces*, and *Sporidiobolus*. Can. J. Microbiol., 2007, **53**, 1024-1031.

- [5] Chi Z., Zhao S.: Optimization of medium and cultivation conditions for pullulan production by a new pullulan-producing yeast strain. *Enzyme Microb. Technol.*, 2003, **33**, 206-211.
- [6] Cho D.H., Chae H.J., Kim E. Y.: Synthesis and characterization of a novel extra-cellular polysaccharide by *Rhodotorula glutinis*. *Appl Biochem Biotechnol.*, 2001, **95**, 183-193.
- [7] Davoli P., Mierau V., Weber R.W.S.: Carotenoids and fatty acids in red yeasts *Sporobolomyces roseus* and *Rhodotorula glutinis*. *Appl. Biochem. Microbiol.*, 2003, **40**, 4, 392-397.
- [8] D'Cunha G.B., Satyanarayan V., Nair P.M.: Purification of phenylalanine ammonia lyase from *Rhodotorula glutinis*". *Phytochemistry*, 1995, **42** (1), 17-20.
- [9] D'Cunha G.B., Satyanarayan V., Nair P.M.: Stabilization of phenylalanine ammonia lyase containing *Rhodotorula glutinis* cells for the continuous synthesis of L-phenylalanine methyl ester. *Enzyme Microb. Technol.*, 1996, **19**, 421-427.
- [10] D'Cunha G.B.: Enrichment of phenylalanine ammonia lyase activity of *Rhodotorula* yeast. *Enzyme Microb. Technol.*, 2005, **36**, 498-502.
- [11] El-Batal A.I.: Optimization of reaction conditions and stabilization of phenylalanine ammonia lyase-containing *Rhodotorula glutinis* cells during bioconversion of trans-cinnamic acid to L-phenylalanine. *Acta Microbiol Pol.*, 2002, **51** (2), 139-152.
- [12] El-Batal A.I.: Continuous production of L-phenylalanine by *Rhodotorula glutinis* immobilized cells using a column reactor. *Acta Microbiol Pol.*, 2002, **51** (2), 153-169.
- [13] Fantinato S., Pollegioni L., Pilone S.M.: Engineering, expression and purification of his-tagged chimeric D-amino acid oxidase from *Rhodotorula gracilis*. *Enzyme Microb. Technol.*, 2001, **29** (6-7), 407-412.
- [14] Fell J.W., Statzell-Tallman A.: „*Rhodotorula*” Harrison. In: *The Yeast, a Taxonomic Study*, 4th ed. pp. 800-827. Ed. by Kurtzman & J.W. Fell., Elsevier, Amsterdam 1998.
- [15] Frengova G., Simova E., Beshkova D.: Caroteno-protein and exopolysaccharide production by co-cultures of *Rhodotorula glutinis* and *Lactobacillus helveticus*. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 1997, **18**, 272-277.
- [16] Frengova G., Simova E., Beshkova D.: Use of whey ultrafiltrate as a substrate for production of carotenoids by the yeast *Rhodotorula rubra*. *Appl Biochem Biotechnol.*, 2004, **112**, 133-141.
- [17] Fukuda H., Fujii T., Ogawa T.: Production of Isobutene by *Rhodotorula* Yeast. *Agric. Biol. Chem.*, 1985, **49** (5), 1541-1543
- [18] Gabler M., Hensel M., Fischer L.: Detection and substrate selectivity of new microbial D-amino acid oxidases. *Enzyme Microb. Technol.*, 2000, **27**, 605-611.
- [19] Grigorova D., Pavlova K., Pachev I.: Preparation and preliminary characterization of exopolysaccharides by yeast *Rhodotorula acheniorum* MC. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 1999, **81**, 181-191.
- [20] Guz J., Dziaman T., Szpila A.: Czy witaminy antyoksydacyjne mają wpływ na proces karcynogenezy? *Postepy Hig Med Dośw.* (online), 2007, **61**, 185-98.
- [21] Hatzinikolaou D.G., Kourentzi E., Stamatis H., Christakopoulos P., Kollis F.N., Kekos D., Macris B.J.: A novel lipolytic activity of *Rhodotorula glutinis* cells: production, partial characterization and application in the synthesis of esters. *J. Biosci. Bioeng.*, 1999, **88**, 1, 53-56.
- [22] He D., Zheng X.-D., Yin Y.-M., Sun P., Zhang H.-Y.: Yeast application for controlling apple post-harvest diseases associated with *Penicillium expansum*. *Bot. Bul. Acad. Sinica*, 2003, **44**, 211-216.
- [23] Krzyściak P., Halska A., Macura A.: Występowanie i chorobotwórczość grzybów z rodzaju *Rhodotorula* sp. *Post. Mikrobiol.*, 2007, **46**, 4, 291-300.
- [24] Kuan I., Liao R., Hsieh H., Chen K., Yu C.: Properties of *Rhodotorula gracilis* D-amino acid oxidases immobilized on magnetic beads through his-tag. *J. Biosci. Bioeng.*, 2008, **105**, 2, 110-115.
- [25] Li C., Zhenming C., Jing L., Xianghong W.: Enhanced carotenoid production by a mutant of the marine yeast *Rhodotorula* sp. hidae. *J. Ocean University of China*, 2006, **6**, 1, 66-71.

- [26] Li Z., Yuan H.: Characterization of cadmium removal by *Rhodotorula* sp. Y11. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 2006, **73**, 458-463.
- [27] Maldonado I.R., Rodriguez-Amaya D.B., Scamparini A.R.P.: Carotenoids of yeasts isolated from the Brazilian ecosystem. *Food Chem.*, 2008, **107**, 145-150.
- [28] Malisorn C., Suntornsuk W.: Optimization of β -carotene production by *Rhodotorula glutinis* DM28 in fermented radish brine. *Bioresource Technology*, 2008, **99**, 2281-2287.
- [29] Martínez C., Gertosio C., Labbe A., Pérez R., Ganga M.A.: Production of *Rhodotorula glutinis*: a yeast that secretes α -L-arabinofuranosidase. *Elec. J. Biotechnol.*, 2006, **9** (4).
- [30] McCormack P.J., Wildman H.G., Jeffries P.: Production of antibacterial compounds by phylloplane – inhibiting yeast and yeastlike fungi. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1994, **60** (3), 927-931.
- [31] Oikawa T., Tsukagawa Y., Soda K.: Endo- β -glucanase secreted by a psychrotrophic yeast: purification and characterization. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 1998, **62** (9), 1751-1756.
- [32] Oikawa T., Tsukagawa Y., Chino M., Soda K.: Increased transglycosylation activity of *Rhodotorula glutinis* endo- β -glucanase in media containing organic solvent. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2001, **65** (8), 1889-1892.
- [33] Oloke J.K., Glick B.R.: Expression of melanin and insecticidal protein from *Rhodotorula glutinis* in *Escherichia coli*. *African J. Biotechnol.*, 2006, **5** (4), 327-332.
- [34] Pavlova K., Panchev I., Hristozova T.: Physico-chemical characterization of exomannan from *Rhodotorula acheniorum* MC. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2005, **21** (3), 279-283.
- [35] Pavlova K., Grigorova D.: Production and properties of exopolysaccharide by *Rhodotorula acheniorum* MC. *Food Res. Int.*, 1999, **32** (7), 473-477.
- [36] Pollegioni L., Molla G., Sacchi S., Rosini E., Verga R., Pilone M.S.: Properties and applications of microbial D-amino acid oxidases : current state and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2008, **78**, 1-16.
- [37] Rao A.V., Rao L.G.: Carotenoids and human health. *Pharmacological Research*, 2007, **55**, 207-216.
- [38] Salinas E., Elorza de Orellano M., Rezza I., Martinem L., Marchesvky E., Sanz de Tosetti M.: Removal of cadmium and lead from dilute aqueous solutions by *Rhodotorula rubra*. *Bioresource Technology*, 2000, **72**, 107-112.
- [39] Suehara K., Kawamoto Y., Furi E., Kohda J., Nakano Y., Yano T.: Biological treatment of wastewater discharged from biodiesel fuel production plant with alkali-catalyzed transesterification. *J. Biosc. Bioeng.*, 2005, **100**, 4, 437-442.
- [40] Takac S., Akay B., Ozdamar T.H.: Bioconversion of trans-cinnamic acid to L-phenylalanine ammonia lyase of *Rhodotorula glutinis*: parameters and kinetics. *Enzyme Microb. Technol.*, 1995, **17**, 445-452.
- [41] Tapiero H., Townsend D.M., Tew K.D.: The role of carotenoids in the prevention of human pathologies. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2004, **58**, 100-110.
- [42] Tinoi J., Rakariyatham N., Deming R.L.: Simplex optimization of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* using hydrolyzed mung bean waste flour as substrate. *Process Biochemistry*, 2005, **40**, 2551-557.
- [43] Velankar H.R., Heble M.R.: Biotransformation of (L)-citronellal to (L)-citronellol by free and immobilized *Rhodotorula minuta*. *Elec. J. Biotechnol.*, 2003, **6**, 90-103.
- [44] Xue F., Hang X., Luo H., Tan T.: A new method for preparing raw material for biodiesel production. *Process Biochemistry*, 2006, **41**, 1699-1702.

TRADITIONAL AND NEW DIRECTIONS IN BIOTECHNOLOGICAL APPLICATIONS OF YEAST SPECIES OF THE GENUS RHODOTORULA

S u m m a r y

The yeast species of the genus *Rhodotorula* are ubiquitous in the human environment. Until recently, they have been mainly perceived as saprophytes, which spoil or contaminate food products. However, owing to many new options discovered by scientists of using them, they could be supposed to become a significant group of micro-organisms in the future. In this paper, some directions of using yeast of the genus *Rhodotorula* are presented. Carotenoids, exopolysaccharides, and enzymes produced by the biomass of *Rhodotorula* strain can be applied in many industrial fields. While assessing the usefulness of yeast, another more important aspect is considered, namely, the utilization of their cell biomass in the processes of binding metal ions or in biodegradation of waste/refuse.

Key words: *Rhodotorula*, carotenoids, enzymes, exopolysaccharides, bio-fuels, adsorption ☒