

ACTA SCIENTIARUM POLONORUM

Czasopismo naukowe założone w 2001 roku przez polskie uczelnie rolnicze

Biotechnologia

Biotechnologia

Biotechnology

10 (3) 2011



Bydgoszcz Kraków Lublin Olsztyn
Poznań Siedlce Szczecin Warszawa Wrocław

Executive Board of *Acta Scientiarum Polonorum*

Jerzy Sobota (Wrocław) – chairman

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

Scientific Board of *Biotechnology*

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

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

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

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

Print edition is an original (reference) edition

Cover design
Daniel Morzyński

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

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

Printed: 150 + 16 copies Publishing sheets: 2,6 Printing sheets: 2,5

Szanowni Państwo,

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

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

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

Zespół Redakcyjny

Dear Readers,

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

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

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

Editorial Team

WPLYW DODATKÓW STABILIZUJĄCYCH NA AKTYWNOŚĆ SACHAROLITYCZNĄ DROŻDŻY PIEKARSKICH *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* W CZASIE SUSZENIA SUBLIMACYJNEGO ORAZ PRZECHOWYWANIA

Katarzyna Samborska, Agata Drzazga

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Streszczenie. Celem pracy było zbadanie wpływu rodzaju oraz stężenia substancji ochronnych (glicerol, sacharoza, fruktoza, maltodekstryna) na aktywność sacharolityczną drożdży piekarskich *Saccharomyces cerevisiae* w czasie suszenia sublimacyjnego oraz przechowywania. Materiał zamrażano w temperaturze -30°C i suszono w temperaturze 40°C przy ciśnieniu 0,63 mbar przez 20 godzin. Stwierdzono pozytywny wpływ dodatku 4% glicerolu, 8% fruktozy oraz 4 i 8% maltodekstryny na zachowanie aktywności sacharolitycznej drożdży po suszeniu. Najlepszymi właściwościami ochronnymi w czasie suszenia i przechowywania charakteryzowała się 8% maltodekstryna.

Słowa kluczowe: drożdże piekarskie, suszenie sublimacyjne, aktywność sacharolityczna

WSTĘP

Suszenie sublimacyjne, ze względu na brak oddziaływania podwyższonej temperatury na materiał, może być stosowane do odwadniania materiałów termolabilnych, takich jak bakterie, drożdże i enzymy [Abadias i in. 2001]. Jednakże, w przypadku suszenia wegetatywnych form mikroorganizmów, szczególnego znaczenia nabiera niekorzystny wpływ dehydracji, obserwowany obok degradacji termicznej. Usuwanie wody z układu komórkowego powoduje przemianę białek protoplazmy z hydrozolu w hydrożel oraz wzrost stężenia elektrolitu, co z kolei prowadzi do zahamowania funkcji życiowych [Paślawska 2006]. Bayrock i Ingledew [1997] podają, że minimalna końcowa zawartość wody pozwalająca na zachowanie aktywności i żywotności drożdży wynosi około 15%. Zwiększenie intensywności odparowania wody może powodować usuwanie z komórek wody związanej, wywołujące zniszczenie struktur biopolimerów i membran komórkowych,

© Copyright by Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Adres do korespondencji – Corresponding author: Katarzyna Samborska, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, Wydział Nauk o Żywności, Katedra Inżynierii Żywności i Organizacji Produkcji, ul. Nowoursynowska 159c, 02-776 Warszawa, e-mail: katarzyna_samborska@sggw.pl

prowadzące z kolei do utraty żywotności komórek [Strumiłło i in. 1991]. Pierwszym etapem suszenia sublimacyjnego jest zamrażanie, w czasie którego również może zachodzić wiele niekorzystnych zmian wpływających na obniżenie żywotności drożdży. Zmiany te to np. denaturacja substancji białkowych czy uszkodzenia mechaniczne poprzez powstające kryształy lodu. Poszczególne szczepy i gatunki mikroorganizmów wykazują znaczne zróżnicowanie w odporności na działanie podwyższonej temperatury, usuwanie wody oraz uszkodzenia mechaniczne w czasie zamrażania. W niektórych przypadkach zastosowanie suszenia sublimacyjnego prowadzi do całkowitej utraty żywotności komórek [Abadias i in. 2001].

Aby otrzymać drożdże suszone o wysokiej aktywności sacharolitycznej, często konieczne jest zastosowanie substancji ochronnych dodawanych do materiału przed suszeniem [Cerrutti i in. 2000, Abadias i in. 2001, Paślawska 2006]. Spośród wielu substancji najkorzystniejsze wydaje się stosowanie cukrów, ze względu na ich stosunkowo niską cenę, neutralność chemiczną oraz powszechność występowania w przetwórstwie żywności. Mechanizm ochronny cukrów, polegający głównie na zastępowaniu wody związanej (usuwanej w czasie suszenia) w strukturach membran i biopolimerów związany jest z następującymi zjawiskami: ochroną przed zniszczeniem ścian komórkowych w warunkach obniżonej zawartości wody, ochroną przed uszkodzeniami mechanicznymi przez powstające w czasie zamrażania kryształy lodu, ochroną przed degradacją termiczną [Cerrutti i in. 2000, Witrowa-Rajchert i Samborska 2002, Santivarangkna i in. 2008].

Celem pracy było zbadanie wpływu rodzaju oraz stężenia substancji ochronnych na aktywność sacharolityczną drożdży piekarskich *Saccharomyces cerevisiae* w czasie suszenia sublimacyjnego oraz przechowywania.

MATERIAŁY I METODY

Materiały: Materiałem do badań były prasowane drożdże piekarskie *Saccharomyces cerevisiae* dostępne w sprzedaży detalicznej (Lallemant, Polska) oraz następujące substancje ochronne: glicerol, sacharoza, fruktoza oraz maltodekstryna niskoscukrzona, dodawane do biomasy w ilości 4 i 8%.

Suszenie: Po uprzednim wymieszaniu z dodatkami ochronnymi drożdże zamrażano w temperaturze 30°C (zamrażarka szokowa IRINOX, seria HC), a następnie suszono sublimacyjnie przy temperaturze półek 40°C i ciśnieniu 0,63 mbar (suszarka sublimacyjna CHRIST Gamma 1–16 LSC) przez 20 godzin.

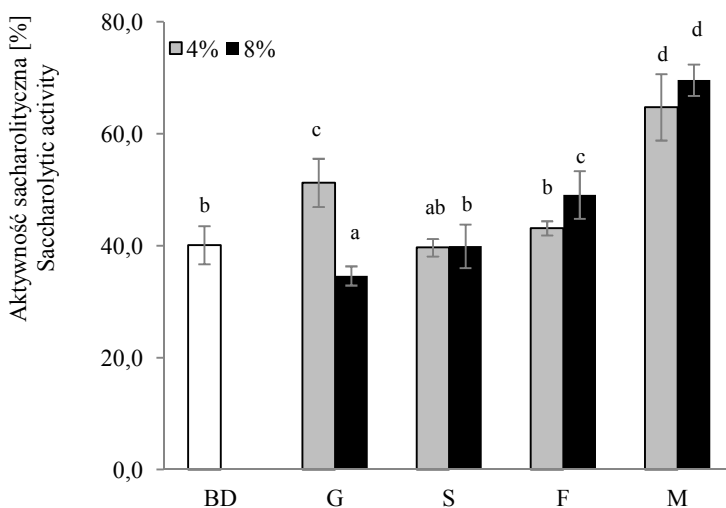
Metody analityczne: Bezpośrednio po suszeniu oraz co 3 tygodnie w czasie 12 tygodni przechowywania oznaczano zawartość suchej substancji (PN-A-79005-4:1997) i aktywność sacharolityczną drożdży (poprzez pomiar ilości wydzielanego CO₂ na podstawie ubytku masy nastawu w czasie godzinnej fermentacji 50% roztworu sacharozy przez 3,275 g s.s. drożdży). Aktywność drożdży suszonych wyrażano jako aktywność względną w stosunku do aktywności drożdży świeżych.

Przechowywanie: Drożdże suszone z dodatkiem 4 i 8% glicerolu, sacharozy, fruktozy oraz maltodekstryny niskoscukrzony przechowywano w temperaturze 25°C z wolnym dostępem powietrza (w otwartych pojemnikach). Drożdże suszone z dodatkiem 8% maltodekstryny przechowywano w temperaturze 25°C, 4°C i -18°C z wolnym dostępem powietrza oraz w szczelnie zamkniętych opakowaniach z laminatu dwuwarstwowego PET12met/PE80 (Coffee Service, Polska). Przechowywanie trwało 12 tygodni.

WYNIKI I DISKUSJA

Wpływ procesu suszenia sublimacyjnego na aktywność sacharolityczną drożdży *Saccharomyces cerevisiae*

Względna aktywność sacharolityczna drożdży piekarskich *Saccharomyces cerevisiae* suszonych sublimacyjnie oznaczona bezpośrednio po suszeniu (rys. 1) wynosiła od $34,6 \pm 1,7\%$ (dodatek 8% glicerolu) do $69,6 \pm 2,8\%$ (dodatek 8% maltodekstryny). Istotny statystycznie wzrost aktywności sacharolitycznej po suszeniu w porównaniu z suszeniem bez dodatków zaobserwowano po zastosowaniu 4% glicerolu, 8% fruktozy oraz 4 i 8% maltodekstryny. Pozostałe warianty charakteryzowały się aktywnością sacharolityczną na poziomie zbliżonym lub niższym jak w przypadku drożdży suszonych bez dodatków. Wzrost stężenia fruktozy i maltodekstryny powodował zwiększenie aktywności sacharolitycznej drożdży, natomiast w przypadku glicerolu zaobserwowano zależność odwrotną. Najlepszymi właściwościami ochronnymi charakteryzowała się maltodekstryna, jej 8% dodatek pozwolił na otrzymanie drożdży suszonych o aktywności sacharolitycznej na poziomie $69,6 \pm 2,8\%$ aktywności drożdży suszonych bez dodatków.



Rys. 1. Względna aktywność sacharolityczna drożdży *Saccharomyces cerevisiae* suszonych sublimacyjnie z dodatkiem glicerolu G, sacharozy S, fruktozy F, maltodekstryny M i bez dodatków BD. Wartości średnie oznaczone tą samą literą nie różniły się statystycznie istotnie (p-value 0,05)

Fig. 1. Relative saccharolytic activity of baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* freeze-dried in a presence of glycerol G, sucrose S, fructose F, maltodextrin M and without any addition BD. Mean values followed by a different letter were significantly different at $p < 0,05$

Dodatek substancji ochronnych różnego pochodzenia w czasie suszenia mikroorganizmów jest sposobem na zwiększenie ich przeżywalności i utrzymanie aktywności sacharolitycznej na wysokim poziomie. Efekt ochronny dodatków zależy od rodzaju substancji oraz jej stężenia. Zbyt duże stężenie może często wywoływać efekt odwrotny i powodować zwiększoną degradację enzymu [Klibanov 1983, Morgan i in. 2006]. Abadías i in. [2001] suszyli sublimacyjnie drożdże *Candida sake* z dodatkiem m.in. fruktozy,

sacharozy, glicerolu i skrobi w ilości 1, 5 i 10%. Porównując wyniki otrzymane przez tych autorów z prezentowanymi na rysunku 1 można stwierdzić, że są one zbliżone, ponieważ zwiększanie stężenia dodatku wpływało na polepszenie zachowania aktywności sacharolitycznej drożdży po suszeniu, z wyjątkiem glicerolu, a spośród czterech wymienionych substancji najlepszymi właściwościami ochronnymi charakteryzowała się skrobia (w bieżącej pracy pochodna skrobi – maltodekstryna). Berny i Hennebert [1991] suszyli sublimacyjnie drożdże *Saccharomyces cerevisiae* z zastosowaniem mleka odtłuszczonego jako nośnika i trehalozy oraz rafinozy jako substancji ochronnych, po użyciu których aktywność sacharolityczna drożdży zwiększyła się z 30 do 98%. Paślowska [2006] stwierdziła, że stosowanie trehalozy i laktozy jako dodatków chroniących komórki przed negatywnym wpływem zamrażania jest uzasadnione ze względu na możliwość obniżenia końcowej wilgotności i aktywności wody oraz poprawę aktywności enzymatycznej liofilizatów.

Zawartość suchej substancji w drożdżach suszonych w obecności substancji ochronnych (tab. 1) wynosiła od $98,3 \pm 0,7$ do $99,0 \pm 0,2\%$. Drożdże suszone bez dodatków miały zawartość suchej substancji na poziomie $99,0 \pm 0,2\%$. Różnice między powyższymi wartościami były nieistotne statystycznie.

Tabela 1. Zawartość suchej substancji (%) w drożdżach *Saccharomyces cerevisiae* suszonych sublimacyjnie z różnymi dodatkami

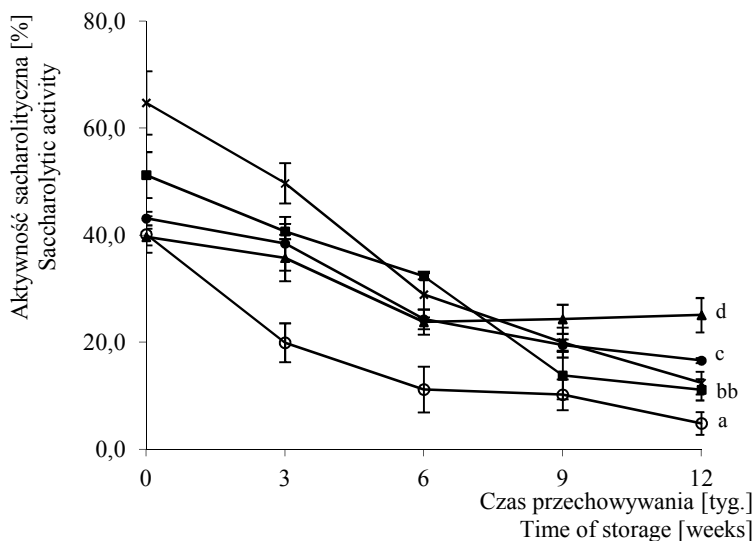
Table 1. Dry matter content (%) in baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* freeze-dried in a presence of protective substances

Substancja ochronna Protective substance	Zawartość substancji ochronnej Protective substance content	
	4%	8%
Glicerol	$98,3 \pm 0,7$	$98,9 \pm 0,4$
Sacharoza	$98,4 \pm 0,7$	$98,5 \pm 0,4$
Fruktoza	$98,2 \pm 0,7$	$98,8 \pm 0,4$
Maltodekstryna	$98,8 \pm 0,6$	$99,0 \pm 0,2$

Tutowa i Kuc [1991] podają, że drożdże należą do materiałów, które w czasie suszenia są szczególnie wrażliwe na utratę wody. Według Liu i in. [1996] usuwanie wody związanej z komórkami wywołuje zniszczenie struktur biopolimerów i membran komórkowych, prowadzące do utraty żywotności, a stopień degradacji z tym związany jest wprost proporcjonalny do ilości usuniętej wody. Dziugan [2009] podaje, że proces próżniowego dosuszania w drugim etapie suszenia sublimacyjnego powoduje znaczny spadek ilości żywych komórek, a zatem zasadne jest przerywanie procesu liofilizacji przy wilgotności końcowej produktu mieszczącej się w przedziale od 4 do 8%. Zależność między końcową zawartością i aktywnością wody a żywotnością drożdży *Saccharomyces cerevisiae* suszonych sublimacyjnie podaje również Paślowska [2007]. Jednakże, wyniki uzyskane w pracy nie potwierdzają przedstawionych wyżej zależności. Aktywność sacharolityczna drożdży po suszeniu była niezależna od końcowej zawartości wody. Istotny wpływ miały rodzaj i stężenie zastosowanych substancji dodatkowych.

Wpływ przechowywania na aktywność sacharolityczną drożdży *Saccharomyces cerevisiae* suszonych sublimacyjnie

Przechowywanie drożdży suszonych z dodatkiem 4% substancji ochronnych w temperaturze 25°C przez 12 tygodni w warunkach swobodnego dostępu powietrza spowodowało obniżenie aktywności sacharolitycznej (rys. 2) do wartości od $4,8 \pm 2,1\%$ (suszone bez dodatków) do $25,1 \pm 3,2\%$ (suszone z sacharozą). Najniższą aktywnością sacharolityczną po przechowywaniu, obok drożdży suszonych bez dodatków, charakteryzowały się te suszone z dodatkiem glicerolu i maltodekstryny. Sacharozą, mimo że bezpośrednio po suszeniu nie wykazała właściwości ochronnych, miała je w czasie przechowywania.

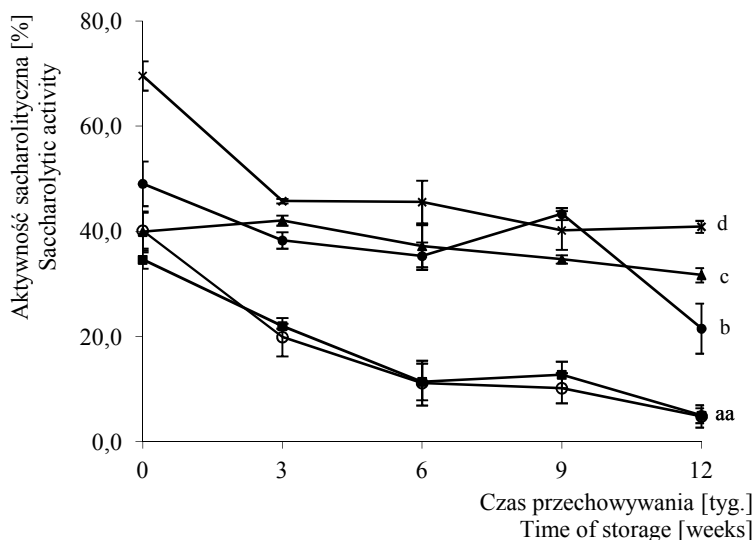


Rys. 2. Zmiany aktywności sacharolitycznej drożdży *Saccharomyces cerevisiae* suszonych sublimacyjnie z dodatkiem 4% glicerolu (■), sacharozy (▲), fruktozy (●), maltodekstryny (x) oraz bez dodatków (○) podczas 12 tygodni przechowywania w temperaturze 25°C. Wartości średnie aktywności sacharolitycznej uzyskane po 12 tygodniach przechowywania oznaczone tą samą literą nie różniły się statystycznie istotnie ($p < 0,05$)

Fig. 2. Saccharolytic activity of baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* freeze-dried in a presence of 4% glycerol (■), sucrose (▲), fructose (●), maltodextrin (x) or without any addition (○) after 12 weeks of storage at 25°. Mean values of saccharolytic activity after 12 weeks of storage followed by a different letter were significantly different at $p < 0,05$

Przechowywanie drożdży suszonych z dodatkiem 8% substancji ochronnych w temperaturze 25°C przez 12 tygodni w warunkach swobodnego dostępu powietrza spowodowało obniżenie aktywności sacharolitycznej drożdży (rys. 3) do wartości od $4,8 \pm 2,1\%$ do $40,9 \pm 1,1\%$. Najgorszym zachowaniem aktywności sacharolitycznej po przechowywaniu charakteryzowały się drożdże suszone bez dodatków oraz suszone z dodatkiem glicerolu. Najlepszymi właściwościami ochronnymi wykazała się maltodekstryna. Aktywność drożdży suszonych z jej 8% dodatkiem po 12 tygodniach przechowywania obniżyła się o 28,7 punktu procentowego i wynosiła $40,9 \pm 1,1\%$ aktywności drożdży świeżych

przez suszeniem. Porównując wyniki otrzymane po przechowywaniu próbek suszonych z dodatkiem 4 i 8% substancji ochronnych, można stwierdzić, że lepsze wyniki daje zastosowanie wyższego dodatku oraz maltodekstryny. Najwyższą wartość względnej aktywności sacharolitycznej po 12 tygodniach przechowywania zanotowano w przypadku 8% dodatku maltodekstryny.



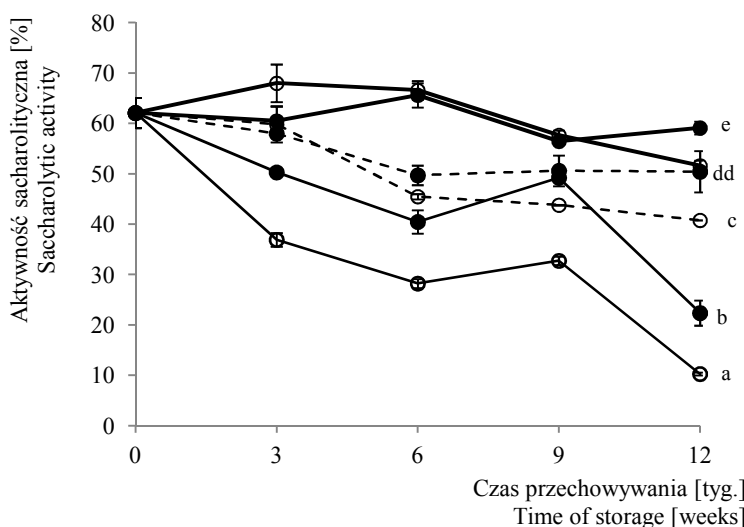
Rys. 3. Zmiany aktywności sacharolitycznej drożdży *Saccharomyces cerevisiae* suszonych sublimacyjnie z dodatkiem 8% glicerolu (■), sacharozy (▲), fruktozy (●), maltodekstryny (x) oraz bez dodatków (○) podczas przechowywania w temperaturze 25°C. Wartości średnie oznaczone tą samą literą nie różniły się statystycznie istotnie (p-value 0,05)

Fig. 3. Saccharolytic activity of baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* freeze-dried in a presence of 8% glycerol (■), sucrose (▲), fructose (●), maltodextrin (x) or without any addition (○) after 12 weeks of storage at 25°. Mean values of saccharolytic activity after 12 weeks of storage followed by a different letter were significantly different at p<0,05

Drożdże w czasie przechowywania ulegają różnym zmianom, do których należą bardzo złożone procesy oddechowe, powiązane z rozkładem substancji zapasowych, przy czym zdolność do autolizy zależy w dużej mierze od warunków przechowywania. Utlenianie niektórych składników powoduje obniżenie aktywności enzymatycznej drożdży oraz powolną utratę biologicznej aktywności wysuszonych drożdży [Sobczak i in. 1997, Sobczak 1988]. Działanie ochronne cukrów, pozwalające na obniżenie postępującej degradacji mikroorganizmów suszonych w czasie przechowywania, jest związane głównie z ich właściwościami szklistotwórczymi. Wysoka lepkość matrycy w stanie szklistym działa stabilizująco poprzez zmniejszanie mobilności cząsteczek i obniżanie szybkości zachodzących reakcji. Najczęściej stosowanymi substancjami szklistotwórczymi są dwucukry (sacharoza, trehaloza) i polisacharydy (maltodekstryna) [Buitink i in. 2000].

Na rysunku 4 przedstawiono wpływ temperatury przechowywania oraz ograniczenia dostępu powietrza (poprzez zastosowanie opakowania z laminatu dwuwarstwowego) na aktywność sacharolityczną drożdży po 12 tygodniach przechowywania. Przechowywanie suszonych drożdży w temperaturze 4 i -18°C w opakowaniach z laminatu pozwoliło

w znacznym stopniu zwiększyć utrzymanie aktywności sacharolitycznej drożdży w porównaniu z przechowywaniem w temperaturze 25°C z wolnym dostępem powietrza. W każdej temperaturze przechowywania aktywność drożdży po przechowywaniu była większa o około 10 punktów procentowych po zastosowaniu opakowania. Aktywność suszonych drożdży przechowywanych w temperaturze 4 i -18°C w opakowaniach wynosiła odpowiednio $50,4 \pm 4,1$ i $59,1 \pm 1,3\%$ aktywności drożdży świeżych przez suszeniem. Porównując między sobą wyniki uzyskane dla próbek przechowywanych z tą samą dostępnością powietrza w różnych temperaturach, można zauważyć istotny wzrost aktywności sacharolitycznej po obniżeniu temperatury przechowywania, również do temperatury -18°C. Costa i in. [2002] stwierdzili, że stabilność przechowalnicza mikroorganizmów suszonych sublimacyjnie jest znacznie wyższa przy niższych temperaturach przechowywania. Nie badali oni jednak wpływu temperatury poniżej 0°C. Teixeira i in. [1995] stwierdzili wzrost szybkości obumierania suszonych bakterii *L. delbrueckii* przechowywanych w temperaturze -20°C oraz wzrost przeżywalności przechowywanych w temperaturze 4°C. W bieżącej pracy nie zaobserwowano negatywnego wpływu temperatury -18°C w porównaniu z temperaturą 4°C na aktywność sacharolityczną suszonych drożdży.



Rys. 4. Zmiany aktywności sacharolitycznej drożdży *Saccharomyces cerevisiae* suszonych sublimacyjnie z dodatkiem 8% maltodekstryny podczas 12 tygodni przechowywania w opakowaniu PETmet/PE (symbole wypełnione) i z wolnym dostępem powietrza (symbole otwarte) w temperaturze 25°C (—), 4°C (---) i -18°C (—). Wartości średnie oznaczone tą samą literą nie różniły się statystycznie istotnie (p-value 0,05)

Fig. 4. Saccharolytic activity of baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* freeze-dried in a presence of 4% maltodextrin during 12 weeks of storage in PETmet/PE bags (filled symbols) or in free air access conditions (open symbols) at 25°C (—), 4°C (---) i -18°C (—). Mean values of saccharolytic activity after 12 weeks of storage followed by a different letter were significantly different at p<0,05

PODSUMOWANIE

Metodą sublimacyjną można otrzymać suszone drożdże piekarskie *Saccharomyces cerevisiae* o wysokiej aktywności sacharolitycznej, pod warunkiem zastosowania odpowiednich substancji ochronnych. Najkorzystniejsze z punktu widzenia zachowania aktywności drożdży po suszeniu i przechowywaniu jest zastosowanie dodatku 8% malto-dekstryny niskoscukrzonowej. Sacharoza nie wykazuje właściwości ochronnych w czasie suszenia drożdży, lecz działa jako stabilizator w czasie przechowywania. Suszone drożdże piekarskie powinny być przechowywane w warunkach chłodniczych lub zamrażalniczych.

PIŚMIENNICTWO

- Abadias M., Benabarre A., Teixido N., Usall J., Vinas I., 2001. Effect of freeze drying and protectants on viability of the biocontrol yeast *Candida sake*. *International J. Food Microbiol.*, 65, 73–182.
- Bayrock D., Ingledew W.M., 1997. Mechanism of viability loss during fluidized bed drying of baker's yeast. *Food Res. Int.*, 30 (6), 417–425.
- Berny J.F., Hennebert G.L., 1991. Viability and stability of yeast cells and filamentous fungus spores during freeze drying: effects of protectants and cooling rates. *Mycologia*, 83, 805–815.
- Buitink J., van den Dries I.J., Hoekstra F.A., Alberda M., Hemminga M.A. 2000. High critical temperature above T_g may contribute to the stability of biological systems. *Biophys. J.* 79 (2), 1119–1128.
- Cerrutti P., Segovia de Huergo M., Galvagno M., Schebor C. Pilar Buera M., 2000. Commercial baker's yeast stability as affected by intracellular content of trehalose, dehydration procedure and the physical properties of external matrices. *App. Microbiol. Biotechnol.*, 54 (4), 575–580.
- Costa E., Usall J., Teixido N., Torres R., Vinas I., 2002. Effect of package and storage conditions on viability and efficacy of the freeze-dried biocontrol agent *Pantoea agglomerans* strain CPA-2. *Journal of Applied Microbiology*, 92, 873–878.
- Dziugan P., 2009. Przeżywalność suszenia sublimacyjnego przez bakterie fermentacji mlekowej i drożdże. *Chłodnictwo*, XLIV (1–2), 54–57.
- Klibanov A.M., 1983. Thermostabilisation of enzymes. *Adv. App. Microbiol.*, 29, 1–29.
- Liu X.D., Strumiłło C., Zbiciński I., 1996. Protection of thermo- and xero-labile materials during thermal drying. *Drying'96*. Łódź Technical University, Łódź.
- Morgan C. A., Herman N., White P. A., Vesey G., 2006. Preservation of microorganisms by drying; a review. *J. Microb. Meth.*, 66, 183–193.
- Pasławska M., 2006. Aktywność drożdży *Saccharomyces cerevisiae* liofilizowanych z dodatkiem wybranych substancji ochronnych. *Inżynieria Rolnicza*, 4 (79), 65–73.
- Pasławska M., 2007. Viability of yeast *Saccharomyces cerevisiae* dried in the presence of lactose. *Acta Agrophysica*, 9 (1), 171–181.
- Santivarangkna C., Higl B., Foerster P. 2008. Protection mechanisms of sugars during different stages of preparation process of dried lactic acid starter cultures, *Food Microbiology*, 25, 429–441
- Sobczak E., 1988. Wpływ niektórych czynników na aktywność suszonych drożdży piekarskich. *Przem. Ferm Owoc-Warz.*, 4, 4–7.
- Sobczak E., Gniewosz M., Raczyńska A., 1997. Biotechnologiczne aspekty hodowli i suszenia drożdży piekarskich. *Przem. Ferm Owoc-Warz.*, 10, 32–35.
- Strumiłło C., Markowski A., Adamiec J., 1991. Selected aspects of drying of biotechnological products. *Drying'91*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 36–55.

- Teixeira P.C., Castro M.H., Malcata F.X., Kirby R.M., 1995. Survival of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* following spray drying. *Journal of Dairy Science*, 78, 1025–1031.
- Tutowa E.G., Kuc P.S., 1991. Suszenie produktów biosyntezy. Wydawnictwa Naukowo-Techniczne, Warszawa.
- Witrowa-Rajchert D, Samborska K., 2002. Metody suszenia mikroorganizmów i produktów syntezy mikrobiologicznej. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość.*, 2(31), 5–15.

THE INFLUENCE OF STABILIZING ADDITIVES ON THE SACCHAROLYTIC ACTIVITY OF BAKER'S YEAST *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* DURING FREEZE-DRYING AND STORAGE

Abstract. The effects of the use of protective agents (glycerol, sucrose, fructose, maltodextrin, concentration 4 and 8%) on the saccharolytic activity of baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* during freeze-drying and storage were studied. A material was frozen at -30°C and freeze dried at 40°C/0,63 mbar during 20h. The positive influence on yeasts saccharolytic activity after drying, as compared to the drying without additives, was observed after the use of 4% glycerol, 8% fructose, 4 and 8% maltodextrin. 8% maltodextrin was the best protective agent during drying and storage at 25°C.

Key words: baker's yeast, freeze-drying, saccharolytic activity

Accepted for print – Zaakceptowano do druku: 30.09.2011

For citation – Do cytowania: Samborska K., Drzazga A., 2011. Wpływ dodatków stabilizujących na aktywność sacharolityczną drożdży piekarskich *Saccharomyces cerevisiae* w czasie suszenia sublimacyjnego oraz przechowywania. *Acta Sci. Pol. Biotechnol.*, 10 (3), 5–14.

HEKSADEKAN JAKO SUBSTRAT W BIOSYNTYZIE KWASU CYTRYNOWEGO I KWASU IZOCYTRYNOWEGO PRZEZ *YARROWIA LIPOLYTICA* A-101

Małgorzata Robak

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Streszczenie. Istotnym problemem w bioprodukcji kwasu cytrynowego (CA) jest czystość procesu. Niewielkie zanieczyszczenie kwasem izocytrynowym (ICA) utrudnia krystalizację. W przypadku mutantów szczepu *Yarrowia lipolytica* A-101, ilość gromadzonego ICA z glukozy, fruktozy lub glicerolu nie przekracza kilku % sumy obu kwasów. Wyjściowy szczep nagromadza w tych warunkach ~14% ICA i ponad 30% gdy substratem jest heksadekan lub kwasy tłuszczowe.

Celem badań była ocena biosyntezy CA i ICA przez szczep *Y. lipolytica* A-101 w podłożu z heksadekanem, przy trzech prędkościach obrotów mieszadła.

Największą zawartość kwasów ($79,3 \text{ gL}^{-1}$) uzyskano przy zastosowaniu wysokiej prędkości obrotowej mieszadła (600 rpm). Przy najniższej prędkości obrotów mieszadła (150 rpm) nagromadzenie obu kwasów było zdecydowanie mniejsze ($8,5 \text{ gL}^{-1}$). Przy dwóch najwyższych szybkościach ilość nagromadzonego ICA dochodziła do 60% sumy badanych kwasów. Przy niskich prędkościach obrotowych mieszadła w przewodzie wydzielany był CA (70%). W podłożu zawierającym glukozę badany szczep nagromadził $31,7 \text{ gL}^{-1}$ CA, a ICA stanowił mniej niż 10% sumy kwasów.

Słowa kluczowe: *Yarrowia lipolytica*, czystość biosyntezy, kwas cytrynowy, kwas izocytrynowy, heksadekan

WSTĘP

Od początku XX wieku kwas cytrynowy (CA) na skalę przemysłową jest produkowany przez *Aspergillus niger* [Leśniak i in. 2002, Lofty i in. 2007]. Przez długi czas *A. niger* był brany pod uwagę jako jedyny producent CA, chociaż już w 1960 roku opisano szczepy drożdży *Yarrowia lipolytica* zdolne do produkcji CA i innych kwasów [Wojtatowicz 1991, Finogenova i in. 2008]. Proces biosyntezy z udziałem drożdży

© Copyright by Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Adres do korespondencji – Corresponding author: Małgorzata Robak, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, ul. C.K. Norwida 25, 50-375 Wrocław, e-mail: malgorzata.robak@up.wroc.pl

w porównaniu z fermentacją prowadzoną przez *A. niger* ma wiele zalet: szersze spektrum wykorzystywanych substratów (n-alkany, n-alkeny, parafiny, glicerol, oleje roślinne, hydrol glukozy oraz syropy glukozy i fruktozy), łatwiejszy sposób kontroli procesu [Papanikolaou i in. 2008]. Jediną wadą produkcji CA przez *Y. lipolytica* jest powstawanie ubocznego produktu, jakim jest kwas izocytrynowy (ICA) [Antonucci i in. 2001, Moeller i in. 2007]. Nawet niewielkie ilości ICA znacznie utrudniają proces krystalizacji CA, powodując wzrost kosztów produkcji tego szeroko wykorzystywanego dodatku do żywności, napojów i leków. W przypadku kilku szczepów (szczep dzięki *Y. lipolytica* A-101 oraz jego mutanty octanowe) badanych w rodzimej Katedrze jako potencjalnych producentów CA z glukozy, syropów glukozy, fruktozy, hydrolizatów skrobiowych czy glicerolu ilość gromadzonego ICA była niewielka, nie przekraczała kilku procent sumy kwasów w przypadku mutantów i 20% w przypadku szczepu dzikiego [Rywińska i in. 2010]. Natomiast jego ilość wzrasta w znacznym stopniu podczas wzrostu szczepu *Y. lipolytica* A-101 z heksadekanu czy substratów olejowych (tab. 1) [Wojtatowicz 1991].

Tabela 1. Ilość CA i ICA wydzielana przez *Y. lipolytica* A-101 w procesach biosyntezy z różnych substratów [Wojtatowicz 1991, zmodyfikowano]

Table 1. CA and ICA secreted by *Y. lipolytica* A-101 in biosynthesis process from different substrates [Wojtatowicz 1991, modified]

Substrat, czas procesu [h] Substrate, process duration [h]	Biomasa Biomass [gL ⁻¹]	CA + ICA [gL ⁻¹]	CA : ICA	CA [%]
n-heksadekan, 94 h n-hexadecane 94 h	8,4	70,2	1,78 : 1	64
olej rzepakowy (surowy), 84 h rape seed oil (raw) 84 h	8,7	57,1	1,44 : 1	59
olej rzepakowy (rafinowany), 80 h rape seed oil (purified) 80 h	10,9	64,0	2,57 : 1	72
olej sojowy (rafinowany), 72 h soya oil (purified) 72 h	7,2	62,0	1,56 : 1	61
porafinacyjne kwasy tłuszczowe, 78 h post oil refinery fatty acids 78 h	8,8	56,3	0,90 : 1	48
etanol, 90 h ethanol, 90 h	8,9	44,5	0,82 : 1	45
glukoza, 84 h glucose, 84 h	7,1	74,0	6,14 : 1	86

Ilość gromadzonego CA i ICA zależy przede wszystkim od szczepu drożdży, ale także od rodzaju wykorzystywanego substratu, jego stężenia oraz od warunków prowadzenia procesu [Arzumanow i in. 2000, Antonucci i in. 2001, Moeller i in. 2007]. W wielu opracowaniach badacze wykazują, że proporcje pomiędzy CA i ICA gromadzonymi z glukozy wynoszą od 3 do 20 [Rane i Sims 1993, Antonucci i in. 2001, Finogenova i in. 2008, Rymowicz i in. 2010]. Według Lewinson i in. [2007] stosunek CA do ICA zależy także od początkowego stosunku węgla do azotu w pożywce (C/N). Gdy jako substrat stosowana jest glukoza, przy wartości stosunku C/N wynoszącej 100, czterokrotnie więcej gromadzone jest CA, a przy wartości tego stosunku > 300 nawet dziewięciokrotnie.

Natomiast Kamzolova i in. [2008] twierdzą, że proporcja gromadzonych kwasów zależy od odczynu środowiska. Podczas biosyntezy CA i ICA z oleju słonecznikowego badany przez nich szczep *Y. lipolytica* VKM Y-2373 (niezależnie od wartości pH) nagromadzał ponad 120 gL^{-1} tych kwasów. Natomiast wyliczony przez nich stosunek ICA: CA wynosił 1,24:1 w pH 4,5 oraz 1,39:1 w pH 6,0, czyli był podobny i raczej wskazuje na mały wpływ pH na proporcje pomiędzy nagromadzonymi kwasami. Wcześniej Papanikolaou i in. [2002] wykazali, że szczep *Y. lipolytica* LGAM S(7) z glukozy, niezależnie od pH, nie nagromadzał więcej niż 10% ICA, czyli w proporcji 9:1.

W literaturze brakuje informacji dotyczących badań proporcji gromadzonych kwasów- CA i ICA- w początkowych godzinach ich biosyntezy w podłożach z heksadekanem. Dlatego celem pracy była ocena wzrostu oraz sprawdzenie czystości biosyntezy CA przez szczep *Y. lipolytica* A-101 w hodowlach w podłożach z heksadekanem w warunkach zróżnicowanej intensywności mieszania. Należy zaznaczyć, że najlepsi producenci CA, mutanty octanowe wywodzące się z tego szczepu, nie rosną na tym substracie i nie można uzyskać w ich przypadku takich informacji.

MATERIAŁY I METODY

Mikroorganizmy. Przedmiotem badań był dziki szczep drożdży *Yarrowia lipolytica* A-101 wyizolowany z gleby i zdeponowany w Kolekcji Czystych Kultur w Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu.

Proces biosyntezy kwasów prowadzono w bioreaktorze AK3 i w kolbach w podłożu zawierającym w 1L: 50 g n-heksadekanu; 0,2 g KH_2PO_4 ; 1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1 g ekstraktu drożdżowego; 1,5 g NH_4Cl oraz roztwór soli mineralnych o składzie opisanym w pracy Robak [2002]. Podłoże przeznaczone do hodowli w kolbach uzupełniono o CaCO_3 (600 mg/kolbkę). Objętość robocza hodowli w bioreaktorach wynosiła 1L, a w kolbach 25 ml.

Hodowle w bioreaktorze prowadzono przy trzech prędkościach obrotowych wału mieszadła 150, 300 i 600 rpm w temperaturze 28°C , przy napowietrzaniu wynoszącym $0,68 \text{ Lmin}^{-1}$. Stosowano stabilizację pH do wartości 5,5 (20% NaOH). Proces prowadzono przez 67 godzin, pobierając próby dwa razy dziennie. Przeprowadzono także 48-godzinną kontrolną hodowlę z zastosowaniem glukozy jako substratu, przy prędkości obrotów mieszadła wynoszącej 600 rpm i pozostałych parametrach identycznych jak w hodowlach z heksadekanem.

Hodowle w kolbach przeprowadzono w dwóch wariantach natlenienia. W tym celu zastosowano różne wypełnienie objętości kolby podłożem hodowlanym, uzyskując stosunek objętości podłoża do objętości kolby: 1/10 i 1/20 (25 mL odpowiednio w kolbie o pojemności 250 i 500 mL). Hodowle w kolbach prowadzono na wytrząsarce przy 120 rpm i amplitudzie 7 cm, przez 90 godzin w temperaturze 28°C . Każdy wariant hodowli przeprowadzono w dwóch powtórzeniach.

Podłoże hodowlane w kolbach i bioreaktorze szczepiono 24-godzinną hodowlą inokulacyjną prowadzoną w podłożu zawierającym w 1 L: 30 g n-heksadekanu; 0,5 g KH_2PO_4 ; 1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1 g ekstraktu drożdżowego; 3 g NH_4Cl . Do każdej kolby dodano 600 mg CaCO_3 . Hodowle prowadzono na wytrząsarce. Inokulum stanowiło 4% hodowli w kolbach i 10% hodowli w bioreaktorze.

Oznaczano przyrost zawartości biomasy, końcowe stężenie biomasy oraz stężenie CA i ICA. Wyliczono objętościową i właściwą szybkość biosyntezy obu kwasów.

Stężenie CA oznaczano metodą pentabromoacetonową [Stern 1957] oraz w HPLC na kolumnie Animex HPX 87H połączonej z detektorem UV w temperaturze pokojowej. Szybkość przepływu fazy ciekłej (0,01 N H₂SO₄) wynosiła 0,6 mLh⁻¹ [Robak 2002].

Stężenie ICA oznaczano enzymatycznie z wykorzystaniem dehydrogenazy izocytrynianowej według metodyki opisanej przez Goldberg i Ellis [1983].

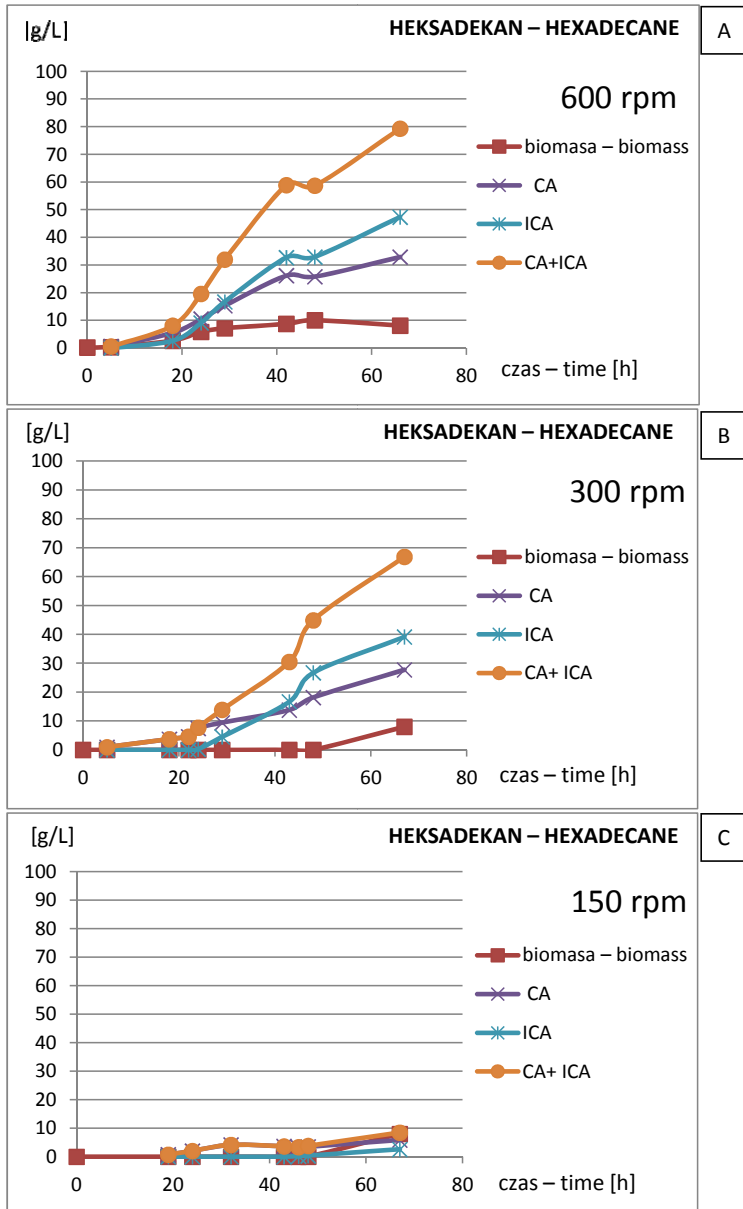
WYNIKI I DYSKUSJA

W dostępnej literaturze nie znaleziono wyników badań dotyczących wpływu szybkości napowietrzania na szybkość biosyntezy CA i ICA oraz na proporcje pomiędzy tymi kwasami nagromadzonymi w podłożach z heksadekanem przez drożdże *Y. lipolytica*. W tej pracy wykazano, że prędkość obrotów wału mieszadła w przedziale 300–600 rpm nie ma istotnego wpływu na czystość biosyntezy CA z heksadekanu (rys. 1). W hodowlach bioreaktorowych najwyższe stężenie kwasów (CA + ICA) uzyskano przy zastosowaniu najwyższych obrotów mieszadła (600 rpm). Sumaryczne stężenie nagromadzonych kwasów po 67 godzinach hodowli wynosiło 79,3 gL⁻¹, przy czym to ICA był produkowany w przewadze (47,3 gL⁻¹). Stosunek CA: ICA wynosił 0,7:1 (tab. 2). Przy pośredniej prędkości obrotów mieszadła (300 rpm) ilość gromadzonego ICA była również znaczna i dochodziła do 60% sumy kwasów (tab. 2). Natomiast niższa prędkość obrotów mieszadła (150 rpm) i tym samym niższe natlenianie podłoża hodowlanego powodowały, że głównie nagromadzał się CA (ponad 70% sumy kwasów) i proces biosyntezy był zdecydowanie mniej wydajny. Drożdże nagromadziły niecałe 8,5 gL⁻¹ badanych kwasów (rys. 1). Porównując, w hodowli w podłożu zawierającym glukozę jako źródło węgla stężenie wydzielonego CA wynosiło 31,7 gL⁻¹ przy nieznacznym udziale ICA wynoszącym 9,6 % sumy kwasów (rys. 2).

Tabela 2. Biosynteza CA i ICA przez *Y. lipolytica* A-101 z heksadekanu i glukozy we wglębnej hodowli okresowej przy różnych prędkościach obrotów mieszadła

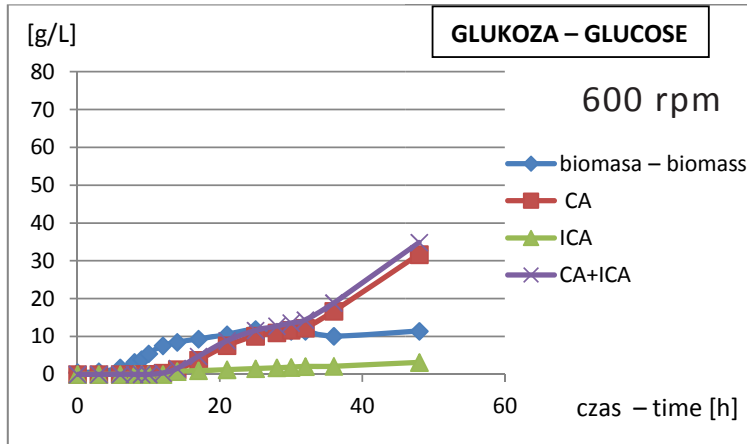
Table 2. Biosynthesis of CA and ICA by *Ylipolytica* A-101 from hexadecane and glucose in batch-culture with different agitation rate

Substrat Substrat	Szybkość mieszania [rpm] Agitation rate	Biomasa [gL ⁻¹] Biomass	CA+ICA [gL ⁻¹]	ICA		CA		CA: ICA
				[gL ⁻¹]	%	[gL ⁻¹]	%	
Heksadekan Hexadecane	150	8,0	8,5	2,6	30,6	5,9	69,4	2,3:1
Heksadekan Hexadecane	300	8,01	66,8	39,1	59,5	27,7	41,5	0,7:1
Heksadekan Hexadecane	600	8,13	79,3	47,3	59,6	32,9	40,4	0,7:1
Glukoza Glucose	600	11,42	33,0	3,2	9,7	29,8	90,3	9,3:1



Rys. 1. Wpływ prędkości obrotowej mieszadła na przyrost biomasy i nagromadzenie CA oraz ICA podczas głębokiej hodowli okresowej *Y.lipolytica* A-101 w podłożu z heksadekanem. Prędkość obrotów mieszadła: (A) 600 rpm; (B) 300 rpm; (C) 150 rpm

Fig. 1. Effect of agitation rate on biomass, CA and ICA accumulation by *Y.lipolytica* A-101 in batch culture on hexadecane based medium. Agitation rate: (A) 600 rpm; (B) 300 rpm; (C) 150 rpm



Rys. 2. Przyrost biomasy i biosynteza CA i ICA we wglębnej hodowli okresowej *Y. lipolytica* A-101 w podłożu z glukozy przy zastosowaniu wysokiej prędkości obrotowej mieszadła (600 rpm)

Fig. 2. Biomass growth and biosynthesis of CA and ICA by *Y. lipolytica* A-101 in BC on glucose based medium with high rate of agitation (600 rpm)

Na podstawie zestawionych w tabeli 2 wyników dotyczących końcowych zawartości badanych kwasów widać, że gdy substratem była glukoza, w przewodzie nagromadzany był CA. Proporcja pomiędzy gromadzonym CA i ICA wynosiła 9,3:1. Nie jest to jednak najwyższa z dotychczas opisanych wartości. We wcześniej przeprowadzonych badaniach średnia proporcja CA : ICA wynosiła ponad 39:1 w trzeciej recyrkulacji komórek podczas biosyntezy CA z hydrołu glukozy przez *Y. lipolytica* A-101.1.31 [Robak 1999]. Także w podłożach zawierających glicerol był nagromadzany przede wszystkim CA. Dla szczepu *Y. lipolytica* A-101.1.22 nagromadzającego CA z odpadowego glicerolu zanotowano proporcję CA: ICA bliską wartości 16:1 [Rymowicz i in. 2010] oraz ponad 49:1 w przypadku szczepu *Y. lipolytica* AWG7 [Rywińska 2008].

Natomiast przewagę biosyntezy ICA zaobserwowano także we wglębnych hodowlach okresowych w kolbach o różnym stosunku objętości podłoża do objętości kolby (tab. 3).

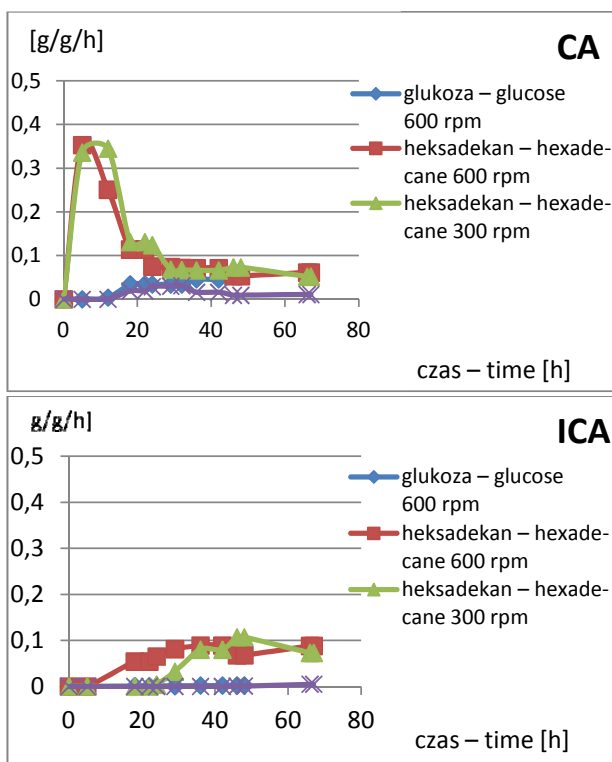
Tabela 3. Biosynteza CA i ICA przez *Y. lipolytica* A-101 z heksadecanu podczas wglębnej hodowli okresowej w kolbach i przy dwóch wariantach wypełnienia kolby podłożem

Table 3. Biosynthesis of CA and ICA by *Y. lipolytica* A-101 from hexadecane in flask batch-culture and with two variants of medium/flask volume filling

Podłoże/kolba* Medium/flask [V/V]	Biomasa Biomass [gL ⁻¹]	CA+ICA [gL ⁻¹]	ICA		CA		CA: ICA
			[gL ⁻¹]	[%]	[gL ⁻¹]	[%]	
1/10	6,52	38,31	16,85	44,0	21,47	56,0	1,30:1
1/20	6,0	74,92	40,57	54,2	34,35	45,8	0,85:1

*Stosunek objętości podłoża do objętości kolby – rate of medium volume to flask volume

W hodowlach bioreaktorowych w podłożu z heksadekanem, średnia szybkość właściwa nagromadzenia CA (wyliczona na koniec procesu) wynosiła 0,061; 0,052 i 0,011 $\text{gg}^{-1}\text{h}^{-1}$, odpowiednio przy prędkościach obrotów mieszadła wynoszących: 600, 300 i 150 rpm. W hodowlach w podłożu zawierającym glukozę, wartość tego parametru wynosiła 0,058 $\text{gg}^{-1}\text{h}^{-1}$. Jednak w początkowych godzinach hodowli prowadzonych przy 600 i 300 rpm szybkość właściwa biosyntezy CA w podłożu z heksadekanem była dużo wyższa i wynosiła 0,336 oraz 0,353 $\text{gg}^{-1}\text{h}^{-1}$ (rys. 3). Porównując, średnia szybkość właściwa biosyntezy ICA w podłożu z heksadekanem przy 600 i 300 rpm była wyższa niż szybkość właściwa produkcji CA i wynosiła odpowiednio 0,077 oraz 0,073 $\text{gg}^{-1}\text{h}^{-1}$. Przy wolniejszym mieszaniu (150 rpm) w podłożu z heksadekanem oraz w podłożu z glukozą średnia szybkość sekrecji ICA była zdecydowanie niższa, wynosiła odpowiednio 0,005 oraz 0,002 $\text{gg}^{-1}\text{h}^{-1}$.



Rys. 3. Kształtowanie się szybkości właściwej biosyntezy CA i ICA we wglębnych hodowlach okresowych *Y. lipolytica* A-101 w podłożach zawierającym heksadekan lub glukozę

Fig. 3. Evolution of specific rate of CA and ICA biosynthesis by *Y. lipolytica* A-101 from hexadecane and glucose in BC

We wcześniejszych badaniach nad szczepami wywodzącymi się ze szczepu dzikiego *Y. lipolytica* A-101 udokumentowano, że podczas niskiego natlenienia hodowli prowadzonej w podłożu zawierającym na inwertowaną melasę – CA był wydzielany od pierwszych godzin procesu z szybkością 0,15 $\text{gg}^{-1}\text{h}^{-1}$ [Robak i in. 1996]. W ramach tej pracy, podczas biosyntezy kwasów z heksadekanu przez szczep *Y. lipolytica* A-101, maksymalną

szybkość właściwą nagromadzenia ICA, wynoszącą $0,107 \text{ gg}^{-1}\text{h}^{-1}$, uzyskano w 48 godzinie przy pośredniej prędkości obrotów mieszadła (rys. 3). Zaprezentowane w ramach tej pracy wyniki wskazują, że mieszanie zdecydowanie wpływa na proporcje między CA i ICA nagromadzonymi przez badany szczep z heksadekanu. Intensywniejsze mieszanie prowadzi do zwiększenia ilości nagromadzanego ICA. Wydaje się to być specyfiką tego szczepu, ponieważ w przypadku innych izolatów tego samego gatunku obserwowano odwrotną zależność. Między innymi Finogenova i in. [1991] wykazali, że podczas biosyntezy kwasów przez *Y. lipolytica* 704 z etanolu, przy niskim natlenieniu w przewodzie gromadzony był ICA, a przy większym natlenieniu pomiędzy kwasami występowała równowaga lub niewielki nadmiar CA.

Wydzielenie CA i ICA w proporcjach, jakie obserwowano w tej pracy podczas biosyntezy badanych kwasów z heksadekanu oraz zanotowane przez Kamzolova i in. [2008] z oleju słonecznikowego, nie może być wynikiem wyłącznego działania cyklu glioksalowego i cyklu Krebsa, napędzanych powstającymi w procesie beta-oksydacji substratu cząsteczkami acetylo-CoA. W żadnym z nich wydzielany ICA nie byłby dominującym produktem. Może należałoby rozważyć schemat, w którym (teoretycznie) z jednej cząsteczki heksadekanu (16xC) w wyniku jednoczesnej diterminalnej i subterminalnej oksydacji powstaje 6 cząsteczek acetylo-CoA (12 C) (które zasilają cykl glioksalowy i częściowo cykl Krebsa) oraz jedna cząsteczka hydroksy dikarboksyłowego kwasu (4xC) ulegająca ostatecznym przemianom do bursztynianu, który po przyłączeniu acetylo-CoA mógłby generować powstanie jednej cząsteczki izocytrynianu w obiegu przypominającym redukcyjny cykl węgla [Evans i in. 1966]. Zaskakującą syntezę pięciowęglowych dikarboksyłowych kwasów opisali Erb i in. [2007] dla *Rhodobacter sphaeroides*. Udokumentowali, że podczas **tlenowego wzrostu** tych drobnoustrojów z octanu zachodzi **redukcyjna** karboksylacja krotonylo-CoA. W proponowanym przebiegu metabolizmu niekoniecznie może dochodzić do karboksylacji, możliwe jest przyłączenie jednej z powstających cząsteczek acetylo-CoA do bursztynianu. Ostatecznie w zaproponowanym obiegu metabolizmu w tym samym czasie powstawałaby jedna cząsteczka ICA i 5 cząsteczek acetylo-CoA. Te ostatnie zagospodarowane w cyklu glioksalowym i Krebsa ostatecznie umożliwiłyby uzyskanie jednej cząsteczki szczawiooctanu (4xC) (zapewniającej przebieg cyklu) i jednej CA (6xC). Zatem według zaproponowanego schematu metabolicznych przemian podczas wzrostu z heksadekanu oba kwasy powstawałyby w równych proporcjach. Ponieważ jednak obserwowano przewagę biosyntezy ICA, należy zastanowić się jeszcze nad znaczeniem miejsca przebiegu oksydacji heksadekanu (cytoplazma i potem mitochondrium), cyklu Krebsa (mitochondrium) i cyklu glioksalowego (peroksysomy) oraz zróżnicowania przepuszczalności błon komórkowych dla acetyloCoA, szczawiooctanu, cytrynianu i izocytrynianu. Różną przepuszczalność cytrynianu wykazano u producentów i nieproducentów CA [Robak 2002], a większą przepuszczalność błon CA przy niskim pH zaobserwowali Anastassiadis i Rehm [2006]. O współdziałaniu cyklu Krebsa, glioksalowego i oksydacji kwasów tłuszczowych świadczy opisana przez Kamzolova i in. [2008] jednoczesna asymilacja glicerolu i kwasów tłuszczowych podczas biosyntezy CA i ICA przez *Y. lipolytica* VKM Y-2373 oraz *Y. lipolytica* N 15. W przypadku mutantów octanowych pochodzących od szczepu *Y. lipolytica* A-101 obserwowano wzrost, gdy w podłożu jednocześnie obecny był octan i glukoza lub octan i glicerol, a brak wzrostu, gdy jednocześnie w podłożu występował etanol i octan [Robak 2007, Robak i in. 2007]. Rywińska i in. [2010] wykazali, że ww. mutanty octanowe

najpierw wykorzystują glicerol, a potem glukozę, gdy oba substraty są jednocześnie obecne w podłożu.

Proces biosyntezy CA i ICA przez *Y. lipolytica* A-101 z heksadekanu z zastosowaniem intensywnego mieszania cechował się stosunkowo wysoką produktywnością. Średnie wartości produktywności (objętościowej szybkości produkcji) wyliczone w odniesieniu do procesu od początku wydzielania kwasów (od 18 h) przy prędkości obrotowej mieszadła równej 600 rpm wynosiły 0,51 gL⁻¹h⁻¹ dla CA oraz 0,56 gL⁻¹h⁻¹ dla ICA. Rywińska i in. [2010], w przypadku tego samego szczepu w procesie biosyntezy CA z glicerolu i glukozy, uzyskali wyższe wartości produktywności CA (od 0,65 do 0,85 gL⁻¹h⁻¹), a ICA stanowił od 16 do 21%. Jeszcze wyższą produktywność wykazali Kamzolova i in. [2008]. Badany przez nich szczep *Y. lipolytica* VKM Y-2373 podczas biosyntezy kwasów z oleju słonecznikowego nagromadzał je z szybkością wynoszącą 1,05 oraz 1,14 gL⁻¹h⁻¹, odpowiednio w odniesieniu do CA i ICA. W światowej literaturze jest tylko kilka doniesień o znacznym nagromadzaniu ICA przez drożdże. W skali przemysłowej ICA jest w dalszym ciągu otrzymywany na drodze chemicznej syntezy lub ekstrakcji z owoców.

WNIOSKI

1. Wybór substratu jest kluczowym elementem wydajnej biosyntezy kwasu cytrynowego. Z heksadekanu szczep *Y. lipolytica* A-101 nagromadza ponad 50% ICA, podczas gdy z glukozy ilość nagromadzanego ICA nie przekracza 10%.

2. Intensywność mieszania zdecydowanie wpływa na proporcje kwasów gromadzonych z heksadekanu przez *Y. lipolytica* A-101; przy czym intensywniejsze mieszanie prowadzi do zwiększenia ilości gromadzonego ICA.

PIŚMIENNICTWO

- Anastassiadis S., Rehm H.-J., 2006. Oxygen and temperature effect on continuous citric acid secretion in *Candida oleophila*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 9 (4), 414–423.
- Antonucci S., Bravi M., Bubbico R., Di Michele A., Verdone N., 2001. Selectivity in citric acid production by *Yarrowia lipolytica*. *Enzyme and Microbial Technology*, 28, 189–195.
- Arzumanow T.E., Shishkanova N.V., Finogenova T.V., 2000. Biosynthesis of citric acid by *Yarrowia lipolytica* repeat-batch culture on ethanol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 53, 525–529.
- Erb T.J., Berg I.A., Brecht V., Muller M., Fuchs G., Alber B.E., 2007. Synthesis of C₅-dicarboxylic acids from C₂-units involving crotonyl-CoA carboxylase/reductase: the ethylmalonyl-CoA pathway. *PNAS*, 104 (25), 10631–10636.
- Evans M.C.W., Buchanan B.B., Arnon D.I., 1966. A new ferredoxin-dependent carbon reduction-cycle in a photosynthetic bacterium. *Biochemistry*, 55, 928–934.
- Finogenova T.V., Shishkanova N.V., Fausek E.A., Eremina S.S., 1991. Biosynthesis of isocitric acid from ethanol by yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 36, 231–235.
- Finogenova T.V., Puntus I.F., Kamzolova S.V., Lumina Yu.N., Monastyrskaya S.E., Morgunov I.G., Boronin A.M., 2008. Mutant *Yarrowia lipolytica* strains producing citric acid from glucose. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 44 (2), 197–202.
- Goldberg D., Ellis G., 1983. Isocitrate dehydrogenase, [in:] Bergmeyer HU (ed). *Methods of enzymatic analysis*. Verlag Chemie, Weinheim, 3, 183–190.

- Kamzolova S.V., Finogenova T.V., Morgunov I.G., 2008. Microbiological production of citric and isocitric acids from sunflower oil. *Food Technol. Biotechnol.*, 46 (1), 51–59.
- Lewinson W.E., Kurtzman C.P., Min Kuo T., 2007. Characterization of *Yarrowia lipolytica* and related species for citric acid production from glycerol. *Enzyme and Microbial Technology*, 41, 292–295.
- Leśniak W., Pietkiewicz J., Podgórski W., 2002. Citric acid fermentation from starch and dextrose syrups by a trace metal resistant mutant of *Aspergillus niger*. *Biotechnology Letters*, 24, 1065–1067.
- Lotfy W.A., Ghanem K.M., El-Helow E.R., 2007. Citric acid production by a novel *Aspergillus niger* isolate: II. Optimization of process parameters through statistical experimental designs. *Bioresource Technology*, 98, 3470–3477.
- Moeller L., Strehlitz B., Aurich A. Zehnsdorf A., Bley T., 2007. Optimization of citric acid production from glucose by *Yarrowia lipolytica*. *Eng. Life Sci.*, 7, (5) 504–511.
- Papanikolaou S., Muniglia L., Chevalot I., Aggelis G., Marc I., 2002. *Yarrowia lipolytica* as a potential producer of citric acid from raw glycerol. *J. Appl. Microbiol.*, 92, 737–744.
- Papanikolaou S., Galiotou-Panayotou M., Fakas S., Komaitis M., Aggelis G., 2008. Citric acid production by *Yarrowia lipolytica* cultivated on olive-mill wastewater-based media. *Bioresource Technology*, 99, 2419–2428.
- Rane K.D., Sims K.A., 1993. Citric acid production by *Candida lipolytica* Y 1095 in cell recycle and fed-batch fermentors. *Biotechnology and Bioengineering*, 46, 325–332.
- Robak M., Wojtatowicz M., Rymowicz W., 1996. Aktywność dehydrogenazy izocytrynianowej drożdży a tempo tworzenia kwasu cytrynowego, *Zesz. Nauk. AR Wroc., Technologia Żywności X*, 27–35.
- Robak M., 1999. Aktywność syntazy cytrynianowej i dehydrogenazy izocytrynianowej drożdży *Yarrowia lipolytica* podczas biosyntezy kwasu cytrynowego z hydrolu glukozowego, *Zesz. Nauk. AR Wroc., Technologia Żywności XIII*, 125–135.
- Robak M., 2002. Studia nad wykorzystaniem octanu i wydzieleniem cytrynianu przez drożdże *Yarrowia lipolytica*. *Zesz. Nauk. AR Wroc., Technologia Żywności*, Nr 442, *Rozprawy CXCI*, 1–91.
- Robak M., 2007. *Yarrowia lipolytica* specific growth rate on acetate medium supplemented with glucose, glycerol or ethanol. *Acta Sci. Polon, Biotechnologia*, 6 (1), 23–33.
- Robak M., Rymowicz W., Filipkowski P., 2007. Effect of sodium acetate on citric acid production from glucose by *Yarrowia lipolytica*, *EJPAU, Biotechnology*, 10 (4), art. 22.
- Rymowicz W., Fatykhova A.R., Kamzolova S.V., Rywińska A., Morgunov I.G., 2010. Citric acid production from glycerol-containing waste of biodiesel industry by *Yarrowia lipolytica* in batch, repeated batch, and cell recycle regimes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 87, 971–979.
- Rywińska A., 2008. Wykorzystanie glicerolu odpadowego do biosyntezy kwasu cytrynowego przez *Yarrowia lipolytica* Wratislavia AWG7. *Acta Sci. Pol., Biotechnol.*, 7 (4), 13–22.
- Rywińska A., Rymowicz W., Żarowska B., Skrzypiński A., 2010. Comparison of citric acid production from glycerol and glucose by different strains of *Yarrowia lipolytica*. *World J. Microbial. Biotechnol.*, 26, 1217–1224.
- Stern J., 1957. Assay of tricarboxylic acids in Colowick S., Kaplan N., (eds.). *Methods in Enzymology*, 3, 549–558.
- Wojtatowicz M., 1991. Studia nad biosyntezą kwasów cytrynowych przez szczep *Yarrowia lipolytica* A-101 i jego mutanty, *Zesz. Nauk. AR Wroc., Rozpr. Hab.*, 96, 1–57.

HEXADECANE AS SUBSTRATE FOR CITRIC AND IZOCITRIC ACIDS BIOSYNTHESIS BY *YARROWIA LIPOLYTICA* A-101

Abstract. Essential problem in biosynthesis of citric acid (CA) is the purity of process. Even low contamination by izocitric acid (ICA) perturbs crystallization. In the case of CA producers, selected from *Yarrowia lipolytica* A-101 yeasts strain, the amount of accumulated ICA from glucose, fructose or glycerol did not exceeded some %. The parent strain, on the same substrates, secretes over a dozen % of ICA and over 30% on hexadecane or fatty acids as substrates.

The aim of the study was to evaluate kinetics of biosynthesis of CA and ICA by *Y. lipolytica* A-101 on hexadecane with three agitation rates (600, 300 and 150 rpm).

The highest amount of acids ($79,3 \text{ gL}^{-1}$) was obtained with the highest agitation rate (600 rpm). Accumulation of acids was significantly lower ($8,5 \text{ gL}^{-1}$) with the lowest agitation rate (150 rpm). With two higher agitation rates, the amount of accumulated ICA was nearly 60% of the total acids amount. With low agitation rate mainly CA was secreted (70%). On glucose, tested strain secreted $31,7 \text{ gL}^{-1}$ CA and the amount of ICA did not exceeded 10% of total acids .

Key words: *Yarrowia lipolytica*, biosynthesis purity, citric acid, izocitric acid, hexadecane

Accepted for print – Zaakceptowano do druku: 30.09.2011

For citation – Do cytowania: Robak M., 2011. Heksadekan jako substrat w biosyntezie kwasu cytrynowego i kwasu izocytrynowego przez *Yarrowia lipolytica* A-101. Acta Sci. Pol. Biotechnol., 10 (3), 15–26.

GENETIC VARIABILITY BETWEEN SELECTED GENOTYPES OF PALEOENDEMIC CHINESE SPECIES – *DAVIDIA INVOLUCRATA* INTRODUCED TO WESTERN POMERANIA

Danuta Kulpa, Miłosz Smolik, Marianna Dobrochowska

West Pomeranian University of Technology in Szczecin

Abstract. The aim of conducted studies was to determine genetic and morphological variability of selected *Davidia involucrata* specimens from Western Pomerania and Berlin using ISSR-PCR technique. The studies were carried out on the *Davidia involucrata* var. *vilmoriniana* growing in Germany in the Botanical Garden in Berlin-Dahlem and in Poland, in Pomerania: in the Dendrological Garden in Przelewiec, Glinna and Central Cemetery in Szczecin. ISSR technique made it possible to determine genetic variability of the examined specimens. This was done by means of 6 out of 30 ISSR primers used in the experiment. Six primers (802, 807, 810, 819, 839, 840) generated in PCR reactions 64 amplicons, of which: 11 were monomorphic, 31 – polymorphic and 12 – genotype-specific. On average 1 primer generated 10 amplicons which ranged from 2550 to 270 bp.

Key words: *Davidiaceae*, genetic diversity, ISSR-PCR

INTRODUCTION

Dovetree (*Davidia involucrata*) is considered to be one of the most beautiful trees of south-eastern Asia. It is a paleoendemic species, a relict of the Tertiary period, occurring exclusively on the area of 4,500 km², in south-eastern China [Gang et al. 2004]. The most decorative element of the tree is its two asymmetrical bracts surrounding apetalous flower. Hanging on a long peduncle bracts flutter even in the breeze. When the trees bloom they are covered with white bracts resembling handkerchiefs scattered freely on twigs, hence its common names – handkerchief tree, ghost tree, dovetree, taubenbaum [Yang 1980, McClintock 1991, Seneta 1996]. This species attracts many people who visit botanical gardens and arboreta exclusively to admire it in full bloom.

There are still many controversions concerning its taxonomy. It was first included into the family: *Cornaceae* [Hutchinson 1967], next *Nyssaceae* [Eyde 1988], and only Takhtajan [1980] distinguished a separate family *Davidiaceae*, with *Davidia involucrata* as the

© Copyright by Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Corresponding author – Adres do korespondencji: Danuta Kulpa, Department of Genetics, Plant Breeding and Biotechnology. West-Pomeranian University of Technology, ul. Janosika 8, 71-424 Szczecin, Poland, e-mail: danuta.kulpa@zut.edu.pl

only member of the genus. Phylogenetic analyses of *Cornales* based on 26s rRNA and combined 26s rDNA-*matk-rbcl* sequence data were carried out by Fan and Xiang [2003]. They confirmed its belonging to the family *Davidiaceae* and this is the most common classification in the latest literature [Li et al. 2002a, Li 2003, Gang et al. 2004].

Dovetree was introduced in Europe at the beginning of the 20-ieth century and currently is found in the majority of dendrological collections all over the continent. In 1931 it was brought to Arboretum in Kórnik from Kew Gardens and Hillier's nursery. Plant nursery in Kórnik in turn, made *Davidia* available for sale in Poland [Seneta 1996].

Great ornamental values of the tree, its adaptability to different habitat conditions, low susceptability to pests or diseases are main arguments for many researchers for popularization of dovetree on green areas in warmer regions of the country. The need for promoting this species is supported by the fact that it belongs to the species threatened with extinction and has been included in the Plant Red Book. Apart from that, in order to preserve gene resources of the species it is of great importance to determine genetic variability of existing specimens, which is possible due to advances in molecular biology enabling us to deepen the knowledge of taxonomy. The method useful for determining genetic variability of plant population is ISSR-PCR (*inter simple sequence repeats*) method, employing DNA polymorphism between microsatellite sequences. It was successfully used to determine genetic variability of many tree species of the genera: *Morus* [Venkateswarlu et al. 2006], *Castanea* [Goulão et al. 2001] or *Olea* [Gomes et al. 2009]. Simplicity, speed and result repeatability belong to advantages of this method. Thus, the aim of the study was to determine genetic variability of *Davidia* specimens growing in Western Pomerania and Berlin using ISSR-PCR method.



Photo 1. Flowers of *Davidia involucrata* var. *vilimoriniana* with white bracts (Specimen A)
Fot. 1. Kwiaty *Davidia involucrata* var. *vilimoriniana* z białym podsadkami (Okaz A)

MATERIAL AND METHODS

Plant material. The material for establishing the experiment were the leaves from the following trees of *Davidia involucrata* var. 'vilmoriniana' (Dode) Wangerin: **Specimen A** – ca 80-year-old tree growing in Dendrological Garden in Przelewiec, of unidentified origin, **B** – ca 20-year-old tree in Przelewiec, propagated as a result of open pollination of specimen A and planted in 1989, **C** – ca 20-year-old tree growing in Dendrological Garden in Przelewiec, brought from Dendrological Garden in Kórnik, **D** – ca 20-year-old tree growing in Dendrological Garden in Glinna, **E** – the tree from Botanical Garden in Berlin-Dahlem, **F** – ca 10-year old tree growing in Szczecin Central Cemetery (Fig. 1).

DNA isolation. DNA was isolated from about 10 leaves of each above mentioned specimen by means of Genomic DNA Prep Plus (A&A Biotechnology). Plant genomic DNA was quantified (GeneQuant DNA/RNA Calculator – Pharmacia LKB) to determine DNA purity and concentration (50 ng DNA in 1 µl of template).

DNA amplification. 30 ISSR primers were used for PCR amplifications. The ISSR reactions were carried out in 15 µl of master-mix (1.5 µl of 10× PCR reaction buffer (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl [pH 8.8], 1% Triton X) 1U of *Taq* polymerase, 30 pmol of ISSR primers, 2.5 mM dNTPs, and 15 mM MgCl₂). DNA amplifications were carried out in a Mastercycler (Eppendorf) with a preliminary step of 7 min at 94°C, followed by 35 cycles of 30 s at 94°C, 30 s at annealing temperature, and 2 min at 72°C, and a final step of 7 min at 72°C. The annealing temperature adjusted according to the T_m of the primers being used in the reaction. Amplified products were mixed with 5 µl of 6× Orange Loading Dye Solution (Fermentas MBI) and were analysed on 2% agarose (Prona) in 1× TBE buffer, then stained with ethidium bromide (0.5 µg·ml⁻¹), and photographed (Polaroid DS-34). GeneRuler 200bp DNA Ladder (Fermentas MBI) was used as a size marker (3000 – 200 bp). The amplification products of different primers recorded on photos were scored in a binary matrix (1 for presence and 0 for absence). From the binary matrix data the similarities were estimated by the similarity estimation method. In the TREECON for Windows software package, the UPGMA method was used to construct genetic tree.

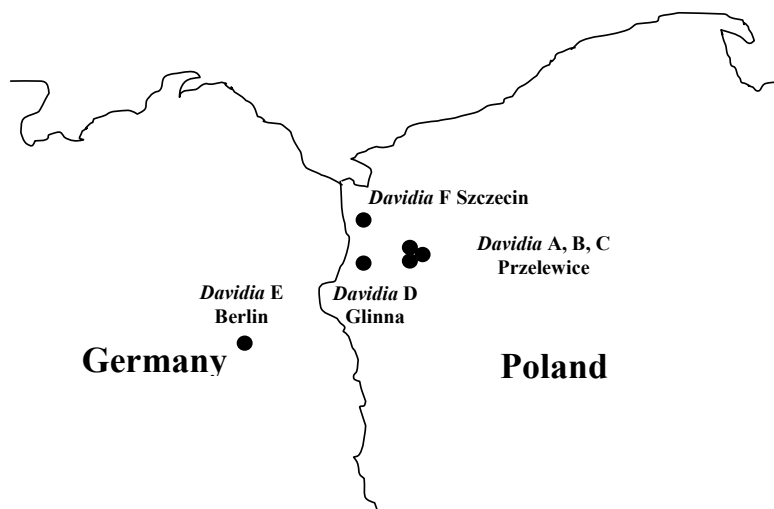


Fig. 1. Map of distribution of provenances of tested specimens of *Davidia*
Rys. 1. Mapa rozmieszczenia badanych okazów *Davidia*

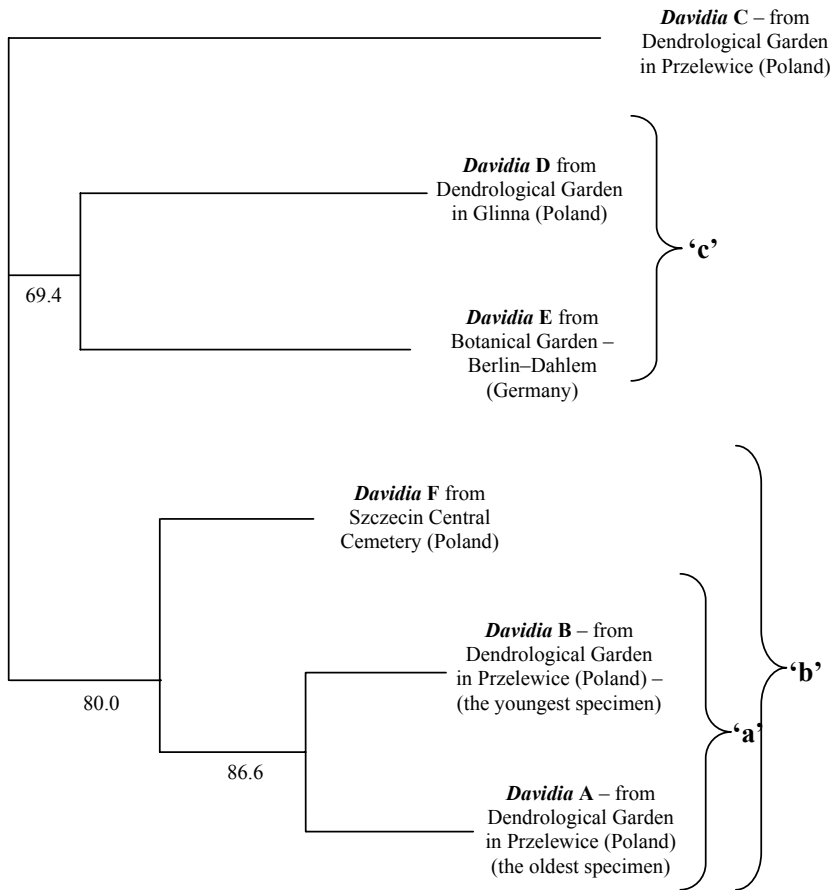


Fig. 2. Dendrogram illustrating genetic relationships among six dovetree plants clustered by UPGMA method

Rys. 2. Dendrogram ilustrujący podobieństwo genetyczne badanych sześciu okazów dawidii chińskiej pogrupowanych na podstawie algorytmu analizy skupień UPGMA

RESULTS

Conducted ISSR amplifications revealed genetic differentiation within *Davidia involucrata* var. *vilmoriniana* genotypes, growing on the area of Western Pomerania and in Berlin. In order to estimate genetic variability 30 primers were used, six of which, (802, 807, 810, 819, 839, 840) generated clear and repeated ISSR products. 64 products were obtained, among which: 11 (17.1%) were monomorphic and 41 (64%) polymorphic. There were 12 (18.7%) genotype-specific ISSR products within the polymorphic group (Table 1).

The total number of bands observed on electropherograms was 223, with an average of 7 loci per one examined DNA template amplified in PCR reactions with one primer (Table 2). The smallest (34) and largest (41) number of ISSR products resulting from

DNA amplification by all primers were obtained in the case of two different genotype of *Davidia* growing in the Przelewiec Dendrological Garden. The most products were generated in reaction with primer 807 (59) and the least with primer 839 (25). Primer 807 generated 12 products, which was the largest number of products generated per one template. The least bands were amplified in reactions with primer 839 for 20-year-old tree from Przelewiec (genotype C). The longest amplicons ~2550 bp were amplified generated with primer 807 for genotypes: C, D and F, respectively, whereas the shortest ones ~270 bp, with the same primer for genotypes: A, B, D and E.

Table 1. Characteristics of ISSR products amplified for tested genotypes of *Davidia*
Table 1. Charakterystyka produktów ISSR amplifikowanych dla badanych genotypów *Davidia*

Primer No. Nr startera	Sequence 5' – 3' Sekwencja 5' – 3'	Annealing temperature [°C] Temperatura przyłączania	Amplicons size range (bp) Długość amplikonów	Number of bands Liczba prążków		
				mono-morphic monomorficznych	polymorphic polimorficznych	specific specyficznych
802	(GA) ₈ T	50	1620–380	1	9	3
807	GGGT(GGGT) ₂ TG	54	2550–270	2	12	0
810	(GA) ₈ A	50	1900–610	2	4	1
819	(GT) ₈ A	52	1780–380	4	5	3
839	(AG) ₈ T	50	970–420	1	4	1
840	(GA) ₈ GT	50	1170–310	1	7	4

Table 2. Number of ISSR products observed on the electrophoregrams for each specimen of *Davidia* investigated in experiment

Tabela 2. Liczba produktów ISSR obserwowanych na elektroforegramach dla każdego z badanych okazów *Davidia*

Primer No. Nr startera	Specimen Okaz						Total products Suma produktów
	A	B	C	D	E	F	
802	5	5	7	5	6	5	33
807	8	10	9	12	9	11	59
810	4	4	5	4	5	4	26
819	7	8	9	8	6	7	45
839	5	5	1	4	5	5	25
840	5	4	6	8	4	8	35
Σ	34	36	37	41	35	40	223

As a result of conducted experiments certain common product were obtained (14%). The length of monomorphic products ranged from ~380 to ~1820 bp. The most products of that kind (4) were observed in the case of DNA amplification by means of primer 819. Primer 807 generated 2 products whereas primers 802, 839 and 840 only, monomorphic one (Table 3).

Table 3. Polymorphic ISSR products
Tabela 3. Polimorficzne produkty ISSR

Specimen Okaz	Primer, amplified polymorphic products and their length in bp Starter, otrzymany produkt polimorficzny i jego długość w pz
A	802 [1220, 1050, 870, 500], 807 [2230, 17108, 1390, 1210, 850, 580, 470, 270], 810 [1470, 710], 819 [1300, 790, 710, 440], 839 [970, 740, 550, 420], 840 [1170, 800, 500].
B	802 [1220, 870, 540, 500], 807 [1210, 1100, 850, 580, 470, 270], 810 [1470, 610], 819 [790, 710, 440], 839 [970, 740, 560, 420], 840 [1170, 800, 660, 500].
C	802 [1620, 1470, 1220, 540, 470], 807 [2550, 2280, 710, 1390, 1210, 1100, 950], 810 [1470, 710], 819 [1300, 790, 440], 839 [-], 840 [800, 570, 340].
D	802 [1050, 470, 4207], 807 [2550, 2230, 1710, 1390, 1100, 950, 660, 580, 470, 270], 810 [1280, 710], 819 [830, 790, 440] 839 [970, 5605, 420], 840 [1170, 660, 570, 500, 370, 340].
E	802 [1620, 1470, 540, 420], 807 [2230, 1710, 1390, 1210, 950, 670, 270], 810 [1470, 1280, 770], 819 [830, 790], 839 [970, 560, 4205], 840 [1170, 570, 500].
F	802 [1220, 870, 540, 500], 807 [2550, 2230, 1710, 1390, 1210, 1100, 850, 670, 580], 810 [1470, 610], 819 [830, 710, 440], 839 [970, 740, 560, 420], 840 [1170, 800, 660, 570, 500, 370].

Polymorphic products constituted the majority of amplicons observed on electropherograms (Table 4). Most of such bands were generated with primer 807 (12) and the least with primers 810 and 839 (4). Polymorphic products were amplified for all investigated genotypes. The most polymorphic DNA products (28) were produced for genotype F and the least for genotype C (20). Besides, in conducted experiments a series of genotype-specific products were obtained on DNA templates prepared from the *Davidia* genotypes described in this experiment as C, D, E and F (Table 5). No products characteristic of a given genotype were found for specimens A and B. There was one characteristic amplicon generated with primer 840 for genotype from Szczecin Central Cemetery (F), two products generated with primers 802 and 839 for genotype E and three products for genotype D generated in reactions with primers: 802, 819 and 840. The largest number of specific products was obtained on template C – six genotype specific products (amplified with primers: 802, 810, 819 and 840). The only primer that did not amplify genotype specific products was 807.

Obtained in the course of experiments electropherograms of ISSR profiles were used for construct the dendrogram of similarity based on UPGMA cluster analysis. Genetic similarity ranged from 52.9 to 86.6%. The greatest was observed between a young and old dovetree from the Przelewiec Dendrological Garden. The smallest similarity was recorded between the genotype of a younger specimen in Przelewiec (B) and the dovetree in the same garden which was brought from the Kórnik Arboretum (specimen C).

The dendrogram of phylogenetic similarity was divided into 3 clusters ('a', 'b' and 'c'). The first group ('a') included the trees from Przelewiec: genotypes A and B – propagated from the seeds of specimen A. There was 86.6% similarity between these genotypes. The second group ('b') consisted of two mentioned above genotypes and the genotype of dovetree from Szczecin Central Cemetery. Similarity between examined samples was 80%. The third group (c) comprised 2 genotypes of dovetree growing in Glinna (Poland) and in Berlin (Germany). Similarity between them amounted to 69.4%. The genotype of

dovetree growing in Przelewice (specimen C, brought from Kórnik) was placed in the last group on constructed dendrogram it was the most distant from the other examined genotypes. Similarity between that genotype in relation to all analyzed genotypes was in the range from 54.1 to 59.5% (Table 6).

Table 4. Monomorphic ISSR products amplified for all *Davidia* genotypes

Tabela 4. Monomorficzne produkty ISSR amplifikowane dla wszystkich genotypów dawidii

Primer No. Nr startera	Products length Długość produktu	% of monomorphic products % produktów monomorficznych
802	~660	7.6
807	~1510, ~1820	14.2
810	~800, ~1070	28.5
819	~380, ~540, ~620, ~980	33.3
839	~830	16.6
840	~1000	8.3

Table 5. Genotype-specific ISSR products for each genotype of *Davidia*

Tabela 5. Produkty ISSR specyficzne dla każdego z genotypów dawidii

Specimen Okaz	Primers no. and products length in bp Nr startera i długość produktu w pz					
	802	807	810	819	839	840
A	–	–	–	–	–	–
B	–	–	–	–	–	–
C	~380	–	~1900	~1540, ~1780	–	~450, ~1100
D	~620	–	–	~1210	–	~750
E	~780	–	–	–	~640	–
F	–	–	–	–	–	~310

Table 6. Similarity matrix obtained for six genotypes of *Davidia*

Tabela 6. Współczynniki podobieństwa genetycznego dla sześciu badanych genotypów dawidii

Specimen Okaz	A	B	C	D	E	F
A	100.0	86.6	55.7	60.3	62.7	76.7
B	86.6	100.0	52.9	61.1	60.6	83.3
C	55.1	52.9	100.0	54.1	55.9	59.5
D	60.3	61.1	54.1	100.0	69.4	69.2
E	62.7	60.6	55.9	69.4	100.0	66.7
F	76.7	83.3	59.5	69.2	66.7	100.0

DISCUSSION

Genetic variability is a fundamental factor which enables the adaptation to different environmental conditions. In this study in order to determine genetic variability among 6 genotypes of dovetree ISSR tool for detecting polymorphism between microsatellite DNA sequences was used. The advantages of this method are its simplicity and reproducibility of results [Zietkiewicz et al. 1994, Rzepka-Plevneš et al. 2006]. ISSR technique is similar to RAPD, both the methods are useful for assessing the variability in organisms under study. The studies on genetic variability of dovetree growing in natural conditions in China were conducted by Song and Bao [2006] employing RAPD method. They investigated specimens from 5 places within the natural environment of that species and collected 186 samples (40–50 from each stand) 10–15 leaves from each tree. Due to few specimens, in our studies we collected one sample from each tree, 5–10 leaves per sample.

Song and Bao [2006] used 80 RAPD primers, 13 (17%) of which generated distinct amplification products. In our studies 6 (20%) out of 30 primers used, generated visible amplicons. Li et al. [2002 b] developed the protocol for rapid extraction of DNA genome from dovetree leaves and bracts. They suggest that the problems with obtaining pure DNA result from a large number of phenol compounds accumulated in leaves. During the process of isolation these compounds are released and damage DNA, which may be the reason of problems with annealing complementary primers to DNA templates.

In our study total number of amplified ISSR products was 64, of which 11 were monomorphic, 41 polymorphic and 12 genotype-specific. On average one primer generated 7 ISSR products. Song and Bao [2006] in experiment with obtained 101 RAPD products, 98 of which turned out to be polymorphic. The average number of bands generated in reaction with one primer was 8. In additional studies the authors proved great inter-population variability as well as the formation of separate micropopulations within the species under study.

In our experiment variability between examined genotypes was affected by genetic factors, environmental and historical aspect i.e. the time and place of genotype introduction was also taken into consideration. On the basis of cluster analysis UPGMA dendrogram of genetic similarity was drawn and divided into 3 group. The greatest similarity (86.6%) was found between an old and young specimen (A and B) from Przelewiec, which may be attributed to gene recombination. The second group included the dovetree from Szczecin Central Cemetery (specimen F) and the above mentioned trees. The third group consisted of genotypes from Berlin and Glinna (D and E). Low degree of variability between genotypes from Glinna, Berlin, Szczecin and Przelewiec might result from the fact that they probably originate from specimens cultivated in a pre-war nursery in Berlin, from which this exotic species was spread around Western Pomerania. *Davidia* growing in Przelewiec which had been brought from Kórnik (specimen C) turned out to be the least similar to the trees included in other groups, probably because it was propagated from the specimen bought for Kórnik, in 1931, in one of English nurseries [Seneta 1996].

This is a preliminary study aiming at deepening the knowledge about this unique but threatened with extinction species. May be, it will contribute to a certain degree to the popularization of dovetree.

REFERENCES

- Eyde R.H., 1988. Comprehending Comus: Puzzles and Progress in the Systematics of the Dog-woods. *Bot. Rev.*, 54 (3), 234–300.
- Fan Ch., Xiang Q.Y., 2003. Phylogenetic analyses of *Cornales* based on 26S rRNA and combined 26S rDNA – matK-rbcL sequence data. *Am. J. Bot.*, 90 (9), 1357–1372.
- Gang W., Han S., Wang H., Luo Y., Deng H., Zhao J.Z., 2004. Living characteristics of rare and endangered species *Davidia involucrata*. *J. For. Res.*, 15 (1), 39–44.
- Gomes S., Martins-Lopes P., Lopes J., Guedes-Pinto H., 2009. Assessing genetic diversity in *Olea europaea* L. using ISSR and SSR markers. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 27 (3), 365–373.
- Goulão L., Valdivieso T., Santana C., Oliveira C.M. 2001. Comparison between phenetic characterization using RAPD and ISSR markers and phenotypic data of cultivated chestnut (*Castanea sativa* Mill.). *Gen. Res. Crop Evol.*, 48 (4), 329–338.
- Hutchinson J., 1967. The genera of flowering plants. Clarendon, Oxford, UK.
- Li Y.X., 2003. Cloning, sequence analysis, and prokaryotic expression of cDNA encoding a putative non-specific lipid-transfer protein from the bracts of dovetree (*Davidia involucrata* Baill.). *J. Plant Biol.*, 46 (3), 167–172.
- Li Y.X., Li Ch., Jung L., Li Y., Fang Ch., 2002a. Suppression subtractive hybridization cloning of cDNAs of differentially expressed genes in dovetree (*Davidia involucrata*) Bracts. *Plant Molec. Biol. Rep.*, 20, 231–238.
- Li Y.X., Xian S.Z., Fang Ch., 2002b. Rapid extraction of genomic DNA from leaves and bracts of dovetree (*Davidia involucrata*). *Plant Mol. Biol. Rep.*, 20, 185a–185e.t.
- McClintock E., 1991. *Davidia involucrata* and *Acer pentaphyllum*. *Pacific Hort.*, 52 (3), 57–61.
- Rzepka-Plevneš D., Kulpa D., Charkot S., 2006. Salt tolerance screening of *Pinus sylvestris* L. from the dunes of the south-west coast of the Baltic Sea under in vitro condition. *J. Food Agric. Envir.*, 4 (2), 329–334.
- Seneta W. 1996. *Drzewa i krzewy liściaste*. T. 3, PWN, Warszawa, 20–22.
- Song C., Bao M., 2006. Genetic diversity of RAPD markers for natural *Davidia involucrata* populations. *Front. For. China*, 1, 95–99.
- Takhajan A.L., 1980. Outline of the classification of flowering plants (*Magnoliophyta*). *Bot. Rev.*, 46, 225–359.
- Venkateswarlu M., Raje Urs S., Surendra Nath B., Shashidhar H.E., Maheswaran M., Veeraiah T.M., Sabitha M.G., 2006. A first genetic linkage map of mulberry (*Morus spp.*) using RAPD, ISSR, and SSR markers and pseudotestcross mapping strategy. *Tree Gen. Genomes*, 3 (1), 15–24.
- Yang Y., 1980. Beautiful Chinese Dovetree – *Davidia involucrata*. *Newslet. For. Sci. Tech.* (9), 17–18.
- Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D., 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) – anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20, 176–83.

**ZMIENNOŚĆ GENETYCZNA POMIĘDZY OKAZAMI
PALEOENDEMICZNEGO CHIŃSKIEGO GATUNKU –
DAVIDIA INVOLUCRATA INTRODUKOWANYMI
NA TERENIE POMORZA ZACHODNIEGO**

Streszczenie. Celem pracy było określenie zmienności genetycznej wybranych do badań okazów dawidii rosnących na Pomorzu Zachodnim i w Berlinie, techniką ISSR-PCR. Badania przeprowadzono na okazach drzew dawidii chińskiej var. ‘*Vilmoriniana*’ rosnących w Niemczech, w Ogrodzie Botanicznym w Berlinie-Dahlem oraz w Polsce, na Pomorzu:

w Ogrodzie Dendrologicznym w Przelewicach, Glinnej, oraz na Cmentarzu Centralnym w Szczecinie. Zastosowana w pracy technika ISSR pozwoliła określić genetyczne zróżnicowanie badanych okazów dawidii chińskiej. Posłużyło do tego 6 spośród 30 użytych w doświadczeniu starterów ISSR. W wyniku badań otrzymano 64 produkty, 11 z nich okazało się monomorficzne, 31 polimorficzne, 12 specyficzne genotypowo. Długości produktów reakcji ISSR-PCR mieściły się w granicach od 2550 do 270 pz.

Słowa kluczowe: *Davidiaceae*, zmienność genetyczna, ISSR-PCR

Accepted for print – Zaakceptowano do druku: 30.09.2011

For citation – Do cytowania: Kulpa D., Smolik M., Dobrochowska M., 2011. Genetic variability beetwen selected genotypes of paleoendemic chinese species – *Davidia involucrata* introduced to Western Pomerania. Acta Sci. Pol. Biotechnol., 10 (3), 27–36.

RECENZENCI – REVIEWERS

- prof. dr hab. Anna Rodziewicz
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
- prof. dr hab. Anna Peczyńska-Czoch
Politechnika Wroclawska
- prof. dr hab. Ewa Sawicka-Sienkiewicz
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
- dr hab. Anita Rywińska
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
- prof. dr hab. Edmund Cibis
Uniwersytet Ekonomiczny we Wrocławiu
- prof. dr hab. Waldemar Rymowicz
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
- prof. dr hab. Ewelina Dziuba
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
- prof. dr hab. Anna Krasowska
Uniwersytet Wroclawski
- prof. dr hab. Małgorzata Robak
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
- prof. dr hab. Jerzy Pietkiewicz
Uniwersytet Ekonomiczny we Wrocławiu
- prof. dr hab. Józefa Chrzanowska
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
- prof. dr hab. Grażyna Krasnowska
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
- prof. dr hab. Tadeusz Miśkiewicz
Uniwersytet Ekonomiczny we Wrocławiu

SPIS TREŚCI CONTENTS

Katarzyna Samborska, Agata Drzazga

- Wpływ dodatków stabilizujących na aktywność sacharolityczną
drożdży piekarskich *Saccharomyces cerevisiae*
w czasie suszenia sublimacyjnego oraz przechowywania 5
- The influence of stabilizing additives on the saccharolytic activity
of baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* during freeze-drying
and storage

Małgorzata Robak

- Heksadekan jako substrat w biosyntezie kwasu cytrynowego
i kwasu izocytrynowego przez *Yarrowia lipolytica* A-101 15
- Hexadecane as substrate for citric and izocitric acids biosynthesis
by *Yarrowia lipolytica* A-101

Danuta Kulpa, Miłosz Smolik, Marianna Dobrochowska

- Genetic variability between selected genotypes
of paleoendemic Chinese species – *Davidia involucrata* introduced
to Western Pomerania..... 27
- Zmienność genetyczna pomiędzy okazami paleoendemicznego
chińskiego gatunku – *Davidia involucrata* introdukowanymi na terenie
Pomorza Zachodniego

Recenzenci – Reviewers..... 37