

ACTA SCIENTIARUM POLONORUM

Czasopismo naukowe założone w 2001 roku przez polskie uczelnie rolnicze

Biotechnologia

Biotechnologia

6(1) 2007



Bydgoszcz Kraków Lublin Olsztyn
Poznań Siedlce Szczecin Warszawa Wrocław

Rada Programowa *Acta Scientiarum Polonorum*

Kazimierz Banasik (Warszawa), Janusz Falkowski (Olsztyn),
Florian Gambuś (Kraków), Franciszek Kluza (Lublin), Edward Niedźwiecki (Szczecin),
Janusz Prusiński (Bydgoszcz), Jerzy Sobota (Wrocław) – przewodniczący,
Stanisław Socha (Siedlce), Waldemar Uchman (Poznań)

Rada Naukowa serii *Biotechnologia*

Danuta Witkowska (Wrocław) – przewodnicząca, Włodzimierz Bednarski (Olsztyn),
Włodzimierz Grajek (Poznań), Anna Maraz (Budapeszt, Węgry),
Zdzisław Targoński (Lublin), Vesna Zechner-Krpan (Zagrzeb, Chorwacja)

Korekta:
Janina Szydłowska,
mgr Elżbieta Winiarska-Grabosz

Łamanie
Halina Sebzda

Projekt okładki
Daniel Morzyński

ISSN 1644-065X

*Wydanie publikacji dofinansowane ze środków Uniwersytetu Przyrodniczego
we Wrocławiu*

© Copyright by Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu,
Wrocław 2007

Redaktor naczelny – prof. dr hab. Andrzej Kotecki
ul. Sopocka 23, 50-344 Wrocław, tel./fax (71) 328-12-77
e-mail: wyd@ozi.ar.wroc.pl <http://www.up.wroc.pl>

Nakład 300 + 16 egz. Ark. druk. 2,25
Drukarnia: F.P.H. „ELMA”

STAN FIZJOLOGICZNY DROŻDZY PIWOWARSKICH W CZASIE FERMENTACJI BRZECZEK SKAŻONYCH MYKOTOKSYNAMI. CZ. 1: T-2 I ZEA*

Barbara Foszczyńska, Ewelina Dziuba

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Streszczenie. Celem pracy było określenie wpływu różnych stężeń toksyny T-2 i zearalenonu (ZEA) na stan fizjologiczny 4 szczepów drożdży piwowskich w kluczowych momentach fermentacji brzezki słodowej. Zastosowano następujące stężenia toksyn: 5, 10 i 15 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (T-2) oraz 5 i 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (ZEA). Badano m.in. żywotność i przyrost biomasy drożdży oraz ich siłę zakwaszania. Stwierdzono, że zearalenon wpływał niekorzystnie na proces namnażania i aktywność metaboliczną drożdży w początkowym stadium fermentacji i przy najwyższym stężeniu, tj. 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Toksyna T-2 wykazała silniejsze oddziaływanie we wszystkich fazach fermentacji obniżając żywotność drożdży i siłę zakwaszania. Przy stężeniu 15 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ hamowała ona przyrost biomasy szczepów S.ca. 13 i S.c. 46.

Słowa kluczowe: drożdże piwowskie, toksyna T-2, zearalenon, fermentacja, stan fizjologiczny drożdży

WSTĘP

Fermentacja brzezki słodowej jest jednym z ważniejszych etapów procesu wytwarzania piwa. Przebieg i efekty fermentacji i dojrzewania piwa zależą w dużym stopniu od jakości drożdży, na którą składają się właściwości danego szczepu oraz stan fizjologiczny wykorzystywanej biomasy. Drożdże charakteryzujące się dobrą kondycją, znajdując w brzezce łatwo przyswajalne źródła węgla, azotu, kwasów tłuszczowych, witamin, makro- i mikroelementów, szybko rozpoczynają fermentację [Kunze 1999]. W wyniku ich metabolizmu zostają wydzielone do środowiska związki, które nadają produktowi finalnemu pożądany profil organoleptyczny. Natomiast drożdże głodzone lub stare cechuje mniejsza zdolność asymilacji wolnego azotu aminowego, mniejszy przy-

* Badania realizowane w ramach projektu badawczego Nr 2 P06T 020 28 finansowanego przez KBN w latach 2005–2007.

rost biomasy komórkowej, powolniejsze tempo fermentacji i dojrzewania, opóźnienie flokulacji [Baca i in. 1996]. Konsekwencją zakłóconego metabolizmu jest wzrost stężenia niekorzystnych dla smaku i aromatu piwa składników, np.: aldehydu octowego, dwutlenku siarki i dwuacetylu.

Drożdże są niezwykle wrażliwe na zmiany warunków środowiska. Na niekorzystne warunki reagują stresem, a jego skutkiem jest obniżenie aktywności fermentacyjnej. Stresem dla drożdży jest niskie stężenie tlenu w początkowej fazie fermentacji, wysoka temperatura, nagłe ochłodzenie lub wysokie ciśnienie osmotyczne [Antkiewicz i Poreda 2003, Casey i Ingledew 1983, Majara i in. 1996a i b]. Czynnikiem stresogennym są związki hamujące aktywność fizjologiczną komórki, jak np. wydzielany w trakcie fermentacji etanol czy CO₂ [Majara i in. 1996a, Odumeru i in. 1992]. Takimi substancjami mogą być także mykotoksyny.

Mykotoksyny są wprowadzane do procesu technologicznego wraz z surowcem silnie zainfekowanym przez grzyby strzępkowe. Z punktu widzenia zdrowotnego i technologicznego najgroźniejsze są wtórne metabolity grzybów z rodzaju *Fusarium*, *Aspergillus* i *Penicillium*, np.: deoksyniwalenol (DON), toksyna T-2, diacetoksyscirpenol (DAS), zearalenon (ZEA) oraz aflatoksyny i ochratoksyna A [Boeira 1999a i b, Flannigan 1987, Kluczek i Kojder 2000]. Generalnie, ilość mykotoksyn w poszczególnych etapach produkcji piwa zmniejsza się [Flannigan 1987, Perkowski 2000]. Część toksyn pozostaje w wysłodzinach, część ulega przekształceniom podczas chmielenia brzezki. Niektóre toksyny, jak DON i T-2, wykazują dużą stabilność, są w stanie przetrwać zabiegi termiczne i przejść do produktu finalnego [Schwarz i in. 1995, Whitehead i Flannigan 1989]. Skażając brzezkę nastawną mogą stanowić zagrożenie dla procesu fermentacji, m.in. niekorzystnie wpływając na komórki drożdży *Saccharomyces*.

Celem pracy było określenie wpływu różnych stężeń toksyny T-2 i zearalenonu na stan fizjologiczny drożdży piwowskich w kluczowych momentach fermentacji brzezki słodowej.

MATERIAŁ I METODY BADAŃ

Materiałem doświadczalnym były toksyny: T-2 i zearalenon (ZEA) zakupione w firmie Sigma Aldrich Sp. z o.o.

Materiał biologiczny stanowiły 4 szczepy drożdży piwowskich: *S. carlsbergensis* I-S.ca./13, *S. cerevisiae (lager)* 23, *S. cerevisiae* I-S.c./46 oraz *S. cerevisiae* I-S.c./57. Drożdże S.ca. 13 oraz S.c. 46 i 57 pochodziły z kolekcji kultur drobnoustrojów Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego w Warszawie. Szczep S.c.23 został wyizolowany w Zakładzie Technologii Fermentacji Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu z 48-godzinnej hodowli suszonych drożdży piwowskich Saflager S-23 (Lesaffre Bio-Corporation sp. z o.o.).

Podłożem fermentacyjnym była 12% brzezka słodowa otrzymana ze słodu jasnego typu pilzneńskiego. Brzezkę skażano roztworem mykotoksyny T-2 lub ZEA w etanolu. Zastosowano następujące stężenia toksyn w brzezce: 5, 10 i 15 µg·ml⁻¹ (T-2) oraz 5 i 50 µg·ml⁻¹ (ZEA). Stężenia te wybrano na podstawie wyników hodowli badanych szczepów drożdży na podłożu syntetycznym skażonym różnymi dawkami mykotoksyn (publikacja w przygotowaniu). Próbę kontrolną stanowiła brzezka bez toksyny, ale z równoważną w stosunku do wprowadzonego wraz z toksyną ilością alkoholu. Brzezki kontrolne i skażone zaszczepiano w warunkach sterylnych inokulum osiągając stężenie

20×10^6 j.t.k. \cdot ml⁻¹. Po zaszczepieniu, brzeczki każdego rodzaju rozdzielano do serii kolb fermentacyjnych (poj. 100 ml). Proces fermentacji z udziałem szczepów S.ca. 13 i S.c.23 prowadzono w temperaturze 10–12 °C przez 9 dni, a szczepów S.c.46 i 57 w temperaturze 23–25 °C przez 5 dni.

W trakcie fermentacji pobierano okresowo próby w celu zbadania żywotności i witalności drożdży. Żywotność drożdży oznaczano metodą barwienia komórek roztworem błękitu metylenowego [Sami i in. 1994]. Przyrost biomasy określano poprzez pomiar gęstości optycznej zawiesiny drożdży (spektrofotometr Beckman DU 650; $\lambda=560$ nm), a następnie wyznaczenie liczby komórek w 1 ml brzeczki z krzywej standardowej właściwej dla danego szczepu (zależność gęstości optycznej od liczby komórek w 1 ml). Witalność drożdży oceniano na podstawie testu siły zakwaszania oraz zawartości wewnątrzkomórkowej trehalozy. Oznaczenie siły zakwaszania wykonano zmodyfikowaną metodą Kara i in. [1988]. Z wymieszanej próby fermentacyjnej pobierano 10 ml zawiesiny drożdży, które dwukrotnie odwirowywano (3000 obr./min, 10 min) stosując przemywanie wodą destylowaną (4 °C). Po odwirowaniu drożdże przenoszono do 10 ml wody destylowanej (25 °C), a po 10 minutach dodawano 0,5 ml 20% roztworu glukozy. Po kolejnych 10 minutach mierzono pH. Siłę zakwaszania drożdży $[\Delta\text{pH}]$ wyrażono jako różnicę wartości pH wody destylowanej użytej do zawieszenia drożdży oraz wartości pH otrzymanej po 10 minutach od chwili dodania roztworu glukozy.

Zawartość trehalozy w komórkach drożdżowych oznaczono metodą antronową po ekstrakcji kwasem trichlorooctowym [Stewart 1975].

OMÓWIENIE I Dyskusja Wyników

Do opisu stanu fizjologicznego drożdży używa się obecnie dwóch terminów: żywotność i witalność [Baca i in. 2000, Latus-Ziętkiewicz 1998]. Żywotność definiowana jest jako procentowy udział żywych komórek w gęstwie drożdżowej. Z kolei witalność to zdolność komórek do przeżycia stresu i zachowania zdolności fermentacyjnych. W prezentowanej pracy oceniano żywotność drożdży podczas fermentacji brzeczek skażonych różnymi dawkami toksyny T-2 i ZEA. Żywotność drożdży, jak i pozostałe parametry, oceniano w wybranych momentach fermentacji, tj. w fazie zafermentowania (1 doba), fermentacji burzliwej (3 lub 4 doba) i końcowej (5 lub 9 doba). Okres zafermentowania jest niezwykle ważny, ponieważ korzystne jest, aby drożdże szybko dostosowały się do nowych warunków i z energią podjęły proces odfermentowywania brzeczki. Przebieg fermentacji burzliwej jest kluczowy dla jakości piwa, bowiem w tym czasie powstaje wiele ważnych dla bukietu składników. Z kolei stan fizjologiczny drożdży pod koniec fermentacji ma m.in. znaczenie przy ocenie przydatności gęstwy drożdżowej do kolejnego nastawu fermentacyjnego.

Żywotność wszystkich szczepów drożdży w momencie inokulacji brzeczki była bardzo dobra, sięgała poziomu 100%. Utrzymała się ona także w pierwszym dniu fermentacji, chociaż w brzeczkach skażonych pojawiły się komórki nieaktywne. W miarę postępu fermentacji żywotność drożdży pogarszała się, zwłaszcza w brzeczkach skażonych toksyną T-2. W burzliwym stadium fermentacji dolnej (4 doba) żywotność szczepu S.ca. 13 w obecności T-2 (10 i 15 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) była osłabiona, sięgała poziomu 83% (tab. 1). Lepszą odporność w tej fazie fermentacji wykazał szczep S.c. 23, który zareagował większą liczbą komórek nieaktywnych dopiero przy najwyższym stężeniu toksyny T-2 (15 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Toksyna T-2 wykazała silny wpływ na żywotność drożdży fermentacji

górną. W 3 dobie fermentacji udział komórek nieaktywnych szczepów S.c. 46 i S.c. 57 zwiększał się wraz ze wzrostem stężenia toksyny T-2. Taka tendencja utrzymała się do końca procesu prowadzonego zarówno ze szczepami dolnej, jak i górnej fermentacji. W ostatnim dniu fermentacji żywotność drożdży była na ogół tym gorsza, im wyższe było stężenie toksyny T-2 (tab. 1).

Tabela 1. Żywotność drożdży piwowskich [%] w czasie fermentacji brzeczek zawierających toksynę T-2

Table 1. Viability of brewing yeasts [%] during fermentation of worts containing T-2 toxin

Szczep drożdży Yeast strain	Stężenie T-2 T-2 concentration [$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$]	Doba fermentacji Day of fermentation				
		1	3	4	5	9
S.ca. 13	0	99,7	–	95,1	–	88,7
	5	99,1	–	99,1	–	90,8
	10	99,0	–	83,5	–	73,6
	15	97,4	–	83,0	–	77,3
S.c. 23	0	99,8	–	98,3	–	86,9
	5	95,4	–	98,4	–	69,1
	10	97,3	–	98,7	–	67,7
	15	96,0	–	88,7	–	58,2
S.c. 46	0	100	97,1	–	99,3	–
	5	96,0	93,3	–	73,2	–
	10	95,1	86,2	–	63,7	–
	15	90,1	80,3	–	45,6	–
S.c. 57	0	97,2	90,3	–	62,0	–
	5	93,2	84,1	–	43,0	–
	10	91,4	81,1	–	37,8	–
	15	87,0	78,3	–	41,1	–

W porównaniu z toksyną T-2, zearalenon w mniejszym stopniu wpływał na poziom aktywnych komórek w trakcie fermentacji brzeczki. W pierwszym dniu fermentacji żywotność wszystkich drożdży, niezależnie od stężenia ZEA, była zadowalająca. Wyjątek stanowił szczep S.ca. 13, który przy skrajnej dawce ZEA, tj. $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ posiadał obniżoną do 93% żywotność (tab. 2). Szczep ten zachował wrażliwość na tę dawkę toksyny do końca fermentacji. Pozostałe szczepy drożdży zarówno w burzliwej, jak i końcowej fazie fermentacji brzeczki zawierającej $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (ZEA) charakteryzowały się niższą, w porównaniu z próbami nieskażonymi, żywotnością.

Żywotność wiąże się ze zdolnością drożdży do namnażania. Niewątpliwie obniżona żywotność badanych szczepów drożdży, wynikająca z obecności toksyn w środowisku fermentacyjnym, miała wpływ na rozwój biomasy. Było to szczególnie widoczne w przypadku toksyny T-2. W pierwszym dniu fermentacji, wraz ze wzrostem stężenia toksyny T-2, zmniejszała się liczba komórek szczepów: S.c. 13 oraz S.c. 46 i 57 (tab. 3). Drożdże dolnej fermentacji S.ca.13 namnażały się najgorzej przy najwyższym stężeniu $15 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (T-2). W tych warunkach, w ciągu całego procesu, liczba komórek tego szczepu zaledwie się podwoiła. Podobnie słaby przyrost biomasy odnotowano dla drożdży S.c. 46 w obecności dawki 10 i $15 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (T-2). Drożdże S.c. 57 w miarę rozwoju fermentacji przystosowały się do niekorzystnych warunków środowiska i w burzliwej fazie procesu (3 doba) stężenie komórek w próbach skażonych toksyną T-2 było porównywalne do próby kontrolnej. Należy zauważyć, że szczep ten wyróżniał się pod

koniec fermentacji wysoką zawartością komórek nieaktywnych, co mogło być związane z jego silnymi zdolnościami do flokulacji.

Tabela 2. Żywotność drożdży piwowarskich [%] w wybranym czasie fermentacji brzeczek zawierających ZEA

Table 2. Viability of brewing yeasts [%] during fermentation of worts containing ZEA

Szczep drożdży Yeast strain	Stężenie ZEA ZEA concentration [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Doba fermentacji Day of fermentation				
		1	3	4	5	9
S.ca. 13	0	100	–	98,8	–	92,6
	5	97,7	–	98,2	–	90,2
	50	92,9	–	92,8	–	84,8
S.c. 23	0	99,9	–	93,8	–	81,3
	5	95,2	–	90,6	–	84,4
	50	95,8	–	89,8	–	80,7
S.c. 46	0	99,1	97,3	–	99,1	–
	5	99,6	97,1	–	97,7	–
	50	99,5	86,9	–	75,9	–
S.c. 57	0	97,9	89,5	–	80,4	–
	5	96,4	87,4	–	74,0	–
	50	95,9	84,5	–	68,5	–

Tabela 3. Liczba komórek drożdży piwowarskich [$\times 10^7$ j.t.k. $\cdot\text{ml}^{-1}$] w czasie fermentacji brzeczek zawierających toksynę T-2

Table 3. Brewing yeasts' cell count [$\times 10^7$ c.f.u. $\cdot\text{ml}^{-1}$] during fermentation of worts containing T-2 toxin

Szczep drożdży Yeast strain	Stężenie T-2 T-2 concentration [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Doba fermentacji Day of fermentation				
		1	3	4	5	9
S.ca. 13	0	2,9	–	8,5	–	10,1
	5	2,8	–	8,7	–	8,7
	10	2,7	–	7,1	–	9,6
	15	2,0	–	3,3	–	3,8
S.c. 23	0	2,3	–	7,5	–	10,3
	5	2,0	–	6,7	–	9,3
	10	2,0	–	6,7	–	9,3
	15	2,1	–	6,6	–	9,2
S.c. 46	0	6,7	10,1	–	10,2	–
	5	4,5	7,8	–	9,0	–
	10	3,1	5,3	–	5,7	–
	15	2,8	3,9	–	4,2	–
S.c. 57	0	6,2	7,8	–	9,1	–
	5	5,2	7,5	–	8,5	–
	10	4,6	7,3	–	8,7	–
	15	3,9	6,7	–	8,1	–

Badane szczepy drożdży namnażały się w obecności zearalenonu w tempie podobnym do prób kontrolnych. Jedyne w początkowej fazie fermentacji brzeczek zawierającej najwyższą dawkę ZEA ($50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) liczba komórek szczepów S.ca. 13, S.c. 46 i S.c. 57 była nieco mniejsza niż w próbach nieskazonych (tab. 4).

Tabela 4. Liczba komórek drożdży piwowskich [$\times 10^7$ j.t.k.ml⁻¹] w czasie fermentacji brzeczek zawierających ZEATable 4. Brewing yeasts' cell count [$\times 10^7$ c.f.u.·ml⁻¹] during fermentation of worts containing ZEA

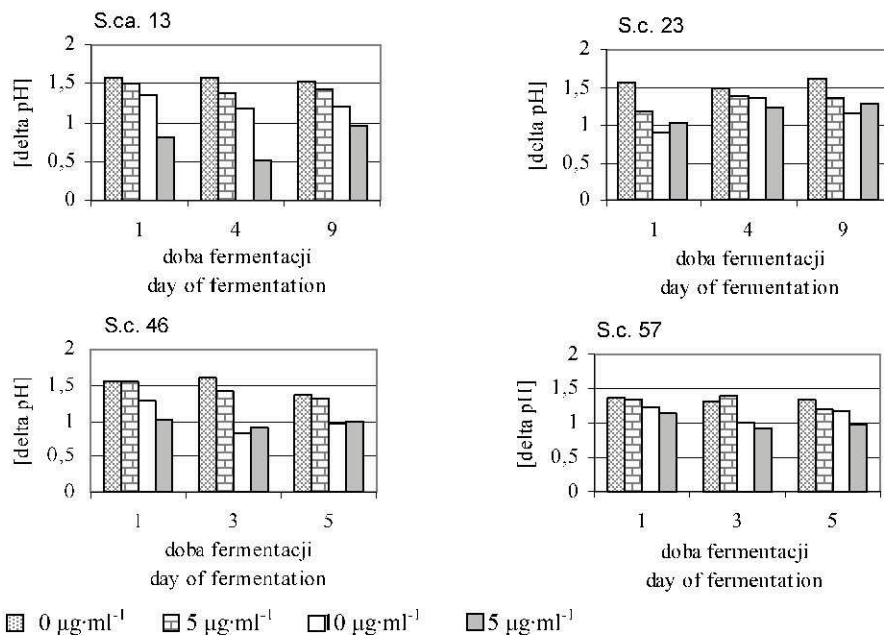
Szczep drożdży Yeast strain	Stężenie ZEA ZEA concentration [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$]	Doba fermentacji Day of fermentation				
		1	3	4	5	9
S.ca. 13	0	2,5	–	7,2	–	8,3
	5	2,5	–	6,7	–	8,2
	50	1,9	–	5,4	–	8,3
S.c. 23	0	2,1	–	6,8	–	9,0
	5	2,1	–	7,5	–	9,3
	50	2,0	–	7,0	–	9,3
S.c. 46	0	6,8	10,3	–	10,3	–
	5	7,3	10,5	–	10,4	–
	50	6,5	10,2	–	9,9	–
S.c. 57	0	7,1	7,7	–	8,8	–
	5	5,4	8,3	–	8,3	–
	50	5,6	7,7	–	9,0	–

Badania własne wykazały, że obecność mykotoksyn w podłożu fermentacyjnym wpływała niekorzystnie nie tylko na żywotność komórek, lecz także na ich witalność. Jedną z metod oceny witalności komórek jest test siły zakwaszania, który polega na pomiarze spadku pH w zawiesinie przed i po dodaniu glukozy. Test siły zakwaszania jest wskaźnikiem aktywności metabolicznej drożdży [Baca i in. 2000, Kara i in. 1988]. Uzyskane wyniki wskazują, że toksyna T-2 wpływała na zdolność drożdży do zakwaszania środowiska fermentacyjnego. W pierwszym dniu fermentacji siła zakwaszania wszystkich szczepów drożdży zmniejszała się wraz ze wzrostem stężenia toksyny T-2 w brzeczce (rys. 1). Taka tendencja utrzymała się do zakończenia fermentacji. Test siły zakwaszania potwierdził szczególną wrażliwość na toksynę T-2 szczepów S.ca. 13 i S.c. 46, które we wszystkich fazach fermentacji brzeczki skażonej, zwłaszcza najwyższą dawką toksyny ($15 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), charakteryzowały się znacznie obniżoną w stosunku do próby kontrolnej siłą zakwaszania. Mniejsza zdolność zebranej biomasy do wydzielania związków kwaśnych może rzutować na przebieg fermentacji kolejnych nastawów.

W przeciwieństwie do T-2, nie stwierdzono wyraźnego wpływu zearalenonu na aktywność drożdży, chociaż w momencie zafementowania brzeczek zawierających $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (ZEA), siła zakwaszania badanych szczepów była nieco mniejsza niż w próbach kontrolnych (rys. 2). W pozostałych fazach fermentacji wszystkie próby charakteryzowały się porównywalną siłą zakwaszania, co może świadczyć o przystosowaniu się drożdży do warunków środowiska.

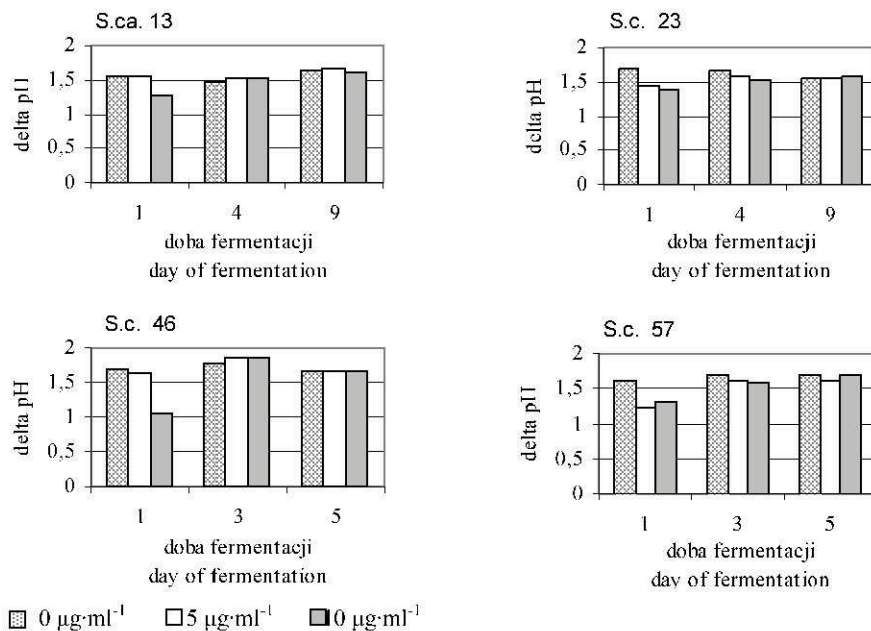
Drożdże reagują na niekorzystne warunki środowiska obniżoną aktywnością metaboliczną. Z drugiej strony komórki drożdży starają się przewyciężyć stres uruchamiając mechanizmy obronne, m.in. poprzez syntezę trehalozy, która jest uznawana za związek ochraniający przed np. szokiem termicznym czy etanolowym [Majara i wsp. 1996a i b]. Dlatego oznaczenie poziomu trehalozy wewnątrzkomórkowej może być użyteczne przy wykrywaniu stresujących warunków przede wszystkim w trakcie fermentacji [Latus-Ziętkiewicz 1998].

W prezentowanej pracy przedstawiono wyniki oznaczeń zawartości trehalozy w komórkach drożdży w czasie fermentacji brzeczek skażonych toksyną T-2 i ZEA (rys. 3 i 4).



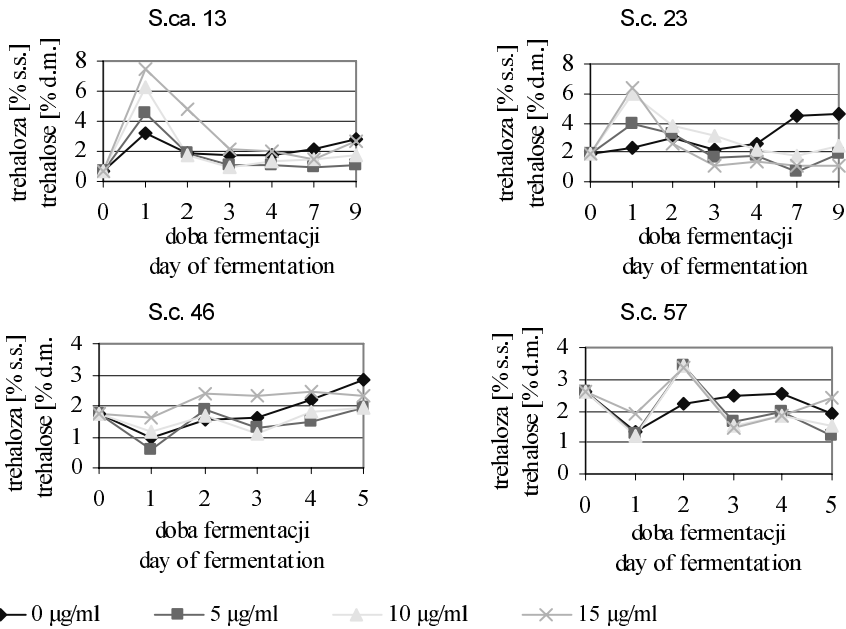
Rys. 1. Siła zakwaszania drożdży [delta pH] w czasie fermentacji brzeczek zawierających toksynę T-2

Fig. 1. Acidification power of yeasts during fermentation of worts containing T-2 toxin



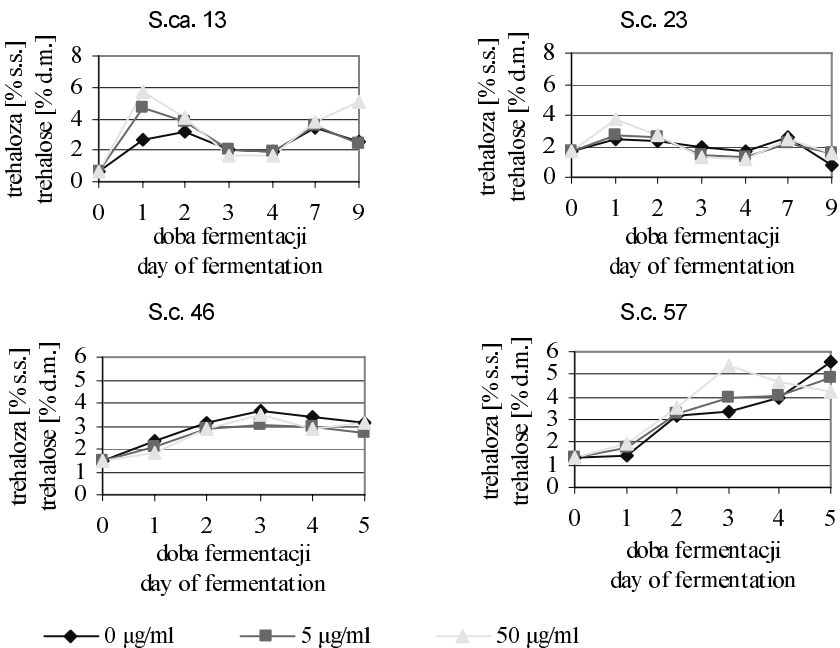
Rys. 2. Siła zakwaszania drożdży [delta pH] w czasie fermentacji brzeczek zawierających toksynę ZEA

Fig. 2. Acidification power of yeasts during fermentation of worts containing ZEA toxin



Rys. 3. Zawartość trehalozy w drożdżach w czasie fermentacji brzeczek zawierających toksynę T-2

Fig. 3. Trehalose content in yeasts during fermentation of worts containing T-2 toxin



Rys. 4. Zawartość trehalozy w drożdżach w czasie fermentacji brzeczek zawierających toksynę ZEA

Fig. 4. Trehalose content in yeasts during fermentation of worts containing ZEA toxin

Po zainicjowaniu fermentacji zaobserwowano wyraźną reakcję drożdży S.ca. 13 i S.c. 23 na występowanie silnej toksyny T-2. W pierwszej dobie fermentacji brzeczek skażonych toksyną T-2 zawartość trehalozy w komórkach zwiększyła się. W próbach o najwyższym stężeniu tego czynnika, tj. $15 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, drożdże S.ca. 13 i S.c. 23 nagromadziły aż do 7,5% oraz 6,4% trehalozy. W miarę postępu fermentacji zawartość trehalozy zmniejszała się.

W przeciwieństwie do fermentacji dolnej, po ok. 12 godzinach od zaszczepienia brzeczki kontrolnych i skażonych toksyną T-2, zawartość trehalozy w komórkach drożdży S.c. 46 i S.c. 57 była mniejsza niż w inokulum. W drugiej dobie procesu nastąpił wzrost ilości trehalozy, w kolejnych dniach stężenie węglowodanu utrzymywało się na podobnym lub nieco niższym poziomie.

W początkowej fazie fermentacji brzeczki skażonych zearalenonem, zaobserwowano przyrost zawartości trehalozy w komórkach szczepu S.ca. 13. Podobnie jak w przypadku toksyny T-2 nie stwierdzono wyraźnej reakcji drożdży fermentacji górnej na obecność ZEA w brzeczce. Niezależnie od stężenia toksyny, drożdże S.c. 46 i 57 zwiększały zawartość trehalozy w komórkach do 2 lub 3 doby fermentacji. Po tym czasie ilość trehalozy utrzymywała się na poziomie 3–5,5% s.m.

PODSUMOWANIE

Podsumowując można stwierdzić, że zarówno toksyna T-2, jak i zearalenon miały negatywny wpływ na stan fizjologiczny drożdży w czasie fermentacji brzeczki słodowej. Zearalenon wpływał niekorzystnie na proces namnażania i aktywność metaboliczną drożdży jedynie w początkowym stadium fermentacji i przy najwyższym stężeniu, tj. $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Toksyna T-2 wykazała silniejsze oddziaływanie we wszystkich kluczowych momentach fermentacji, obniżając żywotność drożdży i ich witalność mierzoną testem siły zakwaszania. Spośród badanych szczepów drożdży najbardziej wrażliwe na toksynę T-2 były szczepy S.ca. 13 i S.c. 46. Toksyna T-2 przy skrajnej dawce $15 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ hamowała przyrost biomasy tych drożdży.

W przygotowaniu jest druga część publikacji opisująca wpływ kolejnych toksyn, tj. diacetoksyscirpenolu (DAS) oraz ochratoksyny A (OTA) na stan fizjologiczny drożdży podczas fermentacji brzeczki słodowej. W pracy tej zostanie podjęta kompleksowa dyskusja uzyskanych wyników badań.

PIŚMIENNICTWO

- Antkiewicz P., Poreda A., 2003. Zdolność adaptacyjna drożdży piwowarskich. *Agroprzemysł* 4, 26-27.
- Baca E., Ilnicka-Olejniczak O., Misiewicz A., 1996. Drożdże piwowarskie, ich charakterystyka i wymagania przemysłu (1). *Przem. Ferm. Ow. Warz.* 12, 12-14.
- Baca E., Michałowska D., Salamon M., 2000. Ocena przydatności drożdży piwowarskich w aktualnych warunkach technologicznych. *Prace Instyt. i Laborat. Bad. Przem. Spozyw.* t. LV, 96-111.
- Boiera L.S., Bryce J.H., Steward G.G., Flanningan B., 1999a. Inhibitory effect of *Fusarium* mycotoxins on growth of brewing yeasts. 1. Zearalenone and fumonisin B₁. *J. Inst. Brew.* 105, 366-375.

- Boiera L.S., Bryce J.H., Stewart G.G., Flanningan B., 1999b. Inhibitory effect of *Fusarium* mycotoxins on growth of brewing yeast. 2. Deoxynivalenol and nivalenon. J. Inst. Brew. 105, 376-383.
- Casey G.P., Ingledew W.M., 1983. High-gravity brewing: Influence of pitching rate and wort gravity on early yeast viability. J. Am. Soc. Brew. Chem. 41, 148-152.
- Flanningan B., 1987. The microflora of barley and malt, [in:] Brewing Microbiology ed. Priest F.G., Campbell I., Elsevier Applied Science, London and New York, 83-120.
- Kara B.V., Simpson W.J., Hammond J.R.M., 1988. Prediction of the fermentation performance of brewing yeast with the acidification power test. J. Inst. Brew. 94, 153-158.
- Kluczek P., Kojder A., 2000. Mikotoksyny w zarysie, Wyd. ATR Bydgoszcz.
- Kunze W., 1999. Technologia piwa i słodu. Piwochmiel Sp. z o.o. Warszawa, 300-320.
- Latus-Ziętkiewicz D., 1998. Gospodarka drożdżami, a jakość piwa (1). Przem. Ferm. Ow. Warz. 10, 31-33.
- Majara M., O'Connor-Cox E.S.C., Axcell B.C., 1996. Trehalose – a stress protectant and stress indicator compound for yeast exposed to adverse conditions. J. Am. Soc. Brew. Chem. 54, 221-227.
- Majara M., O'Connor-Cox E.S.C., Axcell B.C., 1996. Trehalose – an osmoprotectant and stress indicator compound in high and very high gravity brewing. J. Am. Soc. Brew. Chem. 54, 149-154.
- Odumeru J., D'Amore T., Russell I., Stewart G.G., 1992. Effects of heat shock and ethanol stress on the viability of a *Saccharomyces uvarum* (*carlsbergensis*) brewing yeast strain during fermentation of high gravity wort. J. Indust. Microb. Biotechnol. 10 (2), 111-116.
- Perkowski J., 2000. Mikotoksyny w surowcach piwowskich i w piwie oraz w czasie jego otrzymywania. Przem. Ferm. Ow. Warz. 11, 14-16.
- Sami M., Ikeda M., Yabuuchi S., 1994. Evaluation of alkaline methylene blu staining method for yeast activity determination. J. Ferment. Bioeng. 78, 212-216.
- Schwarz P.B., Casper H.H., Beattie S., 1995. Fate and development of naturally occurring *Fusarium* mycotoxins during malting and brewing. J. Am. Soc. Brew. Chem. 53, 121-127.
- Steward P.R., 1975. Analytical methods for yeasts, Methods Cell Biol. 12, 111-147.
- Whitehead M.P., Flanningan B., 1989. The *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol and yeast growth and fermentation. J. Inst. Brew. 95, 411-413.

PHYSIOLOGICAL STATUS OF BREWING YEASTS DURING FERMENTATION OF WORTS CONTAMINATED WITH MYCOTOXINS. P.1: T-2 AND ZEA

Summary. The aim of this study was to determine the influence of different concentrations of T-2 toxin and zearalenone on physiological status of 4 brewing yeast strains during wort fermentation. T-2 toxin was used at concentration of 5, 10 i 15 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ and ZEA of 5 i 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. The viability, biomass growth and acidification power of yeasts were enhanced. It was stated that zearalenone at concentration of 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ influenced the yeast growth and their metabolic activity at first step of fermentation. T-2 toxin had stronger influence at all stages of fermentation causing decrease of viability and acidification power of yeasts. T-2 toxin at concentration of 15 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ inhibited biomass growth of S.ca. 13 i S.c. 46 strains.

Key words: brewing yeasts, T-2 toxin, zearalenone, fermentation, physiological condition of yeasts

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 29.03.2007

STUDY OF GENETIC DIVERSITY OF THE ONION SPECIES BY ISSR-PCR ANALYSIS

Miłosz Smolik, Danuta Rzepka-Plevneš,
Katarzyna Kowalczyk, Marta Grabiec

Agricultural University of Szczecin

Abstract. ISSR amplification was evaluated for its applicability to onions identification. The procedure was tested on six onions including: *Allium cepa* L. (onion), *Allium tuberosum* Rottl. ex Spreng. (chinese chives), *Allium ascalonicum* L. (shallot), *Allium cepa* L. var. *proliferum* (top onion), Welsh onion (*Allium fistulosum* L.) and Welsh onion 'Sprint'. Thirty primers homologous to microsatellite repeats based on various di-, tetra- and penta-SSR motifs with 3' selective nucleotides for anchoring, were screened against the onion genome by 2% agarose gel electrophoresis. Out of the 30 primers 16 gave stable patterns amplifying a total of 187 *loci* of which 159 (85%) were polymorphic. Clearly detectable ISSR amplicons ranged from 139 to 2213 bp in size. The average number of *loci* generated per primer was 12. Specific ISSR *loci* were detected for each onion species. The highest number (15) of species-specific *loci* were obtained for *A. tuberosum*, whereas the lowest number (3) was detected for *A. ascalonicum*. UPGMA cluster analysis was used to construct a dendrogram and to estimate the genetic distances between the *Allium species*. The tree revealed one separate group including *A. fistulosum* 'Sprint', *A. cepa* var. *proliferum*, *A. fistulosum* and *A. ascalonicum*. In this group the smallest divergence is observed between *A. fistulosum* 'Sprint' and *A. cepa* var. *proliferum* (77.9% similarity). The two other species: *A. cepa* and *A. tuberosum* are approximately equidistant from the group.

Key words: *Allium* ssp., DNA fingerprinting, polymorphism, ISSR

INTRODUCTION

Tandemly repeated DNA sequences, such as minisatellites and microsatellites, constitute a vast part of all eukaryotic genomes. Majority of plant microsatellites are dinucleotide repeats, whereas mono-, tri- and tetranucleotide repeats are rare [Wang et al. 1994].

Corresponding author – Autor do korespondencji: Miłosz Smolik, Department of Horticultural Plant Breeding, Agricultural University in Szczecin, ul. Janosika 8, 71-422 Szczecin, e-mail: smolik@ns.rektor.ar.szczecin.pl

Microsatellites have been used as genetic markers in plants, humans, animals and fungi [Neu *et al.* 1999, Wiseman *et al.* 2002]. The increasing interest in this marker system is based on a high degree of intraspecific polymorphism, codominant genetics and its greater reliability and reproducibility compared to other molecular DNA markers [Fischer and Bachmann 2000].

Interspecific relationship in the onion is still insufficiently resolved. The onion genome has a very high proportion of repetitive DNA. The genome size and the high content of repetitive sequences caused difficulties and gave inconsistent results during marker development when the technique was applied to *Allium* [Fischer and Bachmann 2000].

Inter-simple sequence repeat (ISSR) technique uses anchored or non-anchored, primers to amplify DNA sequences between two inverted SSR's [Ziętkiewicz *et al.* 1994]. ISSR markers have been successfully used to assess genetic diversity in germplasm of lupin [Gilbert *et al.* 1999], pea [Lu *et al.* 1996] and redcurrant [Lanham and Brennan 1998]. These markers are also applied for mapping plant chromosomes [King *et al.* 1998].

The aim of this study was to analyse polymorphism of the ISSR markers among the selected onions.

MATERIAL AND METHODS

Plant material and DNA isolation. Six onion accessions representing species: *Allium cepa* L. (onion), *Allium tuberosum* Rottl. ex Spreng. (Chinese chives), *Allium ascalonicum* L. (shallot), *Allium fistulosum* L. (Welsh onion), *Allium cepa* L. var. *proliferum* top onion and cultivar Welsh onion 'Sprint' from the collection of Department of Vegetable Crops Agricultural University in Szczecin were used in this study. Replicate DNA extraction from the leaves of each of the onion species was used to assess the reproducibility of band patterns. DNA was extracted from six young leaves (3 plants per species), using the A&A Biotechnology kit (DNA PrepPlus). Contaminating RNA was removed by digestion with RNase A (10 mg · ml⁻¹).

Primers. 30 ISSR primers were tested during initial screening. The primers were 17- to 18-mers based on various di-, tri-, tetra- and pentanucleotide repeats. They were anchored at the 3' end. The sixteen primers that gave the most informative patterns were used to characterise diversity of the onion species (Table 1).

ISSR amplification. PCR mixtures (25 μ l) contained: 1.5 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 20 mM Tris-HCl pH 8.3, 0.1% Triton X-100, 0.2 μ M primer, 0.2 mM of each dNTP, 1.0 units of *Taq* DNA polymerase (Fermentas MBI) and 50 ng template genomic DNA. DNA was amplified using a Mastecycler (Eppendorf) thermal cycler and using the following programme: initial denaturation at 94°C for 7 min, 40 cycles of 30 s at 94°C, 50 s at annealing temperature, 2 min at 72°C, and 7 min at 72°C for a final extension. The annealing temperature was usually adjusted according to the T_m of the primers being used in the reaction. Amplified products were mixed with 6 \times Orange Loading Dye Solution and were analysed by electrophoresis on a 2 % agarose. M2 DNA Ladder (DNA Gdańsk II) was used as a size marker (100 – 500 bp). Negative controls with water replacing the template DNA were applied to monitor for contamination. The PCR products were visualized with ethidium bromide (0.5 μ g·ml⁻¹) on a UV-21 transilluminator (Fotodyne). Gels were photographed (Polaroid DS-34). Only those bands that showed consistent amplification were analysed.

Table 1. Characteristics of ISSR's generated for six onion species
 Tabela 1. Charakterystyka markerów ISSR generowanych dla sześciu gatunków cebul

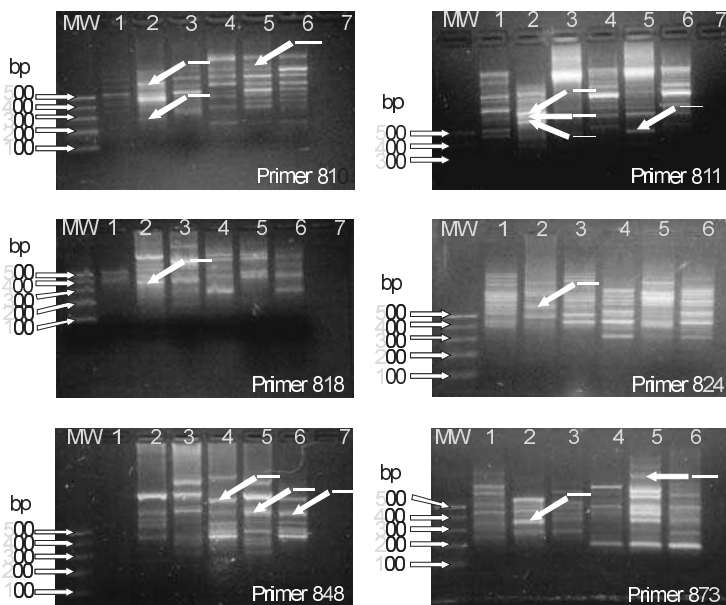
Number	Sequence	Product size (bp)	Długość produktów (pz)	Total	Characteristic			Amplified loci					
					Monomorphic	Polymorphic	Species-specific	Species-specific obiekty	<i>A. cepa</i> zycyafna	<i>A. tuberosum</i> Szczyptorek zycyafny	<i>A. ascalonicum</i> Szalotka	<i>A. fistulosum</i> Siedmiolatka	<i>A. cepa</i> var. <i>profiferum</i> Cebula piętrowa
810	(GA) ₈ T	2213 - 218	13	4	6	3	5	9	8	9	8	9	8
811	CAC(CA) ₆ AT	1771 - 485	15	6	6	3	9	10	10	11	8	11	8
818	(CA) ₈ G	1793 - 293	11	4	5	2	7	7	8	9	7	9	7
824	(TC) ₈ G	1355 - 349	16	5	9	2	11	8	11	12	9	12	13
825	(AC) ₈ T	1789 - 442	13	3	7	3	10	8	9	8	9	8	9
827	(AC) ₈ GG	1248 - 320	13	0	11	2	0	6	6	5	10	10	9
834	(AG) ₈ GC	1416 - 410	8	0	6	2	0	0	5	3	6	6	7
840	(GA) ₈ GT	1220 - 279	12	0	10	2	0	11	10	10	9	9	11
845	(TC) ₈ GT	1200 - 428	9	0	4	5	0	0	5	4	7	7	3
847	(CA) ₈ GC	783 - 306	6	3	1	2	4	4	4	4	5	4	4
848	(CA) ₈ GC	1327 - 274	17	0	11	6	0	8	9	9	10	10	9
849	(GT) ₈ GAA	1346 - 479	11	0	9	2	0	3	6	6	8	8	1
857	(AC) ₈ GGTC	591 - 139	7	2	2	3	2	6	2	3	3	3	4
860	(TG) ₈ CA	1811 - 337	7	0	7	0	2	6	5	2	4	4	5
873	(GAC) ₄ A	1125 - 215	20	1	15	4	8	6	7	7	13	11	11
880	(GGAGA) ₃ GT	1376 - 372	9	0	6	3	0	0	7	6	3	0	0
	Total		187	28	115	44	58	92	112	101	127	109	109
	Mean		12	2	7	3	4	6	7	6	8	8	7

Data analysis. Each fragment that was amplified using ISSR primers, was coded in a binary form by '0' or '1' for absence or presence in a given species, respectively. The 0/1 matrix was used to calculate genetic distance among species and next it was employed to construct dendrogram by means of an unweighted pair-group method with arithmetic means – UPGMA, using software packages Diversity one 1.3 (Pharmacia LKB). Molecular weight of each DNA fragment was calculated using the same software packages.

RESULTS

Genetic similarity among 6 onions, was studied using 30 ISSR primers. Sixteen primers that gave detectable amplification products (amplicons) in the initial screening, were selected (Tab. 1). In these reactions 187 *loci* were amplified, of which 159 (85%) were polymorphic (Tab. 1). Detectable ISSR amplicons ranged from 139 to 2213 bp in size. The number of *loci* amplified per one primer ranged from 6 (primer 847) to 20 (primer 873). On average, 12 *loci* per primer were amplified.

Species-specific ISSR amplicons, that were present in the DNA profiles of only one onion were detected (Tab. 1 and 2, Fig. 1). The highest number of species-specific amplicons was obtained for *A. tuberosum* (15) and *A. cepa* var. *proliferum* (11), respectively, whereas the smallest for *A. cepa* and *A. fistulosum* (Tab. 2).



MW – molecular weight – WM – wzorzec masowy, 1 – *Allium cepa*, 2 – *Allium tuberosum*, 3 – *Allium ascalonicum*, 4 – *Allium fistulosum*, 5 – *Allium cepa* var. *proliferum*, 6 – *Allium fistulosum* ‘Sprint’, 7 – negative control – kontrola negatywna

Fig. 1. ISSR-PCR fingerprints of six onion species using the 3' anchored selecte primer. The selected bands marked with white arrows are species-specific

Rys. 1. Fingerprinting ISSR otrzymany w reakcjach ze starterami ze specyficznym końcem 3'. Wybrane, specyficzne dla gatunków cebuli, prążki zaznaczono białymi strzałkami

Figure 1 depicts fingerprints for six onions using various primers. Specifically, the species *A. cepa* was distinguished by the presence of the 2213 bp (primer 810), 1109 and 600 bp fragments (primer 825) not found in other species. The primers 848 and 849 (data not shown) revealed two species-specific bands (607 and 950 bp) for *A. fistulosum*. For the other species of onion, putative specific markers were generated (Tab. 2).

Most of primers were dinucleotide (GA)₈, (AG)₈, (CA)₈, (AC)₈, (CT)₈, (TC)₈ and (TG)₈ repeats varying in size and in degeneration of the 3' anchor sequence (Tab. 1). Each of these primers gave amplification patterns for the onion accession (Fig. 1). Dinucleotide repeats (TC)₈, (GA)₈ and (CA)₈ with anchor gave the most polymorphic profiles (Fig. 1). Other dinucleotides, such as (AG)₈, (CT)₈ and (GT)₈ gave lower number of polymorphic products (Tab. 2).

Table 2. Specific products revealed by ISSR fingerprinting

Tabela 2. Specyficzne produkty otrzymane w reakcjach ISSR

Species Gatunek	Primers no. and product length in bp. Numer startera i długość produktów w pz
<i>A. cepa</i>	810[2213], 825[1109, 600]
<i>A. tuberosum</i>	810[762, 275], 811[758, 693, 606], 818[469, 320], 824[538], 825[901], 840[489], 848[274], 849[660], 857[473, 361], 873[417]
<i>A. ascalonicum</i>	827[478], 845[1046, 428], 880[577, 459, 372]
<i>A. fistulosum</i>	848[607], 849[950]
<i>A. cepa</i> var. <i>proliferum</i>	810[1348], 811[493], 824[906], 845[1200, 594, 535], 847[500, 433], 848[837, 582], 873[1125]
<i>A. fistulosum</i> 'Sprint'	827[1248], 834[907, 500], 840[998], 848[1033, 574], 857[574]

The unanchored tetranucleotide repeat (GACA)₄ primer (873) detected polymorphism and specific amplicons for *A. tuberosum* (417 bp) and *A. cepa* var. *proliferum* (1125 bp). In addition an 3' anchored primer (880) with a pentanucleotide repeat (GGAGA)₃ was used. As shown in Table 2, amplification with this primer yielded species-specific amplicons. This primer generated three putative markers for the *A. ascalonicum* (577, 459 and 372 bp).

In the present study, eight of the sixteen primers amplified size similar products (monomorphic amplicons) for every onion species assayed (Tab. 3). The higher and lower number of monomorphic amplicons were generated by primers 811 (5), 824 (5) and 873 (1), respectively.

Dendrogram was constructed by means of the UPGMA method using data from 0/1 similarity matrix. The tree revealed one separate group including *A. fistulosum* 'Sprint', *A. cepa* var. *proliferum*, *A. fistulosum* and *A. ascalonicum*. In this group the largest similarity (77.9%) was observed between *A. fistulosum* 'Sprint' and *A. cepa* var. *proliferum*. *A. tuberosum* and *A. cepa* var. *cepa* are approximately equidistant from the group and from each other (Fig. 2).

Table 3. Monomorphic *loci* amplified by ISSR technique obtained for all tested onion species
 Tabela 3. Monomorfixne *loci* amplifikowane w reakcjach ISSR otrzymane dla wszystkich badanych gatunków cebuli

Number Numer	Primer Starter		Monomorphic products (bp) Monomorfixne produkty (pz)
	Sequence Sekwencja		
810	(GA) ₈ T		[1161, 929, 707, 410]
811	CAC(CA) ₆ AT		[991, 893, 841, 644, 547]
818	(CA) ₈ G		[781, 625, 533, 293]
824	(TC) ₈ G	(AC) ₈ T	[1051, 829, 747, 500, 450]
825	(CA) ₈ GC		[1501, 794, 645, 568]
847	(AC) ₈ GGTC		[783, 576, 306]
857	(GACA) ₄		[217, 139]
873			[513]

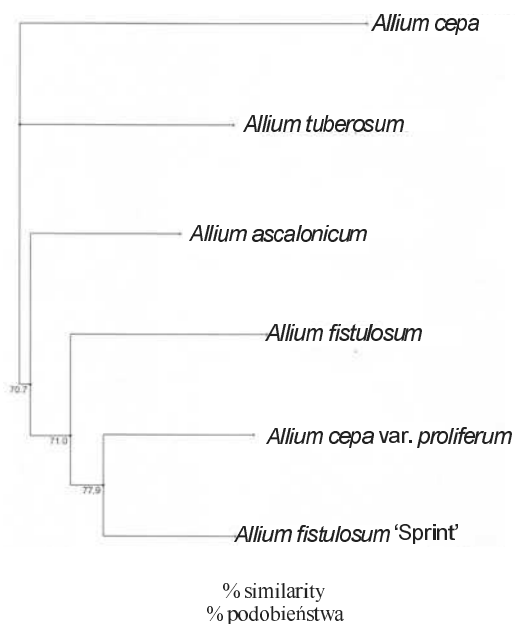


Fig. 2. Dendrogram of six onion species based on ISSR markers profiles clustered by UPGMA method

Rys. 2. Dendrogram podobieństwa wykreślony w oparciu o profile markerów ISSR dla sześciu gatunków cebuli za pomocą metody UPGMA

DISCUSSION

In the present study the ability of 16 ISSR primers to differentiate onion species was investigated. Most of ISSRs primers revealed a high degree of genetic differences and enabled genotypes identification.

The dinucleotide anchored primers generated distinct fingerprints for each of the six onion species. The ISSR analyses of soybeans and common bean showed that di- and trinucleotide SSR occurred in the genomes at higher frequencies than tetranucleotide repeats [Rongwen et al. 1995, Galvan et al. 2003].

Tikunov et al. [2003] reported that unanchored tetranucleotide (GATA)₄ primers generated fingerprints for each of five tomato species. The primer showed a radically different band fingerprint for *Lycopersicon hirsutum*. However, in the experiments, with unanchored tetranucleotide (GACA)₄ primer, a higher percentage of polymorphic bands than dinucleotide primers were observed. Similar results in maize and rice were found by Kantety et al. [1995] and Joshi et al [2000], respectively.

Genetic variation in *Allium* genus was studied mainly on the basis of molecular characters [Hadacova et al. 1981, Wilkie et al. 1993, Hong et al. 1996 and van Raamsdonk and de Vries 1997].

Wilkie et al. [1993] made attempts to estimate the genetic diversity among several onion species (*A. schoenoprasum*, *A. ampeloprasum*, *A. roylei*, *A. fistulosum* and *A. cepa*) with RAPD primers. For example, *A. schoenoprasum* and *A. ampeloprasum* were grouped together, whereas *A. roylei* and *A. cepa* formed a separate group.

Hong et al. [1996] investigated the genetic relationship based on RAPD markers between 10 species from subgenera *Melanocrommyum*, *Amerallium*, *Allium* and *Rhizirideum*, whereas van Raamsdonk et al. [1997] used the RAPD technique to investigate the genetic divergence among the species: *A. altaicum*, *A. tuberosum*, *A. roylei* and *A. fistulosum*. The dendrogram based on RAPD markers showed virtually complete agreement with the existing system of onion classification.

The present work has shown that ISSR-PCR analysis is quick and generates polymorphism which provides the potential for large scale DNA fingerprinting purposes. Based on the results of ISSR analysis, a similarity coefficient was computed, from which an ISSR dendrogram was constructed using hierarchic cluster analysis (UPGMA). It was shown that only two species *A. cepa* and *A. tuberosum* are separated from other species. The other species formed a single cluster *A. fistulosum* 'Sprint', *A. cepa* var. *proliferum*, *A. fistulosum* and *A. ascalonicum*. However, in the experiments only four onion species were investigated. The clustering of these species on the dendrogram is consistent with that obtained on the basis of RAPD and PCR-RFLP analysis by Arifin et al. [2000].

CONCLUSIONS

1. Among 30 ISSR primers representing di-, tri-, tetra-, and pentarepeats, 16 primers revealed polymorphic patterns. Using those 16 primers, 187 loci in total were amplified, out of which 159 were size polymorphic. The used primers amplified a specific DNA profiles.

2. The analysis of the tree of genetic similarity showed that the onion species used in the study were similar to each other in a range of 51.6 – 77.9%.

REFERENCES

- Arifin S.N., Ozaki Y., Okubo H., 2000. Genetic diversity in Indonesian shallot (*Allium cepa* var. *ascalonicum*) and *Allium* × *wakegi* revealed by RAPD markers and origin of *A.* × *wakegi* identified by RFLP analyses of amplified chloroplast genes. *Euphytica* 111, 23-31.
- Fischer D., Bachmann K., 2000. Onion microsatellites for germplasm analysis and their use in assessing intra- and interspecific relatedness within the subgenus *Rhizirideum*. *Theor. Appl. Genet.* 101: 153-164.
- Galvan M.Z., Bomet B., Balatti P.A., Branchard M., 2003. Inter simple sequence repeat (ISSR) markers as a tool for the assessment of both genetic diversity and gene pool origin in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Euphytica* 132: 297-301.
- Gilbert J.E., Lewis R.V., Wilkinson M.J., 1999. Developing an appropriate strategy to assess genetic variability in plant germplasm collections. *Theor. Appl. Genet.* 98: 1125–1131.
- Hadacova V., Klozova E., Hadac E., Turkova V., Pitterova K., 1981. Composition of esterase isoenzyme pattern in seed of some *Allium* species and in cultivars of *Allium cepa* L. *Biol. Plant.* 23: 174-181.
- Hong C.J., Arisumi K.I., Etoh T., 1996. RAPD analysis of ornamental *Alliums* for phylogenetic relationship. *Mem. Fac. Agr. Kagoshima Univ.* 32: 51-58.
- Joshi S.P., Gupta V.S., Aggarwal R.K., Ranjekar R.K., Brar D.S., 2000. Genetic Diversity and Phylogenetic Relationship as Revealed by Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) Polymorphism in the Genus *Oryza*, *Theor. Appl. Genet.* 100, 1311–1320.
- Kantety R.V., Zeng X., Bennetzen J., Zehr B.E., 1995. Assessment of genetic diversity in dent and popcorn (*Zea mays* L.) inbred lines using inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification. *Mol. Breed.* 1: 365–373.
- King J.J., Bradeen J.M., Bark O., McCallum J.A., Havey M.J., 1998. A low-density genetic map of onion reveals a role for tandem duplication in the evolution of an extremely large diploid genome. *Theor. Appl. Genet.* 96: 52-62.
- Lanham P.G., Brennan R.M., 1998. Characterization of the genetic resources of red current (*Ribes rubrum*: subf. *Ribesia*) using anchored microsatellite markers. *Theor. Appl. Genet.* 96: 917–921.
- Lu J., Knox M.R., Ambrose M.J., Brown J.K.M., Ellis T.H.N., 1996. Comparative analysis of genetic diversity in pea assessed by RFLP- and PCR-based methods. *Theor. Appl. Genet.* 93: 1103–1111.
- Neu C., Kaemmer D., Kahl G., Fischer D., Weising K., 1999. Polymorphic microsatellite markers for the banana pathogen *Mycosphaerella fijiensis*. *Mol. Ecol.* 8, 513-525.
- Rongwen J., Akkaya M.S., Bhagwat A.A., Lavi U., Cregan P., 1995. The use of microsatellite DNA markers for soybean genotype identification. *Theor. Appl. Genet.* 90, 43-48.
- Tikunov Yu.M., Khrustaleva L.I., Karlov G.I., 2003. Application of ISSR markers in the genus *Lycopersicon*. *Euphytica* 131, 71-80.
- van Raamsdonk L.W.D., de Vries T., 1997. Biosystematic studies in *Allium* L. section *Cepa*. *Bot. J. Linn. Soc.* 109, 131-143.
- Wang G., Mahalingan R., Knap H.T., 1998. (CA) and (GA) anchored simple sequence repeats (ASSRs) generated polymorphism in soybean, (*Glycine max* L.) Merr. *Theor. Appl. Genet.* 96, 1086–1096.
- Wiseman S.M., Loree T.R., Rigual N.R., Hicks Wesley L. Jr, Winston J.S., Swede H., Bartos J. D., Anderson G.R., Stoler D.L., 2002. Papillary thyroid cancer: high inter- (simple sequence repeat) genomic instability in a typically indolent cancer. Published online 25 April 2003 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/hed.10292
- Wilkie S.E., Isaac P.G., Slater J.R., 1993. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in *Allium*. *Theor. Appl. Genet.* 86, 497-504.

Ziętkiewicz E., Rafalski A., Labuda D., 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20, 176–183.

OKREŚLENIE ZRÓŻNICOWANIA GENETYCZNEGO RODZAJU CEBULA ZA POMOCĄ TECHNIKI ISSR-PCR

Streszczenie. W badaniach określono przydatność techniki ISSR do identyfikacji gatunków i odmian cebuli. Badaniami objęto sześć cebul: *Allium cepa* L. (cebula zwyczajna), *Allium tuberosum* Rottl. ex Spreng. (szczypiorek czosnkowy), *Allium ascalonicum* L. (szalotkę), *Allium cepa* L. var. *proliferum* (cebulę piętrową) i (*Allium fistulosum* L.) (siedmiolatkę) oraz odmianę siedmiolatki ‘Sprint’. W badaniach przetestowano, rozdzielając produkty amplifikacji w 2% żelu agarozowym, 30 starterów ze specyficznym końcem 3', komplementarnych do dwu-, cztero- i pięcionukleotydowych sekwencji mikrosatelitarnych. Spośród 30 zastosowanych starterów, 16 amplifikowało ogółem 187 *loci*, z czego 159 (85%) było polimorficznymi. Długość identyfikowanych amplikonów wahała się od 139 do 2213 pz. Średnia liczba *loci* amplifikowanych przez starter wynosiła 12. Dla każdego z badanych gatunków cebuli identyfikowano specyficzne genotypowo produkty ISSR. Największą liczbę (15) specyficznych genotypowo produktów stwierdzono dla *A. tuberosum*, zaś najmniejszą (3) dla *A. ascalonicum*. Dla określenia podobieństwa genetycznego między obiektami cebuli wykreślono dendrogram podobieństwa genetycznego w oparciu o algorytm skupień UPGMA. Dendrogram zawierał jedną odrębną grupę podobieństwa, do której należały *A. fistulosum* ‘Sprint’, *A. cepa* var. *proliferum*, *A. fistulosum* i *A. ascalonicum*. W grupie tej najmniejsze podobieństwo stwierdzono między *A. fistulosum* ‘Sprint’, a *A. cepa* var. *proliferum* (77,9% podobieństwa). Pozostałe gatunki *A. cepa* i *A. tuberosum* zgrupowane zostały w pobliżu omówionej grupy podobieństwa.

Słowa kluczowe: *Allium* ssp., DNA fingerprinting, polimorfizm, ISSR

Accepted for print – Zaakceptowano do druku: 29.03.2007

YARROWIA LIPOLYTICA SPECIFIC GROWTH RATE ON ACETATE MEDIUM SUPPLEMENTED WITH GLUCOSE, GLYCEROL OR ETHANOL

Małgorzata Robak

University of Live and Environmental Sciences of Wrocław

Abstract. Specific growth rate of five *Yarrowia lipolytica* strains growing in acetate medium (0,6%) supplemented with glycerol, ethanol or glucose (concentration range between 0 to 1%) was estimated. The studied strains differ in acetate utilisation, citric acid secretion and colony morphology. The rate of yeast growth, as well as, the biomass level changed as a consequence of the presence of second carbon source in acetate culture. Addition of ethanol inhibited (completely or partly) the growth in acetate medium of all tested strains, while glycerol and glucose stimulates the wild strain growth (A-101), induced acetate growth of *acu*⁻ mutants (A-101.1.31 and A-101.1.31.K1) and inhibited the growth of revertant strain (A-101.1.22). The maximal specific growth rate was observed for glycerol growing yeast, and a periodic variation of μ was observed in the case of very small amount of available C source. The maximal specific growth rate of wild strains on glucose was higher than on acetate.

Key words: *Yarrowia lipolytica*, specific growth rate, acetate, glycerol, ethanol, Bioscreen

INTRODUCTION

Y. lipolytica mutants not able to utilise acetate (*acu*⁻) as sole carbon source were isolated [Barth and Weber 1987, Wojtatowicz 1993, Wojtatowicz et al.1995]. Those mutants are divided into 4 classes according to their ability to utilise n-alkanes, fatty acids and ethanol [Heslot 1990, Kujau et al.1992, Mauersberger et al.1995]. One class gather the mutants unable to assimilate acetate and n-alkanes but able to use ethanol as a sole C source [Kujau et al.1992]. Metabolism of strains belonging to that class is poorly understood. *Y.lipolytica* A-101.1.31 and A-101.1.31.K1 strains belong to that class [Robak 2000]. In the study of *Y.lipolytica* A-101.1.31 and *Y.lipolytica* A-101.1.31.K1 mutants an induction of acetate utilisation by the addition of glucose to their culture was observed [Robak 2002]. It is one of the first described case of such induction in eu-

karyotic cells, an second for *Y. lipolytica* [Rodrigues and Pais 2000]. A co-utilisation of acetate and glucose was described for *Z. bailli* [Sousa 1996] and *Corynebacterium glutamicum* [Wendisch et al. 2000]. The simultaneous utilisation of glucose and ethanol by *S. cerevisiae* was studied as well [De Jong-Gubbels et al. 1995].

Acetate has a double action on living cells. Firstly, it is known as sporulation inductor of fungi, yeast and bacteria, then it is the sole carbon source in the sporulation media [Barnett et al. 1983]. Secondly, it is the inhibitor of microorganismes growth and hence it is used as food preserving additive. Both properties of acetate are widely applied from long time, however the mechanism of sporulation induction as well as the mechanism of toxicity still remain unknown.

The growth of most of isolates of *Y. lipolytica* is inhibited by the concentration of 4-10g/l of sodium acetate [Barth and Gaillardin 1997]. However, some strains grow well at 20g/l [Finogenova 1986] and the cell division of other ones (mutants) was stopped by 1,8g/l of sodium acetate, even in the presence of glucose [Tzschoppe 1999]. Hence, among *Yarrowia lipolytica* species sensitivity to acetate is strain depending.

The aim of that work was to estimate and compare the specific growth rate of five, different in acetate utilisation, citric acid secretion and colony morphology strains of *Y. lipolytica* yeast in sodium acetate medium supplemented with glycerol, ethanol or glucose.

MATERIAL AND METHODS

Microorganisms. Strains *Yarrowia lipolytica* A-101(wild strain), *Y. lipolytica* A-101.1.31, *Y. lipolytica* A-101.1.31.K1 (acetate non utilising-*acu*⁻ strains, UV mutants) and *Y. lipolytica* A-101.1.22 (acetate utilising-*acu*⁺-strain, revertant of an *acu*⁻ UV mutant) from the collection of Department of Biotechnology and Food Microbiology, Agricultural University of Wrocław, and *Y. lipolytica* ATCC 32 338A strain from the American Type Culture Collection were used.

Media and culture conditions. A chemically defined medium (MMT) [Robak 2000] with addition of glycerol (0–10 g), ethanol (10 g), sodium acetate (0,6 g) or glucose (10 g) as carbon source was applied. Seed cultures of *Y. lipolytica* were carried out on shaker (at 150 rpm), at 28 °C, during 48 h in 250 ml flask containing 25 ml of MMT medium with 0,1% of glucose. An automatic analyser, incubating turbidometric Microbiology Reader -Bioscreen C, was used for study of yeasts growth. Growth cultures, were inoculated with 50µl of seed cultures standardised at $4-5 \times 10^7$ cells/ml and incubated in the final volume of 400µl during 48 h at 28 °C with maximal shaking regime. Simultaneously 200 wells were incubated, hence each assay (combination of carbon sources and strain) was in five parallels. Medium, carbon sources and seed cultures were automatically doses by Bioscreen C. The optical density (OD) was measured with white filter every 15 minutes.

Results analyse. Excel graphs (OD versus time) were plotted and the effectiveness of growth was estimated on the basis of maximal OD value. Growth kinetics was evaluated on the basis of specific growth rate (μ [h^{-1}]) calculated according Wilson et al. [1982].

RESULTS

Utilisation of Bioscreen C, an automated microbiological turbidimeter, for the study of the yeast growth guarantees: the sterility during the medium and strain dosage as well as during the cultivation, the shaking regime and temperature maintenance and a 15minutes cycling of turbidity (OD) measurements. The repeatability of OD values obtained with that analyser was high. The maximal standard deviation was 15%. The growth curves of the studied strains on acetate with different doses of glycerol were given as the increase of OD versus time during the culture [Fig. 1]. Despite good repeatability, changes of specific growth rates (μ) calculated on the basis of OD measurements (according the Wilson equation) did not produce so good fitted plots [Fig. 2]. A great variability of μ values was obtained. However some precious information could be observed from those graphs, like the maximal specific growth rate value (μ_{\max}) and the time of the acquirement of that μ_{\max} . In the presence of 1% of glycerol acu^- mutant A-101.1.31 grew with μ_{\max} of 0,370 [h^{-1}] and acu^- mutant A-101.1.31.K1 with μ_{\max} of 0,456 [h^{-1}] [Tab. 1]. Those μ_{\max} were respectively observed at 30 and 46 hour of culture [Fig. 2]. Strain A-101.1.22 (revertant) reached the μ_{\max} at 43 hour but since 21 hour was growing with the similar μ , about 0,2 h^{-1} [Fig. 2, Tab. 1]. Two periods with different μ_{\max} were shown during the growth of wild strain A-101 [Fig. 2]. In the first period with ~ 7 hours duration, μ_{\max} was 0,285 [h^{-1}], and in the second very short one (30 minutes) μ_{\max} was 0,502 [h^{-1}] [Fig. 2]. Strain ATCC 32 338 A did not grow on glycerol, even in the presence of acetate as second C source [Fig. 2]. Acetate as a sole carbon source did not inhibited that strain growth [Tab. 1].

A considerable increase in the growth of acu^- mutants in glycerol containing medium supplemented with acetate was observed when rate growth was calculated as the mean value (μ_a) for selected periods of time: 0–24, 0–30, 0–48 hours. The μ_a of mutants growth in glycerol with acetate during first 24 hours, was 4 to 6 times higher than during the same period of growth in glycerol containing medium [Tab. 2]. The rate of those two values calculated for the wild strain was only 1,15 times higher.

The wild strain (A-101) grew well in the presence of glycerol, ethanol or sodium acetate as a sole carbon source but when ethanol and acetate simultaneously were present in the medium final biomass (ΔOD_{\max}) was significantly smaller [Tab. 3]. Acetate mutants (A-101.1.31 and A-101.1.31.K1) failed to grow in medium containing acetate and ethanol but in contrary in medium containing acetate and glycerol they grew well, however μ_{\max} was smaller than on glycerol as a sole C source [Tab. 1, Fig. 2]. Glycerol in the concentration of 0,1% had a positive effect on acetate utilisation by acu^- mutants [Fig. 1a]. A higher biomass (OD_{\max}) of the acu^- mutants was obtained on glycerol with acetate than on glycerol alone [tab.3]. Addition of glycerol to an acetate based medium inhibited the growth of the revertant (A-101.1.22) [Fig. 1b] and slightly diminish the final biomass of the wilds strain (A-101) [Tab. 2]. The highest biomass (highest OD value) was obtained with the wild strains growing in the presence of 1% glycerol or 1% of ethanol. The biomass of that strain obtained on sodium acetate was smaller but the concentration of that C source was only 0,6% [Tab. 3]. High biomass was also obtained for mutant A-101.1.31 in acetate medium supplemented with glycerol (1%) and in medium containing ethanol (1%) as a sole carbon source.

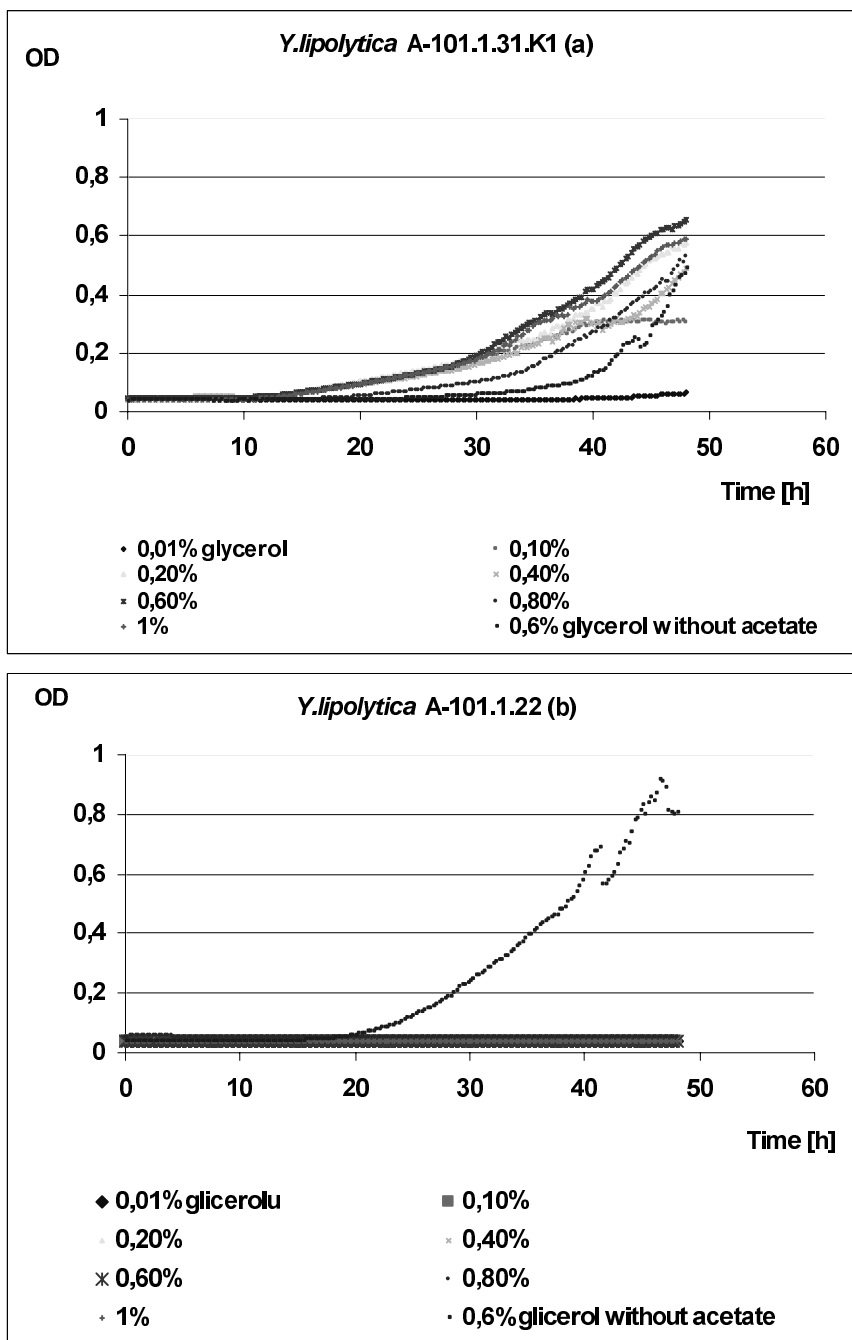


Fig. 1: Growth (OD) on sodium acetate (0,6%) and glycerol (0–1%) of *Y. lipolytica* A-101.1.31.K1 (a) and *Y. lipolytica* A-101.1.22 (b)

Rys. 1. Wzrost (OD) *Y. lipolytica* A-101.1.31.K1 (a) oraz *Y. lipolytica* A-101.1.22 (b) w obecności octanu sodu (0,6%) i glicerolu (0–1%)

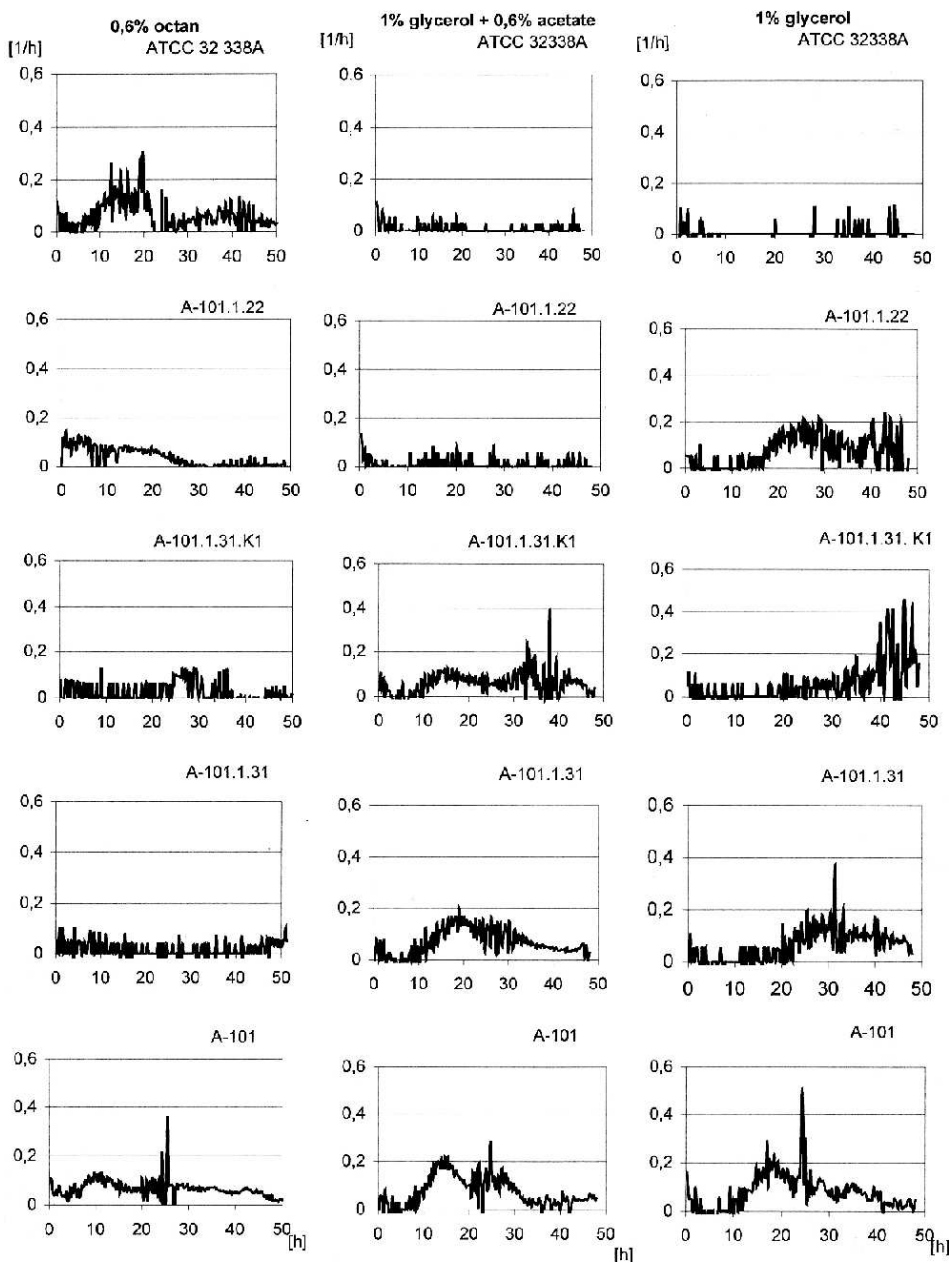


Fig. 2. *Y.lipolytica* specific growth rate on acetate (0,6%), glycerol (1%) and acetate (0,6%) plus glycerol (1%)

Rys. 2. Szybkość właściwa wzrostu *Y.lipolytica* w obecności octanu sodu (0,6%), glicerolu (1%) oraz octanu sodu (0,6%) z glicerolem (1%)

Table 1. Maximal specific growth rate (μ_{max}) of *Y. lipolytica* on different carbon sources
 Tabela 1. Maksymalna szybkość właściwa wzrostu (μ_{max}) *Y. lipolytica* w obecności różnych źródeł węgla

<i>Y.lipolytica</i> strains / szczepy	A-101	A-101.1.31	A-101.1.31.K1	A-101.1.22	ATCC 32 338A
Carbon source Źródło węgla	Maximal specific growth rate μ_{max} [h ⁻¹] Maksymalna szybkość właściwa wzrostu (μ_{max}) [h ⁻¹]				
1% glycerol 1% glicerol	0,502*	0,456	0,370	0,215	No growth Brak wzrostu
1% glycerol & 0,6% sodium acetate 1% glicerol & 0,6% octan sodu	0,279	0,204	0,389	No growth Brak wzrostu	No growth Brak wzrostu
0,6% sodium acetate 0,6% octan sodu	0,175	No growth Brak wzrostu	No growth Brak wzrostu	0,086	0,281
1% glucose 1% glukoza	0,265	0,255	0,249	0,297	0,414
1% glucose & 0,6% sodium acetate 1% glukoza & 0,6% octan sodu	0,237	0,220	0,276	0,276	0,301
1% glucose & 1% ethanol 1% glukoza & 1% etanol	0,157	nd	nd	nd	nd
1% ethanol 1% etanol	0,237	0,266	0,362	nd	nd
1% ethanol & 0,6% sodium acetate 1% etanol & 0,6% octan sodu	0,237	No growth Brak wzrostu	No growth Brak wzrostu	nd	nd

* see Fig. 2 and text,

Nd= not determined; nie oznaczano

Table 2. Average value of specific growth rate (μ_a) of *Y.lipolytica* on glycerol and acetate for determined periods of culture time
 Tabela 2. Średnia wartość właściwej szybkości wzrostu (μ_a) *Y.lipolytica* w obecności glicerolu i octanu wyznaczana dla określonego przedziału czasu hodowli

Time interval Przedział czasowy	Strains Szczepy	A-101	A-101.1.31	A-101.1.31.K1	A-101.1.22	ATCC 32 338A
	Carbon source Źródło węgla	Specific growth rate, average value, μ_a [h ⁻¹] Średnia wartość właściwej szybkości wzrostu, μ_a [h ⁻¹]				
0-24h	1% glycerol 1% glicerol	0,077	0,016	0,008	0,042	(-)0,004
	1% glycerol & 0,6% sodium acetate 1% glicerol & 0,6% octan sodu	0,089	0,066	0,050	0,001	(-)0,003
0-30h	1% glycerol 1% glicerol	0,089	0,037	0,015	0,062	(-)0,002
	1% glycerol & 0,6% sodium acetate 1% glicerol & 0,6% octan sodu	0,096	0,073	0,052	0,001	0,002
0-48h	1% glycerol 1% glicerol	0,077	0,060	0,054	0,064	0,002
	1% glycerol & 0,6% sodium acetate 1% glicerol & 0,6% octan sodu	0,073	0,066	0,058	0	0,001

Table 3. Biomasse level (delta OD_{max}) of *Y.lipolytica* on glycerol, ethanol and acetate
 Tabela 3. Plon biomasy (delta OD_{max}) *Y.lipolytica* w obecności glicerolu, etanolu i octanu

Strains Szczepy	A-101	A-101.1.31	A-101.1.31.K1	A-101.1.22	ATCC 32 338A
Carbon source Źródło węgla	Biomasse – Biomasa Delta OD _{max}				
1% glycerol 1% glicerol	1,417	0,602	0,453	0,767	0
1% glycerol & 0,6% sodium acetate 1% glicerol & 0,6% octan sodu	1,190	0,849	0,542	0	0,002
0,6% sodium acetate 0,6% octan sodu	0,513	0,004	0,005	0,056	0,250
1% ethanol & 0,6% sodium acetate 1% etanol & 0,6% octan sodu	0,250	0	0	nd	nd
1% ethanol 1% etanol	1,336	0,914	0,733	nd	nd

Nd=not determined – nie oznaczano

DISCUSSION

The observed variation of the specific growth rate, in the case of Bioscreen C studies, could arise from apparatus (variation of DO measurement) but also could be connected with the insufficient amount of carbon source available in the medium causing a not equilibrated cells growth. When a very small amount of C was available we can even estimate the “generation time” or “live time of cell”, because cyclic increase in growth rate was observed (2-3 hours). It is well known that in the batch cultures the specific growth rate is subjected to change because of the previously outgoing changes in substrate, metabolites and biomass concentration. Variations observed for specific growth rate plots could be smoothed by the application of algorithm taking into consideration some of changing metabolic parameters [Neeleman and van Boxtel 2001] but such mathematical modelling are not published for Bioscreen C studies.

On the basis of presented results, the threshold of specific growth rate (μ) determination is $\pm 0,004$ [h⁻¹], because that value was obtained for strain ATCC 32 338A, non growing on glycerol (delta OD_{max} = 0). In the case of the study of glucose induction of *acu*⁻ mutants acetate utilisation the value of $\mu = \pm 0,006$ [h⁻¹] was considered as the threshold of specific growth rate determination [Robak 2002]. It was calculated for the growth of mutants on acetate as a sole carbon source.

A good evaluation of the growth rate can be done by the comparison of the means value of μ , calculated for determined period of time (for example 0-24h, 0-30h, 0-48h). Such analyse enabled the determination of an important increase in the growth rate of *acu*⁻ mutants in the glycerol and acetate containing medium compare to the growth in glycerol medium.

Maximal specific growth rate of *Y.lipolytica* on ethanol and glycerol (first phase) was similar to μ_{max} on glucose, and it was about half of the rate determined in acetate containing medium, which was 0,175 [h⁻¹]. On glycerol a short second period of growth medium was observed with higher specific growth rate, $\mu_{max}=0,502$ [h⁻¹]. This value is very close to the μ_{max} calculated for the growth of *Y.lipolytica* on alkanes [Wojtatowicz

1991]. The short duration (30 minutes) of second increase of specific growth rate observed on glycerol could be the result of substrate exhausting.

However, the wild and *acu* mutants strains are able to use acetate or ethanol as sole carbon source [Robak 2000], the lack of their growth in the medium containing acetate and ethanol was shown in the present study. It reflects a "competition" in the assimilation and/or metabolism of those two carbon sources. Probably a competition took place between glycerol and acetate in the case of revertant mutant, as well. In the case of *S. cerevisiae* a simultaneous uptake of glucose and ethanol is a function of substrates concentration rate, hence as many as six metabolic pathways are proposed [De Jong-Gubbels 1995]. Any of taken into the consideration way is not based on the competition of glucose and ethanol assimilation. There are no reports on the competition between acetate and ethanol as well as for acetate and glycerol, till now.

REFERENCES

- Barnett J.A., Payne R.W., Yarrow D., 1983. Yeast: characteristics and identification, Cambridge University Press, Cambridge.
- Barth G., Gaillardin C., 1997. Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*, FEMS Microbiology Review 19, 219-237.
- Barth G., Weber H., 1987. Genetic analysis of the gene *ICL1* of the yeast *Yarrowia lipolytica*, Yeast 3, 255-262.
- Chang D-E., Shin S., Rhee J-P., Pan J-G., 1999. Acetate metabolism in a *pta* mutant of *Escherichia coli* W3110 : importance of maintaining acetyl coenzyme flux for growth and survival, J. Bacteriol. 181, 6656-6663.
- De Jong-Gubbels P., Vanrolleghem P., Heijnen S., Van Dijken J.P., Pronk J.T., 1995. Regulation of carbon metabolism in chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae* grown on mixture of glucose and ethanol, Yeast 11, 407-418.
- Diez-Gonzalez F., Russell JB., 1997. The ability of *Escherichia coli* O157:H7 to decrease its intracellular pH and resist the toxicity of acetic acid, Microbiology 143, 1175-1180.
- Finogenova T.V., Shishkanova N.V., Ermakova I.T., Kataeva I.A., 1986. Properties of *Candida lipolytica* mutants with the modified glyoxylate cycle and their ability to produce citric acid and isocitric acid. II. Synthesis of citric and isocitric acid by *C. lipolytica* mutants and peculiarities of their enzyme systems, Appl. Microbiol. Biotechnol. 23, 378-383.
- Heslot H., 1990. Genetics and genetic engineering of the industrial yeast *Yarrowia lipolytica*, Adv. Biochem. Engin. Biotechnol. 43, 43-73
- Kujau M., Weber H., Barth G., 1992. Characterisation of mutants of the yeast *Yarrowia lipolytica* defective in acetyl-coenzyme A synthetase, Yeast 8, 193-203.
- Lasko D.R., Zamboni N., Sauer U., 2000. Bacterial response to acetate challenge: a comparison of tolerance among species, Appl. Microbiol. Biotechnol. 54(2), 243-247.
- Mauersberger S., Schunck W-H., Barth G., 1995. Alkane non-utilizing in *Yarrowia lipolytica* isolation and first characterization. First *Yarrowia lipolytica* International Meeting, 18-21 lipiec, Thiverval-Grignon, France
- Neeleman R., van Boxtel A.J.B., 2001. Estimation of specific growth rate from cell density measurements, Bioprocess and Biosystems Engineering 24, 179-185.
- O'Beirne D., Hamer G., 2000. The use of glucose/acetate mixture by *Escherichia coli* W3110 under aerobic growth conditions, Bioprocess. Eng. 23, 375-380.
- Robak M., 2000. Metabolic changes in acetate mutants of *Yarrowia lipolytica* yeast., Bulletin of the Polish Academy of Sciences, Biological Sciences, 48(4), 277-286.

- Robak M., 2002. Study of acetate utilisation and citrate secretion by *Yarrowia lipolytica* yeast. Zesz. Nauk. AR Wroc. Technol. Żywn. Rozpr. Hab. nr. 442.
- Rodrigues G., Pais C., 2000. The influence of acetic and other weak carboxylic acids on growth and cellular death of the yeast *Yarrowia lipolytica*, Food Technol. Biotechnol. 38(1), 27-32.
- Shimokawa O., Nakayama H., 2000. Estimation of minimum sterol 14- α - demetylation-inhibitory concentration of azoles in *Candida* yeasts using acetate-mediated growth inhibition potential utility in susceptibility testing, J. Clin. Microbiol. 38(8), 2893-2896.
- Sousa M.J., Miranda L., Corte-Real M., Leao C., 1996. Transport of acetic acid in *Zygosaccharomyces bailii*: effects of ethanol and their implications on the resistance of the yeast to acidic environments, Appl. Environ. Microbiol. 62(9), 3152-3157.
- Tzschoppe K., Augstein A., Bauer R., Kohlwein S.D., Barth G., 1999. *Trans*-dominant mutations in the GPR1 gene cause high sensitivity to acetic acid and ethanol in the yeast *Yarrowia lipolytica*, Yeast 15, 1645-1656.
- Wendisch V.F., de Graaf A.A., Sahm H., Eikmanns B.J., 2000. Quantitative determination of metabolic fluxes during cointilization of two carbon sources : comparative analyses with *Corynebacterium glutamicum* during growth on acetate and/or glucose, J. Bacteriol. 182(11), 3088-3096.
- Wilson J.J., Khachatourians G.G., Ingledew W.M., 1982. Schwanniomyces: SCP and ethanol from starch, Biotechnol. Letters 4(5), 333-338.
- Wojtatowicz M., 1991. Studia nad biosyntezą kwasów cytrynowych przez szczep *Yarrowia lipolytica* A-101 i jego mutanty, Zesz. Nauk. AR Wroc. Technol. Żywn. Rozpr. Hab. 96.
- Wojtatowicz M., Marchin G.L., Erickson L.E., 1993. Attempts to improve strain A-101 of *Yarrowia lipolytica* for citric acid production from n-paraffins, Process. Biochem. 28, 453-460.

SYBKOŚĆ WŁAŚCIWA WZROSTU DROŹDŹ *YARROWIA LIPOLYTICA* W PODŁOŻU OCTANOWYM WZBOGACONYM GLUKOZĄ, GLICEROLEM LUB ETANOLEM

Streszczenie. Wyznaczono szybkość właściwą wzrostu pięciu szczepów *Yarrowia lipolytica* w podłożu octanowym (0,6%) wzbogaconym glicerolem, etanolem lub glukozą (w steżeniu od 0 do 1%). Badane szczepy różniły się zdolnością do wykorzystania octanu i sekrecji cytrynianu oraz morfologią kolonii. W podłożu octanowym, szybkość właściwa wzrostu drożdży oraz plon biomasy zmieniały się w zależności od obecności drugiego źródła węgla. Dodatek etanolu hamował (całkowicie lub częściowo) wzrost wszystkich szczepów w podłożu octanowym, podczas gdy glicerol i glukoza stymulowały wzrost szczepu dzikiego (A-101), indukowały wzrost mutantów octanowych, acu^- (A-101.1.31 oraz A-101.1.31.K1) i hamowały wzrost revertanta octanowego (A-101.1.22). Maksymalną szybkość właściwą wzrostu obserwowano dla drożdży wyrastających w obecności glicerolu, a periodyczne wahania szybkości wzrostu obserwowano przy najmniejszych dawkach dostępnego źródła C. Maksymalna szybkość wzrostu szczepu dzikiego była wyższa w obecności glukozy niż octanu.

Słowa kluczowe: *Yarrowia lipolytica*, szybkość wzrostu, octan, glicerol, etanol, Bioscreen

Accepted for print – Zaakceptowano do druku: 29.03.2007

SPIS TREŚCI CONTENTS

Barbara Foszczyńska, Ewelina Dziuba

Stan fizjologiczny drożdży piwowarskich w czasie fermentacji brzeczek skażonych mykotoksynami. Cz. 1: T-2 i ZEA 3

Physiological status of brewing yeasts during fermentation of worts contaminated with mycotoxins. P.1: T-2 and ZEA

Milosz Smolik, Danuta Rzepka-Plevneš, Katarzyna Kowalczyk, Marta Grabiec

Study of genetic diversity of the onion species by ISSR-PCR analysis 13

Określenie zróżnicowania genetycznego rodzaju cebula za pomocą techniki ISSR-PCR

Małgorzata Robak

Yarrowia lipolytica specific growth rate on acetate medium supplemented with glucose, glycerol or ethanol 23

Szybkość właściwa wzrostu drożdży *Yarrowia lipolytica* w podłożu octanowym wzbogaconym glukozą, glicerolem lub etanolem