

ACTA SCIENTIARUM POLONORUM

Czasopismo naukowe założone w 2001 roku przez polskie uczelnie rolnicze

Biotechnologia

Biotechnologia

Biotechnology

9(4) 2010



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), Mikołaj Protasowicki (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)

Opracowanie redakcyjne i korekta:

Elżbieta Winiarska-Grabosz
Anna Piskor

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 2010



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

Nakład 200 + 16 egz. Ark. wyd. 3,0. Ark. druk. 2,5
Druk i oprawa: F.P.H. „ELMA”

USE AND COMPARISON OF MOLECULAR AND CLASSICAL METHODS FOR THE IDENTIFICATION OF MOULDS ISOLATED FROM THE SOIL

Michał Piegza, Joanna Rzaśa,
Ewelina Siepka, Danuta Witkowska

Department of Animal Nutrition and Feed Management,
Wrocław University of Environmental and Life Sciences

Abstract. Present work contains the attempt to compare methods of microorganisms identification, for example, the similarity between species – molecular and classical. The both methods were used because classical approaches based on the use of morphological criteria are, as in several other fungi, difficult to apply in *Trichoderma*, due to plasticity of characters to interpret. Consequently, almost all recent studies have used molecular data to characterize and identify species. The comparison of these two techniques is based on using guidelines of macroscopic and microscopic evaluation of few classical factors as well as RAPD and RFLP – molecular techniques. Results indicate that none of the technique being compared is adequate when used alone, although molecular ones are more accurate. There is no complete convergence between RAPD and RFLP what makes it even harder to interpret but this fact can be the result of inconvenient markers used in experiment.

Key words: moulds, *Trichoderma sp.*, RAPD, RFLP, molecular methods

INTRODUCTION

The classical methods helpful in the identification of the microorganisms used to be one of the most frequent methods in laboratories necessary to detect the similarity between species. Because of the low cost, availability of the substrates and not really advanced methodology and equipment they are still the basic tool used by scientists. Unfortunately, they are not always accurate because the unambiguous statement about a specific sample is often impossible to make.

Together with the science progress more accurate, timesaving and monosemantic techniques of identification were developed [Barszczewski and Robak 2004]. Two of them were used in this work: RFLP and RAPD.

Corresponding author – Adres do korespondencji: Michał Piegza, Biotechnology and Food Microbiology Department, Wrocław University of Environmental and Life Sciences, Norwida 25/27, 50-375 Wrocław, e-mail: Michal.Piegza@wnoz.up.wroc.pl

Restriction fragment length polymorphism (RFLP) and random amplified polymorphic DNA (RAPD) are both techniques possible to be used to differentiate microorganisms by analysis of their DNA by their DNA restriction patterns (RFLP) or amplified fragments (RAPD).

The RAPD analysis was originally devised by Welsh and McClelland as in vitro DNA amplification technique [Welsh and McClelland 1990]. It employs short synthetic oligonucleotides as a random primer to exponentially increase the template DNA by polymerase chain reaction (PCR). This technique is known to be a very useful means of analyzing genetic structures and relationships in plants, fungi, bacteria species, animals and viruses. It is now widely used in the area of studying genetic mapping, diagnostics and taxonomy [Kwon and Lee 1996]. RFLP is also successfully used for the identification of yeasts isolated from dairy products [Andrighetto et al. in: Barszczewski and Robak 2004], wine production process and brewing yeast strains [Tornai-Lehoczki and Dlauchy in: Barszczewski and Robak 2004].

Microorganisms used in this research are mostly cosmopolitan soil-borne fungi frequently also found on decaying wood *Trichoderma* genus. They are playing the role in breakdown of organic matter. Because of its well developed enzymatic apparatus they are used industrially to enzyme [Kubicek and Penttila in: Druzhinina and Kubicek 2005] and antibiotics production [Sivasithamparam and Ghisalberti in: Druzhinina and Kubicek 2005]. Simultaneously they can be specific bio-disintegrators that limit pathogens growth – they are capable of suppressing a number of fungal phytopathogens that originate in air or soil [Markovich and Kononova 2003]. These saprophytic soil moulds are strong antagonists of parasites causing severe sicknesses of plants, for example: seedling gangrene, roots decay and wilting, leading to death of the plant [Hjeljord and Tronsmo 1998].

The enzymes used by *Trichoderma* are among the others: β -1,3-glucanases that is believed to be involved in sustenance of saprophytes and mycoparasites [Chet 1987, Sivan Chet 1989] and are important enzymes used in genetic manipulation (DNA separation, protoplast formation), chitinases capable of lysing cell walls of ascomycetes and basidiomycetes [Chet 1987, Chet et al. 1998, Elad et al. 1982, Lorito 1989] and extracellular proteases that may play a role in lysis of cell walls of other fungi [Peberdy 1990, Wessels 1986]. The degradation of microbial cell walls, subsequently leading to the prevention of pathogenic microorganisms or protoplast production for genetic studies [Kitamoto 1988, Lorito et al. 1993].

A wide variety of enzymes present in *Trichoderma* fungi encourages food technologists to use them in animal feed industry (better availability of fodder), fruit and vegetable processing (pulp maceration) and yeast hydrolysate production [Witkowska et al. 1999].

An ability to antagonize and parasitize other fungi made it possible to use certain *Trichoderma* species for suppressing a broad range of phytopathogenic fungi [Chet 1987, Hjeljord and Tronsmo 1998, Nei and Li 1979, Singh and Faull 1990]. Not only does the use of these strains maintain the level of agricultural production, it also decreases environmental pollution and the expenditure of chemical pesticides and fumigants [Markovich and Kononova 2003].

The aim of the research was to look for new strains of *Trichoderma* and comparison of molecular and classical method for its identification.

MATERIALS AND METHODS

Samples of the soil were taken from six different places localized near the root system of birch-tree (Bcp), azalea (Alp), fern (Plp), pine (Slp), larch (Mlp) and willow (Wcp). The soil was scattered directly onto the Petri dish with Czapek, LAB and PDA medium. The multiple passage of full-grown colonies was made on PDA medium until pure cultures were obtained. During the isolation the biggest pressure was exerted on colonies likely belonging to *Trichoderma* genus.

As a model microorganisms five different strains of *Trichoderma* from the collection of Biotechnology and Food Microbiology Department were used. They were representatives of genus: *T. hamatum*, *T. reesei* and *T. koningi*.

As a result of the isolation from the soil 31 isolates were obtained, which after evaluation with classical method (microscopically and macroscopically) were most recognized as *Trichoderma* genus representatives. All strains used in experiment are shown in Table 1.

Table 1. Strains used in the experiment

Tabela 1. Zestawienie szczepów wykorzystanych w doświadczeniu

No.	Nazwa – Name	No.	Nazwa – Name
1.	<i>Trichoderma</i> sp. Wcp1	19.	<i>Trichoderma</i> sp. Mlp6
2.	<i>Fusarium</i> sp. Alp4	20.	<i>T. reesei</i> M7-1 (collection strain)
3.	<i>Trichoderma</i> sp. Bcp2	21.	<i>Trichoderma</i> sp. Slp1
4.	<i>Trichoderma</i> sp. Alp2	22.	<i>T. erinaceum</i> Plp3
5.	<i>T. hamatum</i> T2 (collection strain)	23.	<i>Trichoderma</i> sp. Acp1
6.	<i>Trichoderma</i> sp. Blp2	24.	<i>T. reesei</i> Alp1
7.	<i>Trichoderma</i> sp. Plp1	25.	<i>Trichoderma</i> sp. Slp2
8.	<i>Trichoderma</i> sp. Mlp2	26.	<i>Trichoderma</i> sp. Acp3
9.	<i>Aspergillus</i> sp. Bcp1	27.	<i>T. koningi</i> 276 (collection strain)
10.	<i>Trichoderma</i> sp. Slp3	28.	<i>T. harzianum</i> T33 (collection strain)
11.	<i>Trichoderma</i> sp. Acp2	29.	<i>T. hamatum</i> C1 (collection strain)
12.	<i>Trichoderma</i> sp. Plp2	30.	<i>Trichoderma</i> sp. Bcp4
13.	<i>T. fasciculatum</i> Mlp1	31.	<i>Trichoderma</i> sp. Bcp3
14.	<i>Trichoderma</i> sp. Pcp1	32.	<i>Trichoderma</i> sp. Mlp4
15.	<i>Trichoderma</i> sp. Wcp2	33.	<i>Trichoderma</i> sp. Blp1
16.	<i>Fusarium</i> sp. Alp3	34.	<i>Trichoderma</i> sp. Slp4
17.	<i>Trichoderma</i> sp. Mlp3	35.	<i>Fusarium</i> sp. Alp5
18.	<i>Trichoderma</i> sp. Mlp5	36.	<i>T. aureoviride</i> Plp4

To confirm the evaluation with classical method, molecular analysis has been taken, especially since so many of the isolates are *Trichoderma* sp. The aim was also to estimate the connection between the isolates and to classify the microorganism to the types.

Template DNA was isolated according to modified Hoffman and Winston method [Barszczewski and Robak 2004]. One loop of fresh biomass (20 h old cultures on YM slants at 30°C) was transferred into a 1,5 ml tube containing 1 ml of sterile water. After vortexing and centrifugation (5 min; approx. 10 000 g) the supernatant was decanted and the cells were washed twice with sterile water. Two hundred microlitres of the following mix were added to each tube: 1mM EDTA; 10 mM Tris-HCl; pH=8,0; 100 mM NaCl; 2% Triton X-100; 1% SDS, and approx. 0,3 g of glass beads (d = 20–40 µm). After vortexing the cells, 200 µl of PCIA-buffer (10 mM Tris-HCl, pH=8, 1 mM EDTA) were added and centrifuged (5 min; approx. 10000 g). The aqueous phase was transferred into a new 1,5 ml tube, containing 1 ml of ice-cold 96% ethanol. After 20 min at -20°C, the precipitated nucleic acids were centrifuged (5 min; approx. 10 000 g). The supernatant was decanted and the precipitate was dried. Finally, 50 µl TE-buffer and 3 µl of RNaze. A stock solution (10 mg/ml, Macherey-Nagel) was added and the solution was incubated for 30 min at 37°C [Barszczewski and Robak 2004].

The propriety of extraction was controlled with electrophoresis.

Electrophoresis. 10 µl of DNA solution were mixed with 2 µl of 6 x Loading Dye Solution (Fermentas) and loaded into a 1% agarose gel (Top Vision LE GQ Agarose, Fermentas) containing 6 µl of ethidium bromide solution (10 mg/ml). Gene Ruler 100 bp DNA Ladder Plus (Fermentas) was used as molecular weight DNA standards and the DNA bands were separated by agarose gel electrophoresis in 0,5 x TBE buffer at 8 Vcm⁻¹. The ethidium bromide stained DNA bands were visualized under UV light and photographed (Vilber Lourmat System).

RAPD-PCR analysis. To compared isolated strains RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*) was used with 3 different microsatellite sequences: (GAC)₅, (GTG)₅, (GACA)₄, and a fragment of M13 phage GAGGTGGNGGNTCT [Arisan-Atac et al. 1995, Piegza et al. 2006].

Each reaction mixture contained 3 µl of 10x PCR buffer (Fermentas); 3 µl of 25 mM MgCl₂; 0,3 µl of 10 mM dNTPs mix (Sigma); 0,1 µl of 100 µM primer; 0,4 µl of *Taq* DNA polymerase (5 U/µl), and 23,2 µl of sterile water. Amplification reactions were performed with a T3Thermocycler under the following conditions: 93°C for 3 min, 35 cycles: 93°C for 1 min, 38°C for 1 min, and 72°C for 2 min; final extension at 72°C for 5 min. Fifteen microlitres of each PCR products were mixed with 3 µl of 6x Loading Dye Solution and pipetted into the wells of 1% agarose gel. Received profiles were analyzed.

RFLP-PCR. Further RFLP-PCR was applied, where template DNA was amplified with NS3 and ITS4 primers. The reaction mixture contained 0,3 µl of *Taq* polymerase, 3,0 µl of PCR buffer, 3,0 µl of 25 mM MgCl₂, 0,3 µl of 10 mM dNTP mix, 0,1 µl of each primer, 5,0 µl of template DNA, and 18,2 µl sterile distilled water. The amplification was made in Tpersonal thermocycler (Biometra) under the following conditions: 5 min denaturation at 95°C, 35 cycles at 95°C for 30 s, 61.5°C for 30 s, 72°C for 3 min, and final extension at 72°C for 5 min [Arisan-Atac et al. 1995, Piegza et al. 2006].

After amplification 4 µl of PCR products, 0,2 µl of restriction enzymes each (*Hae* III, *Scr*F I, *Msp* I), 1 µl of appropriate buffer and 4,8 µl of sterile water were mixed. The reaction mixtures were incubated at 37°C for 2 hours. After the incubation time, the mixtures were mixed with 2 µl of 6 X Loading Dye Solution (Fermentas) and loaded on agarose gel 1%. Electrophoresis conditions were the same as described earlier.

The obtained profiles were analyzed with BioGene software. Dendograms were obtained by means of the Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Average (UPGMA) clustering analysis on the base of Dice Coefficient [Nei and Li 1979] and the overall dendrogram were calculated with WEPA as described earlier for *Candida sake* strains [Walczak et al 2007].

RESULTS AND DISCUSSION

Usage of classical comparison methods (micro- and macroscopic analysis) allowed 31 of the isolates to identify as *Trichoderma* genus, 3 as *Fusarium* genus and 1 as *Aspergillus* genus, as it is shown in Table 1. *Trichoderma* genus was the genus of interest and among 31 isolates 9 strains were identified as specific types.

During macroscopic and microscopic analysis the special pressure was put on the evaluation of few factors: growth, size, shape, height, edging, lucidity, color and the structure of colonies, then sporification and the look of the cells (data not shown).

Examples of the examined samples are shown on Figures 1 and 2.

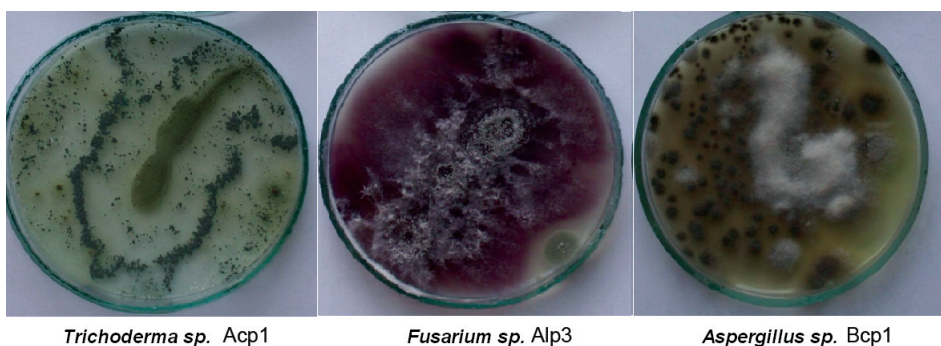


Fig. 1. Examples of macroscopic evaluation of the isolates on PDA medium

Ryc. 1. Przykładowy obraz makroskopowy ocenianych izolatów na podłożu PDA

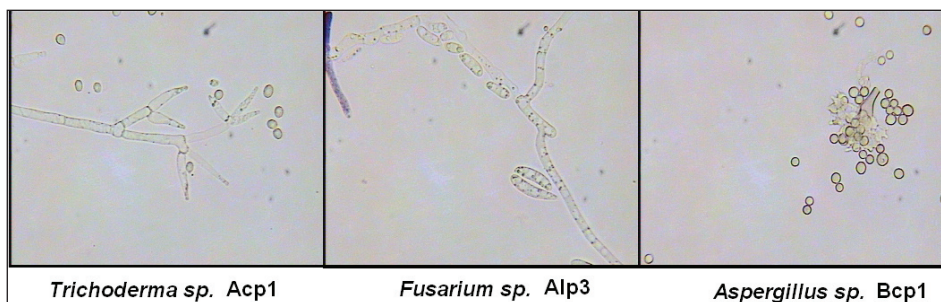


Fig. 2. Examples of microscopic evaluation of the isolates

Ryc. 2. Przykładowy obraz mikroskopowy ocenianych izolatów

As far as molecular methods are concerned, results of the examinations partly confirmed classical method and partly made it questionable.

Electrophoresis pictures showed below were used to make some assumptions about the collected strains. The description is based on the pictures themselves and also on partial dendrograms which allows us to estimate the level of similarity of the microorganisms. Dendrograms were made with usage of BioGene computer software.

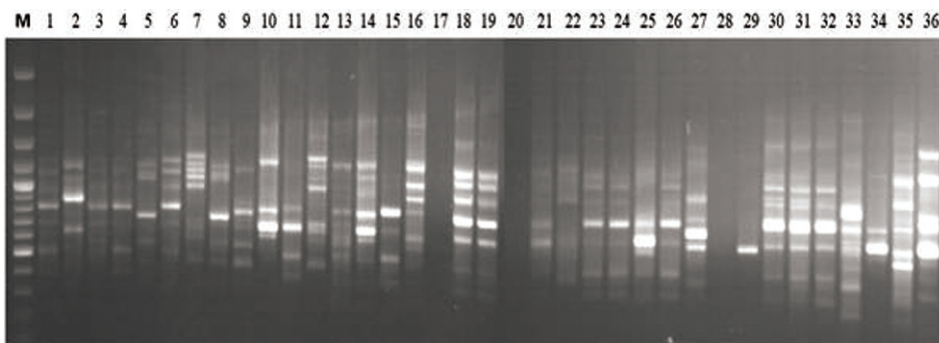


Fig. 3. Electrophoresis separation of the RAPD reaction products, obtained with usage of (GAC)₅ primer

Ryc. 3. Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji z użyciem primera (GAC)₅

Figure 3 shows that strains Slp1 and Slp2 (line 21 and 25) are in 100% the same even that intensity of the products are different. According to this photo also Bcp4 (line 30) and Bcp3 (line 31) are most probably the same types. Additionally the strain Mlp4 (line 32) – classified also as *Trichoderma sp.* is quite the same, despite the origin (root system of different tree).

Similarities between the strain *T. hamatum* T2 from the Department collection (line 5) and Mlp2 (line 8) has been observed in 90% and the products size were 1,758; 1163; 758; 569 bp.

As also figure 3 shows, similarities exceeded 90% are visible for strains: Acp2 and Wcp2 (lines 11 and 15), Alp1 and Acp3 (lines 24 and 26) – products 1004; 878; 715; 411 bp, Mlp5 and Mlp6 (lines 18 and 19) – products 1500; 850; 680; 570; 358 bp, Bcp4 and Bcp3 (lines 30 and 31) – products 1750; 908; 860; 670; 560; 370 bp.

Both dendrograms constructed on the basis of figure 3 and 4 also show likeness in around 85% between strains : Wcp1 and Blp2 (lines 1 and 6), Alp1 (line 24) and Acp1 (line 23), Alp2 and Bcp1 (lines 4 and 9), Slp3 and Bcp2 (lines 10 and 3), Bcp4/Bcp3 (line 30/31) and Mlp4 (line 32).

Figure 4 shows 100% of similarity between strains Alp1, Mlp4 and Slp4 (lines 24, 32 and 34) – products 1022; 883 bp, and also between strains Plp1 and Plp2 (lines 7 and 12) – only one 620 bp product with the Collection strain M7-1 (line 20) which represents *T. reesei*.

Alikeness around 85% can be observed between Wcp1 and Alp4 (line 1 and 2) – products 1022; 675 bp and also between Bcp4 (line 30) and Blp2 (line 6) – products 2400; 1150; 872 bp.

Bcp4 (line 30) and Bcp3 (line 31) are similar in 67% and again strain Mlp4 (line 32) is also very similar to them both.

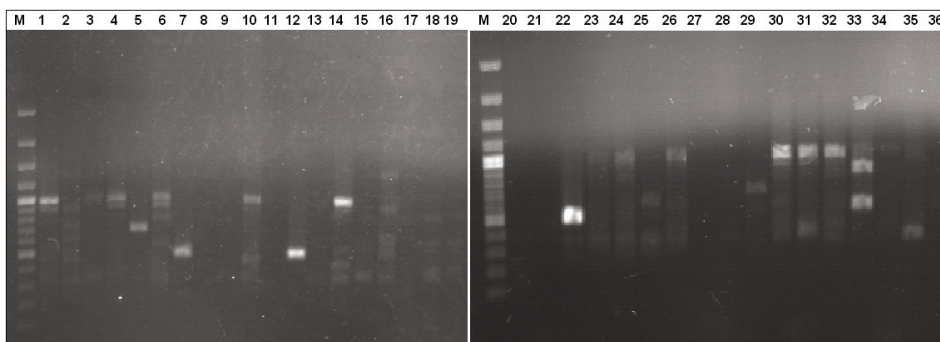


Fig. 4. Electrophoresis separation of the RAPD reaction products, obtained with usage of $(GACA)_4$

Ryc. 4. Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji z użyciem primeru $(GACA)_4$

Data on figure 5 shows, that the similarity between Bcp4 (line 30) and Bcp3 (line 31) is preserved – similar product 1470 bp, but the strain Mlp4 (line 32) is not really visible. Strains Pcp 1 (line 14) and Wcp2 (line 15) seems to be also quite similar (86% according to partial dendrogram) and this suspicion was confirmed on few other pictures (excluding Fig. 1 and 2).

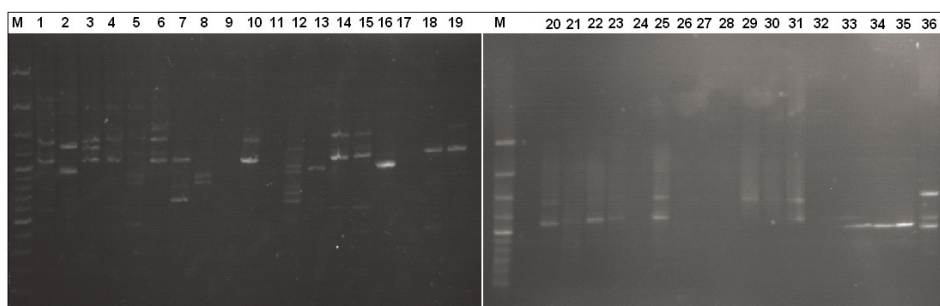


Fig. 5. Electrophoresis separation of the RAPD reaction products, obtained with usage of M13 primer

Ryc. 5. Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji z użyciem primeru M13

Here the collection strain *T. reesei* M7-1 (line 20) is in 80% as similar to strains Acp1 (line 23), Bcp3 (line 31), Slp3 (line 10) and Alp2 (line 4). Dendrogram also shows that strain Bcp1 (line 9) – products 942 and 864 bp isn't alike to any of the strains.

Figure 6 shows that the similarity of strains Mlp5 (line 18) and Mlp6 (line 19) is very significant (790; 530; 275 bp). Their origin in addition is the same (larch tree) what makes even more probable that they represent the same type. Strains Bcp4, Bcp3 still show high level of similarity (over 90%) according to partial dendrogram, although even 100% of similarity can be observed – between Collection strain *T. hamatum* T2 and Mlp3 (line 5 and 17) – product 1400 bp and also between Mlp1 and Mlp2 (lines 13 and 8) – products 550 and 420 bp.

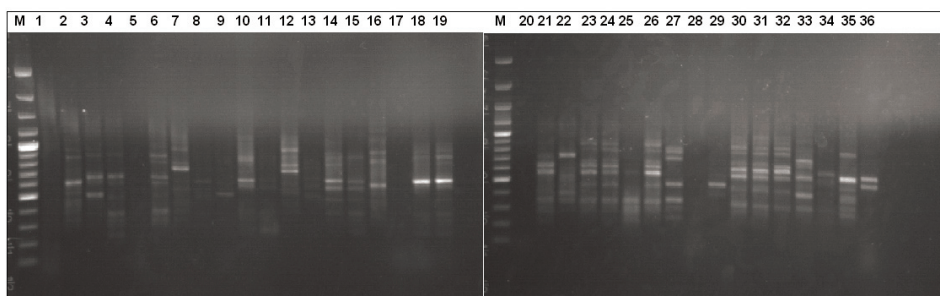


Fig. 6. Electrophoresis separation of the RAPD reaction products, obtained with usage of $(GTG)_5$ primer

Ryc. 6. Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji z użyciem primera $(GTG)_5$

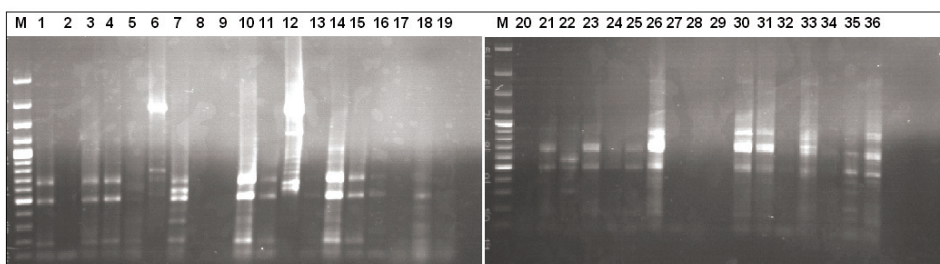


Fig. 7. Electrophoresis separation of the RFLP reaction products, obtained with usage of HaeIII restriction enzyme

Ryc. 7. Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR trawionych restrykcyjnym enzymem HaeIII

As it could be observed on the previous pictures Bcp4 (line 30), Bcp3 (line 31) and Mlp4 (line 32) seems to be very similar (about 90% on dendrogram). In addition strain Alp2 (line 4) shows 85% of alikeness to these 3 strains – products 809; 586; 506; 405; 280 bp.

Also alleged *Fusarium sp.* (Alp4, line 2) shows quite high probability of being connected with *Trichoderma sp.* (Plp1, line 7) – about 50%.

Strain Acp2 (line 11) according to dendrogram isn't alike to any of the strains.

The analysis of figure 7 shows 100% resemblance between strains Bcp1 and Acp2 (line 9 and 11) – products 690; 512; 195 bp. The same situation is between Wcp2 (line 15) and Alp2 (line 4) – products 749; 569; 214 and 110 bp but in addition strain Alp3 (line 16) which was assumed to be *Fusarium sp.* is also alike. Dendrogram confirms that, showing 89% of similarity between them.

Also profiles of Slp3 (line 10) and Pcp1 (line 14) strains seems to be similar (according to dendrogram they are in 82%) – 729; 554; 350; 214; 124 bp.

Resemblance higher than 80% show also strains: Acp1 and Wcp1 (lines 23 and 1) – 684; 512; 186 bp, Slp3 (line 10), Plp1 (line 7) with Acp2 (line 11).

According to this profile strains Alp4 (line 2) and two of the Collection strains: M7-1 and T33 (line 20 and 28) aren't alike to any of other strains.

Figure 8 demonstrates 100% of resemblance between strains: Acp2, Slp1 and Acp1 (lines 11, 21, 23) – products 683 and 287 bp, between Alp2 and Blp2 (lines 4 and 6) – 691;

525; 280 bp and also between Slp2 and Slp4 (lines 25 and 34) – 740 bp. Strain Mlp4 (line 32) shows 100% alikeness with the Collection strain 276 (line 27 – *T. koningi*).

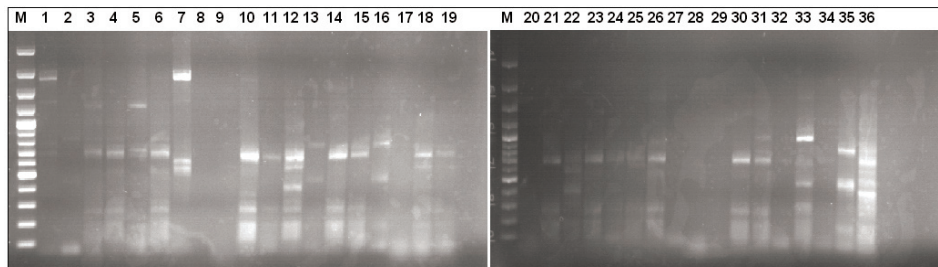


Fig. 8. Electrophoretic separation of the RFLP reaction products, obtained with usage of MspI restriction enzyme

Ryc. 8. Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR trawionych restrykcyjnym enzymem MspI

The picture shows that again strains Wcp2 (line 15), Bcp2 (line 3) and Alp2 (line 4) are showing great similarity but this time strain Alp3 (line 16) assumed to be *Fusarium sp.* is not included.

In addition strains Slp3 (line 10) and Pcp1 (line 14) same as Acp3 (line 26) and Bcp3 (line 31) are showing 85% of likeliness. None of the strains shows similarity to the collection strains and four of them: Mlp3 (line 17), Alp4 (line 2), T33 (line 28 – collection strain) and C1 (line 29 – collection strain) aren't alike to any of the strains.

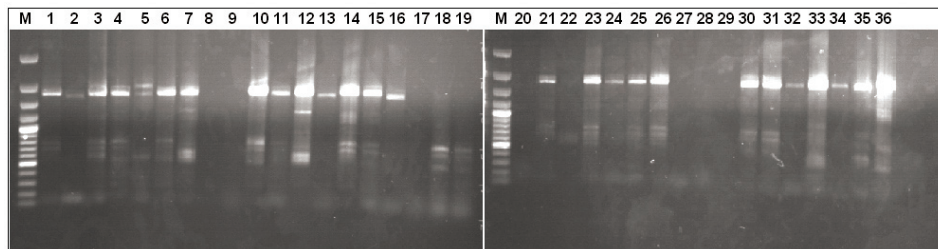


Fig. 9. Electrophoresis separation of the RFLP reaction products, obtained with usage of SrfI restriction enzyme

Ryc. 9. Rozdział elektroforetyczny produktów reakcji PCR trawionych restrykcyjnym enzymem SrfI

The results obtained with SrfI restriction enzyme show one connection with collection strain *T. hamatum* T2 (line 5) – strain Wcp2 (line 15) – 2181; 1925; 777; 670; 127 bp. But the similarity is not significant and as on previous pictures none of the other collection strains shows the similarity with isolates (Fig. 9).

Although few of the strains show 100% similarity: Wcp1 with Acp2 (lines 1 and 11) – product 1925; 824; 700; 167 bp, Slp3 and Acp1 (lines 10, 23) – 2026; 824; 711; 540 bp, Slp1 and Alp2 (lines 21, 4) – 1839 and 800 bp, Bcp4 and Bcp3 (lines 30 and 31) – 1793; 700, 532 bp and Mlp1 with Alp1 (lines 13 and 24) from which Alp1 with usage of classical method was assumed to be *T. reesei*.

The connection between Wcp1 (line 1), Bcp2 (line 3) and Acp2 (line 11) strains can be seen, that is over 80%. The same situation is between strains: Slp3, Acp1 and Blp2 (lines 10, 23 and 6).

In addition, once again *T.harzianum* T33 – the collection strain – (line 28) doesn't show similarity to any other strain according to this picture.

Two general dendrograms – showed below – were made on the ground of these particular analysis.

Dendrograms show that the most similar to each other are strains Bcp4 and Bcp3 (both *Trichoderma sp.* according to classical method), on dendrogram 2 (RFLP) the similarity was 80% and on dendrogram 1 (RAPD) even higher – 88%. We can see high resemblance in their genetic profile, so most likely they are strains from the same type – like it was deduced with classical method.

Unfortunately, the researches occurred quite big similarity between two presumably different types, both in RAPD and RFLP analysis. Additionally, those two different molecular analysis were giving various results, for example strain *Fusarium sp.* Alp3 showed 64% (dendrogram 2) of similarity to *T. fasciculatum* Mlp1 strain in RFLP analysis and also 53% of similarity to *T. erinaceum* strain in RAPD examination (Fig. 10). Strain *Aspergillus sp.* Bcp1 didn't show any similarity to the rest of examined strains as far as RFLP technique was concerned, but with usage of RAPD it showed 23% likeness to *T. hamatum* C1 strain.

Additionally the use of RAPD method showed that the strain *Fusarium sp.* Alp4 is in 56% as similar as *Trichoderma sp.* Plp1.

A fact worth to emphasize is also lack of similarity between two collection strains analyzed as the same types – C1 and T2 strains recognized as both *Trichoderma hamatum*.

In conclusion, as it was observed, macroscopic methods couldn't give satisfactory results. It was need to use some more practice techniques. But also here it wasn't really only one on of them. Starters used in RAPD and RFLP-PCR analysis didn't lead to unambiguous differentiation of the isolates of interest. To have some of the certainty which genus were dealt with in our researches, it was need to use both molecular techniques and compare them to each other. On the one hand probably microsatellite sequences and restriction enzymes used after Barszczewski and Robak [2004] to examine brewery yeasts, were not suitable in the case of yeasts isolated from the soil, but on the other another scientists have used the same primers in RAPD analysis. Arisan-Atac et al. [1995] identified subgroups of *Trichoderma viride* and other *Trichoderma* with use of 3 oligonucleotide primers – M-13 wild-type phage DNA, (GTG)₅ and (GACA)₄. Turner et al. [1997] also used the same primers in their work on biogeography and phenotypic variation in *Trichoderma* sect. *Longibranchiatum* and associated *Hypocrea* species. Kullnig et al. [2000] in their researches on molecular identification of *Trichoderma* species from Russia, Siberia used M-13 and (GTG)₅ primers in RAPD analysis too [Arisan-Atac et al. 1995, Kullnig et al. 2000, Turner et al. 1997].

While it is going about RFLP analysis, the ITS4 and NS3 primers were used in this work. Hermosa et al. [2004] provided their researches on genetic diversity shown in *Trichoderma* biocontrol isolates with usage of ITS1 primer, as well as Lubeck et al. [2000], who identified *Trichoderma* strains from building materials [Hermosa et al. 2004, Lubeck et al. 2000].

More researches with usage of different molecular tools need to be done to determine those strains precisely.

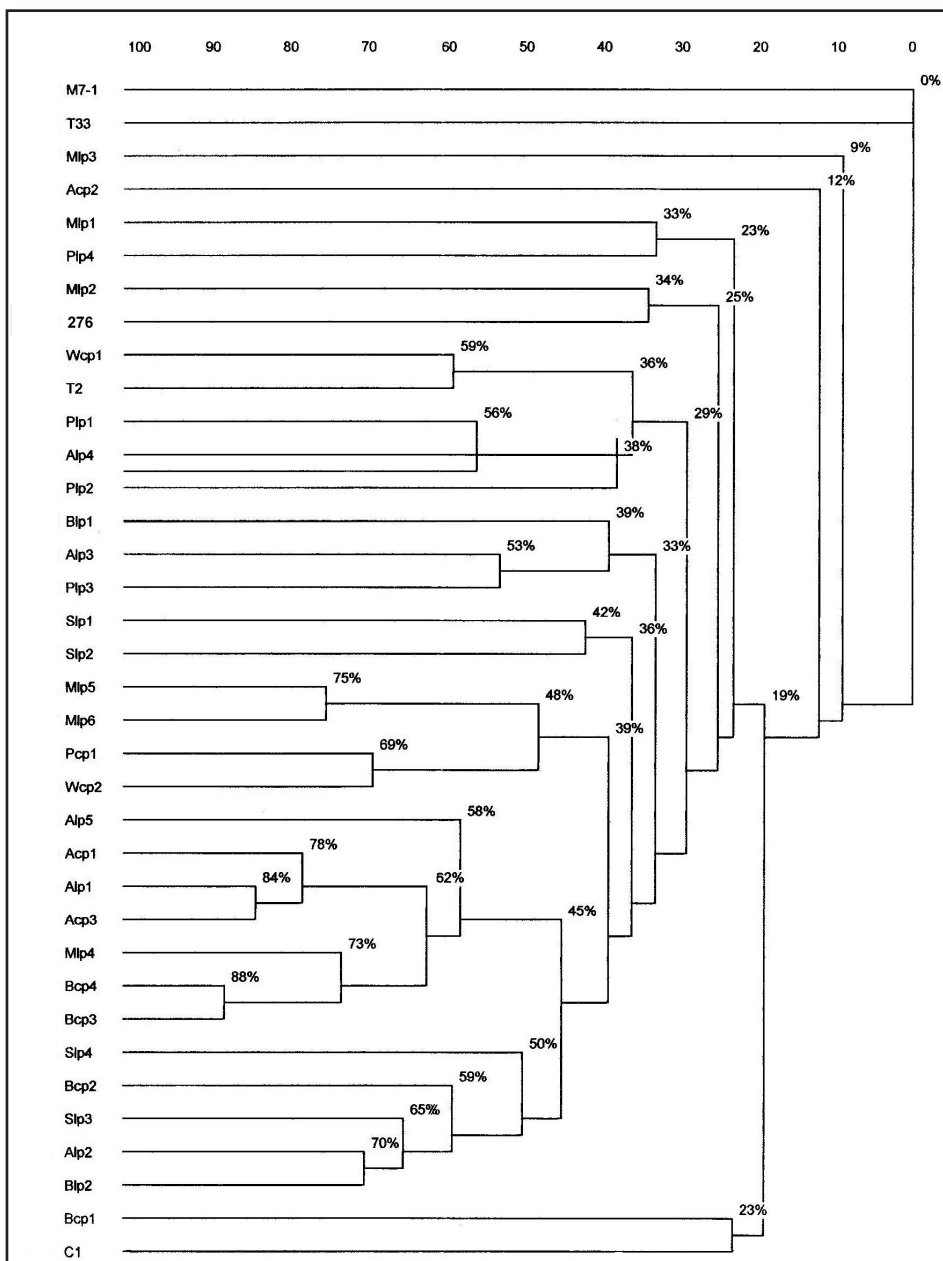


Fig. 10. Dendrogram obtained by means of the Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Average (UPGMA) clustering analysis on the base of Dice Coefficient for four RAPD analyses (WEPA)

Ryc. 10. Dendrogram otrzymany z wykorzystaniem metody średnich połączeń dla wszystkich analiz RAPD

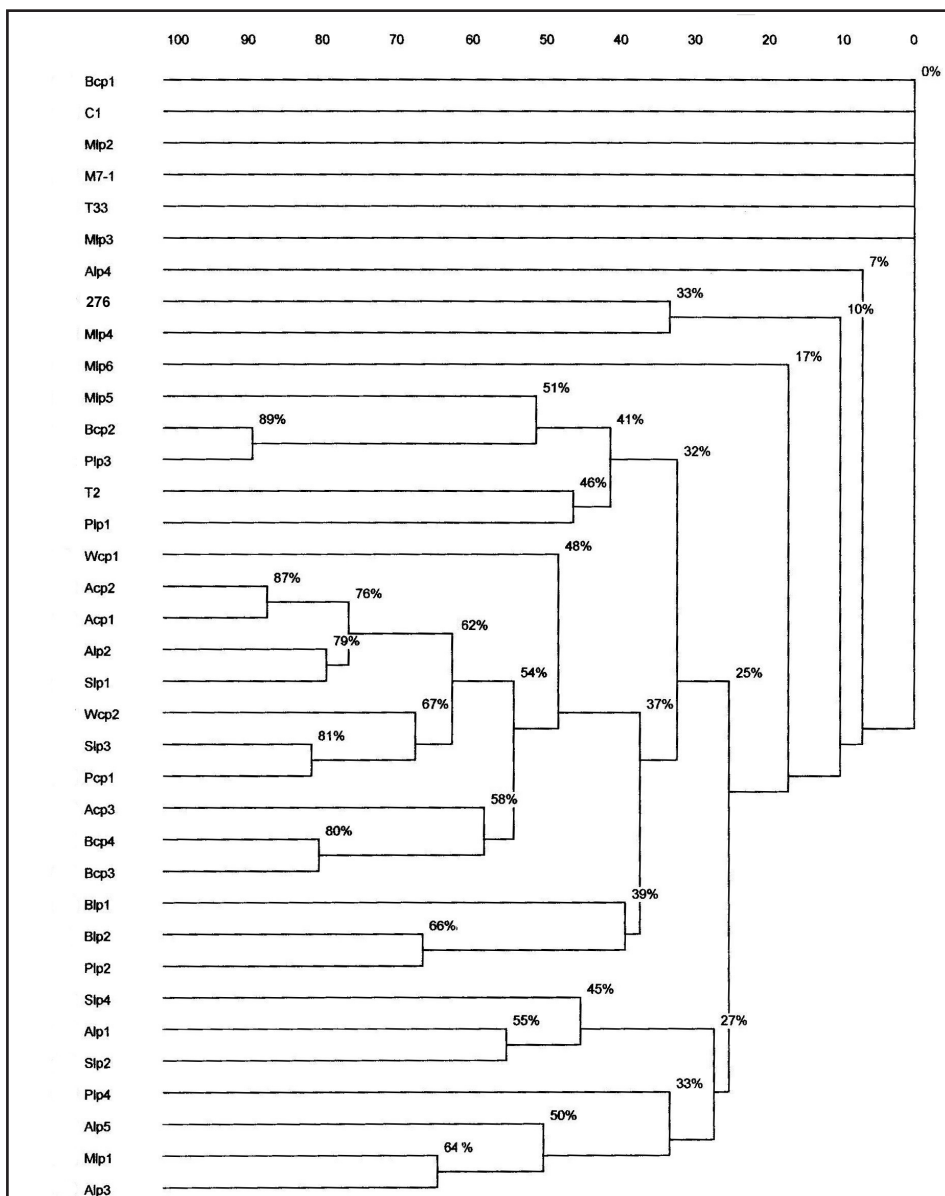


Fig. 11. Dendrogram obtained by means of the Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Average (UPGMA) clustering analysis on the base of Dice Coefficient for three RFLP-PCR analyses (WEPA)

Ryc. 11. Dendrogram otrzymany z wykorzystaniem metody średnich połączeń dla wszystkich analiz RFLP-PCR

CONCLUSION

1. Classical identification method allow to identification only 3 strains of *Trichoderma* to the species.
2. Non of molecular analysis did not allow to full similarity between the isolates, and comparison to collection strain.

ACKNOWLEDGEMENTS

Authors thank prof. dr hab. Małgorzata Narkiewicz-Jodko for morphologically reexamining the identity of some of the strains used.

REFERENCES

- Arisan-Atac I., Heidenreich E., Kubicek C.P., 1995. Randomly amplified polymorphic DNA fingerprinting indentifies subgroups of *Trichoderma viride* and other *Trichoderma* sp. capable of chestnut blight biocontrol. FEMS Microbiology Letters, 126, 249–256 .
- Barszczewski W., Robak M., 2004. Differentiation of contaminating yeasts in brewery by PCR-based techniques. Food Microbiology, 21, 227–231.
- Chet I., Benhamou N., Haran S., 1998, [in:] *Trichoderma* and *Gliocladium*, Harman G.E., Kubicek C.E. (eds.), London: Taylor and Francis, vol. 2, 153–171.
- Chet I., 1987 (ed.). Innovative Approaches to Plant Disease Control. New York: Wiley, 137–160 .
- Druzhinina I., Kubicek C., 2005. Species concepts and biodiversity in *Trichoderma* and *Hypocrea*: from aggregate species to species clusters? Univ SCI 6B(2), 100–112 .
- Druzhinina I., Kopchinsky A., Kubicek C., 2006. The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. Mycoscience, 47, 55–64.
- Elad Y., Chet I., Henis Y., 1982. Can. J. Microbiol., 28, 719–725.
- Hermosa R., Keck E., Chamorro I., Sanz L., Vinzaino J., Grondona I., Monte E., 2004. Genetic diversity shown in *Trichoderma* biocontrol isolates. Mycol. Res., 108(8), 897–906.
- Hjeljord L., Tronsmo A., 1998, [in:] *Trichoderma* and *Gliocladium*, Harman G.E., Kubicek C.E. (eds.), London: Taylor and Francis, vol. 2, 129–151.
- Kullnig C., Szakas G., Kubicek C.P., 2000. Molecular identification of *Trichoderma* species from Russia, Siberia and Himalaya. Mycol. Res., 104(9), 1117–1125.
- Kwon O.S., Lee J.Y., 1996. Fast Genetic Variation among Coliphage Quasispecies Revealed by a Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). Analysis Journal Microbiology, 166–171.
- Lorito M., 1998, [in:] *Trichoderma* and *Gliocladium*, Harman G.E., Kubicek C.E. (eds.), London: Taylor and Francis, vol. 2, 73–99.
- Lubeck M., Pulsen S., Lubeck P., Jensen P., Thrane U., 2000. Identification of *Trichoderma* strains from building materials by ITS1, UP-PCR fingerprinting and UP-PCR cross hybridization. Microbiology Letters, 185, 129–134 .
- Maj A., Witkowska D., Robak M., 2002. Biosynthesis and properties of beta-1,3-glucanases of *Trichoderma hamatum*. Electronic Journal of Polich Agricultural Universities, 5.
- Markovich N.A., Kononova G.L., 2003. Lytic Enzymes of *Trichoderma* and Their Role in Plant Defense from Fungal Diseases: A Review. Applied Biochemistry and Microbiology, 39, 4, 341–351.
- Nei M., Li W-H., 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 5269–5273.

- Papavizas G.C., 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, Ecology and Potential for Biocontrol. Ann. Rev. Phytopathol., 23, 23–54.
- Peberdy J.F., 1990. Biochemistry of Cell Walls and Membranes. [in:] Fungi. Kuh, P.J., Trinci A.P.J., Jung M.J., Goosey M.W., Copping L.G. (eds.), Heidelberg: Springer, 5–24.
- Piegza M., Barszczewski W., Witkowska D., Stempniewicz R., Robak M., 2006. Scanning of *Geotrichum candidum* genome by RFLP-PCR of rDNA and RAPD. EJPAU Biotechnology, 9, 3.
- Singh J., Faull J.L., 1990. [in:] Biocontrol of Plant Pathogens, Mukerji K.G., Garg K.L. (eds.), Boca Raton: CRC, 167–179.
- Sivan A., Chet I., 1989. Degradation of fungal cell walls by lytic enzymes of *Trichoderma harzianum*. J. Gen. Microbiol., 135, 3, 675–682.
- Turner D., Kovacs W., Kuhls K., Lieckfeldt E., Peter B., Arisan-Atac I., Strauss J., Samuels G.J., Borner T., Kubicek C.P., 1997. Biogeography and phenotypic variation in *Trichoderma* sect. Longibranchiatum and associated Hypocrea species. Mycol. Res., 101(4), 449–459.
- Walczak E., Czaplinska A., Barszczewski W., Wilgosz M., Wojtatowicz M., Robak M., 2007. RAPD with microsatellite as a tool for differentiation of *Candida* genus yeasts isolated in brewing. Food Microbiology 24, 305–312.
- Wessels J.G.H., 1986. Cell wall synthesis in apical hyphal growth. Int. Rev. Cytol., 104, 37–79.
- Witkowska D., Stempniewicz R., Maj A., 1999. Lytic enzymes of *Trichoderma* and its utilization in yeast protoplast formation Polish. Journal of Food and Nutrition Science, 8/49, 2, 245–252.
- Welsh J., McClelland M., 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Res, 18.

WYKORZYSTANIE I PORÓWNANIE MOLEKULARNYCH I KLASYCZNYCH METOD DO IDENTYFIKACJI PLEŚNI IZOLOWANYCH Z GLEBY

Streszczenie. W prezentowanej pracy skupiono się na porównaniu metod identyfikacji mikroorganizmów, w tym przypadku podobieństwa pomiędzy szczepami, z wykorzystaniem klasycznych metod płytkowo-mikroskopowej i molekularnej. Obie metody zastosowano, opierając się na założeniu potwierdzonym w ostatnim czasie wskazującym na znaczne zróżnicowanie w obrębie rodzaju *Trichoderma*, utrudniającym dokładną morfologiczną identyfikację. Obecnie kładzie się również silny nacisk na molekularną identyfikację gatunków. Porównanie metod klasycznej i molekularnej oparto na zastosowaniu typowych wyznaczników makro- i mikroskopowych oraz molekularnych RAPD i RTLP-PCR. Wyniki wskazały, iż żadna z zastosowanych metod nie jest do końca adekwatna, jednak dokładniejsze wyniki uzyskano, stosując metodę wykorzystującą techniki molekularne. Niestety, nie zaobserwowano powiązania pomiędzy RAPD i RFLP, a ich zderzenie wręcz komplikowało interpretację wyników. Eliminacją tych problemów może być zastosowanie innych markerów molekularnych

Słowa kluczowe: pleśnie, *Trichoderma* sp., RAPD, RFLP, metody molekularne

Accepted for print – Zaakceptowano do druku: 15.12.2010

For citation – Do cytowania: Peigza M., 2010. Use and comparison of molecular and classical methods for the identification of moulds isolated from the soil. Acta Sci. Pol. Biotechnol., 9(4), 3–16.

WYKORZYSTANIE NIEKOMERCYJNYCH ENZYMÓW PROTEOLITYCZNYCH DO HYDROLIZY BIAŁEK JAJA*

Marta Pokora, Marek Szoltyśnik, Anna Dąbrowska,
Józefa Chrzanowska, Tadeusz Trziszka

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Streszczenie. Przedmiotem badań był preparat owoalbuminowy stanowiący produkt uboczny uzyskiwany podczas wydzielania lizozymu i cystatyny z białka jaja kurzego, które poddano hydrolizie enzymatycznej. Początkowo oceniono podatność tego białka na działanie handlowych preparatów proteinaz: termolizyny, pronazy i neutrazy oraz enzymów proteolitycznych pozyskanych z dyni figolistnej (*Cucurbita ficifolia*) oraz z drożdży *Y. lipolytica*: serynowej i aspartylowej proteinazy. Do dalszej hydrolizy wykorzystano trzy ostatnie enzymy. Rozkład białka śledzono podczas 24-godzinnej inkubacji enzymu z substratem, oznaczając stopień jego hydrolizy i przyrost wolnych grup aminowych, a także prowadząc rozdział chromatograficzny metodą RP-HPLC. Stwierdzono, że najgłębszą degradację preparatu owoalbuminowego na poziomie 45% uzyskano pod wpływem proteinazy serynowej z dyni. Wyraźnie niższą aktywność wobec tego białka przejawiały obydwie proteinazy drożdżowe. Profile peptydowe RP-HPLC uzyskanych hydrolizatów potwierdziły różnice w podatności preparatu owoalbuminy na działanie testowanych enzymów proteolitycznych.

Słowa kluczowe: preparat owoalbuminy, produkt uboczny, hydroliza, proteinazy, *Cucurbita ficifolia*, *Yarrowia lipolytica*

WSTĘP

Znaczenie hydrolizy białek w produkcji żywności wynika nie tylko z możliwości poprawy ich właściwości funkcjonalnych (wodochłonność, zdolność żelowania czy stabilizowania emulsji), ale także z właściwości odżywczych. Hydrolizaty białek pokarmowych stanowiące mieszaninę peptydów o zróżnicowanej masie cząsteczkowej oraz wolnych

* Wykonano w ramach realizacji projektu nr POIG.01.03.01-00-133/08 pt. Innowacyjne technologie produkcji biopreparatów na bazie nowej generacji jaj (OVOCURA). Projekt współfinansowany ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego realizowany w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka 2007–2013.

Adres do korespondencji – Corresponding author: Marek Szoltyśnik, Wydział Nauk o Żywności, Katedra Technologii Surowców Zwierzęcych i Zarządzania Jakością, ul. C.K. Norwida 25/27, 50-375 Wrocław, e-mail: marek.szoltyśnik@up.wroc.pl

aminokwasów są łatwiej przyswajane przez organizm niż natywne białka. Dlatego są one szeroko wykorzystywane w produkcji suplementów diety oraz środków spożywczych specjalnego przeznaczenia żywieniowego [Clemente 2000, Yujie i in. 2006].

W praktyce przemysłowej prowadzi się głównie hydrolizę enzymatyczną białek. Jej zaletą, w porównaniu z hydrolizą kwasową czy zasadową, jest niski koszt wynikający z możliwości prowadzenia jej w normalnych warunkach. Procesy katalizowane przez enzymy są ponadto wysoce specyficzne i ich przebieg można w pełni kontrolować. Daje to możliwość otrzymywania hydrolizatów białkowych o określonych stopniu hydrolizy i składzie peptydów, charakteryzujących się wysoką aktywnością biologiczną i jakością żywieniową [Darewicz i in. 2000]. Do hydrolizy białek wykorzystywane są najczęściej komercyjne preparaty enzymów proteolitycznych, zarówno pochodzenia zwierzęcego (pepsyna, trypsyna, chymotrypsyna, pankreatyna), roślinnego (papaina, ficyna, bromelaina), jak i mikrobiologicznego (Alcalase, Neutrase, Protamex™) [Darewicz i in. 2000, Gastaldi i in. 2003, Tunçtürk i Zorba 2006, Hui 2007]. Zastosowanie niekonwencjonalnych enzymów, pozyskiwanych z tańszych źródeł może natomiast prowadzić do otrzymania hydrolizatów o atrakcyjnych właściwościach, przy jednoczesnej redukcji kosztów produkcji tych preparatów.

Celem podjętych badań była ocena przydatności niekomercyjnych enzymów proteolitycznych otrzymanych z drożdży *Yarrowia lipolytica* i z dyni figolistnej *Cucurbita ficifolia* do hydrolizy preparatu owoalbuminy, będącego produktem ubocznym przy pozyskiwaniu lizozymu i cystatyny z białka jaja.

MATERIAŁ I METODY

Enzymy. Do badań wykorzystano preparaty handlowe enzymów proteolitycznych: Thermolysin (Sigma), Neutrase (Sigma) i Pronase (Sigma) oraz niekomercyjne preparaty, które otrzymywano w Katedrze Technologii Surowców Zwierzęcych i Zarządzania Jakością. Preparat proteinazy serynowej z dyni figolistnej *Cucurbita ficifolia* uzyskiwano zgodnie z metodologią proponowaną przez Dryjanskiego i in. [1990]. Preparat serynowej i aspartylowej proteinazy z *Yarrowia lipolytica* otrzymywano z hodowli wgłębnych drożdży prowadzonych na podłożu mineralno-organicznym o pH odpowiednio zasadowym i kwaśnym [Szołtysik i in. 2008].

Substraty. Do degradacji wykorzystywano preparat owoalbuminy stanowiący produkt uboczny procesu pozyskiwania lizozymu i cystatyny z białka jaja metodą etanolową [Sokołowska i in. 2007]. Jako standardowe substraty wykorzystano również kazeinę (BDH, Ltd. England) oraz hemoglobinę wypreparowaną z krwi bydlęcej w Zakładzie Enzymologii IBBM Uniwersytetu Wrocławskiego.

Oznaczanie zawartości białka. Zawartość białka oznaczano za pomocą metody Lowry i in. [1951].

Oznaczanie aktywności enzymów. Aktywność proteolityczną proteinaz serynowych oraz metaloproteinazy (termolizyny) oznaczano wobec kazeiny i owoalbuminy w pH 7,5, natomiast proteinazy aspartylowej wobec hemoglobiny i owoalbuminy w pH 3,0. Hydrolizę 1% roztworów substratów prowadzono w temp. 37°C przez 1 godz. Reakcję przerywano 5% kwasem trichlorooctowym (TCA). W supernatantach uzyskanych po odwirowaniu osadu niestrawionego białka (10 min, 5500 obr./min) dokonano pomiaru

absorbancji na spektrofotometrze Thermo Electron Evolution przy 280 nm. Za jednostkę aktywności enzymatycznej przyjęto taką ilość enzymu, która w opisanych warunkach testu daje przyrost ekstynkcji $\Delta E = 0,1$ [Chrzanowska i Kołaczkowska 1998].

Przebieg hydrolizy preparatu owoalbuminy. Hydrolizę enzymatyczną 1% roztworu białka prowadzono w temp. 37°C przez 24 godz. przy udziale proteiny z dyni figolistnej (50 U/mg) i serynowej proteiny z drożdży *Y. lipolytica* (150 U/mg) w 0,1 M buforze Tris -HCl o pH 8,0 oraz przy udziale proteiny aspartylowej (150 U/mg) w 0,1 M buforze glicyna-HCl o pH 3,0. Przebieg hydrolizy kontrolowano przez wyznaczenie stopnia hydrolizy, określenie przyrostu wolnych grup aminowych oraz rozdział hydrolizatów metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej w układzie odwróconych faz (RP-HPLC).

Stopień hydrolizy (DH) białka wyznaczono na podstawie oznaczenia stężenia peptydów rozpuszczalnych w 5% TCA według metody Spellman i in. [2003].

Zawartość wolnych grup aminowych oznaczono, stosując zmodyfikowaną metody Kuchroo i in. [1983].

Chromatografia cieczowa w układzie odwróconych faz (RP-HPLC). Profile peptydowe hydrolizatów enzymatycznych preparatu owoalbuminowego wyznaczano metodą RP-HPLC. Rozdział dokonano z wykorzystaniem kolumny Zorbax XDB-C₁₈ Agilent (250x4,5 mm). Kolumnę równoważono 0,1% TFA, po czym nanoszono próbę hydrolizatu zawieszono w fazie A (0,1% TFA w H₂O). Rozdział prowadzono przy przepływie 1 ml/min, w temp. 30°C. Zaadsorbowane peptydy zwalniano w gradiencie (0–100%) fazy B (0,1% TFA w acetonitrylu). Pomiaru absorbancji dokonywano przy długości fali $\lambda=230$.

WYNIKI I DISKUSJA

W pracy podjęto badania nad wykorzystaniem preparatu owoalbuminy jako substratu w procesie hydrolizy enzymatycznej. Preparat ten stanowi produkt uboczny powstający w czasie izolacji lizozymu i cystatyny z białka jaja metodą etanolową według Sokołowskiej i in. [2007]. Ze względu na częściową denaturację podczas precypitacji etanolem preparat ten nie wykazuje atrakcyjnych pod względem technologicznym właściwości funkcjonalnych [Graszkiewicz i in. 2010]. Hydroliza enzymatyczna może więc być atrakcyjniejszą metodą jego zagospodarowania [Cigić i Zelenik-Blatnik 2004].

Rozpoczynając badania, określono poziom aktywności handlowych preparatów enzymów proteolitycznych: termolizyny, neutrazy i pronazy oraz niekomercyjnych preparatów: proteiny serynowej wydzielonej z dyni figolistnej oraz dwóch proteinaz z drożdży *Y. lipolytica*: serynowej i aspartylowej wobec preparatu owoalbuminy oraz standardowego substratu, za jaki uznano kazeinę lub hemoglobinę przy oznaczaniu aktywności aspartylowej proteiny. Uzyskane wyniki zestawiono w tabeli 1. Spośród testowanych handlowych enzymów najwyższą aktywność zarówno wobec kazeiny, jak i preparatu owoalbuminy wykazała proteina z *Bacillus amyloliquefaciens* – neutraza, która osiągała wartości odpowiednio 8 625,7 i 6 214,4 U/mg. Natomiast spośród niekomercyjnych preparatów najbardziej aktywna była serynowa proteina z dyni figolistnej, której aktywność wobec kazeiny i preparatu owoalbuminy wyniosła odpowiednio 5690,8 i 5395,7 U/mg.

Tabela 1. Aktywność badanych enzymów proteolitycznych wobec kazeiny/hemoglobiny i preparatu owoalbuminy

Table 1. Activity of proteolytic enzymes against casein/hemoglobin and ovoalbumin preparation

Enzym Enzyme	Aktywność [U*mg ⁻¹] Activity	
	kazeina/hemoglobina casein/hemoglobin	preparat owoalbuminy ovoalbumin precipitate
Termolizyna (<i>Bacillus thermoproteolyticus</i>)	4952,3	5167,9
Neutraza (<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>)	8625,7	6214,4
Pronaza (<i>Streptomyces griseus</i>)	2677,0	1938,3
Proteinaza serynowa z dyni figolistnej	5690,8	5395,7
Proteinaza serynowa <i>Yarrowia lipolytica</i>	713,4	350,2
Proteinaza aspartylowa <i>Yarrowia lipolytica</i>	766,7	392,1

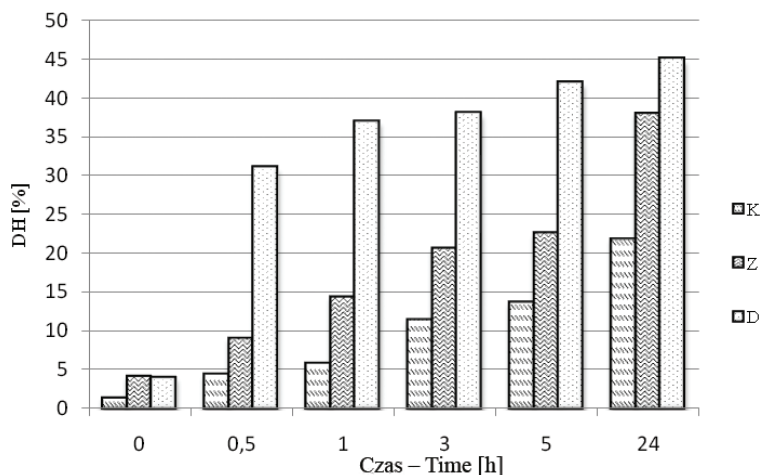
Niższa aktywność tych proteinaz wobec owoalbuminy w porównaniu z kazeiną, podobnie jak i obydwu proteinaz drożdżowych oraz pronazy, wynika prawdopodobnie ze zmian w strukturze tego białka zachodzących podczas precypitacji, co powoduje, że jest ono trudniejszym substratem dla tych enzymów.

Proteinazy drożdżowe w porównaniu z pozostałymi testowanymi enzymami przejawiały kilkukrotnie niższe poziomy aktywności wobec użytych w badaniach substratów.

W dalszych badaniach do hydrolizy preparatu owoalbuminowego wykorzystano enzymy pochodzące z niekonwencjonalnych źródeł – proteinazę serynową z dyni figolistnej oraz proteinazy z drożdży *Y. lipolytica*: serynową i aspartylową.

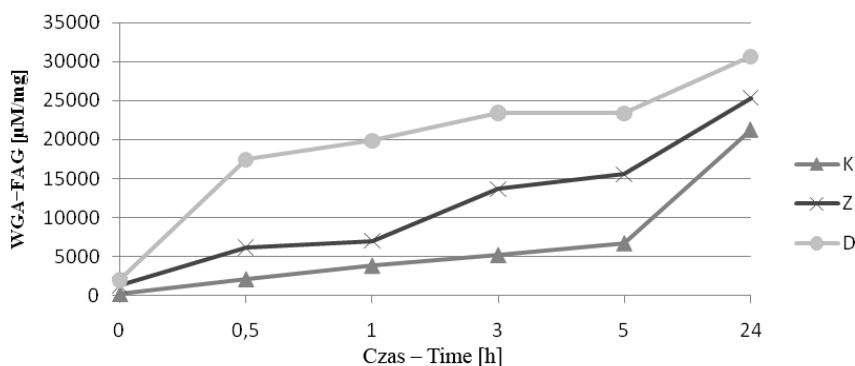
Podatność owoalbuminy na działanie tych enzymów oceniano, prowadząc 24-godziną hydrolizę tego białka. Przy udziale proteinaz serynowej z *Y. lipolytica* i z dyni figolistnej proces ten prowadzono – w pH zasadowym (8,0), natomiast przy udziale drożdżowej proteinazy aspartylowej w pH kwaśnym (3,0). Przebieg degradacji białka śledzono ilościowo poprzez oznaczenie stopnia hydrolizy (DH) i przyrostu wolnych grup aminowych, a uzyskane wyniki przedstawiono na rysunkach 1 i 2. Stopień hydrolizy określa w sposób bezpośredni poziom degradacji białka. Wywiera on istotny wpływ na fizykochemiczne i biologiczne właściwości otrzymywanych hydrolizatów białkowych [Li i in. 2007]. Poziom hydrolizy preparatu owoalbuminy był zróżnicowany w zależności od czasu trwania reakcji i rodzaju enzymu. Najwyższy stopień hydrolizy wykazano w próbach, do których wprowadzono serynową proteinazę pozyskaną z dyni figolistnej. Po 24 godzinach inkubacji wynosił on 45%. Na wysoką aktywność proteolityczną tego enzymu wskazywali w swych badaniach Curotto i in. [1989] oraz Dryjanski i in. [1990], którzy testowali go wobec azokolagenu i kazeiny jako substratów. Degradacja owoalbuminy prowadzona przy udziale zewnątrzkomórkowej proteinazy serynowej pozyskanej z drożdży *Y. lipolytica* przyczyniła się do uzyskania po 24 godzinach DH niższego o ok. 7%. Najniższy stopień hydrolizy owoalbuminy wykazano w próbach, do których wprowadzono pozakomórkową aspartylową proteinazę wydzieloną z drożdży *Y. lipolytica*. W hydrolizacie uzyskanym po 24 godz. działania tego enzymu udział drobnocząsteczkowej frakcji związków azotowych rozpuszczalnych w 5% TCA wynosił 21,84%. Uzdolnienia proteolityczne

zewnątrzkomórkowych proteinaz drożdży *Y. lipolytica* były wcześniej oceniane wobec białek mleka, które okazały się substratami bardzo podatnymi na ich działanie [Gdula i in. 2002, Czajgucka i in. 2003]. Obserwując dynamikę procesu degradacji badanego preparatu owoalbuminowego, stwierdzono, że bardzo intensywnie, zwłaszcza w pierwszej godzinie, przebiegał on przy udziale proteinazy z dyni figolistnej. Zastosowanie proteinaz drożdżowych skutkowało stałą szybkością rozkładu białka w czasie prowadzenia reakcji hydrolizy.



Rys. 1. Stopień hydrolizy (DH%) preparatu owoalbuminy degradowanego: proteinazą serynową z dyni figolistnej (D), proteinazą serynową (Z) i proteinazą aspartyłową (K) z drożdży *Y. lipolytica*

Fig. 1. Degree of hydrolysis (DH%) of ovoalbumin by serine proteinase from *Cucurbita ficifolia* (D), serine proteinase (Z) and aspartic proteinase from *Y. lipolytica*

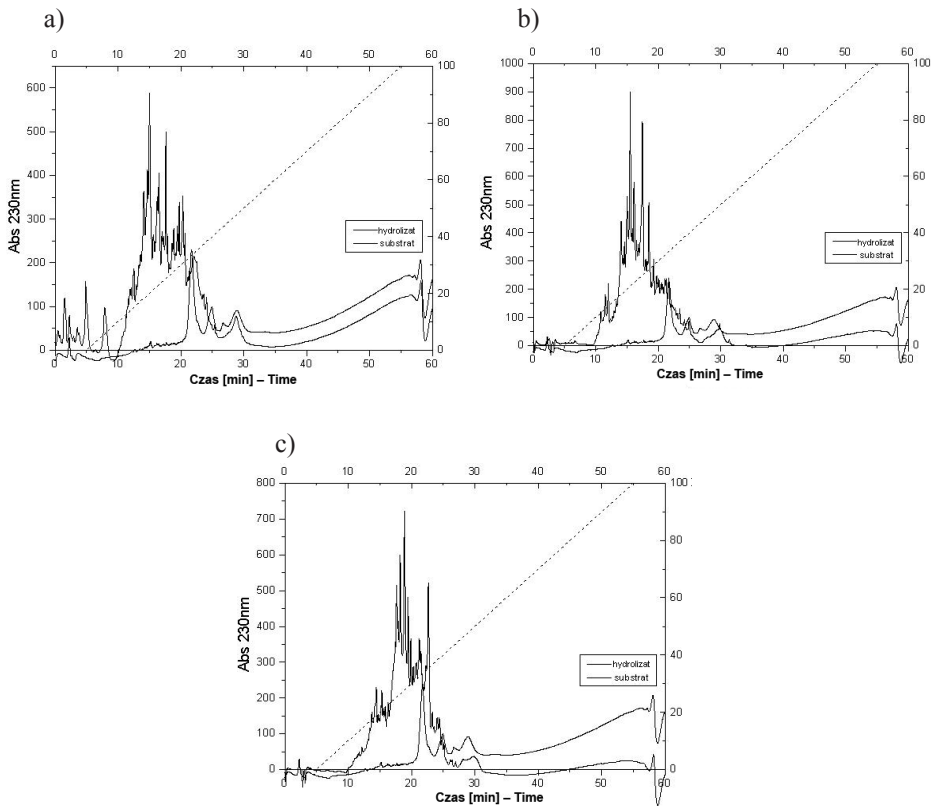


Rys. 2. Zmiany zawartości wolnych grup aminowych (WGA) podczas hydrolizy preparatu owoalbuminy: proteinazą serynową z dyni figolistnej (D), proteinazą serynową (Z) i proteinazą aspartyłową (K) z drożdży *Y. lipolytica*

Fig. 2. Changes in free amino groups contents (FAG) during hydrolysis of ovoalbumin by serine proteinase from *Cucurbita ficifolia* (D), serine proteinase (Z) and aspartic proteinase from *Y. lipolytica*

Analiza stężenia wolnych grup aminowych wykazała najwyższy ich poziom sięgający 30 639 $\mu\text{M Gly/g}$ w 24-godzinny hydrolyzacie otrzymany z udziałem enzymu pochodzenia roślinnego. Wprowadzenie proteinaz pochodzenia drożdżowego przyczyniło się do wolniejszego rozkładu białka. Zawartość grup aminowych uwolnionych po degradacji owoalbuminy prowadzonej z udziałem proteiny serynowej z *Y. lipolytica* ostatecznie wynosiła po całodobowym procesie 25 349 $\mu\text{M Gly/g}$, podczas gdy z dodatkiem proteiny aspartylowej była niższy o ponad 4 000 $\mu\text{M Gly/g}$.

Różnice w podatności owoalbuminy z jaja kurzego na działanie trzech testowanych enzymów określono również na podstawie rozdzielów chromatograficznych (RP-HPLC) frakcji peptydowej, a uzyskane profile przedstawiono na rysunku 3.



Rys. 3. Profile peptydowe hydrolyzatów (RP-HPLC) preparatu owoalbuminy otrzymanych przy wykorzystaniu proteiny serynowej z dyni figolistnej (a), proteiny serynowej (b) i proteiny aspartylowej (c) z drożdży *Y. lipolytica*

Fig. 3. Peptide profiles of owoalbumin hydrolysates (RP-HPLC) prepared with serine proteinase from *Cucurbita ficifolia* (a), serine proteinase (b) and aspartic (c) proteinase from *Y. lipolytica*

Podczas inkubacji enzymu z substratem we wszystkich analizowanych próbach zaobserwowano obecność nowych niskocząsteczkowych produktów degradacji białka, zróżnicowanych pod względem hydrofobowości, nieobecnych w próbie kontrolnej.

Największą liczbę uzyskanych frakcji peptydowych wykazano w hydrolizatach, do których wprowadzono dyniową proteinazę. W próbach tych zaobserwowano również pojawienie się szczytów przy krótkich czasach retencji (do 10 min), nieobecnych w preparatach białka hydrolizowanego z udziałem enzymów pochodzenia drożdżowego.

WNIOSKI

1. Preparat owoalbuminy, jako substrat do otrzymania hydrolizatów o potencjalnie większym wykorzystaniu w przetwórstwie żywności, charakteryzował się zróżnicowaną podatnością na działanie proteinaz komercyjnych i pozyskanych z niekonwencjonalnych źródeł – z dyni figolistnej oraz drożdży *Y. lipolytica*.

2. Spośród testowanych niekomercyjnych enzymów serynowa proteinaza z dyni w największym stopniu degradowała preparat owoalbuminowy, powodując po 24 godzinach hydrolizy rozkład tego białka w 45%.

3. Profile peptydowe RP-HPLC uzyskanych hydrolizatów potwierdziły różnice w swoistości działania testowanych enzymów proteolitycznych na preparat owoalbuminowy.

PIŚMIENNICTWO

- Chrzanowska J., Kołaczowska M., 1998. Production of extracellular proteolytic enzymes by *Beauveria bassiana*. *Acta Mycol.*, 33, 277–285.
- Cigić B., Zelenik-Blatnik M., 2004. Preparation and characterization of chicken egg white hydrolysate. *Acta Chim. Slov.*, 51, 177–188.
- Clemente A., 2000. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. *Trends Food Sci. Technol.*, 11(7), 254–262.
- Curotto E., Gonzáles G., O'Reilly S., Tapia G., 1989. Isolation and partial characterization of protease from *Cucurbita ficifolia*. *Elsevier Sci. Pub. B.V.*, 243(2), 363–365.
- Czajgucka A., Chrzanowska J., Juszczyk P., Szołtysik M., Wojtatowicz M., 2003. Aktywność proteolityczna szczepów drożdży pochodzących z serów rokopól. *Acta Sci. Pol. Biotechnol.*, 2(1–2), 73–81.
- Darewicz M., Dziuba J., Caessens P.W.J.R., 2000. Effect of enzymatic hydrolysis on the emulsifying and foaming properties of milk proteins – a review. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 9(1), 3–8.
- Dryjanski M., Otlewski J., Polanowski A., Wilusz T., 1990. Serine proteinase from *Cucurbita ficifolia* seed; purification, properties, substrate specificity and action on native squash trypsin inhibitor (CMTI I). *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*, 371, 889–895.
- Gastaldi E., Trial N., Guillaume C., Bourret E., Gontard N., Cuq J.L., 2003. Effect of Controlled κ -Casein Hydrolysis on Rheological Properties of Acid Milk Gels. *J. Dairy Sci.*, 86(3), 704–711.
- Gdula A., Chrzanowska J., Kieźel X., Szołtysik M., Wojtatowicz M., 2002. Factors affecting hydrolytic enzymes production by *Yarrowia lipolytica*. *Acta Sci. Pol. Biotechnol.*, 1(1–2), 81–88.
- Graszkiewicz A., Żelazko M., Trziszka T., 2010. Application of pancreatic enzymes in hydrolysis of egg-white proteins. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 60(1), 57–61.
- Kuchroo C. N., Rahilly J., Fox P. F. 1983. Assesment of proteolysis in cheese by reaction with trinitrobenzene sulphonc acid. *Irish J. Food Sci. Technol.*, 7, 129–133.

- Li B., Chen F., Wang X., Ji B., Wu Y., 2007. Isolation and identification of antioxidative peptides from porcine collagen hydrolysate by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. *Food Chem.*, 102, 1135–1143.
- Lowry O.H., Rosebrough N. J., Farr A.L., Randal R.J., 1951. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265–275.
- Sokołowska A., Kubiak A., Trziszka T., Polanowski A., 2007. **Rapid one step separation of proteinaceous agents of antimicrobial activity from hen's egg white.** *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 57, 499–502.
- Spellman D., McEvoy E., O'Cuinn G., FitzGerald R.J., 2003. Proteinase and exopeptidase hydrolysis of whey protein: comparison of the TNBS, OPA and pH stat methods for quantification of degree of hydrolysis. *Int. Dairy J.*, 13(6), 447–453.
- Szołtyśnik M., Chrzanowska J., Żelazko M., Niedbalska J., Połomska X., Juszczak P., Wojtatowicz M., 2008. Produkcja pozakomórkowych hydrolaz przez szczepy *Yarrowia lipolytica* pochodzące z sera. *Acta Sci. Pol. Biotechnol.*, 7(4), 23–34.
- Tunçtürk Y., Zorba Ö., 2006. The effects of enzymatic hydrolysis of casein on apparent yield stress and some emulsion properties. *Food Hydrocoll.*, 20(4), 475–482.
- Yujie C., Bo T., Bo S., Mingruo G., 2006. Enzymatic hydrolysis conditions for egg white proteins. *Bull. Facul. Agric. Niigata Unive.*, 58(2), 143–146.

APPLICATION OF NONCOMMERCIAL PROTEOLYTIC ENZYMES IN HYDROLYSIS OF EGG-WHITE PROTEINS

Abstract. Ovoalbumine preparation obtained as by-product during isolation of lysozyme and cystatin from egg white was used as substrate for proteolytic enzymes. The protein was degraded by plant serine proteinase isolated from *Cucurbita ficifolia* and by two yeast proteinases: aspartic and serine isolated from *Yarrowia lipolytica*. Degradation process was monitored by determination of the hydrolysis degree and the increase of free amino groups concentration. The obtained hydrolysates were also fractioned by RP-HPLC. It was shown that the highest degree of hydrolysis (45%) of ovoalbumin preparation was achieved with plant proteinase. Peptide profiles of the protein hydrolysates confirmed differences in specificity of tested proteinases against ovoalbumin preparation.

Key words: ovoalbumine preparation, by-product, hydrolysis, proteinases, *Cucurbita ficifolia*, *Yarrowia lipolytica*

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 15.12.2010

Do cytowania – For citation: Pokora M., Szołtyśnik M., Dąbrowska A., Chrzanowska J., Trziszka T., 2010. Wykorzystanie niekomercyjnych enzymów proteolitycznych do hydrolizy białek jaja. *Acta Sci. Pol. Biotechnol.*, 9(4), 17–24.

ANALIZA MIKROFLORY REGIONALNYCH SERÓW GOŁKA*

Anna Sip, Agnieszka Olejnik-Schmidt,
Michał Więckowicz, Włodzimierz Grajek

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Streszczenie. Celem pracy było zbadanie stanu mikrobiologicznego wędzonych serów regionalnych gołka wywarzanych z niepasteryzowanego mleka owczo-krowiego w rejonie Karpat oraz dokonanie wstępnej identyfikacji występujących w nich bakterii fermentacji mlekowej. Stan mikrobiologiczny gołek określano na podstawie wyników oznaczeń liczebności tlenowych bakterii mezofilnych, bakterii fermentacji mlekowej (LAB), *Staphylococcus aureus* oraz drożdży i pleśni. W gołkach badano też obecność bakterii *Salmonella* i *Listeria*. Liczebność poszczególnych grup drobnoustrojów oznaczano metodą posiewową, a obecność bakterii będących wskaźnikiem bezpieczeństwa mikrobiologicznego wykrywano metodą ELFA. Skład rodzajowy LAB gołek określano na podstawie wyników analizy metagenomowej. Analizę tę prowadzono metodą PCR z zastosowaniem specyficznych rodzajowo starterów. Dominujące LAB identyfikowano ponadto na poziomie gatunku metodą PCR-RFLP i sekwencjonowania. Przeprowadzone badania wykazały, że mikroflora gołek wytwarzanych przez różnych producentów miała zbliżony skład ilościowy. Najbardziej liczna była w niej populacja kwasolubnych LAB. W badanych gołkach było ich średnio $6,9 \times 10^9$ jtk \cdot g⁻¹. We wszystkich gołkach znajdowało się też od $1,2 \times 10^6$ do $1,6 \times 10^7$ jtk \cdot g⁻¹ drożdży. W żadnej gołce nie wykryto obecności bakterii *Salmonella*, *Listeria*, enterotoksycznych *S. aureus* oraz pleśni. W gołkach występowały natomiast LAB z rodzaju *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus* i *Leuconostoc*. Wśród 166 szczepów LAB wyizolowanych z gołek dominowały bakterie *Lb. casei*.

Słowa kluczowe: gołka, sery regionalne, bakterie fermentacji mlekowej, analiza metagenomowa, identyfikacja, PCR-RFLP

* Praca finansowana z grantu MNiSW nr N N312 204435 (2044/B/P01/2008/35)

Adres do korespondencji – Corresponding author: Anna Sip, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, ul. Wojska Polskiego 48, 60-627 Poznań, e-mail, aniasip@up.poznan.pl

WSTĘP

Żywność regionalna z uwagi na tradycyjny sposób produkcji oraz unikalne właściwości cieszy się w ostatnich latach coraz większym zainteresowaniem, nawet wśród bardzo wymagających konsumentów. Większość z nich produkty regionalne kojarzy bowiem z produktami zdrowymi i naturalnymi [Gąsiorowski 2005].

Do najbardziej znanych w Europie produktów regionalnych należą włoska szynka parmeńska (Culatello di Libello), hiszpańska szynka Jamon Iberico de Bellota, czereśnie z Lari, a także sery z Lancashire w północno-zachodniej Anglii i francuski ser Roquefort. W Polsce bardzo popularnymi produktami regionalnymi są sery wytwarzane na terenie Karpat. Jednym z nich jest gołka, nazywana też pucokiem lub karą. Pierwotnie była ona wytwarzana z mleka krowiego jedynie w okresie jesienno-zimowym i stanowiła alternatywę dla nieprodukowanych w tym okresie serów owczych. Obecnie gołka jest produkowana i sprzedawana na lokalnych bazarach przez cały rok. Coraz częściej do jej produkcji jest wykorzystywane także mleko mieszane (owczo-krowie). Gołka, podobnie jak oscypek, należy do serów podpuszczkowych dojrzewających produkowanych z masy parzonej. Jest ona wytwarzana z niepasteryzowanego mleka na drodze spontanicznych fermentacji [Furczoń i in. 2007]. W fermentacjach tych biorą udział mikroorganizmy obecne w surowcu oraz pochodzące z całego otoczenia produkcyjnego. Wiele z nich reprezentuje więc mikroflorę specyficzną dla tego środowiska. Z uwagi na jej unikalny charakter wytwarzanie gołek o analogicznych właściwościach w innych rejonach geograficznych jest niemożliwe.

Z danych literaturowych wynika, że najważniejszymi mikroorganizmami biorącymi udział w procesie fermentacji większości serów regionalnych są bakterie fermentacji mlekowej (LAB) [Beresford i in. 2001, Wołoszek i Bonczar 2002, Hutkins 2006, Settanni i Moschetti 2010]. Bakterie te mogą również odgrywać ważną rolę w kształtowaniu niepowtarzalnych właściwości sensorycznych i organoleptycznych gołek oraz decydować o ich trwałości. Drobnoustroje uczestniczące w procesie produkcji gołek nie zostały jednak jak dotąd zidentyfikowane. W literaturze brak jest również danych dotyczących składu ilościowego mikroflory tego sera. Dlatego też gołki wytwarzane w warunkach rzemieślniczych przez różnych wytwórców postanowiono poddać kompleksowym badaniom mikrobiologicznym. Ich celem było określenie stanu mikrobiologicznego gołek oraz ustalenie, jakie mikroorganizmy są ich typową mikroflorą.

MATERIAŁY I METODY

Golka

Przedmiotem badań było 9 prób gołek wędzonych wyprodukowanych z niepasteryzowanego mleka owczo-krowiego. Wytypowane do badań gołki wyprodukowano we wrześniu 2009 r. w 9 różnych bacówkach wchodzących w skład Tatrzańsko-Beskidzkiej Spółdzielni Mleczarskiej „Gazdowie” w Leśnicy. Badaniom poddawano świeżo wyprodukowane sery (sery dwudniowe). Od każdego wytwórcy pobierano po 3 sery.

Oznaczanie liczebności wybranych grup drobnoustrojów

Próby gołki o masie 10 g zawieszano w 90 ml 2% (w/v) cytrynianu trójsodowego, homogenizowano za pomocą wibracyjnego homogenizatora (Pulsifier), rozcieńczano w wodzie peptonowej metodą rozcieńczeń dziesiętnych i posiewano w co najmniej trzech powtórzeniach na płytki Petriego, które zalewano takimi pożywkami agarowymi jak: bulion wzbogacony (Biocorp) z 2% (v/v) glukozy, MRS agar (Biocorp), M17 agar (Biocorp), Raka-Ray agar (Biocorp), Baird-Parker agar z dodatkiem RPF (plazmy krwi króliczej z fibrynogenem) (Noack) oraz chloramfenikol agar (Biocorp). Podłoże bulionowe stosowano do oznaczania ogólnej liczby bakterii tlenowych; pożywkę MRS agar, M17 agar oraz Raka-Ray agar do oznaczenia liczebności bakterii fermentacji mlekowej odpowiednio, pałeczek mlekowych, paciorkowców mlekowych oraz kwasolubnych LAB; pożywkę Baird-Parker'a agar z dodatkiem RPF do oznaczania enterotoksycznych *Staphylococcus aureus*, natomiast pożywkę z chloramfenikolem – do oznaczania liczebności drożdży i pleśni. Podłoża do oznaczeń liczebności bakterii suplementowano 50 mg · l⁻¹ natamycyny (Devocid®, Gist-brocades). Wszystkie badane grupy bakterii namnażano w temperaturze 37°C przez 48–72 godz., a drożdże i pleśnie hodowano w temperaturze 20°C przez 72–96 godz. W przypadku oznaczania liczebności bakterii fermentacji mlekowej hodowlę prowadzono warunkach beztlenowych (85% N₂, 15%CO₂) wytworzonych za pomocą systemu do hodowli beztlenowych mikroorganizmów (Anaxomat). Pozostałe drobnoustroje namnażano w warunkach tlenowych. Po inkubacji liczono wyrosłe kolonie za pomocą automatycznego licznika kolonii (Colony Counter, Easy Count 2) i na tej podstawie oznaczano liczebność populacji badanych grup drobnoustrojów, którą wyrażano w jtk · g⁻¹ gołki. Wyniki otrzymanych oznaczeń poddawano następnie podstawowej obróbce statystycznej, wykorzystując program Microsoft Excel.

W 25 g gołki oznaczano także obecność bakterii *Listeria*, *Listeria monocytogenes* i *Salmonella*. Wstępne namnażanie ww. bakterii prowadzono w podłożach płynnych w sposób zgodny z normami: PN-EN ISO 11290-1:1999/A1 2005 i PN-EN ISO 6579:2003. Po namnożeniu bakterie *Listeria*, *Listeria monocytogenes* i *Salmonella* wykrywano metodą enzymoimmunofluorescencyjną (ELFA) za pomocą analizatora mini-Vidas, wykorzystując testy VIDAS *Listeria* DUO (LDUO) oraz Vidas *Salmonella* (SALM) (Biomérieux).

Izolacja meta-DNA i jego amplifikacja z wybranymi starterami

10 g próby każdego sera zawieszano w 200 ml bulionu wzbogaconego, rozdrabniano za pomocą pulsacyjnego homogenizatora (Pulsifier) i inkubowano w temperaturze 37°C przez 16 godz. Po inkubacji pobierano 2 ml homogenatu i odwirowywano (5,5 tys. g, 10 min), a następnie z osadu izolowano metagenomowe DNA. Do jego izolacji stosowano zestaw Genomic Mini (A&A BIOTECHNOLOGY). Izolację prowadzono według instrukcji podanej przez producenta. W otrzymanych próbach potwierdzano obecność DNA bakteryjnego poprzez przeprowadzenie reakcji PCR ze starterami EUBAC (tab. 1) zaprojektowanymi na podstawie analizy sekwencji genów małej podjednostki 16S rybosomu bakteryjnego. Amplifikacje prowadzono w aparacie firmy Biometra T Gradient w warunkach przedstawionych w tabeli 2. Produkty amplifikacji rozdzielano elektroforetycznie w 2% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny (0,5 µg/ml). Rozdział elektroforetyczny prowadzono w buforze TBE (1x) przy stałym natężeniu 100mA przez 60 min. W meta-DNA badano następnie obecność fragmentów DNA bakterii ferment-

tacji mlekowej z rodzajów *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* i *Weissella*. Do detekcji ich obecności stosowano startery specyficzne rodzajowo. Sekwencje starterów wykorzystywanych do wykrywania sekwencji DNA charakterystycznych dla ww. rodzajów LAB, wielkości produktów ich amplifikacji oraz warunki reakcji PCR podano w tabelach 1 i 2. Produkty PCR, w zależności od wielkości, rozdzielano następnie w 1, 2 lub 3% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny (0,5 µg/ml). W przypadku amplikonów o długości poniżej 1000 pz stosowano specjalną agarozę o wysokiej zdolności rozdziału (Merck). Elektroforezę prowadzono w buforze TBE (1x) przy stałym natężeniu 80 mA przez ok. 45 minut. Wyniki rozdziału elektroforetycznego archiwizowano za pomocą System Image Master VDS-CL (Amsterdam, Pharmacia).

Izolacja i identyfikacja bakterii fermentacji mlekowej

Po oznaczeniu liczebności LAB, z agarowego podłoża MRS i M17 izolowano zróżnicowane pod względem morfologicznym kolonie. Wyizolowane kolonie namnażano w temperaturze 30°C przez 24 h w płynnej pożywce analogicznej do podłoża agarowego. Otrzymane czyste kultury wstępnie identyfikowano, stosując metody fenotypowe. Z każdej próby sera wyprowadzono ok. 20 czystych kultur LAB. Ich biomasę odwirowywano (5,5 tys. g, 10 min) i zamrażano w temperaturze -20°C. Po rozmrożeniu izolowano z niej genomowe DNA. Izolację DNA prowadzono za pomocą gotowych zestawów Genomic Mini (A&A BIOTECHNOLOGY) według instrukcji podanej przez producenta. Genomowe DNA wykorzystywano jako matrycę do reakcji PCR, w której amplifikowano sekwencje 16S rDNA. Reakcje PCR prowadzono z wykorzystaniem starterów: S-D-Bact-0008-a-S-20, S-*-V-Univ-1492-b-A-21 (tab. 1) w warunkach przedstawionych w tabeli 2. Amplikony PCR trawiono następnie restrykcyjnie enzymami: HinPI (temp. 37°C, 30 min; inaktywacja w temp. 85°C, 10 min) oraz TaqI (temp. 65°C, 30 min). Trawienie prowadzono w buforze Fast Digest x1 (Fermentas). Produkty trawienia rozdzielano elektroforetycznie w 10% żelu poliakrylamidowym w buforze 1x TBE przy stałym natężeniu 50 mA przez 60 min, a następnie wizualizowano metodą srebrzenia.

Amplikony o zróżnicowanym profilu restrykcyjnym (nie poddawane trawieniu restrykcyjnemu o pełnej długości około 1500 pz) oczyszczano za pomocą zestawu Cleanup A&A Biotechnology, a następnie sekwencjonowano (Genomed Warszawa). Wyniki sekwencjonowania analizowano z wykorzystaniem programu VectorNTI oraz baz danych BLASTN i Ribosomal Database Project i na ich podstawie dokonywano identyfikacji wytypowanych kultur LAB.

Tabela 1. Startery zastosowane w pracy
Table 1. Primers used in this work

Starter Primer	Sekwencja (5' → 3') Sequence (5' → 3')	Wielkość produktu PCR [bp] Amplicon size [bp]	Zastosowanie Application	Literatura Reference
EUBAC-50F	AACACATGCTCGAACG	~300	bakteryjne DNA	Dawson, dane niepublikowane
EUBAC-338R	CTGCTGCCTCCCGTAGGAGT			
Carnob1F	CCGTCAGGGGATGAGCAGTTAC	820	<i>Carnobacterium</i>	Nissen i in. 1994
Carnob2R	ACATTCGAAACGGATGCTAAT			
Entgr1F	TACTGACAAACCATTTCATGATG	112	Enterococcus	Ke i in. 1999
Entgr2R	AACTTCGTCACCAACGCGAAC			
LactocgrP1F	GCGGCGTGCCTAATACATGC	319	Lactococcus	Klijn i in. 1995
LactocgrP2R	CTGCTGCCTCCCGTAGGAGT			
Lactob71R	TCAAAACTAAACAAAGTTTC	950	Lactobacillus	Moura i in. 2007
Lactob0677F	CTCCATGTGTAGCGGTG			
LeucgrpF	GCGGCTGCGGCGTCACCTAG	1200	Leuconostoc	Schillinger i in. 2008
Leucgr-WeissgrR	GGNTACCTTGTTACGACTTC			
Pediogr23SF	GAACTCGTGTACGTTGA- AAAGTGTGA	701	Pediococcus	Pfannebecker i Fröhlich 2008
Pediogr23SR	GCGTCCCTCCATTGTTCAAACA- AG			
WieissgrpF	GATGGTTCTGCTACCACTAAG	1200	Weissella	Schillinger i in. 2008
Leucgr-WeissgrR	GGNTACCTTGTTACGACTTC			
SDBac08	AGAGTTTGATCCTGGCTCAGT	~1500	16S DNA	Suau i in. 1999
Unv1492	ACGCTACCTTGTTACGACTT			

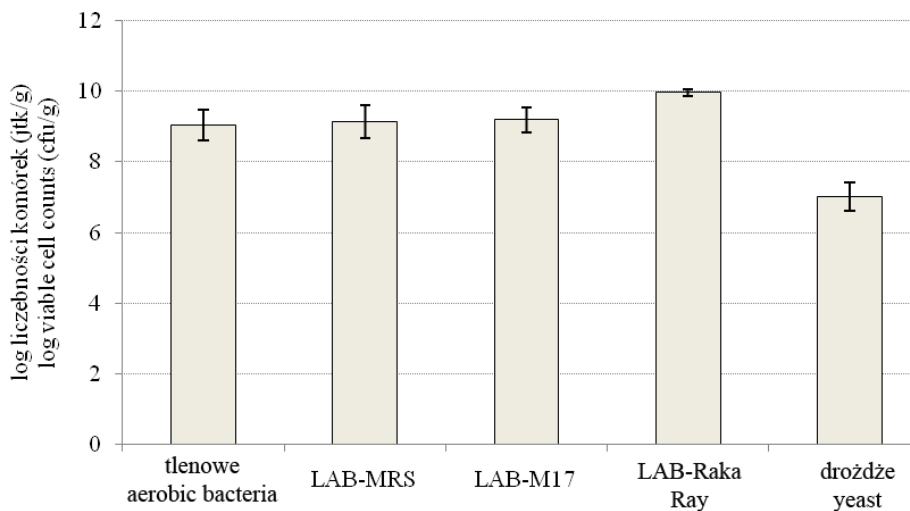
Tabela 2. Warunki reakcji PCR
Table 2. PCR conditions

Startery Primers	Temperature [°C] / czas [min] Temperature [°C] / time [min]				
	Denaturacja wstępna Initial denaturation	Denaturacja Denaturation	Przyłączenie starterów Primer annealing	Synteza Elongation	Synteza końcowa Elongation
EUBAC-50F/ EUBAC-338R	95/3	94/0,5	52/1	72/0,5	72/5
Carnob1F/Carnob2R	95/5	95/0,5	50/0,5	72/0,5	72/5
Entgr1F/Entgr2R	95/3	95/0,5	55/0,5	72/1	72/7
LactocgrP1F/LactocgrP2Rkr	95/3	94/1	55/1,5	72/2,5	72/5
Lactob0677F/Lactob71R	95/5	95/0,5	50/0,5	72/0,5	72/10
LeucgrpF/Leucgr-WeissgrR	95/3	94/3	53/1	72/1,5	72/5
Pediogr23SF/Pediogr23SR	95/5	94/0,5	69,5/0,5	72/0,5	72/5
WieissgrpF/Leucgr-WeissgrR	95/3	94/3	50/1	72/1,5	72/5
SDBac08 / Unv1492	95/5	94/1	48/1	72/1,5	72/3

WYNIKI I DYSKUSJA

Dziewięć prób gołek wytworzonych z mleka mieszanego w różnych baczówkach poddano wielokierunkowym badaniom mikrobiologicznym. W ramach ich oznaczono liczebność bakterii tlenowych, bakterii fermentacji mlekowej, enterotoksycznych *Staphylococcus aureus* oraz drożdży i pleśni. Gołki przebadano też w kierunku obecności drobnoustrojów chorobotwórczych, najczęściej spotykanych w serach, tj. *Salmonella* i *Listeria*.

Przeprowadzone badania, których wyniki przedstawiono na wykresie 1, wykazały, że skład ilościowy mikroflory gołek wytworzonych w tradycyjny sposób przez różnych producentów był zbliżony. W badanych gołkach znajdowało się średnio $6,9 \times 10^8$ jtk \cdot g⁻¹ mezofilnych bakterii tlenowych. We wszystkich gołkach występowały także drożdże. Ich liczebność była jednak przeciętnie o 2 cykle log niższa niż populacji bakterii tlenowych. W żadnej próbie gołki nie wykryto obecności pleśni. Spośród oznaczanych grup drobnoustrojów we wszystkich gołkach najbardziej liczna była populacja LAB. Do oznaczeń jej liczebności wykorzystano 3 podłoża, tj. podłoże M17 rekomendowane do oznaczeń paciorkowców mlekowych, MRS zalecane do oznaczania pałeczek mlekowych oraz Raka-Ray faworyzujące wzrost kwasolubnych LAB. Dzięki temu oznaczono liczebność LAB o zróżnicowanych wymaganiach pokarmowych i warunkach rozwoju. Ustalono, że w gołkach dominowały LAB zdolne do wzrostu na podłożu Raka-Ray. Ich liczebność wynosiła średnio 10^{10} jtk \cdot g⁻¹. Liczba LAB rosnących na podłożach M17 i MRS była odpowiednio o ok. 0,7 i 1,3 cykła log niższa. Na podstawie badań mikroskopowych (dane nieprezentowane) stwierdzono ponadto, że wśród LAB rosnących na każdym z zastosowanych podłoży dominowały pałeczki mlekowe. W żadnej próbie gołki nie wykryto natomiast obecności enterotoksycznych bakterii *S. aureus*, komórek bakterii *Salmonella* i *Listeria*, w tym chorobotwórczych *L. monocytogenes*. Na tej podstawie stwierdzono, że badane gołki były bezpieczne z mikrobiologicznego punktu widzenia.



Wykres 1. Liczebność wybranych grup mikroorganizmów w gołkach (wartości średnie ± odchylenie standardowe)

Graph 1. Cell counts of selected microorganisms in the gołka cheeses (means ± standard deviations)

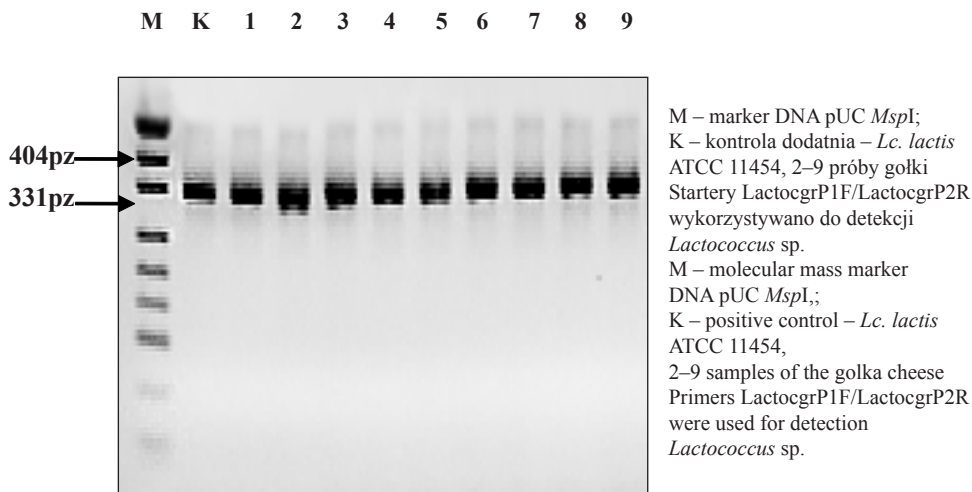
W literaturze brak jest danych dotyczących jakości mikrobiologicznej gołek. Znaleźć można w niej jedynie informacje o stanie mikrobiologicznym innego sera z masy parzonej, tj. oscypka. Z badań przeprowadzonych przez Wołoszek i Bonczar [2003] wynika, że w oscypkach wytworzonych w tym samym rejonie ogólna liczba drobnoustrojów wahała się od $1,5 \times 10^8$ do $2,1 \times 10^9$ jtk \cdot g⁻¹, a liczebność drożdży mieściła się w przedziale $4,4 \times 10^3$ – $7,2 \times 10^5$ jtk \cdot g⁻¹. Liczebność mikroorganizmów oznaczanych w poszczególnych oscypkach była zatem dużo bardziej zróżnicowana niż w badanych przez nas gołkach. W oscypkach analizowanych przez ww. badaczy występowały ponadto pleśnie. W niektórych partiach oscypków wykrywano też gronkowce [Paciorek i Bonczar 2001]. Skład ilościowy mikroflory wielu innych opisanych w literaturze serów regionalnych wytwarzanych na drodze spontanicznych fermentacji jest również zróżnicowany z uwagi na zmiany w składzie mikroflory surowca oraz różnice w stanie mikrobiologicznym środowiska produkcyjnego, będącego jednocześnie głównym źródłem drobnoustrojów uczestniczących w procesie ich produkcji [Beresford i in. 2001, Golahmadov i in. 2006, Belgacem i in. 2008, Settanni i Moschetti 2010].

W związku z tym, że najliczniejszą grupą mikroorganizmów w gołkach były LAB, które jak wynika z danych literaturowych, odgrywają zasadniczą rolę w produkcji podpuszczkowych serów dojrzewających [Cogan i in. 1997, Beresford i in. 2001], postanowiono ustalić ich skład rodzajowy. W tym celu przeprowadzono analizę metagenomową. Analizę tę wybrano jako narzędzie badawcze, ponieważ dzięki niej możliwe jest szybkie wykrycie w obrębie badanej populacji poszukiwanych drobnoustrojów, nawet jeśli są one martwe lub występują w śladowych ilościach [Streit i Schmitz 2004, Deja-Sikora i in. 2007, Brugere i in. 2009]. W przypadku prac mających na celu wyjaśnienie roli poszczególnych drobnoustrojów w procesie produkcji gołek informacje takie mają zasadnicze znaczenie. W ramach analizy metagenomowej z natywnej mikroflory gołek wyizolowano meta-DNA i przebadano je w kierunku obecności sekwencji typowych dla 7 rodzajów LAB, których obecność wykryto już w innych serach [Cogan i in. 1997, Beresford i in. 2001, Hutkins 2006, Settanni i Moschetti 2010]. Do ich detekcji zastosowano technikę PCR i specyficzne rodzajowo startery, które zaprojektowano na podstawie analizy sekwencji 16S i 23S rDNA. W wyniku reakcji PCR przeprowadzonej ze starterami LactocgrP1F/LactocgrP2Rkr, LeucgrF/Leucgr-WeissgrR oraz Entgr1F/Entgr2R we wszystkich badanych próbach (ścieżki 1–9) otrzymano produkty amplifikacji o pożądanej wielkości, tj. odpowiednio 319 pz (fot. 1), 1200 pz (fot. 2) oraz 112pz (fot. 3). W obrębie metagenomowego DNA wyizolowanego z mikroflory wszystkich badanych prób gołek występowało zatem DNA bakterii *Lactococcus*, *Leuconostoc* i *Enterococcus*. Amplikony o długości typowej *Lactobacillus* (950 pz) otrzymano natomiast w 8 z 9 badanych prób (fot. 4). Sekwencji typowych dla bakterii z rodzajów *Carnobacterium*, *Pediococcus* i *Weissella* (tab. 4) nie wykryto z kolei w żadnej próbie badanego metagenomowego DNA.

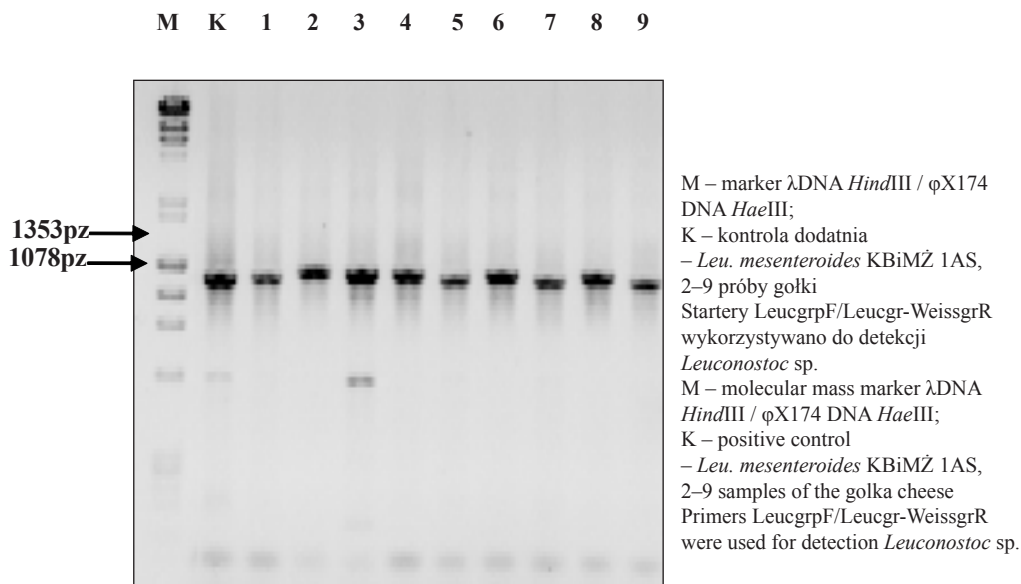
Na podstawie powyższych wyników stwierdzono, że we wszystkich badanych serach występowały bakterie *Lactococcus*, *Leuconostoc* i *Enterococcus*. W 8 z 9 badanych gołek były także obecne bakterie *Lactobacillus*. W skład natywnej mikroflory badanych gołek nie wchodziły natomiast bakterie *Carnobacterium*, *Pediococcus* i *Weissella* (tab. 3).

Obecność materiału genetycznego bakterii *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* i *Lactobacillus* w większości prób gołek dowodzi jednocześnie, że wymienione rodzaje bakterii są ich typową mikroflorą i to prawdopodobnie one uczestniczą w kształtowaniu

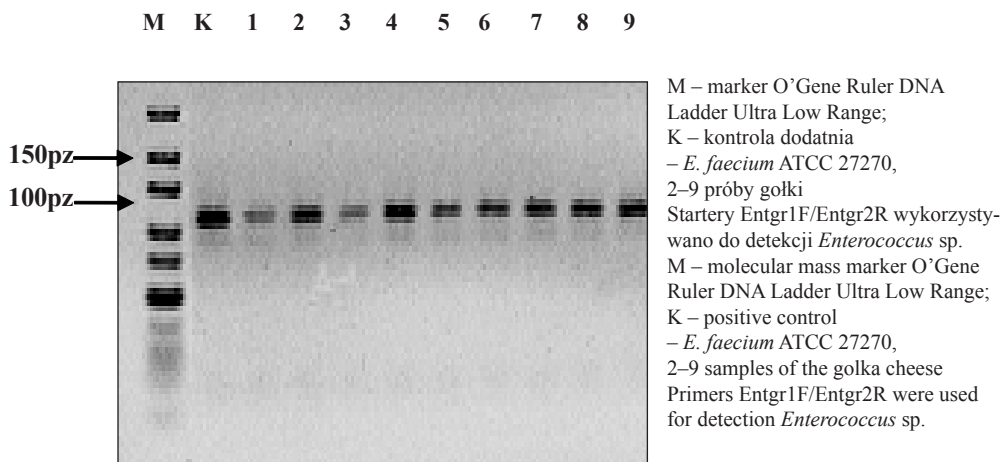
ich unikalnych właściwości oraz w ich utrwalaniu. Wykryte w gołkach bakterie *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* oraz *Lactobacillus* są także typową mikroflorą wielu innych serów regionalnych wytwarzanych w Europie [Bereford i in. 2001, 2003, Hutkins 2006, Settanni i Moschetti 2010]. Spośród wymienionych rodzajów LAB w większości serów regionalnych dominują bakterie *Lactobacillus*.



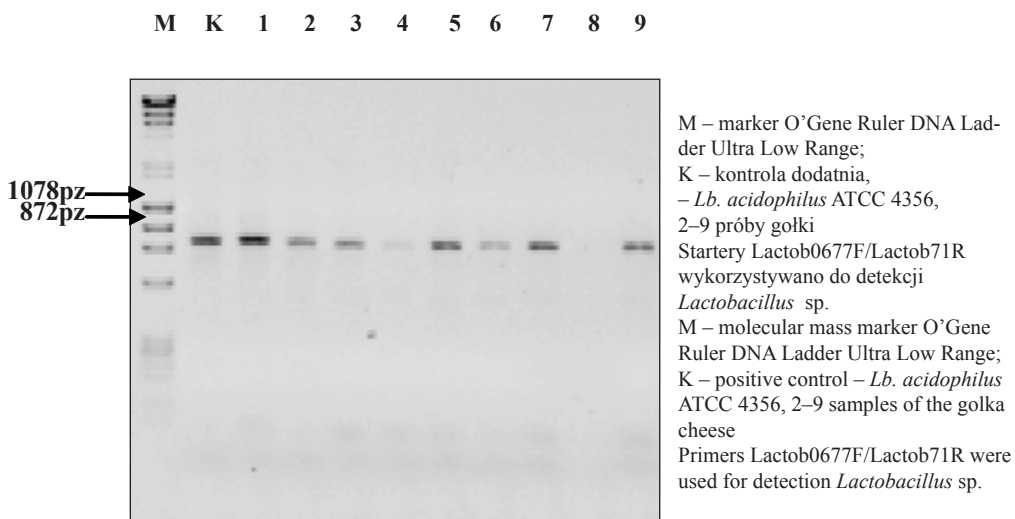
Fot. 1. Elektroforetyczny rozdział produktów reakcji PCR ze starterami LactocgrP1F/LactocgrP2R
Phot. 1. Electrophoretical pattern of PCR products with primers LactocgrP1F/LactocgrP2R



Fot. 2. Elektroforetyczny rozdział produktów PCR ze starterami LeucgrpF/Leucgr-WeissgrR
Phot. 2. Electrophoretical pattern of PCR products with primers LeucgrpF/Leucgr-WeissgrR



Fot. 3. Elektroforetyczny rozdział produktów reakcji PCR ze starterami Entgr1F/Entgr2R
Phot. 3. Electrophoretical pattern of PCR products with primers Entgr1F/Entgr2R



Fot. 4. Elektroforetyczny rozdział produktów reakcji PCR ze starterami Lactob0677F/Lactob71R
Phot. 4. Electrophoretical pattern of PCR products with primers Lactob0677F/Lactob71R

Tabela 3. Wyniki amplifikacji metagenomowego DNA mikroflory gołek ze starterami specyficznymi dla 6 rodzajów LAB

Table 3. Results of amplification meta-DNA of golka microflora with primers specific for 6 species of LAB

Startery Primers	Próba Sample								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Carnob1F/Carnob2R	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Entgr1F/Entgr2R	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LactogrP1F/LactogrP2Rkr	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactob0677F/Lactob71R	+	+	+	+	+	+	+	-	+
LeucgrpF/Leucgr-WeissgrR	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Pediogr23SF/Pediogr23SR	-	-	-	-	-	-	-	-	-
WeissgrpF/Leucgr-WeissgrR	-	v	-	-	-	-	-	-	-

+ produkt amplifikacji; - brak produktu amplifikacji

+ PCR product; - lack of PCR product

Tabela 4. Wyniki identyfikacji bakterii fermentacji mlekowej wyizolowanych z gołek

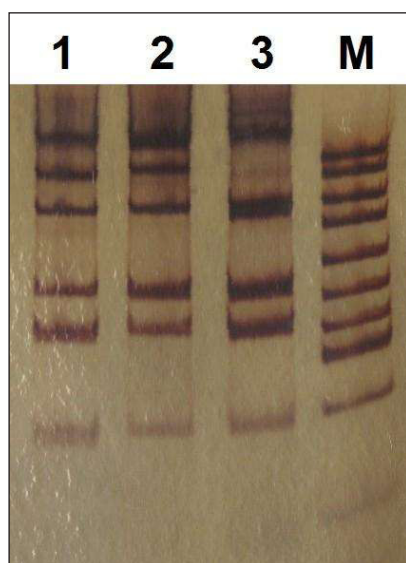
Table 4. Results of identification of lactic acid bacteria isolated from golka cheeses

Próba Sample	Wynik filogenetycznej identyfikacji* Phylogenetic identification result*	Stopień homologii z sekwencją zdeponowaną w GenBank Percent homology with GenBank sequence	Ilość zidentyfikowanych izolatów Number of identified isolates
1	<i>Lactobacillus casei</i>	100	18
2	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99	18
3	<i>Lactobacillus casei</i>	100	17
4	<i>Lactobacillus casei</i>	100	17
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	99	3
5	<i>Lactobacillus casei</i>	100	20
6	<i>Lactobacillus casei</i>	100	17
7	<i>Lactobacillus casei</i>	100	16
	<i>Enterococcus hirae</i>	99	2
8	<i>Enterococcus hirae</i>	99	18
9	<i>Lactobacillus casei</i>	100	17
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	100	3
Razem Summary	<i>Lactobacillus casei</i>		122 (73,5%)
	<i>Lactobacillus plantarum</i>		24 (14,45%)
	<i>Enterococcus hirae</i>		20 (12,05%)

* na podstawie porównania sekwencji ampliconów 16S rDNA

* on the basis of sequence analysis of 16S rDNA amplicons

W ramach pracy zidentyfikowano ponadto metodą PCR-RFLP i sekwencjonowania 166 dominujących w gołkach szczepów LAB. Po przeanalizowaniu profili prążków otrzymanych w wyniku elektroforezy amplikonów 16S rDNA po trawieniu enzymami HinPI oraz TaqI (fot. 5) ustalono, że 122 izolaty, czyli 73,5% badanej populacji należało do gatunku *Lactobacillus casei*. Na podstawie profili RFLP kolejne 24 izolaty zidentyfikowano jako *Lactobacillus plantarum*, a 20 jako *Enterococcus hirae*. W obrębie populacji LAB wyizolowanej z czterech gołek (próby 1, 3, 5, 6) wykryto jedynie bakterie *L. casei* (tab. 4). W dwóch gołkach (próby 4 i 9) towarzyszyły im również bakterie *Lb. plantarum*, a w jednej (próba 7) bakterie *E. hirae*. Dwie gołki, tj. próby oznaczone jako 2 i 8, miały inną dominującą mikroflorę. W próbie 2 były nią bakterie *Lb. plantarum*, a w próbie 8 bakterie *E. hirae*. Badania mające na celu wyjaśnienie przyczyn oraz konsekwencji różnic w składzie gatunkowym LAB wykrytych w gołkach są już prowadzone przez autorów.



1 – *Lactobacillus casei*,
 2 – *Lactobacillus plantarum*,
 3 – *Enterococcus hirae*,
 M – molecular weight marker, pUC MspI, Fermentas
 Amplikony 16S rDNA trawiono enzymami HinPI
 and TaqI
 Amplicons 16S rDNA were digested with HinPI
 and TaqI endonucleases

Fot. 5. Wyniki analizy PCR-RLFP amplikonów 16S rDNA izolatów LAB pochodzących z gołek
 Phot. 5. Results of analysis of PCR-RLFP amplicons 16S rDNA from isolates of LAB originating
 from gołka cheeses

Z danych literaturowych wynika, że wykryte w gołkach bakterie *Lb. casei* i *Lb. plantarum* są typowe dla fermentowanych produktów mlecznych, zwłaszcza półtwardych i twardych serów dojrzewających wytwarzanych metodami rzemieślniczymi. Dominująca populacja LAB w większości z nich jest jednak dużo bardziej złożona. W jej skład obok *Lb. casei* i *Lb. plantarum* często wchodzi także bakterie *Lb. paracasei*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. curvatus*, *Lb. brevis*, *Lb. helveticus*, *Lb. fermentum*, *Lb. bifementas*, *P. acidilactici* i/lub *P. pentosaceus*, czyli bakterie których nie wyizolowano z gołek [Bereford i in. 2001, 2003, Hutkins 2006, Settanni i Moschetti 2010]. W świeżo wyprodukowanych serach regionalnych z mleka surowego, tj. np. Feta, Teleme, Kefaloty, Afuega'l Pitu, Machon, Casu Axedu, Fontina, Toma oraz wielu innych dominują bakterie *Lb. plantarum*

[Bereford i in. 2001]. W trakcie dojrzewania w serach produkowanych bez udziału kultur starterowych zwiększa się zwykle liczebność bakterii *Lb. casei*, które stają się jednocześnie najbardziej liczną grupą LAB. W niektórych jednak świeżo wyprodukowanych serach, podobnie jak w większości badanych przez nas gołek, dominują już *Lb. casei*, a *Lb. plantarum* są drugą pod względem liczebności grupą LAB [Arizcun i in. 1997]. Niestarterową mikroflorą kwaszącą wielu serów podpuszczkowych z mleka surowego są również bakterie *Enterococcus*. Bakterie te z uwagi na zdolność do metabolizowania cytrynianów oraz silne właściwości proteolityczne i lipolityczne odgrywają ważną rolę w kształtowaniu ich cech smakowo-zapachowych [Oumer i in. 2001, Sarantinopoulos i in. 2001]. *E. hirae*, których obecność wykryto w gołkach, w innych serach regionalnych występują sporadycznie. Zwykle wykrywane są w nich natomiast *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. durans*, *E. mundtii* i *E. gallinarum* [Ziarno 2006]. Wyizolowane z gołek kultury *E. hirae* powinny być jednak dokładnie przebadane, zwłaszcza pod kątem bezpieczeństwa zdrowotnego. Z danych literaturowych wynika bowiem, że niektóre szczepy *E. hirae* mogą wywoływać bakterieję u pacjentów z obniżoną odpornością immunologiczną oraz podobnie jak inne enetrokoki produkować aminy biogenne [Gilad i in. 1998, Canalejo i in. 2008, Ribeiro i in. 2008].

Badania nad mikroflorą gołek zapoczątkowane w ramach pracy dostarczyły jednak nie tylko informacji o charakterze poznawczym. Doprowadziły one również do wyizolowania z gołek charakterystycznych dla nich LAB. Bakterie te w przyszłości mogą być wykorzystane do opracowywania nowych kultur starterowych.

WNIOSKI

1. Skład ilościowy mikroflory gołek wytwarzanych w warunkach rzemieślniczych bez udziału kultur starterowych przez różnych producentów był zbliżony.

2. Wszystkie badane gołki były bezpieczne z mikrobiologicznego punktu widzenia.

W skład natywnej mikroflory gołek wchodziły bakterie z rodzajów *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus* i *Leuconostoc*.

3. W większości gołek dominowały bakterie *Lb. casei*. W niektórych gołkach wśród dominujących LAB występowały także *Lb. plantarum* i *E. hirae*.

PIŚMIENNICTWO

- Arizcun C., Barcina Y., Torre P., 1997. Identification of lactic acid bacteria isolated from Roncal and Idiazabal cheeses. *Lait* 77, 729–736.
- Belgacem B. Z., Ferchichi M., Prévost H., Dousset X., Manai M., 2008. Screening for anti-listerial bacteriocin-producing lactic acid bacteria from "Gueddid" a traditionally Tunisian fermented meat. *Meat Sci.*, 78, 513–521.
- Beresford T.P., Fitzsimons N.A., Brennan N.L., Cogan T.M., 2001. Recent advances in cheese microbiology. *Int. Dairy J.*, 11, 259–274.
- Brugere J.F., Mihajlovski A., Missaoui M., Peyret P., 2009. Tools for stools, the challenge of assessing human intestinal microbiota using molecular diagnostics. *Expert Rev. Mol. Diagn.*, 9, 353–365.

- Canalejo E., Ballesteros R., Cabezudo J., Garcia-Arata I., Moreno J., 2008. Bacteriemic spondylodiscitis caused by *Enterococcus hirae*. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 27, 613–615.
- Cogan T.M., Barbosa M., Beuviel E., Bianchi-Salvadori B., Coconcelli P.S., Fernandes I., Gomez J., Gomez R., Kalantzopoulos G., Ledda A., Medina M., Rea M.C., Rodriguez E., 1997. Characterization of lactic acid bacteria in artisanal dairy products. J. Dairy Res., 64, 409–421.
- Dawson S., Small Subunit rDNA PCR Primers, Plant and Microbial Biology Department, PaceLabWest, dane niepublikowane.
- Deja-Sikora E., Sikora M., Golebiewski M., Tretyn A., 2007. Metagenomic libraries as sources of genes useful for biotechnology, Biotechnol., 4, 125–139.
- Furczoń K., Michałek J., Oprychał T., Kochut P., 2007. Katalog serów wołowskich i górskich. „Agro-Smak 2”, 9–20.
- Gilad J., Borer A., Riesenberk K., Peled N., Shnaider A., Schaeffer F., 1998. *Enterococcus hirae* septicemia in patient with end-stage renal disease undergoing hemodialysis. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 17, 576–577.
- Golahmodov S.G., Batdorj B., Dalgalarondo M., Chobert J.-M., Kuliev A.A., Haertle T., 2006. Characterization of bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) from lactic acid bacteria isolated from traditional Azerbaijani cheese. Eur. Food Res. Technol., 224, 229–235.
- Hutkins R. W., 2006. Microbiology and technology of fermented foods, Blackwell Publishing, 145–207.
- Ke D., Picard F. J., Martineau, Menard Ch., Roy P. H., Ouellette M., Bergeron M. G., 1999. Development of a PCR assay for rapid detection of enterococci. J. Clin. Microbiol., 37, 3497–3503.
- Klijn N., Weerkamp A.H., De Vos W.M., 1995. Detection and characterization of lactose-utilizing *Lactococcus* spp. in natural ecosystems. Appl. Environ. Microbiol., 61, 788–792.
- Moura P., Simões F., Girio F., Laureiro-Dias M. C., 2007. PCR monitoring of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* dynamics in fermentations by piglet intestinal microbiota. J. Basic Microbiol., 47, 148–157.
- Nissen H., Holck A., Dainty R.H., 1994. Identification of *Carnobacterium* spp. and *Leuconostoc* spp. in meat by genus-specific 16S rRNA probes. Letters Appl. Microbiol., 19, 165–168.
- Oumer B.A., Gaya P., Fernandez-Garcia E., Marciaca R., Garde S., Medina m. Nunez P., 2001. Proteolysis and formation of volatile compounds in cheese manufactured with bacteriocin producing adjunct culture. J. Dairy Res., 68, 117–129.
- Paciorek A., Bonczar G., 2001. Jakość oszczypków z uwzględnieniem oceny mleka owczego i zentycy. Zeszyty Naukowe Akademii Rolniczej w Krakowie, Technologia Żywności 1, 103–117.
- Pfannebecker J., Fröhlich J., 2008. Use of a species-specific multiplex PCR for the identification of pediococci. Int. J. Food Microbiol., 128, 288–296.
- Ribeiro T.C., Pinto V., Gaspar F., Lopes M.F., 2008. *Enterococcus hirae* causing wound infections in a hospital. J. Chin. Clin., Med. 3, 150–152.
- Sarantinopoulos P., Andrighetto G., Georgalaki M.D., Rea M.C., Lombardi A., Cogan T.M., Kalantzopoulos G., Tsakalidou E., 2001. Biochemical properties of enterococci relevant to their technological performance. Int. Dairy J., 11, 621–647.
- Schillinger U., Boehringer B., Walbaum S., Caroline L., Gonfa A., Huch M., 2008. A genus-specific PCR method for differentiation between *Leuconostoc* and *Weissella* and its application in identification of heterofermentative lactic acid bacteria from coffee fermentation. FEMS Microbiol. Letters, 286, 222–226.
- Settanni L., Moschetti G., 2010. Non-starter lactic acid bacteria used to improve cheese quality and provide health benefits. Food Microbiol., 27, 691–697.
- Streit W.R., Schmitz R.A., 2004. Metagenomics – the key to the uncultured microbes. Curr. Opin. Microbiol., 7, 492–498.

- Suau A., Bonnet R., Sutren M., Godon, J.J., Gibson G.R., Collins M.D., Doré J., 1999. Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 4799–4807.
- Wołoszek M., Bonczar G., 2002. Właściwości oszczypków z mleka owczego, krowiego i mieszaniny mleka krowio-owczego. *Przem. Spoż.*, 9, 14–19.
- Wołoszek M., Bonczar G., 2003. Jakość mikrobiologiczna oszczyków z mleka owczego, owczo-krowiego i krowiego. *Żywność 3 (suppl.)*, 103–116.
- Ziarno M., 2006. Bakterie rodzaju *Enterococcus* w mleku i przetworach mleczarskich. *Medycyna Wet.*, 62, 145-148.

ANALYSIS OF MICROFLORA ASSOCIATED WITH REGIONAL GOLKA CHEESES

Abstract. The assessment of the microbiological quality of golka – a smoked regional cheeses produced from unpasteurized mixed milk (sheep and cow) in the Carpathian Mountains region as well as a primary identification of LAB derived from these products were the main objectives of this study. The counts of aerobic bacteria, LAB, *S. aureus*, yeasts and molds was determined. The presence of *Salmonella* and *Listeria* was also investigated. The cell counts of microorganisms was determined using standard plating techniques, and the presence of selected indicator strains was established using the ELFA method. The qualitative analysis of the LAB population was performed using PCR-based analysis of metagenomic DNA isolated from natural golka microbiota. Dominating LAB species were further identified using PCR-RFLP and 16S rRNA sequencing. The results of the performed studies have revealed, that the cell counts of microorganisms inhabiting golka cheeses was similar regardless the fact, that the samples were provided by different suppliers. The population of acidophilic LAB was the most abundant, reaching the level of 6.9×10^9 cfu \cdot g⁻¹. *Salmonella*, *Listeria*, enterotoxigenic *S. aureus* strains and molds were not detected in the analyzed cheese samples. Nevertheless, all golka samples showed presence of yeasts ranging from 1.2×10^6 to 1.6×10^7 cfu \cdot g⁻¹. LAB from the genera *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus* and *Leuconostoc* were detected in all samples. *Lb. casei* strains were dominant among 166 tested isolates.

Key words: golka, regional cheeses, lactic acid bacteria, metagenomic analysis, identification, PCR-RFLP

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 15.12.2010

Do cytowania – For citation: Sip A., Olejnik-Schmidt A., Więckowicz M., Grajek W, 2010. Analiza mikroflory regionalnych serów gołka. *Acta Sci.Pol. Biotechnol.*, 9(4), 25–38.

SPIS TREŚCI CONTENTS

Michał Piegza, Joanna Rząsa, Ewelina Siepka, Danuta Witkowska Use and comparison of molecular and classical methods for the identification of moulds isolated from the soil	3
Wykorzystanie i porównanie molekularnych i klasycznych metod do identyfikacji pleśni izolowanych z gleby	
Marta Pokora, Marek Szoltysik, Anna Dąbrowska, Józefa Chrzanowska, Tadeusz Trziszka Wykorzystanie niekomercyjnych enzymów proteolitycznych do hydrolizy białek jaja	17
Application of noncommercial proteolytic enzymes in hydrolysis of egg-white protein	
Anna Sip, Agnieszka Olejnik-Schmidt, Michał Więckowicz, Włodzimierz Grajek Analiza mikroflory regionalnych serów gołka	25
Analysis of microflora associated with regional golka cheeses	