

# ACTA SCIENTIARUM POLONORUM

Czasopismo naukowe założone w 2001 roku przez polskie uczelnie rolnicze

**Biotechnologia**

Biotechnologia

Biotechnology

11 (2) 2012



Bydgoszcz Kraków Lublin Olsztyn  
Poznań Siedlce Szczecin Warszawa Wrocław

**Executive Board of *Acta Scientiarum Polonorum***

Jerzy Sobota (Wrocław) – chairman

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

**Scientific Board of *Biotechnology***

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

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

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

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

Print edition is an original (reference) edition

Cover design  
Daniel Morzyński

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

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

Printed: 150 + 16 copies Publishing sheets: 2,8. Printing sheets: 2,5

Druk i oprawa: EXPOL, P. Rybiński, J. Dąbek, Spółka Jawna  
ul. Brzeska 4, 87-800 Włocławek

*Szanowni Państwo,*

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

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

*Od 2007 roku czasopismo wydawane jest jako kwartalnik. Wymogi redakcyjne oraz szczegóły dotyczące przygotowania artykułu można znaleźć na stronie [www.acta.media.pl](http://www.acta.media.pl)*

*Zespół Redakcyjny*

*Dear Readers,*

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

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

*Since 2007 the journal has been published as quarterly. The editorial requirements and details concerning the instruction for authors can be found at: [www.media.pl](http://www.media.pl).*

*Editorial Team*

## PCR JAKO NARZĘDZIE DO IDENTYFIKACJI I RÓŻNICOWANIA DROBNOUSTROJÓW

Marlena Marciniak, Małgorzata Robak

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

**Streszczenie.** Bazując na łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR), opracowano wiele technik, które są stosowane w kryminalistyce, medycynie, badaniach filogenetycznych oraz do identyfikacji i różnicowania organizmów. Wybór metody do rutynowego stosowania w danym laboratorium nie jest prosty i wymaga zaznajomienia się z wieloma technikami. Chcąc ułatwić wybór metody do analizy drobnoustrojów, w pracy zamieszczono opis i porównanie następujących technik: RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA), PCR-RFLP (PCR-Restriction Fragments Length Polymorphism), RISA (Ribosomal Intergenic Spacer Analysis), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), Multiplex PCR oraz Real-time PCR. Metody porównano pod względem cech najbardziej użytecznych, jakimi są: zakres stosowania technik, powtarzalność analiz, trudność w wykonaniu oznaczeń, czasochłonność, możliwości automatyzacji badań oraz koszty jednostkowej analizy.

**Słowa kluczowe:** RAPD, PCR-RFLP, RISA, Multiplex PCR, Real-time PCR, AFLP

### WSTĘP

Obecnie w diagnostyce mikrobiologicznej stosowane są zarówno „klasyczne” metody fenotypowania (np. galerie API bioMerieux) oraz serotypowania (testy ELISA, testy lateksowe) drobnoustrojów, jak i coraz częściej metody analizujące polimorfizm materiału genetycznego [Bzducha 2007, Wojtatowicz i in. 2008]. W ostatnich latach nastąpił intensywny rozwój badań opartych na poszukiwaniu lub analizowaniu unikatowego dla danego organizmu fragmentu genomu. Przewagą tych metod nad postępowaniem tradycyjnym są: niezależnienie wyników od warunków hodowli mikroorganizmów, skrócenie czasu analizy oraz wprowadzanie automatyzacji badania. Zasadniczo techniki stosowane do identyfikacji i różnicowania mikroorganizmów oparte na badaniach sekwencji DNA

---

© Copyright by Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Adres do korespondencji – Corresponding author – Małgorzata Robak, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, ul. Chelmońskiego 37/41, 51-630 Wrocław, e-mail: malgorzata.robak@up.wroc.pl

dzieli się na metody hybrydyzacyjne i metody wykorzystujące technikę PCR (łańcuchowa reakcja polimerazy).

Hybrydyzacja kwasów nukleinowych polega na stosowaniu tzw. sond genetycznych, czyli znakowanych jednoniciowych fragmentów DNA lub RNA zawierających sekwencje specyficzne dla określonego organizmu [Frąc, Jezierska-Tys 2010]. Hybrydyzacja może przebiegać również na poziomie komórkowym, przeprowadzona *in situ* umożliwia określenie rozmieszczenia mikroorganizmów w środowisku, np. FISH (ang. *fluorescence in situ hybridization*). Zastosowanie znakowanej fluorochromem sondy umożliwia bezpośrednią wizualizację przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego, skaningowego lub analizę ilościową dzięki wykorzystaniu cytometru przepływowego [Więckowicz 2009, Miłtuła i in. 2010].

Dużą popularnością w ostatnich latach cieszy się hybrydyzacja DNA-DNA połączona z zastosowaniem mikromacierzy, która dzięki miniaturyzacji umożliwia jednoczesne badanie nawet tysięcy sekwencji [Kaczmarczyk, Bartoszcze 2006].

Łańcuchowa reakcja polimerazy – PCR (ang. *Polymerase Chain Reaction*) to technika wynaleziona w 1983 r. przez Kary’ego Mullisa [Saiki i in. 1988]. Metoda umożliwia specyficzną amplifikację *in vitro* określonych odcinków DNA. Bazując na PCR, opracowano wiele technik, które są stosowane w kryminalistyce, medycynie, badaniach filogenetycznych [Słomski i in. 2004]. Wybór metody do rutynowego stosowania w danym laboratorium nie jest prosty i wymaga zaznajomienia się z wieloma technikami. Chcąc przyszłemu użytkownikowi ułatwić dokonanie wyboru, w pracy tej zamieszczone są opis i porównanie metod opartych na PCR wykorzystywanych do identyfikacji i różnicowania mikroorganizmów pod względem cech najbardziej użytecznych, jakimi są: zakres stosowania technik, powtarzalność analiz, trudność w wykonaniu oznaczeń, czasochłonność, możliwości automatyzacji badań oraz koszty jednostkowej analizy.

Przeprowadzenie takiego porównania ma również na celu podjęcie próby wyznaczenia aspektów, jakimi powinna charakteryzować się metoda idealna czy najbardziej uniwersalna.

## OPIS METOD

W opisie uwzględniono następujące metody: RAPD, PCR-RFLP, RISA, AFLP, Multiplex PCR oraz Real-time PCR.

### 1. RAPD-losowa amplifikacja polimorficznego DNA

RAPD (ang. *Randomly Amplified Polymorphic DNA*) jest najprostszą techniką spośród molekularnych metod różnicowania. Została zastosowana po raz pierwszy w 1990 r. przez Williama i in. [1990]. Jest modyfikacją klasycznej PCR, w której wykorzystywany jest pojedynczy starter, zbudowany z 5–15 nukleotydów o losowo wybranej sekwencji. Primer działa zarówno jako wiodący (forward) – jego sekwencja jest taka sama jak 5’ koniec sekwencji powielanej; oraz odwrotny (reverse) – sekwencja jest komplementarna do 3’ końca powielanej sekwencji. Zasadnicze etapy reakcji są identyczne z PCR, przeprowadza się je w ściśle określonych temperaturach i ilościach powtórzeń. W zależności od zastosowanej matrycy DNA różne są ilość i lokalizacja miejsc komplementarnych do startera. Zatem w wyniku RAPD otrzymuje się od kilku do kilkunastu produktów amplifi-

kacji o zróżnicowanej wielkości (300–3000 pz), a ich ilość jest charakterystyczna dla danego organizmu. Możliwe jest zatem różnicowanie nawet blisko ze sobą spokrewnionych gatunków, a nawet szczepów [Bautista-Munoz i in. 2003, Robak i in. 2005, Walczak i in. 2007]. Metoda czasami jest też nazywana fingerprinting PCR [Naumov i in. 2010]. Jej wykorzystanie wymaga odpowiedniego doboru sekwencji startera, dającej informacyjne profile amplikonów oraz często kompilacji wyników analiz z kilkoma starterami [Barszczewski, Robak 2004, Walczak i in. 2007]. Główną wadą metody jest często obserwowany brak powtarzalności w odniesieniu do pojedynczej analizy. W zbiorczej analizie, np. dla 4 starterów wykonanych w 3 powtórzeniach, wynik jest wiarygodny.

## 2. PCR-RFLP – polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych

Metoda PCR-RFLP (ang. *Restriction Fragments Length Polymorphism*) opiera się na amplifikacji badanego materiału genetycznego o znanej i specyficznej dla danego gatunku sekwencji nukleotydowej, a następnie trawieniu produktów reakcji enzymem lub enzymami restrykcyjnymi. Enzymy restrykcyjne „tną” DNA w ściśle określonych miejscach. Działania takie pozwalają na wykrycie polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych charakterystycznego dla danego organizmu. Analizę wielkości produktów prowadzi się po uprzednim rozdzieleniu uzyskanych produktów w procesie elektroforezy.

Polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych w zależności od obranego celu molekularnego może dotyczyć: DNA chromosomalnego (*restriction endonuclease analysis*-REA), DNA plazmidowego (*restriction endonuclease analysis of plasmid*-REAP), poszczególnych genów (*locus specific* RFLP) czy genów kodujących rRNA (rybotypowanie) [Krawczyk 2007, Giedrys-Kalemba 2009]. Dzięki zastosowaniu odpowiedniego enzymu restrykcyjnego przy cięciu produktów amplifikacji wybranego genu możliwe jest uzyskanie różnych fragmentów, charakterystycznych dla danego drobnoustroju, stanowiących specyficzny wzór restrykcyjny badanego organizmu [Wieczorek, Osek 2005]. Często w celu dokładniejszej identyfikacji stosowanych jest kilka reakcji hydrolizy restryktazami.

Szczególną odmianą jest PCR-RFLP-rDNA polegająca na cięciu enzymami restrykcyjnymi rDNA, zwykle wykorzystywana przy identyfikacji drożdży. Gen rybosomalnego RNA zawiera informacje potrzebną do syntezy wszystkich cząsteczek rRNA budujących rybosom (18S rRNA; 5,8S rRNA i 26S rRNA). Klastry te występują w wielu kopiach w genomie komórki mikroorganizmu eukariotycznego. Posiadają regiony zmienne – ITS1 i ITS2-, które amplifikowane techniką PCR dają dla poszczególnych gatunków drożdży produkty o różnej wielkości, dodatkowo w odmienny sposób trawione przez restryktazy [Tornai-Lehoczki, Dlauchy 2000]. Metoda ta została wykorzystana do identyfikacji drożdży z rodzaju *Candida* oraz *Saccharomyces* [Barszczewski, Robak 2004, Połomska i in. 2007].

Na podobnej zasadzie oparta jest metoda RISA – analiza rybosomalnych sekwencji międzygenowych oraz ARISA – automatyczna analiza rybosomalnych sekwencji międzygenowych opisane poniżej.

## 3. Metoda RISA – analiza rybosomalnych sekwencji międzygenowych oraz ARISA – automatyczna analiza rybosomalnych sekwencji międzygenowych

Metoda RISA (ang. *Ribosomal Intergenic Spacer Analysis*) opiera się na analizie długości sekwencji międzygenowych (*spacer*) w rDNA. W technice tej amplifikowany techniką PCR jest polimorficzny region DNA znajdujący się między sekwencjami kodującymi

rRNA podjednostek rybosomów 16S i 23S w genomie prokariotycznym lub 18S i 26S w genomie eukariotycznym. Regiony te charakteryzują się dużą zmiennością, mogą kodować tRNA i są podstawą w różnicowaniu drobnoustrojów [Więckowicz 2009].

W przypadku RISA polimorfizm jest wykrywany poprzez barwienie rozdzielonych elektroforetycznie fragmentów DNA. W metodzie ARISA (ang. *Automated Ribosomal Intergenic Spacer Analysis*) wykorzystywana jest oligonukleotydowa sonda znakowana fluorescencyjnie, a amplikony wykrywane są następnie automatycznie, np. w elektroforezie kapilarnej. Pozwala to na szybkie badanie różnorodności organizmów nawet w przypadku dużej liczby próbek [Ranjard i in. 2001].

Obie techniki umożliwiają skuteczne różnicowanie drobnoustrojów i dostarczają powtarzalnych profili mikroorganizmów.

#### 4. AFLP – polimorfizm długości amplifikowanych fragmentów

AFLP (ang. *Amplified Fragment Length Polymorphism*) jest to technika wieloetapowa, stanowiąca połączenie metod RFLP i PCR [Giedrys-Kalemba 2009]. Pierwszym etapem jest trawienie badanego materiału dwoma enzymami restrykcyjnymi, które różnią się między sobą częstością rozpoznawania miejsc restrykcyjnych. W wyniku trawienia otrzymuje się produkty o odmiennej długości, zazwyczaj nieprzekraczającej 500 pz. W kolejnym etapie reakcji do produktów trawienia przyłącza się adaptory o długości 10–30 nukleotydów, zbudowane z dwóch części: sekwencji specyficznej do miejsca restrykcyjnego oraz z sekwencji rdzeniowej. Proces ten katalizuje ligaza. Na podstawie sekwencji nukleotydowej adaptorów syntetyzuje się startery dla procesu AFLP. Primery dobrane są w ten sposób, że odznaczają się komplementarnością do sekwencji adaptorów i miejsca restrykcyjnego. Tak przygotowane DNA jest poddawane dwóm reakcjom PCR – preamplifikacji oraz specyficznej amplifikacji. Przebiegają one w ściśle określonych warunkach oraz w obecności specyficznych starterów dla każdej z nich. Ilość produktów otrzymanych w procesie warunkowana jest ilością specyficznych nukleotydów obecnych w starterze w ostatnim etapie powielania (im jest ich mniej, tym większa ilość uzyskanych produktów). Produkty amplifikacji rozdziela się w żelu agarozowym w procesie elektroforezy i porównuje ze wzorcem. Obserwuje się polimorfizm wynikający z: mutacji obejmujących miejsce restrykcyjne, mutacji występujących w pobliżu miejsca restrykcyjnego komplementarnych do nukleotydów selekcyjnych występujących na końcu 3' startera, insercji lub delecji na obszarze powielanych fragmentów.

AFLP bazuje na obecności lub braku fragmentów restrykcyjnych, a nie na różnicach w długości uzyskanych fragmentów jak w przypadku RFLP.

#### 5. Multiplex PCR – kilkustarterowa PCR

Multiplex PCR to modyfikacja łańcuchowej reakcji polimerazy, polegająca na zastosowaniu kilku par różnych, ale specyficznych starterów w jednej reakcji. Umożliwia tym samym jednoczesną amplifikację fragmentów DNA na bazie jednej lub różnych matryc [Kozak-Cięszczyk 2005].

Dobranie starterów warunkujących amplifikację produktów o różnej długości umożliwia powielanie DNA pochodzącego z innych regionów genomu lub od różnych organizmów. Dzięki temu możliwe jest wykrycie sekwencji genów kodujących różne czynniki i identyfikowanie szczepów zjadliwych [Barańska-Rybak 2006].



Technika ta pozwala przyspieszyć badanie większych obszarów DNA z jednoczesną kontrolą poprawności prowadzenia procesu [Reszka i in. 2009]. Jest wykorzystywana w zestawach diagnostyki mikrobiologicznej (np. QIAGEN Multiplex PCR Kit).

## **6. Real-time PCR-łańcuchowa reakcja polimerazy z monitorowaniem przyrostu ilości produktu w czasie rzeczywistym**

PCR stała się jednym z podstawowych narzędzi w biologii molekularnej, jednak nie jest możliwe uzyskanie dzięki niej jednoznacznych wyników ilościowych. W latach dziewięćdziesiątych ubiegłego wieku Higuchi i in. [1993], dodając do mieszaniny reakcyjnej w PCR bromku etydyny i prowadząc reakcję w termocyklerze z wbudowanym źródłem światła UV i kamerą rejestrującą fluorescencję, opracowali metodę obserwacji przyrostu ilości DNA bezpośrednio podczas reakcji.

Teoretycznie ilość produktu po każdym cyklu amplifikacji powinna rosnąć wykładniczo, jednak w wyniku wyczerpania się składników reakcji spada aktywność polimerazy, a tym samym obniża się wydajność amplifikacji. W tradycyjnej PCR analiza ilości amplifikowanego produktu prowadzona jest po zakończeniu wszystkich cykli reakcji, czyli w fazie *plateau*. Zastosowanie PCR w czasie rzeczywistym pozwala na monitorowanie ilości kopii produktu po każdym cyklu amplifikacji [Wiedro i in. 2007]. Taka identyfikacja jest możliwa dzięki dodaniu do mieszaniny reakcyjnej barwników, fluorochromów lub specyficznie znakowanych fluorochromem oligonukleotydowych sond emitujących fluorescencję, której intensywność jest proporcjonalna do ilości DNA [Reszka i in. 2009].

Najczęściej stosowanym do detekcji ilości produktu barwnikiem jest SYBR Green I, który niespecyficznie przyłącza się do dwuniciowej cząsteczki DNA. Barwnik interkaluje do zdenaturowanej matrycy, dopiero gdy przyłączony zostaje primer i syntetyzowana jest nić komplementarna – rezultatem tego jest pojawienie się fluorescencji [Krawczyk 2007, Wiedro i in. 2007, Studzińska i in. 2008]. Real-time PCR ze względu na znaczne uproszczenie i skrócenie czasu analizy (nie ma potrzeby wykonywania rozdzielów elektroforetycznych) staje się rutynową metodą w poszukiwaniu obecności i ekspresji genów, mutacji i polimorfizmu genetycznego.

## **PORÓWNANIE METOD OPARTYCH NA PCR**

Możliwość wykorzystania danej analizy w praktyce jest kluczem do uzyskania przez badacza satysfakcjonującego wyniku. Na drodze do identyfikacji czy też przydzielenia organizmu do danej jednostki taksonomicznej stoją przeszkody wynikające z ograniczeń samych metod. Różnią się one: zakresem stosowania, powtarzalnością uzyskiwanych wyników, stopniem trudności wykonania, czasem analizy, aparaturą i możliwością automatyzacji oraz oczywiście ceną.

### **1. Zakres stosowania technik**

Metoda RAPD znalazła szerokie zastosowanie w celach identyfikacyjnych i różnicujących mikroorganizmy głównie za sprawą swej prostoty, a także wysokiej siły dyskryminacyjnej. Technika ta stosowana była także w badaniach epidemiologicznych do różnicowania mikroorganizmów pochodzących z różnych środowisk [Barańska-Rybak 2006, Woods i in. 1993, Neela i in. 2005], monitorowania czystości procesów w produkcji

żywności i określeniu źródła pochodzenia szczepów [Robak i in. 2005] oraz przy tworzeniu map genetycznego pokrewieństwa gatunków [Kosiński i in. 2009]. Za pomocą RAPD różnicowano wiele gatunków zarówno bakterii, jak i drożdży. RAPD wykorzystywane jest także do różnicowania roślin [Arif i in. 2010, Kosiński i in. 2009].

PCR-RFLP stosowana była do identyfikacji wielu mikroorganizmów, m.in. z rodzajów *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Xanthomonas*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, a także z gatunków *Neisseria meningitidis*, *Helicobacter pylori*, *Listeria monocytogenes*, *Chlamydia trachomatis* [Giedrys-Kalemba 2009]. Technika ta znalazła również zastosowanie w różnicowaniu pomiędzy szczepami jednego gatunku w badaniach epidemiologicznych [Krawczyk, 2007] oraz w badaniach struktury populacji drobnoustrojów [Więckowicz 2009, Frąc i Jezierska-Tys 2010].

Technika AFLP należy do metod skomplikowanych, jednak cechują ją wysoka siła dyskryminacyjna i czułość. Połączenie RFLP i selektywnej amplifikacji techniką PCR pozwala na stosowanie tej metody do analizowania nawet całego genomu mikroorganizmu oraz badanie DNA niezależnie od stopnia jego komplikacji czy pochodzenia [Barańska-Rybak 2006]. AFLP powszechnie stosowana jest w badaniach taksonomicznych [Giedrys-Kalemba 2009] oraz genotypowaniu blisko spokrewnionych szczepów bakteryjnych [Krawczyk 2007], rzadziej w badaniach epidemiologicznych [Puławska i in. 2009]. Do zalet tej techniki należy zaliczyć również fakt, że wymaga mniejszej ilości wyjściowego, oczyszczonego materiału genetycznego niż PCR-RFLP i nie ma potrzeby testowania różnych starterów jak w RAPD.

RISA jest metodą, która została opracowana w celu badania różnorodności, składu gatunkowego oraz określania struktury populacji mikroorganizmów tworzących nawet złożone ekosystemy [Fisher, Triplet 1999]. RISA znalazła zastosowanie w różnicowaniu szczepów bakterii blisko spokrewnionych ze sobą gatunków, występujących w glebach zanieczyszczonych oraz ryzosferze roślin [Frąc, Jezierska 2010], a także w badaniach nad zmianami składu jakościowego populacji drobnoustrojów wywołanych wpływem substancji toksycznych [Więckowicz 2009]. Technika ta jest powszechnie używana w badaniach taksonomicznych i filogenetycznych, pozwala identyfikować prawie wszystkie rodzaje bakterii, również należących do Archaea [Więckowicz 2009]. Metodami tymi można zróżnicować bakterie nawet na poziomie szczepu. Wykorzystywane były do identyfikacji izolatów z następujących gatunków: *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecium*, *Serratia marcescens*, *Listeria monocytogenes* [Krawczyk 2007].

Opracowanie multiplex PCR pozwoliło na amplifikację w jednej mieszaninie reakcyjnej kilku fragmentów DNA. Metoda ta stosowana jest najczęściej do wykrywania wielu markerów chorobotwórczych [Weiner 2008], różnych patogenów [Kozak-Cięszczyk 2005] czy też czynników wirulencji. Test ten pozwala na ustalenie przynależności drobnoustroju do gatunku, a nawet podgatunku [Wieczorek 2005].

## 2. Powtarzalność analiz

Opisywane metody charakteryzują się wysoką powtarzalnością wyników zarówno w skali wewnątrzlaboratoryjnej, jak i między różnymi ośrodkami badawczymi z jednym wyjątkiem. Metodę RAPD cechuje mała powtarzalność uzyskanych wyników. Wymaga ona pełnej standaryzacji postępowania [Krawczyk 2007]. Niemniej jest najprostszą spośród omawianych metod identyfikacji i różnicowania drobnoustrojów. Nie wymaga znajomości sekwencji nukleotydowej DNA badanego organizmu. Stanowi to ogromną zaletę tej

metody, gdyż umożliwia różnicowanie niezidentyfikowanych nigdy wcześniej izolatów [Robak i in. 2005].

W przypadku wszystkich omawianych metod czynnikami zmiennymi dla każdej reakcji są: dobranie odpowiedniej metody otrzymania materiału genetycznego i przeprowadzenie PCR. Każda z tych technik wymaga wyizolowania DNA o wysokiej czystości, co nie zawsze jest proste [Piegza i in. 2011]. Kluczowym etapem omawianych analiz jest także odpowiednie zaprojektowanie przebiegu reakcji PCR. Dobranie odpowiednich parametrów amplifikacji DNA jest niejednokrotnie bardzo czasochłonne.

W metodzie PCR-RFLP wybierane są geny specyficzne dla określonego mikroorganizmu, zatem wymagana jest znajomość amplifikowanej sekwencji DNA. Poznanie badanej sekwencji ma również znaczenie przy doborze odpowiednio tnących enzymów restrykcyjnych [Krawczyk 2007, Frąc, Jezierska 2010]. Dodatkową trudnością przy stosowaniu metody PCR-RFLP jest interpretacja wyników wzorów restrykcyjnych, która wymaga od badacza pewnego doświadczenia [Barańska-Rybak 2006]. W przypadku tej metody dochodzi również kwestia odpowiedniego doboru enzymów restrykcyjnych, ich ilości i czasu inkubacji. Nieodpowiednie przeprowadzenie reakcji trawienia może skutkować pojawianiem się w obrazie elektroforetycznym niespecyficznych produktów.

Podstawową trudnością przeprowadzenia badania metodą AFLP jest stopień jej skomplikowania i wieloetapowość. Pierwszy etap analizy wymaga trawienia DNA dwoma odpowiednio dobranymi enzymami restrykcyjnymi, które muszą różnić się między sobą częstotliwością cięcia. Należy tak dobrać enzymy, aby jeden z nich rozpoznawał sekwencję restrykcyjną częściej niż drugi. Kolejnym etapem mogącym nastęrczyć trudności jest projektowanie odpowiednich adaptorów i starterów dla reakcji PCR. Stosowanie metody AFLP wymaga zatem doświadczenia badacza i zdolności interpretacji często skomplikowanych wyników analizy. W ostatnich latach pojawiły się liczne modyfikacje metody mające na celu uproszczenie procedury badawczej (SE-AFLP, Single Enzyme AFLP), zwiększenie mocy dyskryminacyjnej (TE-AFLP, Three Enzyme AFLP) czy ułatwienie sposobu wizualizacji uzyskiwanych produktów analizy (FB-AFLP, Fluorescence-Based AFLP) [Krawczyk 2007].

Do przeprowadzenia analizy rybosomalnych sekwencji międzygenowych RISA wymagana jest duża ilość oczyszczonego DNA, a metoda wizualizacji barwieniem srebrem nie daje jednoznacznych wyników [Frąc, Jezierska-Tys 2010]. Również zautomatyzowany wariant metody RISA nie jest pozbawiony wad. Istnieje konieczność dodawania do mieszaniny reakcyjnej barwników pasywnych, np. ROX, charakteryzujących się stałą fluorescencją w czasie, w celu poprawy wykrywania niektórych pasm i niwelowania niespecyficznych fluorescencji [Ranjard i in. 2001, Więckowicz 2009].

W przypadku testu wykorzystującego kilka par starterów, jakim jest multiplex PCR, największą trudnością jest dobranie odpowiednich warunków reakcji. Szczególną uwagę należy zwrócić na projektowanie starterów i ustalenie ich stężenia w mieszaninie reakcyjnej. Poszczególne startery muszą być skierowane na amplifikację genów charakterystycznych dla danego organizmu, co wymusza na badaczu poznanie amplifikowanej sekwencji w celu odpowiedniego zaprojektowania bądź doboru starterów. Temperatury topnienia poszczególnych par starterów muszą być do siebie zbliżone i tak dobrane tak, aby uzyskane w czasie PCR produkty różniły się od siebie długością, co pozwoli na skuteczne rozdzielenie ich na żelu. W obrębie sekwencji poszczególnych starterów nie

powinno obserwować się homologii sekwencji, co zapobiegnie łączeniu się różnych starterów między sobą, zamiast z matrycowym DNA [Weiner 2008].

Najnowsza technika, Real-time PCR też nie jest bez wad. Podczas stosowania barwnika SYBR Green I do wizualizacji przyrostu produktu istnieje możliwość zafałszowania wyników, ponieważ fluorochrom może łączyć się w reakcji z jakimkolwiek dwuniciowym DNA, np. niespecyficznymi produktami reakcji lub primerami w postaci dimerów. Aby wykryć takie struktury, należy analizować krzywe topnienia dla wszystkich produktów powstałych w amplifikacji, co wydłuża czas analizy. Jednak stosowanie SYBR Green jest najbardziej opłacalne ze względu na cenę fluorochromu, prostotę jego stosowania, a także stosunkowo dużą czułość [Wierdo i in. 2007, Studzińska i in. 2008]. Jest to także najmniej czasochłonna metoda. Dzięki zastosowaniu tej techniki możliwe jest uzyskanie wyniku, czyli identyfikacji drobnoustroju, w znacznie krótszym czasie niż w przypadku innych metod. Związane jest to z wydatnym skróceniem czasu trwania cyklu i detekcją produktu w „systemie zamkniętym”, czyli bezpośrednio w próbówce z mieszaniną reakcyjną bez konieczności wykonanie elektroforezy.

### 3. Koszty analizy

Aparatura niezbędna do przeprowadzania analiz to koszt jednostkowy w wysokości kilkudziesięciu tysięcy złotych, jednak w przypadku przeprowadzania systematycznie dużej liczby analiz wydatek taki staje się opłacalny ekonomicznie. Odczynnikami, które w istotny sposób wpływają na koszty całego oznaczenia są niewątpliwie enzymy restrykcyjne. Są to jedne z najdroższych reagentów stosowanych w laboratoriach biologii molekularnej. Również barwniki i sondy molekularne stosowane w metodzie Real-time PCR podnoszą koszty całkowite przeprowadzenia analizy. W tabeli nr 1 zestawiono ceny poszczególnych składników reakcji niezbędnych do przeprowadzenia omawianych analiz (wg cen w katalogu firmy ThermoScientific z grudnia 2012 r.).

Tabela 1. Koszty odczynników używane w metodach PCR

Table 1. Cost of chemicals used in PCR methods

Produkt Product	Ilość Amount	Cena [euro] Price
Polimeraza Taq Taq polymerase	100 U 500 U	17,3 49,0
dNTPs	4 x 0,25 ml (100 mM)	123,0
PreamTag Master Mix buffer x2	200 reakcji – reactions	107,0
Startery – Primers	1000 reakcji reactions	0,36 (IBB Warszawa)
T4 Ligase	2000 U	44,3
Bufor z SYBR Green Buffer with SYBR Green	100 x 20 µl reakcji reactions	105,8
Enzymy restrykcyjne Restrictases		
EcoRI	10000 U	43
TaqI	3000 U	39

\*Koszty poszczególnych odczynników wg cen katalogu firmy ThermoScientific  
Price of chemicals according company catalog

Firmy biotechnologiczne nie posiadają w swojej ofercie gotowych starterów, ale je syntetyzują i dostarczają zgodnie z zamówioną sekwencją. Koszt jest uzależniony od długości oligonukleotydów. W ofercie firmy DNA Gdańsk ([www.dnagdansk.com](http://www.dnagdansk.com)) w wariacie długości nieprzekraczającym 33 nukleotydów, koszt startera wynosi 0,5 euro za zasadę, w ilości wystarczającej do przeprowadzenia około 1000 reakcji (po 2 µl roztworu 10 µM na reakcję). W tabeli nr 2 kompleksowo porównano wszystkie omawiane metody identyfikacji i różnicowania drobnoustrojów, uwzględniając: potencjał różnicujący metody, powtarzalność uzyskiwanych wyników, stopień skomplikowania wykonania, czas analizy oraz koszty.

Tabela 2. Porównanie metod identyfikacji i różnicowania drobnoustrojów opartych na PCR  
Table 2. Comparison of PCR based methods of identification and differentiation of microorganisms

Metoda Method	Potencjał różnicujący Discrimination power	Powtarzalność Repeatability	Wykonanie analizy Technique of analysis	Czas wykonania [dni] Duration of analysis [days]	Koszty Cost
RAPD	duży – high	niska – low	łatwe – simple	1	niskie – low
PCR-RFLP	średni medium	wysoka – high	średnie moderate	1	średnie – medium
AFLP	duży – high	wysoka – high	trudne complicated	1–2	wysokie – high
RISA / ARISA	średni moderate	wysoka – high	średnie – moderate	1	średnie – medium
Multiplex PCR	duży – high	wysoka – high	średnie – moderate	1	średnie – medium
Real-time PCR	duży – high	wysoka – high	średnie – moderate	1	wysokie – high

## WNIOSKI

Metody identyfikacji i różnicowania drobnoustrojów oparte na PCR, w porównaniu z klasycznymi technikami posiewowymi, pozwalają wydatnie zmniejszyć nakład pracy ludzkiej oraz umożliwiają modyfikowanie analiz. Kompleksowe porównanie wszystkich omawianych metod identyfikacji i różnicowania drobnoustrojów ukazuje, że nie ma wśród nich metody idealnej, którą powinny charakteryzować: duża siła dyskryminacyjna, proste wykonanie i relatywnie krótki czas analizy oraz powtarzalność uzyskanych wyników w skali międzylaboratoryjnej.

Dobór odpowiedniej metody do przeprowadzenia planowanego eksperymentu musi być starannie przemyślany i powinien uwzględniać spełnianie przez nią kryteriów pełnej wiarygodności uzyskanych wyników. W zależności od obranego celu badania, jakim może być: różnicowanie lub identyfikacja drobnoustrojów (np. patogenów), badanie różnorodności mikroorganizmów w ekosystemie, określenie ilości kopii genu, badanie ekspresji genu, wykrywanie mutacji, najkorzystniejsze będzie dobranie metody charakteryzującej się odpowiednią czułością i relatywnie niskimi kosztami.

## PIŚMIENNICTWO

- Arif I.A., Bakir M.A., Khan H.A., Al Farhan A.H., Al Homaidan A.A., Bahkali A.H., Al Sadoon M., Shobrak M., 2010. Application of RAPD for molecular characterization of plant species of medicinal value from an arid environment. *Genet. Mol. Res.*, 9 (4), 2191–2198.
- Barańska-Rybak W., 2006. Identyfikacja szczepów *Staphylococcus aureus* izolowanych od pacjentów z rozpoznaniem czyraczności przewlekłej przy pomocy nowoczesnych technik diagnostycznych celem wdrożenia ukierunkowanej terapii i prewencji. Praca Doktorska, Katedra i Klinika Dermatologii, Wenerologii i Alergologii, AM w Gdańsku.
- Barszczewski W., Robak M., 2004. Differentiation of contaminating yeasts in brewery by PCR-based techniques. *Food Microbiology*, 2 (21), 227–231.
- Bautista-Munoz C, Boldo X M, Villa-Tanaca L, Hernandez-Rodriguez C., 2003. Identification of *Candida* spp By Randomly Amplified Polymorphic DNA Analysis and Differentiation between *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* by direct PCR Methods. *J Appl Microbiol* 41(1), 414–420.
- Bzducha A., 2007. Szybkie metody identyfikacji mikroorganizmów w żywności, *Medycyna Weterynaryjna*, 7 (63), 773–777.
- Fisher M., Triplett E., 1999. Automated Approach for Ribosomal Intergenic Spacer Analysis of Microbial Diversity and Its Application to Freshwater Bacterial Communities, *Applied and Environmental Microbiology*, 10 (65), 4630–4636.
- Frać M., Jezierska-Tys S., 2010. Różnorodność mikroorganizmów środowiska glebowego, *Postępy Mikrobiologii*, 1 (40), 47–58.
- Giedrys-Kalemba S., 2009. Typowanie molekularne w dochodzeniu epidemiologicznym. Zakażenia szpitalne. Podręcznik dla zespołów kontroli zakażeń. Red. Heczko P., Wójkowska-Mach J., Wyd. Lekarskie PZWL, Warszawa.
- Higuchi R., Fockler C., Dollinger G., Watson R., 1993. Kinetic PCR Analysis: Real-time Monitoring of DNA Amplification Reactions. *Nature Biotechnology*, 11, 1026–1030.
- Kaczmarczyk M., Bartoszcze M., 2006. Mikromacierze DNA-nowe narzędzie w wykrywaniu czynników biologicznych. *Przegląd Epidemiologiczny*, 60, 803–811.
- Kosiński I., Stefanowicz-Hajduk J., Ochocka R., 2009. Demographic versus genetic (RAPD) variation between and within two populations of the cloned plant *Paris quadrifolia* L. (*Liliaceae*). *Pol. J. Ecol.* 57(2), 303–311.
- Kozak-Cięszczyk M., 2005. Diagnostyka molekularna w parazytologii. *Kosmos. Problemy nauk biologicznych*, 1 (54), 49–60.
- Krawczyk B., 2007. Diagnostyka molekularna w zakażeniach szpitalnych. *Postępy Mikrobiologii*, 4 (46), 367–378.
- Neela V., Mariana N., Radu S., Zamperi S., Raha A., Rosli, R., 2005. Use of RAPD to investigate the epidemiology of *Staphylococcus aureus* infection in Malaysian hospitals. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21 (3), 245–251.
- Mitula A., Barszczewski W., Robak M., 2010. *Yarrowia lipolytica* cell cycle study. *EJPAU, Biotechnology* 13(2), #.8, 1–12.
- Naumova E.S, Serpova E.V, Naumov G.I., 2010. Genome variability of the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Microbiology* 79(2), 229–236.
- Pięga M., Barszczewski W., Juszczyk P., Wojtatowicz M., Robak M., 2011. Porównanie metod ekstrakcji DNA z komórek różnych gatunków drożdży. *Acta Sci. Polon. Biotechnologia*, 10 (1), 29–38.
- Połomska X., Juszczyk P., Cadez N., Raspor P., Robak M., Wojtatowicz M., 2007. Comparison of physiological and PCR-RFLP rDNA identification of yeast species commonly found in cheese, *Polish journal of food and Nutrition Sciences*, 2 (57), 221–226.

- Puławska J., Kielak K., Sobiczewski P., 2009. Bioróżnorodność bakterii *Erwinia amylovora* – sprawcy zarazy ogniowej. *Postępy Mikrobiologii*, 2 (48), 133–141.
- Ranjard L., Poly F., Lata J.-C., Mougel C., Thioulouse J., Nazaret S., 2001. Characterization of Bacterial and Fungal Soil Communitied Ribosomal Intergenic Spacer Analysis Fingerprints: Biological and Methodological Variability, *Applied and Environmental Microbiology*, 10 (67), 4479–4487.
- Reszka A., Ziemińska A., Wiechetek A., 2009. Metody i techniki biologii molekularnej w biotechnologii środowiskowej, *Środowisko. Czasopismo techniczne*, 2 (106), 102–114,
- Robak M., Baranowska K., Barszczewski W., Wojtatowicz M., 2005. RAPD jako metoda różnicowania i identyfikacji drożdży, *Biotechnologia* 4 (71), 142–155.
- Saiki R., Gelfand D., Stoffel S., Scharf S., Higuchi R., Horn G., Mullis K., Erlich H., 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239 (4839), 487–491.
- Słomski R., Szalata M., Wielgus K., 2004. Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR), Przykłady analiz DNA. Praca zbiorowa pod red. Słomski R., wyd. AR im. Augusta Cieszkowskiego, Poznań.
- Studzińska A., Tyburski J., Dąca P., Tretyn A., 2008. PCR w czasie rzeczywistym. Istota metody i strategii monitorowania przebiegu reakcji. *Biotechnologia* 1(80), 71–85.
- Tornai-Lehoczki J., Dlačny D., 2000. Delimitation of brewing yeast strains using different molecular techniques. *Int. J. Food Microbiol.* 62, 37–45.
- 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.
- Weiner M., Opracowanie testów multiplex PCR do identyfikacji i charakterystyki shigatoksycznych *Escherichia coli*, 2008. *Medycyna Weterynaryjna*, 3 (63), 310–313.
- Wieczorek K., Osek J., 2005. Przydatność wybranych technik PCR w różnicowaniu termotolerancyjnych szczepów *Campylobacter*. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 4 (45), 132–138.
- Wiedro K., Stachowska E., Chlubek D., 2007. Łańcuchowa reakcja polimerazy z analizą w czasie rzeczywistym. *Roczniki Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie*, 3 (57), 5–9.
- Więckowicz M., 2009, Molekularne metody identyfikacji mikroorganizmów w złożonych ekosystemach, *Postępy Mikrobiologii*, 1 (48), 67–73.
- Williams J.G.K., Kubelic A.R., Livak K.J., Rafalski J.A., Tingey S., 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acid. Res.*, 18, (22), 6531–6535.
- Wojtatowicz M., Stempniewicz R., Żarowska B, Rymowicz W., Robak M., 2008. *Mikrobiologia Ogólna*. Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, Wrocław.
- Woods J.P., Kersulyte D., Goldman W.E., Berg D.E., 1993. Fast DNA Isolation from *Histoplasma capsulatum*: methodology for arbitrary primer polymerase chain reaction-based epidemiological and clinical studies. *Journal of Clinical Microbiology*, 31(2), 463–464.

## PCR AS TOOL FOR IDENTIFICATION AND DIFFERENTIATION OF MICROORGANISMS

**Abstract.** Many techniques used in criminalistics, medical diagnostics, in phylogenetic studies and in organisms identification and differentiation are based on polymerase chain reaction (PCR). The choice of routine method to be applied routinely in a particular laboratory, is not easy and necessitate the knowledge and understanding of some one. In this paper, to facilitate the choice of the routine method for microorganism identification and

differentiation, the detailed description of following methods is presented: RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA), PCR-RFLP (PCR-Restriction Fragments Length Polymorphism), RISA (Ribosomal Intergenic Spacer Analysis), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), Multiplex PCR and Real-time PCR. The methods were compared by the most useful characteristics such as: application field, analysis repeatability, difficulty degree, analysis duration, automation possibility and cost.

**Key words:** RAPD, PCR-RFLP, RISA, Multiplex PCR, Real-time PCR, AFLP

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 30.06.2012

Do cytowania – For citation: Marciniak M., Robak M., 2012. PCR jako narzędzie do identyfikacji i różnicowania drobnoustrojów. *Acta Sci. Pol. Biotechnol.*, 11 (2), 5–16.



## **WPLYW WARUNKÓW PRZECHOWYWANIA NA AKTYWNOŚĆ SACHAROLITYCZNA DROŻDŻY *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* SUSZONYCH SUBLIMACYJNIE**

Katarzyna Samborska, Agata Drzazga

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

**Streszczenie.** W pracy przedstawiono wpływ temperatury oraz rodzaju opakowania na zmiany aktywności sacharolitycznej drożdży *Saccharomyces cerevisiae* suszonych sublimacyjnie w czasie przechowywania. Drożdże po uprzednim wymieszaniu z maltodekstryną (dodatek 8%), stosowaną jako substancja ochronna, zamrażano w temperaturze -30°C i suszono w temperaturze 40°C przy ciśnieniu 0,63 mbar przez 20 godz. Suszone próbki przechowywano w temperaturze -18, 4 i 25°C w opakowaniach o różnej barierowości. Stwierdzono, że aby utrzymać aktywność sacharolityczną drożdży suszonych po 12 tygodniach przechowywania na poziomie co najmniej 80% aktywności po suszeniu, należy przechowywać je w temperaturze 4°C w opakowaniu o wysokiej barierowości względem tlenu i wody (PETmet/PE) lub w temperaturze -18°C w dowolnym opakowaniu. Aby zapewnić utrzymanie ponad 90% aktywności konieczne jest przechowywanie w wysoce barierowych opakowaniach (PETmet/PE lub PET/AL/PE) w temperaturze -18°C.

**Słowa kluczowe:** drożdże piekarskie, suszenie sublimacyjne, aktywność sacharolityczna, przechowywanie

### **WSTĘP**

Prasowane drożdże piekarskie, przeznaczone do stosowania w przetwórstwie żywności oraz w gospodarstwach domowych, są materiałem nietrwałym, szybko tracącym swą biologiczną aktywność w czasie przechowywania [Sobczak i in. 1997]. Utrwalanie drożdży wiąże się z usunięciem wody z biomasy za pomocą różnych metod suszenia. Zapotrzebowanie na drożdże suszone wzrasta, ze względu na wygodę ich użycia i większą stabilność

---

© Copyright by Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

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

w czasie przechowywania w porównaniu z drożdżami świeżymi [Cerutti i in. 2000]. Stosowane są następujące metody suszenia: niskotemperaturowe suszenie konwekcyjne [Guzhova i in. 2008, Tsaousi i in. 2008], fluidyzacyjne [Bayrock, Ingledew 1997a, 1997b, Turker i in. 2006], fontannowe po uprzednim unieruchomieniu, np. w kulkach alginianowych [Paślawska i in. 2006, Paślawska 2008], suszenie pod obniżonym ciśnieniem [Cerrutti i in. 2000], suszenie sublimacyjne z zastosowaniem dodatków ochronnych [Lodato i in. 1999, Miyamoto-Shinohara i in. 2000, Paślawska 2006]. W zależności od metody i parametrów suszenia oraz obecności dodatków ochronnych przeżywalność drożdży podczas suszenia jest bardzo różna. Przykładowo, po suszeniu konwekcyjnym w temperaturze 30°C przeżywalność wynosiła 14,8%, suszenie w złożu fontannowym w temperaturze 30 oraz 40°C pozwoliło uzyskać żywotność odwodnionej populacji na poziomie 68% [Paślawska 2008], a względna aktywność sacharolityczna drożdży piekarskich *Saccharomyces cerevisiae* suszonych sublimacyjnie oznaczona bezpośrednio po suszeniu wynosiła od 34,6 (dodatek 8% glicerolu) do 69,6% (dodatek 8% maltodekstryny) [Samborska, Drzazga 2011].

Sposób przechowywania oraz rodzaj opakowania wpływają na trwałość wszystkich suszonych produktów, a w przypadku materiałów aktywnych biologicznie mają one szczególne znaczenie. Tak jak w przypadku większości produktów łatwo psujących się, najważniejszymi czynnikami wpływającymi na trwałość suszonych drobnoustrojów są: dostęp tlenu i wody, dostęp światła oraz temperatura. Warunki przechowywania powinny być tak dobrane, aby ograniczyć wpływ tych niekorzystnych czynników, co może być m.in. realizowane poprzez dobór odpowiednich opakowań [Morgan i in. 2006, Meng i in. 2008].

W dostępnej literaturze można odnaleźć nieliczne przykłady badań nad zmianami żywotności i aktywności suszonych kultur mikroorganizmów w czasie przechowywania. W większości przypadków autorzy analizują jedynie przeżywalność w czasie suszenia. Costa i in. [2002] badali wpływ rodzaju opakowania (ampułki szklane oraz laminaty wysoko- i niskobarierowe) oraz temperatury przechowywania na stabilność suszonych kultur *Pantoea agglomerans*. Stwierdzono, że po 3 miesiącach przechowywania w ampułkach szklanych i wysokobarierowych laminatach w temperaturze 4°C zachowana została aktywność i żywotność suszonych bakterii, korzystniejsze jest zatem zastosowanie wysokobarierowych opakowań oraz obniżonej temperatury przechowywania.

W poprzedniej części pracy [Samborska, Drzazga 2011] badano wpływ różnych dodatków stabilizujących (glicerol, sacharoza, fruktoza, maltodekstryna) na aktywność sacharolityczną drożdży *S. cerevisiae* w czasie suszenia sublimacyjnego i stwierdzono, że najlepszymi właściwościami ochronnymi charakteryzowała się maltodekstryna (dodatek 8%). Celem obecnej pracy było zbadanie wpływu temperatury przechowywania suszonych drożdży piekarskich oraz rodzaju zastosowanego opakowania na aktywność sacharolityczną drożdży suszonych sublimacyjnie z dodatkiem maltodekstryny jako substancji stabilizującej.

## MATERIAŁ I METODY

**Material:** Materiałem do badań były prasowane drożdże piekarskie *S. cerevisiae* dostępne w sprzedaży detalicznej (Lallemant, Polska) oraz maltodekstryna niskoscukrzona (Hortimex, Polska) stosowana jako substancja ochronna (dodatek 8%). Rodzaj i zawartość

dotadku stabilizującego dobrano na podstawie wcześniejszych badań [Samborska, Drzazga 2011].

**Suszenie:** Drożdże po wymieszaniu z maltodekstryną zamrażano w temperaturze  $-30^{\circ}\text{C}$  (zamrażarka szokowa IRINOX, seria HC), a następnie suszono sublimacyjnie w temperaturze  $40^{\circ}\text{C}$  i ciśnieniu 0,63 mbar (suszarka sublimacyjna CHRIST Gamma 1-16 LSC) przez 20 godzin.

**Przechowywanie:** Drożdże suszone przechowywano przez 12 tygodni w temperaturze  $25^{\circ}\text{C}$ ,  $4^{\circ}\text{C}$  i  $-18^{\circ}\text{C}$ , w opakowaniach z polipropylenu orientowanego OPP, laminatu dwuwarstwowego PET/PE, laminatu dwuwarstwowego PETmet/PE oraz laminatu trójwarstwowego PET/AL/PE (Coffee Service, Polska). Charakterystykę materiałów opakowaniowych przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Charakterystyka materiałów opakowaniowych stosowanych do przechowywania suszonych drożdży

Table 1. Characteristics of the packaging materials used for the storage of dried yeasts

Materiał* Material	Gęstość Density [ $\text{g}/\text{m}^2$ ]	Przepuszczalność Permeability rate	
		$\text{O}_2$ [ $\text{ml}/\text{m}^2/24$ h]	$\text{H}_2\text{O}$ [ $\text{g}/\text{m}^2/24$ h]
OPP	45	1200	3,5
PET/PE	115	50	1,5
PETmet/PE	95	<1	2
PET/AL/PE	105	<1	<1

\* OPP – polipropylen orientowany, PET – poliester, PE – polietylen, met – metalizowany, AL – aluminium  
OPP – oriented polypropylene, PET – poliester, PE – polyethylene, met – metalized, AL – aluminium

**Metody analityczne:** Bezpośrednio po suszeniu oraz co 3 tygodnie w czasie 12 tygodni przechowywania oznaczano zawartość suchej substancji według PN-A-79005-4:1997 i aktywność sacharolityczną drożdży (poprzez pomiar ilości wydzielanego  $\text{CO}_2$  na podstawie ubytku masy nastawu w czasie godzinnej fermentacji 50% roztworu sacharozy przez 3,275 g s.s. drożdży). Aktywność drożdży suszonych wyrażano jako aktywność względną w stosunku do aktywności drożdży świeżych.

**Metody statystyczne:** Za pomocą analizy wariancji (Statgraphics Centurion XV) określano, czy różnice w zawartości suchej substancji oraz aktywności sacharolitycznej drożdży suszonych po zakończeniu przechowywania były istotne statystycznie.

## WYNIKI I OMÓWIENIE

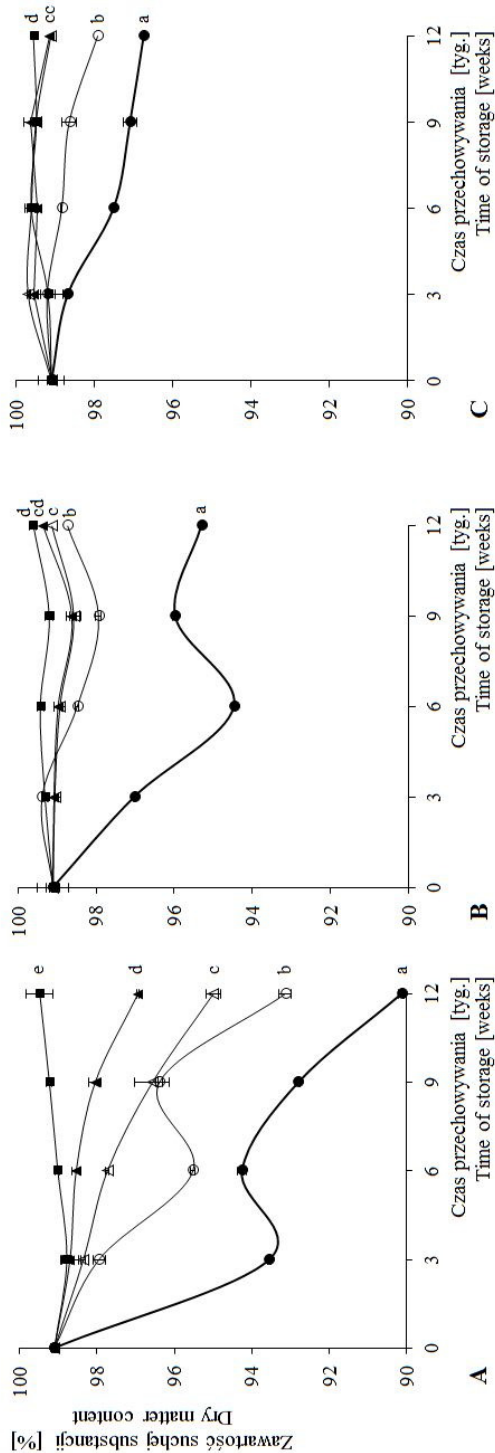
Względna aktywność sacharolityczna drożdży piekarskich *S. cerevisiae* suszonych sublimacyjnie oznaczona bezpośrednio po suszeniu wynosiła  $62,1 \pm 3,0\%$ , a zawartość suchej substancji  $99,1 \pm 0,1\%$ .

Na rysunku 1 przedstawiono zmiany **zawartości suchej substancji** w drożdżach suszonych sublimacyjnie w czasie 12 tygodni przechowywania, w zależności od tempera-

tury przechowywania i rodzaju zastosowanego opakowania. Niezależnie od temperatury przechowywania największymi zmianami zawartości suchej substancji, związanymi z chłonięciem wody z otoczenia, charakteryzowały się próbki przechowywane z wolnym dostępem powietrza. Zmiany te wynosiły: 9,0 punktu proc. w temperaturze 25°C, 3,8 punktu proc. w 4°C i 2,3 punktu proc. w -18°C, a więc obniżanie temperatury przechowywania wpłynęło hamująco na chłonięcie wody przez próbki.

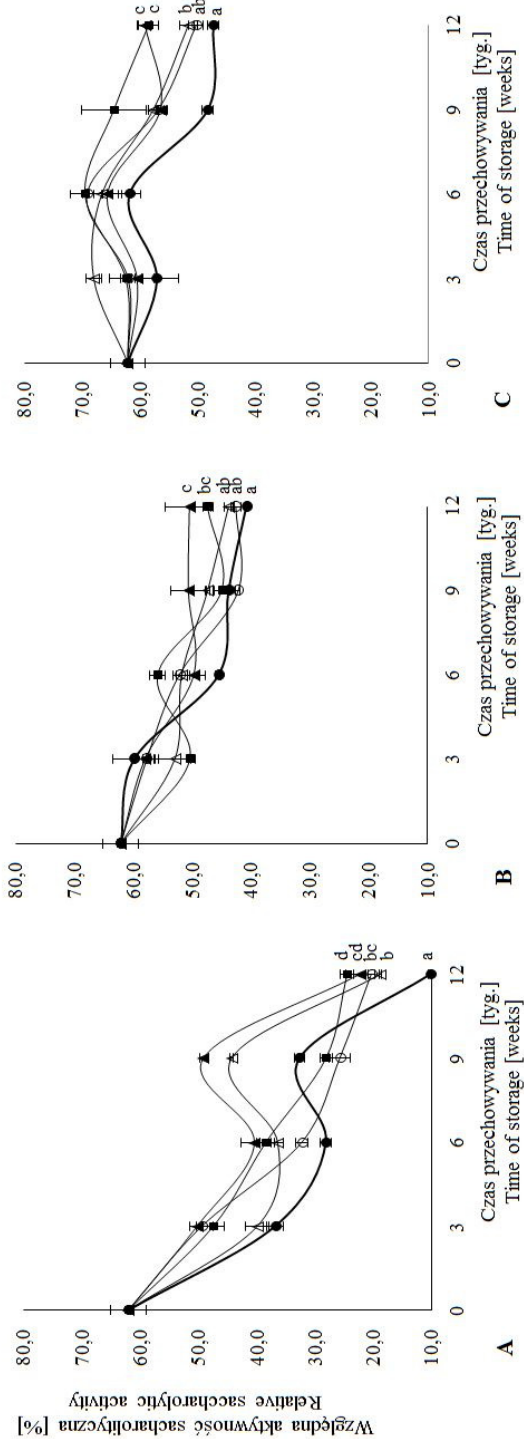
Próbki przechowywane w opakowaniach charakteryzowały się zmniejszonym chłonięciem wody w porównaniu z próbkami kontrolnymi, a intensywność zmian zawartości suchej substancji zależała od rodzaju opakowania oraz temperatury przechowywania. Różnice w zmianach zawartości suchej substancji pomiędzy próbkami przechowanymi w różnych opakowaniach były najbardziej widoczne w przypadku temperatury 25°C, w której wszystkie różnice pomiędzy zawartościami suchej substancji były istotne statystycznie i każda próbka znalazła się w odrębnej grupie jednorodnej. Opakowania o wysokiej barierowości (PETmet/PE i PET/AL/PE) pozwoliły na znaczne ograniczenie chłonięcia wody, utrzymując zawartość suchej substancji w próbkach na poziomie 96,9 i 99,5% po 12 tygodniach przechowywania. Próbki przechowywane w opakowaniach o niższej barierowości (OPP i PET/PE) charakteryzowały się znacznie większym zmniejszeniem zawartości suchej substancji, odpowiednio do wartości 93,1 i 95,0%, niższym jednak niż próbki kontrolne przechowywane z wolnym dostępem powietrza. Przechowywanie w obniżonych temperaturach (4 i -18°C) wpłynęło na znaczne zmniejszenie różnic w ilości wchłoniętej wody pomiędzy próbkami w różnych w opakowaniach. W obu temperaturach największe chłonięcie wody (poza próbą kontrolną z wolnym dostępem powietrza, która stanowiła odrębną grupę jednorodną o najniższej zawartości suchej substancji) zanotowano w przypadku zastosowania opakowania z OPP o najmniejszej barierowości do zawartości suchej substancji 97,9% (4°C) i 96,8% (-18°C). Zawartość suchej substancji w próbkach przechowywanych w pozostałych opakowaniach utrzymywała się na zbliżonym poziomie jak w próbkach bezpośrednio po suszeniu. We wszystkich temperaturach najlepszą barierowością względem pary wodnej wykazały się próbki przechowywane w opakowaniu PET/AL/PE, stanowiły one odrębne grupy jednorodne o zawartości suchej substancji, najbardziej zbliżonej do wartości zanotowanej bezpośrednio po suszeniu.

Zmiany **aktywności sacharolitycznej** drożdży suszonych sublimacyjnie (wyrażonej jako aktywność względna w stosunku do drożdży świeżych przed suszeniem) w czasie 12 tygodni przechowywania, w zależności od temperatury przechowywania i rodzaju zastosowanego opakowania, przedstawiono na rysunku 2. Niezależnie od temperatury przechowywania największymi zmianami aktywności sacharolitycznej charakteryzowały się próbki przechowywane z wolnym dostępem powietrza, które stanowiły w każdej temperaturze odrębną grupę jednorodną o najniższej aktywności sacharolitycznej. W temperaturze 25°C aktywność sacharolityczna drożdży po 12 tygodniach przechowywania wynosiła zaledwie 17% wartości zanotowanej po suszeniu. Obniżenie temperatury przechowywania do 4°C pozwoliło na zwiększenie tej wartości do 66%, a po zastosowaniu temperatury -18°C po 12 tygodniach przechowywania aktywność wynosiła 76% wartości zanotowanej po suszeniu. Drożdże przechowywane w opakowaniach charakteryzowały się znacznie lepszym zachowaniem aktywności po przechowywaniu, a różnica między aktywnością drożdży opakowanych i przechowywanych z wolnym dostępem powietrza była największa w przypadku przechowywania w 25°C.



Rys. 1. Zawartość suchej substancji w drożdżach *Saccharomyces cerevisiae* suszonych sublimacyjnie z dodatkiem 8% maltodekstryny po 12 tygodniach przechowywania w temperaturze 25°C (A), 4°C (B), -18°C (C) w opakowaniach z: OPP(○), PET/PE(△), PETmet/PE(▲), PET/AL/PE(■), próba kontrolna przechowywana z wolnym dostępem powietrza (●), wartości średnie oznaczone tą samą literą (od a do e) nie różniły się statystycznie istotnie (P-value 0,05)

Fig. 1. Dry matter content in baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* freeze-dried with the addition of 8% maltodextrin after 12 weeks of storage at 25°C (A), 4°C (B), -18°C (C), packed in OPP(○), PET/PE(△), PETmet/PE(▲), PET/AL/PE(■), mean values followed by a different letter (from a to e) were significantly different at P<0.05



Rys. 2. Względna aktywność sacharolityczna drożdży piekarskich *Saccharomyces cerevisiae* suszonych sublimacyjnie z dodatkiem 8% maltodekstryny po 12 tygodniach przechowywania w temperaturze 25°C (A), 4°C (B), -18°C (C) w opakowaniach z: OPP(○), PET/PE(Δ), PETmet/PE(▲), PET/AL/PE(■), próba kontrolna przechowywana z wolnym dostępem powietrza (●), wartości średnie oznaczone tą samą literą (od a do d) nie różniły się statystycznie istotnie (P-value 0,05)

Fig. 2. Relative saccharolytic activity of baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* freeze-dried with the addition of 8% maltodextrin after 12 weeks of storage at 25°C (A), 4°C (B), -18°C (C), packed in OPP(○), PET/PE(Δ), PETmet/PE(▲), PET/AL/PE(■), mean values followed by a different letter (from a to d) were significantly different at P<0.05

Meng i in. [2008] stwierdzili, że żywotność bakterii probiotycznych suszonych sublimacyjnie w czasie przechowywania jest odwrotnie proporcjonalna do temperatury przechowywania, a według Bruno i Shah [2003] temperaturą optymalną do przechowywania suszonych sublimacyjnie bakterii probiotycznych jest  $-18^{\circ}\text{C}$ .

Aktywność drożdży po przechowywaniu zależała znacząco od rodzaju zastosowanych opakowań. Opakowania o wysokiej barierowości (PETmet/PE i PET/AL/PE) pozwoliły na lepsze zachowanie aktywności sacharolitycznej drożdży niż opakowania o większej przepuszczalności dla wody i tlenu (OPP i PET/PE). W temperaturze  $4^{\circ}\text{C}$  zastosowanie laminatu metalizowanego PETmet/PE pozwoliło na utrzymanie aktywności drożdży na poziomie 81% wartości uzyskanej po suszeniu, a w przypadku laminatu trójwarstwowego PET/AL/PE wartość ta wynosiła 76%. Obniżenie temperatury przechowywania do  $-18^{\circ}\text{C}$  pozwoliło na dalsze polepszenie zachowania aktywności po 12 tygodniach przechowywania do poziomów odpowiednio 95 i 94%.

Jedną z przyczyn obniżania aktywności sacharolitycznej suszonych drożdży oraz innych mikroorganizmów w czasie przechowywania jest niekorzystny wpływ wzrostu zawartości wody w suszach wynikający z ich właściwości higroskopijnych. Ilość wody w suszonym materiale wpływa na szybkość utraty żywotności i aktywności suszonych mikroorganizmów, gdyż zależy od niej szybkość zachodzenia przemian chemicznych i enzymatycznych [Zayed, Ross 2004]. Porównując zmiany zawartości suchej substancji w suszonych drożdżach ze zmianami ich aktywności sacharolitycznej w czasie przechowywania, można stwierdzić, że ogólnie istniała zależność pomiędzy wzrostem zawartości wody a obniżaniem się aktywności sacharolitycznej drożdży. Jednakże, w niektórych przypadkach aktywność drożdży w czasie przechowywania obniżała się pomimo utrzymywania zawartości suchej substancji na wysokim poziomie, co można zaobserwować np. w przypadku drożdży przechowywanych w opakowaniach PETmet/PE i PET/AL/PE w  $25^{\circ}\text{C}$ . Przechowywanie w tak wysokiej temperaturze było niekorzystne mimo zastosowania wysoce barierowych opakowań.

Porównując zawartość suchej substancji w suszach z aktywnością sacharolityczną drożdży przechowywanych w temperaturze  $4$  i  $-18^{\circ}\text{C}$  w opakowaniach PET/PE, PETmet/PE i PET/AL/PE, widoczny jest również istotniejszy wpływ temperatury przechowywania niż zawartości wody w suszach na utrzymanie aktywności sacharolitycznej drożdży. Próbkę te miały bardzo zbliżone zawartości suchej substancji po 12 tygodniach przechowywania w obydwu temperaturach, jednakże te przechowywane w temperaturze  $-18^{\circ}\text{C}$  charakteryzowały się wyższą aktywnością sacharolityczną. Świadczy to o znacznie silniejszym zahamowaniu niekorzystnych przemian prowadzących do utraty aktywności w temperaturze obniżonej poniżej  $0^{\circ}\text{C}$ .

Należy również zauważyć, że opakowania mniej barierowe w stosunku do wody wykazywały również mniejszą barierowość w stosunku do tlenu (tab. 1), co również mogło być przyczyną obniżania aktywności w czasie przechowywania, gdyż natlenienie suszonych mikroorganizmów powoduje wówczas powolną utratę ich biologicznej aktywności [Bozoglu i in. 1987, Sobczak 1988].

## WNIOSKI

1. Metodą sublimacyjną można otrzymać suszone drożdże piekarskie *S. cerevisiae* o aktywności sacharolitycznej stabilnej w czasie przechowywania, pod warunkiem zastosowania odpowiednich parametrów przechowywania.
2. Temperatura przechowywania oraz rodzaj zastosowanego opakowania wpływają na zmiany aktywności sacharolitycznej drożdży suszonych w czasie przechowywania.
3. Suszone drożdże piekarskie powinny być przechowywane w warunkach chłodniczych lub zamrażalniczych w opakowaniach o wysokiej barierowości.
4. W celu utrzymania aktywności sacharolitycznej drożdży suszonych po 12 tygodniach przechowywania na poziomie co najmniej 80% aktywności po suszeniu należy przechowywać je w temperaturze 4°C w opakowaniu o wysokiej barierowości względem tlenu i wody (PETmet/PE) lub w temperaturze -18°C w dowolnym opakowaniu.
5. Aby zapewnić utrzymanie ponad 90% aktywności po 12 tygodniach przechowywania, konieczne jest przechowywanie w wysoce barierowych opakowaniach (PETmet/PE lub PET/AL/PE) w temperaturze -18°C.

## PIŚMIENNICTWO

- Bayrock, D., Ingledew, W.M., 1997a. Fluidized bed drying of baker's yeast: Moisture levels, drying rates, and viability changes during drying. *Food Res. Int.*, 30, 407–415.
- Bayrock, D., Ingledew, W.M., 1997b. Mechanism of viability loss during fluidized bed drying of baker's yeast. *Food Res. Int.*, 30, 417–425.
- Bozoglu, T.F., Ozilgen, M., Bakir, U., 1987. Survival kinetics of lactic acid starter cultures during and after freeze drying. *Enzyme Microb. Technol.*, 9, 531–537.
- Bruno F.A., Shah N.P., 2003. Viability of two freeze-dried strains of *Bifidobacterium* and commercial preparations at various temperatures during prolonged storage. *Food Microb. Safety*, 68, 2336–2339.
- Cerutti P., Segovia de Huergo M., Galvagno M., Schebor C. Pilar Buera M., 2000. Commercial baker's yeast stability as affected by intracellular content of trehalose, dehydration procedure and the physical properties of external matrices. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 54 (4), 575–580.
- Costa E., Usall J., Teixido N., Torres R., Vinas I., 2002. Effect of package and storage conditions on viability and efficacy of the freeze-dried biocontrol agent *Pantoea agglomerans* strain CPA-2. *J. Appl. Microbiol.*, 92, 873–878.
- Guzhova I., Krallish I., Khroustalyova G., Margulis B., Rapoport A., 2008. Dehydration of yeast: Changes in the intracellular content of Hsp70 family proteins. *Process Biochem.*, 43, 1138–1141.
- Lodato P., Segovia M., Buera M.P., 1999. Viability and thermal stability of a strain of *Saccharomyces cerevisiae* freeze-dried in different sugar and polymer matrices. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 52, 215–220.
- Meng X.C., Stanton C., Fitzgerald G.F., Daly C., Ross R.P., 2008. Anhydrobiotics: The challenges of drying probiotic cultures. *Food Chem.*, 106, 1406–1416.
- Miyamoto-Shinohara Y., Imaizumi T., Sukenobe J., Murakami Y., Kawamura S., Komatsu Y., 2000. Survival rate of microbes after freeze-drying and long-term storage. *Cryobiol.*, 41, 251–255.
- Morgan C.A., Herman N., White P.A., Vesey G., 2006. Preservation of microorganisms by drying; a review. *J. Microb. Meth.*, 66, 183–193.
- Pasławska M., 2006. Aktywność drożdży *Saccharomyces cerevisiae* liofilizowanych z dodatkiem wybranych substancji ochronnych. *Inż. Roln.*, 4 (79), 65–73.



- Pasławska M., Peroń S., Nejman M., 2006. Wykorzystanie metody suszenia w złożu fontannowym do utrwalania drożdży unieruchomionych w matrycy alginianu. *Inż. Roln.*, 12(87), 409–416.
- Pasławska M., 2008. Wpływ temperatury suszenia fontannowego na kinetykę odwadniania i żywotność drożdży. *Inż. Roln.*, 5(103), 161–166.
- Samborska K., Drzazga A., 2011. Wpływ dodatków stabilizujących na aktywność sacharolityczną drożdży piekarskich *Saccharomyces cerevisiae* w czasie suszenia sublimacyjnego oraz przechowywania. *Acta Sci. Pol. Biotechnol.*, 10 (3), 5–14.
- Sobczak E., 1988. Wpływ niektórych czynników na aktywność suszonych drożdży piekarskich. *Przem. Ferm Owoc.-Warz.*, 4, 4–7.
- Sobczak E., Gniewosz M., Raczyńska A., 1997. Biotechnologiczne aspekty hodowli i suszenia drożdży piekarskich. *Przem. Ferm Owoc.-Warz.*, 10, 32–35.
- Tsaousi K., Dimitrellou D., Koutinas A.A., 2008. Low-temperature thermal drying of *Saccharomyces cerevisiae* starter culture for food production. *Food Chem.*, 110, 547–553.
- Turker M., Kanarya A., Yuzgec U., Kapucu H., Senalp Z., 2006. Drying of baker's yeast in batch fluidized bed. *Chem. Eng. Proc.*, 45, 1019–1028.
- Zayed, G., Roos, Y.H. (2004). Influence of trehalose and moisture content on survival of *Lactobacillus salivarius* subjected to freeze drying and storage. *Process Biochem.*, 39, 1081–1086.

#### THE EFFECT OF STORAGE ON THE SACCHAROLYTIC ACTIVITY OF FREEZE-DRIED BAKER'S YEAST *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

**Abstract.** The influence of temperature and type of packaging material on the saccharolytic activity of freeze-dried yeast *Saccharomyces cerevisiae* during storage was investigated. Yeast's after mixing with maltodextrin (8%, used as a protective substance), were frozen at -30°C and dried at 40°C /0.63 mbar for 20 h. Dried samples were stored at -18, 4 and 25°C in high (PETmet/PE, PET/AL/PE) and low (PET/PE, OPP) barrier bags. It was found that in order to remain at least 80% of the saccharolytic activity of dried yeast's after 12 weeks, compared to the activity after drying, it is necessary to store them at 4°C in the bags with a high barrier against oxygen and water (PETmet/PE) or at -18°C in any package. To ensure the maintenance of over 90% of the activity is necessary to use the high-barrier packaging (PETmet/PE or PET/AL/PE) and storage temperature -18°C.

**Key words:** bakers yeast's, freeze-drying, saccharolytic activity, storage

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 30.06.2012

Do cytowania – For citation: Samborska K., Drzazga A., 2012. Wpływ warunków przechowywania na aktywność sacharolityczną drożdży *Saccharomyces cerevisiae* suszonych sublimacyjnie. *Acta Sci. Pol. Biotechnol.*, 11 (2), 17–26.



## COMPARISON OF LIPOLYTIC ACTIVITY OF YEAST STRAINS ISOLATED FROM ROKPOL CHEESE

Marek Szołtysik, Piotr Juszczyk, Agata Czajgucka, Barbara Żarowska, Anna Dąbrowska, Xymena Połomska, Konrad Babij, Maria Wojtatowicz, Józefa Chrzanowska

Faculty of Food Science, Wrocław University of Environmental and Life Sciences

**Abstract.** Lipolytic activity of seven yeast strains: *Candida famata* MI1a, *C. intermedia* BI2a, *C. kefyr* PII1b, *C. sphaerica* FII7a, *Geotrichum penicillatum* EII6a, *Saccharomyces kluyveri* BII3a and *Yarrowia lipolytica* PII6a was investigated. These strains representing yeast species occurring in mould cheese Rokpol are potential cheese co-starters. The extra and intracellular lipolytic activity of the yeast was analyzed against tributyrine and p-nitrophenyl derivatives of fatty acids. Also their ability to hydrolyze bovine milk fat was assayed. It was shown that generally activity of extracellular yeast lipases were higher than of intracellular enzymes. The most lipolytic were strains *Y. lipolytica* PII6a and *C. sphaerica* FII7a, which preferentially hydrolyzed butyrate p-nitrophenyl derivative and release the highest amounts of oleic acid from milk fat.

**Key words:** yeast, lipases, synthetic substrates, milk fat, hydrolysis, Rokpol cheese

### INTRODUCTION

Many yeasts occurring in cheeses as non starter microflora have been reported to produce lipolytic enzymes. Among them genera of *Candida*, *Rhodotorula*, *Pichia*, *Torulopsis*, *Geotrichum* and *Yarrowia* are characterised by especially high lipolytic activity [Hadeball 1991, Roostita, Fleet 1996, Jakobsen, Narvhus 1996, Corzo, Revah 1999, Suzzi et al. 2001, Juszczyk et al. 2005, Cholet et al. 2007]. During cheese ripening lipases are involved in triacylglycerols (TGA) hydrolysis and liberation of free fatty acids, which may directly affect development of characteristic flavor or become precursors of aroma com-

---

© Copyright by Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Corresponding author – Adres do korespondencji: Szołtysik M., Department of Animal Products Technology and Quality Management Wrocław University of Environmental and Life Sciences, ul. Chełmońskiego 37/41, 51-640 Wrocław, Poland; tel. (48 71) 3207 775; e-mail: kort@o2.pl

pounds of these products [Stead 1986, Ferreira, Viljoen 2003]. In blue and Italian cheeses yeast of *Candida*, *Debaryomyces* and *Rhodotorula* play an important role in development of their piquancy which is due primarily to short chain fatty acids release [Tomasini et al. 1993, Collins et al. 2003].

Lipases derived from different species and strains differ in specificity for liberation fatty acids from milk fat [Hou 1997, De Freitas et al. 2009].

Extracellular lipases of *G. candidum* possess unique specificity for cis-9-unsaturated fatty acids [Bertolini et al. 1994]. Similar to those enzymes are lipases of *C. curvata*, which preferentially split from TGA unsaturated fatty acids [Gripon et al. 1991]. Lipases of another yeast *Torulopsis* spp. appeared to be specific for short chain fatty acids, while enzymes of *C. mycoderma* hydrolyze fatty acids containing 12–16 carbon atoms in chain [Hadeball 1991]. Lipases of *C. valida* and *D. hansenii* responsible also for lipolysis in smear cheese Limburger release mainly of lauric and myristic acids [Stead 1986]. Some yeast lipases exhibit the high degree of positional specificity. Hou [1997] investigated 25 yeast lipases with respect to their positional specificity against triacylglycerols and showed that 19 of them revealed 1,3-positional specificity. However majority of yeast lipases hydrolyse TGA without specificity both in attacked position at the glycerol molecule and in the nature of fatty acid [Hou 1997, Vakhlu, Kour 2006]. In recent years an increasing demand for lipolytic enzymes of a definite substrate specificity has been observed. These enzymes are commonly used in food industry, especially for the production of specific flavor and aroma compounds, inter-esterification of fats and production of modified acyloglycerols [Ghosh et al. 1996, Pandey et al. 1999, Vakhlu, Kour 2006, Aravindan et al. 2007, Kontkanen et al. 2011].

Yeasts characterised by high lipolytic activity are potential adjunct cultures for cheese production, what may result in acceleration of ripening process as well as improving of cheese organoleptic properties. Selected strains of yeast like *D. hansenii*, *Y. lipolytica*, *G. candidum* and also *Saccharomyces cerevisiae* were used as starters for soft cheeses due to their protein and fat catabolism [Devoyod 1990, Addis et al. 1999, Vannini et al. 1999, Van Tempel, Jakobsen 2000, Ferreira, Viljoen 2003, De Wit et al. 2005].

The aim of this study was to evaluate lipolytic activity of yeast strains representing species occurring in mould cheese Rokpol, what may allow to select among them the most promising cheese co-starters or source of lipolytic enzymes for dairy industry.

## MATERIAL AND METHODS

**Microorganisms:** Seven strains belonging to seven yeast species occurring in Rokpol cheese: *Candida famata* MI1a, *C. intermedia* BI2a, *C. kefir* PII1b, *C. sphaerica* FII7a, *Geotrichum penicillatum* EII6a, *Saccharomyces kluyveri* BII3a and *Yarrowia lipolytica* PII6a [Wojtatowicz et al. 2001] were tested. Strains were obtained from the Collection of the Department of Biotechnology and Food Microbiology of Wrocław University of Environmental and Life Sciences. Yeasts were stored at +4°C on YM agar composed of (g/L): glucose (POCH) (10); bacto peptone (Difco) (5); yeast extract (Difco) (3); malt extract (Difco) (3) and agar (15).

**Growth media and culture conditions:** Strains were grown in YCG medium composed of (g/l): yeast extract (1.7), casein (2) and glucose (10). The medium after sterilisation

(at 121°C for 15 min) was inoculated with 1% (v/v) of seed culture. The cultures (50 ml) were performed in 250-ml Erlenmeyer flasks at 28°C for 48 h.

The seed culture of yeasts (25 ml) were carried out in flasks (100 ml) incubated at 28°C on a rotary shaker (160 rpm) for 24 hours in the medium containing (g x l<sup>-1</sup>): yeast extract (3), malt extract (3), bacto peptone (5), glucose (10).

Preparation of enzyme extracts of yeast: The yeast cultures were centrifuged at 7000 g for 15 min. at 4°C. Supernatants, after filtration (0.45 µm), were used for extracellular activity determinations. Cell pellets were washed twice with 50 mM phosphate buffer, at pH 7.0, resuspended in 10 ml of the same buffer and sonificated at 4°C in an ultrasonic desintegrator VD-11 (Techpan, P1) for 8 minutes with 1 min intervals after each minute of sonification. After centrifugation at 15 000 g for 20 min at 4°C, the cell free extracts were filtered (0.45 µm) and used for intracellular activity determinations.

Protein determination: Protein content was determined according to method of Lowry et. al. [1951] using bovine serum albumin (Sigma, USA) as standard.

Enzyme assay: The lipolytic activity of enzyme extracts separated from cultures of each yeast strain was assayed by plate diffusion method using as substrate 1% tributyrin (Sigma). To quantify the activity, 5-mm-diameter wells were punched and filled with 0.1 ml of yeast enzyme extracts. Plates were incubated at 37°C and the diameter of the clearing zones was measured after 72 hours. The tests were carried out in triplicates and the data are presented as average values. The activity was calculated from standard curve prepared for lipase of *Candida cylindracea* (Sigma) (of standard activity 5390 U·mg<sup>-1</sup>) [Sztajer et al. 1988]. The one unit of lipolytic activity was expressed as 1 mm of clearing diffusion zone against a darker background.

Lipolytic activity was determined also spectrophotometrically by monitoring hydrolysis of p-nitrophenyl (p-NP) derivatives of fatty acids: butyric, caproic, caprylic, capric, lauric and stearic, according to Pereira-Meirelles et al. [1997]. Activity of lipases was expressed in units, where one unit was defined as µmole of p-nitrophenol released from substrate per minute, per mg of protein.

Milk fat degradation by yeast lipases was investigated according to Kamaly et al. [1990]. Reaction mixture contained 4 ml of yeast enzyme extract, 4 ml of milk fat emulsion (1g of milk fat in 2% (w/v) polyvinyl alcohol (Sigma) and 8 ml of 0,02 M phosphate buffer pH 7.0. The reaction mixture was incubated at 37°C for 72 hours in shaking water bath. In control enzyme extracts before addition to reaction mixtures were heated at 100°C for 10 min.

After incubation free fatty acids (FFA) were isolated according to Deeth et al. [1983]. The FFAs were determined by gas chromatography method using Agilent Technologies 6890N Network GC System equipped with mass detector (Agilent Technologies 5973 inert Mass Selective Detector). The analysis was performed on the Agilent DB-225MS capillary column (60 m · 250 µm · 0,25 µm). Injector operating conditions: 240°C. Temperature increased from 60°C (5 min) until 240°C at 4°C · min<sup>-1</sup>. Velocity of carrier gas (helium) was 2.0 ml · min<sup>-1</sup> and the split flow ratio was 100:1 for the entire study. The peaks were identified and quantified by reference to FFA standards (prepared in diethyl ether containing formic acid). The relative fatty acids composition was estimated as a percentage of the total peak area.

Statistical analysis: the data were analysed statistically using Statistica AGXP V.5.5. The mean values with standard deviations are reported.

## RESULTS AND DISCUSSION

Extra and intracellular lipolytic activities of seven yeast strains: *C. famata* MI1a, *C. intermedia* BI2a, *C. kefyry* PII1b, *C. sphaerica* FII7a, *G. penicillatum* EII6a, *S. kluyveri* BII3a and *Y. lipolytica* PII6a, isolated from Polish mould cheese Rokpol [Wojtatowicz et al. 2001], were investigated on both synthetic and natural substrates.

Results of yeasts lipolytic activity determinations against synthetic substrate tributyrin are shown in Table 1. A diffusion test with tributyrin showed that extracellular lipases of tested yeasts strains, except that of *C. sphaerica* FII7a, exhibited higher activity than intracellular enzymes. Similar results with yeast lipases were reported also by Adamczak, Bednarski [1996]. The activity of extracellular lipases was in range from 21 to 90 U·mg<sup>-1</sup>, while activity of intracellular enzymes ranged from 15 to 78 U·mg<sup>-1</sup>. The highest lipolytic activity was exhibited by the strain of *Y. lipolytica* PII6a. On the other hand, the strain MI1a of *C. famata*, predominant species in yeast microflora of Rokpol cheese [Wojtatowicz et al. 2001], produced lipases of lowest activities of 21 and 15 U·mg<sup>-1</sup> for extra and intracellular enzymes, respectively. The results obtained by other authors [Hadeball 1991, Corzo, Revah 1999] also show that lipases produced by the strains of *Y. lipolytica*, exhibited high activities in relation to triacylglycerols (TGA), not only synthetic, such as tributyrin or tricaprylin, but also natural, e.g. those present in olive oil, soya oil, sunflower oil or rapeseed oil.

Table 1. Activity of extracellular and intracellular yeast lipases against tributyrin  
Tabela 1. Aktywność zewnętrz- i wewnętrzkomórkowych lipaz oznaczona wobec tributyriny

Yeast strains Szczep drożdży	Lipolytic activity [U/mg] – Aktywność lipolityczna	
	extracellular zewnętrzkomórkowa	intracellular wewnętrzkomórkowa
<i>C. famata</i> MI1a	21.0±3.0	15.0±2.0
<i>C. intermedia</i> BI2a	35.0±2.0	18.0±2.0
<i>C. kefyry</i> PII1b	53.0±3.0	48.0±3.0
<i>C. sphaerica</i> FII7a	66.0±2.0	78.0±4.0
<i>G. penicillatum</i> EII6a	56.0±2.0	47.0±2.0
<i>S. kluyveri</i> BII3a	49.0±3.0	48.0±3.0
<i>Y. lipolytica</i> PII6a	90.0±5.0	78.0±4.0

Activity of extra and intracellular yeast lipases was also measured spectrophotometrically against p-NP derivatives of fatty acids: butyric, caproic, caprylic, capric, lauric and stearic. Level of this activity varied depending on the source of enzyme. Extracellular lipases of *C. intermedia* BI2a and *Y. lipolytica* PII6a preferably hydrolyzed p-NP derivative of butyrate, but the enzymes of *Y. lipolytica* showed three times higher activity (148,9 U·mg<sup>-1</sup>) with this substrate than the former strain (Table 2). Stearate p-NP was another good substrate for extracellular enzymes of the yeast strains under study. However the activity depending on yeast strain ranged from 31.9 U·mg<sup>-1</sup> (*C. intermedia* BI2a) to 127.3 U·mg<sup>-1</sup> (*Y. lipolytica* PII6a). In contrast, caprilate p-NP proved to be the best substrate (41.1 U·mg<sup>-1</sup>) for extracellular lipases synthesized by the strain of *C. kefyry* PII1b (Table 2).

Table 2. Activity of extracellular yeast lipases against p-NP fatty acids derivatives  
Tabela 2. Aktywność zewnątrzkomórkowych lipaz oznaczona wobec p-NP pochodnych kwasów tłuszczowych

Yeast strains Szczep drożdży	Lipolytic activity [U/mg] – Aktywność lipolityczna					
	butyrate p-NP maślan	caproate p-NP kapronian	caprylate p-NP kaprylan	caprate p-NP kaprynian	laurate p-NP laurynian	stearate p-NP stearynian
<i>C. famata</i> MI1a	31.7±2.1	22.8±2.0	29.6±2.3	22.8±1.8	33.8±3.1	36.9±2.7
<i>C. intermedia</i> BI2a	39.4±2.4	33.8±3.1	29.4±1.8	25.9±1.6	26.9±2.7	31.9±2.2
<i>C. kefyri</i> PII1b	40.9±3.1	37.2±2.7	41.1±3.2	32.8±2.7	40.6±4.1	35.3±3.6
<i>C. sphaerica</i> FII7a	59.2±2.8	80.1±4.8	44.1±3.3	48.9±3.7	45.8±3.5	98.3±4.3
<i>G. penicillatum</i> EII6a	66.2±3.6	48.3±2.5	42.8±2.9	49.4±3.3	57.2±4.8	78.4±4.1
<i>S. kluyveri</i> BII3a	48.9±2.8	47.2±3.5	35.8±2.7	37.4±3.0	38.9±2.7	54.8±2.2
<i>Y. lipolytica</i> PII6a	148.9±4.1	117.8±4.7	91.3±3.8	87.4±4.2	85.7±4.2	127.3±5.3

Intracellular lipase activities of the yeast strains on all the substrates under studies were slightly lower than those of extracellular enzymes (Table 3). Lipases of *C. famata* MI1a, *C. sphaerica* FII7a, *G. penicillatum* EII6a and *S. kluyveri* BII3a, similarly to their extracellular enzymes, showed the greatest activity against stearate p-NP. The activities of enzymes of yeast of *C. sphaerica* FII7a and *G. penicillatum* EII6a against this substrate were 77.9 U·mg<sup>-1</sup> and 66.9 U·mg<sup>-1</sup>, while those observed with the enzymes of *S. kluyveri* BII3a and *C. famata* MI1a, were 49.2 U·mg<sup>-1</sup> and 34.1 U·mg<sup>-1</sup>, respectively. Caproate p-NP was the best substrate for intracellular yeast lipases of *C. intermedia* BI2a (32.6 U·mg<sup>-1</sup>), while laurate p-NP was the best for strain *C. kefyri* PII1b (38.7 U·mg<sup>-1</sup>). Intracellular lipolytic activity of *Y. lipolytica* PII6a was the highest against butyrate (121.4 U·mg<sup>-1</sup>) followed by stearate (118.9 U·mg<sup>-1</sup>) and caproate p-NP derivatives (112.4 U·mg<sup>-1</sup>) (Table 3). In general lipolytic activity of this strain comparing to other yeasts was the highest on all synthetic substrates used in the study.

Table 3. Activity of intracellular yeast lipases against p-NP fatty acids derivatives  
Tabela 3. Aktywność wewnątrzkomórkowych lipaz oznaczona wobec p-NP pochodnych kwasów tłuszczowych

Yeast strains Szczep drożdży	Lipolytic activity [U/mg] – Aktywność lipolityczna					
	butyrate p-NP maślan	caproate p-NP kapronian	caprylate p-NP kaprylan	caprate p-NP kaprynian	laurate p-NP laurynian	stearate p-NP stearynian
<i>C. famata</i> MI1a	28.1±1.8	26.9±1.6	25.9±2.5	20.1±2.5	30.5±3.0	34.1±2.8
<i>C. intermedia</i> BI2a	30.6±2.4	32.6±2.2	27.8±2.3	19.1±1.6	23.4±1.8	26.1±1.7
<i>C. kefyri</i> PII1b	32.6±3.1	35.3±2.6	37.5±3.1	30.1±2.9	38.7±3.3	33.1±2.2
<i>C. sphaerica</i> FII7a	68.4±4.1	63.1±3.8	52.1±4.5	47.7±3.2	65.8±4.5	77.9±5.5
<i>G. penicillatum</i> EII6a	57.8±4.7	50.8±3.1	44.9±3.5	46.8±3.4	51.8±3.8	66.9±4.8
<i>S. kluyveri</i> BII3a	44.1±3.8	45.8±4.1	40.0±3.8	33.1±3.0	37.8±2.8	49.2±3.1
<i>Y. lipolytica</i> PII6a	121.4±5.1	112.4±5.2	87.3±6.1	82.1±5.4	84.0±5.2	118.9±5.8

The activity of extra and intracellular lipases of tested yeast strains was also evaluated on milk fat. In many studies it was shown that emulsions of this fat are useful model substrates for investigating the action of lipolytic enzymes involved in cheese flavor development during ripening process [Kamaly et al. 1990, Tomasini et al. 1993, Regado et al. 2007, Kontkanen et al. 2011]. The release of free fatty acids from milk fat was analyzed after 72 h incubation of enzymes with this substrate (Fig. 1). The highest degree of milk fat degradation was observed with lipases of *Y. lipolytica* PII6a. The quantities of fatty acids released by extra and intracellular enzymes of this strain were 421.5 mg·100 g<sup>-1</sup> and 457.3 mg·100 g<sup>-1</sup> of milk fat, respectively (Fig. 1). Other authors [Faid et al. 1992, Roostita, Fleet 1996, Van Tempel, Jakobsen 2000] also reported high lipolytic activity against milk fat of *Y. lipolytica* strains originating from cheese or other dairy products.

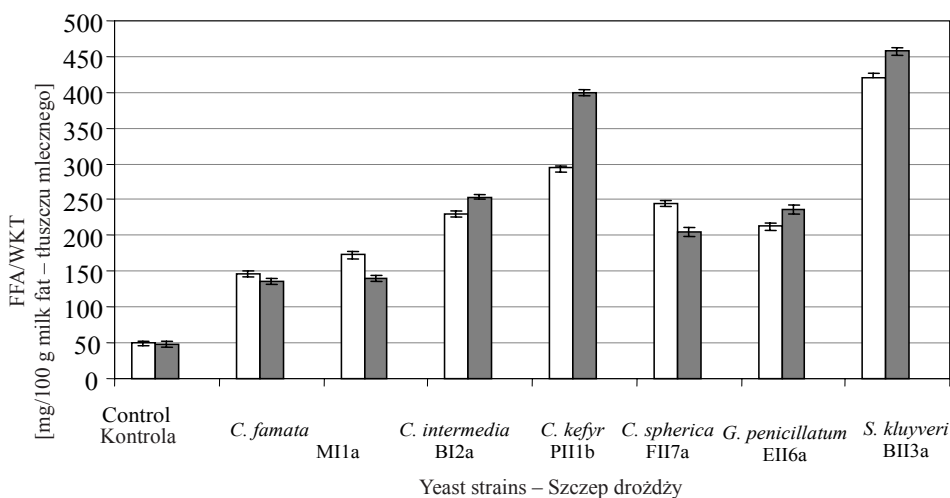


Fig. 1. Content of free fatty acids released by extracellular (□) and intracellular (■) yeast lipases (mg/100 g of fat)

Rys. 1. Zawartość wolnych kwasów tłuszczowych uwolnionych przez zewnątrz- (□) i wewnątrzkomórkowe (■) lipazy drożdżowe (mg/100 g tłuszczu)

Lipases of the other yeast strains hydrolyzed milk fat to a lower extent. The use of extracellular and intracellular lipases of *C. sphaerica* FII7a, *S. kluyveri* BII3a, *C. kefyry* PII1b and *G. penicillatum* EII6 resulted in fatty acid release from this substrate within the range of 212.9–294.2 mg·100 g<sup>-1</sup>, and 254.0–399.9 mg·100 g<sup>-1</sup>, respectively. The lowest efficiency of milk fat degradation was observed with yeast enzymes of *C. intermedia* BI2a and *C. famata* MI1a. Their extracellular and intracellular lipases released from milk fat 146.4–173.9 mg·100 g<sup>-1</sup> and 136.1–139.6 mg·100 g<sup>-1</sup> of fatty acids, respectively. The amount of FFAs in the control assay was 48.5–50.1 mg·100 g<sup>-1</sup> of milk fat. The results obtained in the study showed that activities of extracellular lipases were higher than intracellular enzymes of the strains belonging to the species of *C. famata*, *C. intermedia* and *G. penicillatum*. The activity of intracellular enzymes was higher than extracellular only for *C. sphaerica* FII7a.



Tables 4 and 5 show the results of chromatographic analysis of fatty acids released from milk fat with the use of yeast extra and intracellular lipases, respectively. The relative contents of each free fatty acids are presented.

Table 4. Relative contents of free fatty acids released from milk fat by extracellular yeast lipases [%]

Tabela 4. Względna zawartość wolnych kwasów tłuszczowych [%] uwolnionych z tłuszczu mlecznego przez zewnątrzkomórkowe lipazy

Yeast strains Szczip drożdży	Free fatty acids [%] – Wolne kwasy tłuszczowe									
	C <sub>4</sub>	C <sub>6</sub>	C <sub>8</sub>	C <sub>10</sub>	C <sub>12</sub>	C <sub>14</sub>	C <sub>16</sub>	C <sub>18:0</sub>	C <sub>18:1</sub>	C <sub>18:2</sub>
<i>C. famata</i> MI1a	0.16	0.25	0.52	4.75	9.55	14.35	11.56	12.13	34.69	12.04
<i>C. intermedia</i> BI2a	0.15	0.21	0.46	5.55	7.28	12.9	16.36	9.76	38.54	8.79
<i>C. kefir</i> PII1b	0.12	0.18	0.35	4.99	5.27	14.95	13.76	10.13	43.24	7.01
<i>C. sphaerica</i> FII7a	0.09	0.20	0.30	4.22	14.06	15.30	17.95	14.20	26.45	7.23
<i>G. penicillatum</i> EII6a	0.13	0.15	0.33	7.46	8.26	11.86	14.02	16.41	31.31	10.07
<i>S. kluyveri</i> BII3a	0.14	0.27	0.47	9.86	15.34	11.52	11.86	14.69	24.97	10.88
<i>Y. lipolytica</i> PII6a	0.10	0.18	0.28	4.48	8.48	14.52	19.05	13.59	30.75	8.57
Control – Kontrola	0.37	0.43	0.74	10.12	9.64	5.54	30.79	9.06	9.70	23.61

Table 5. Relative contents of free fatty acids released from milk fat by intracellular yeast lipases [%]

Tabela 5. Względna zawartość wolnych kwasów tłuszczowych [%] uwolnionych z tłuszczu mlecznego przez zewnątrzkomórkowe lipazy

Yeast strains Szczip drożdży	Free fatty acids [%] – Wolne kwasy tłuszczowe									
	C <sub>4</sub>	C <sub>6</sub>	C <sub>8</sub>	C <sub>10</sub>	C <sub>12</sub>	C <sub>14</sub>	C <sub>16</sub>	C <sub>18:0</sub>	C <sub>18:1</sub>	C <sub>18:2</sub>
<i>C. famata</i> MI1a	0.23	0.19	0.34	6.36	7.14	14.72	15.06	11.75	33.96	10.25
<i>C. intermedia</i> BI2a	0.28	0.20	0.49	6.25	5.48	15.20	15.72	10.80	38.96	6.62
<i>C. kefir</i> PII1b	0.18	0.22	0.30	11.83	10.78	15.67	14.50	12.63	30.76	3.13
<i>C. sphaerica</i> FII7a	0.08	0.06	0.31	8.10	9.06	17.97	19.52	17.18	21.75	5.97
<i>G. penicillatum</i> EII6a	0.20	0.19	0.31	4.70	4.89	17.77	14.51	13.53	32.75	11.15
<i>S. kluyveri</i> BII3a	0.07	0.15	0.30	6.68	8.51	11.05	14.37	19.84	25.30	13.73
<i>Y. lipolytica</i> PII6a	0.10	0.18	0.31	6.87	9.42	15.79	17.57	11.03	33.86	4.87
Control – Kontrola	0.37	0.42	0.74	10.10	9.62	5.42	30.64	9.09	9.75	23.85

Oleic acid (C<sub>18:1</sub>), which is preferentially esterified in milk TGA at *sn*-1 and *sn*-3 positions, was released in the largest quantities by extracellular lipases of all yeast strains under investigation (Table 3). After 72 h of hydrolysis, the content of this acid ranged from 24.97% (*S. kluyveri* BII3a) to 43.24% (*C. kefir* PII1b) of all FFAs released from TGA by these enzymes. At the same time, the content of this acid found in the control was 9.70%. Other authors [Suzzi et al. 2001, Geurzoni et al. 2001] showed also that oleic acid was the principal fatty acid released in butter inoculated with different strains of yeast *Y. lipolytica*. Earlier Hadeball [1991] reported that lipases of *Y. lipolytica* prevalently act on oleyl residues at positions 1 and 3 of the TGA.

Besides, all tested yeast lipases preferably released myristic acid (C<sub>14</sub>), which was found within the range of 11.52–14.95% as compared to 5.54% in the control. Higher affinity to lauric acid (C<sub>12</sub>) was observed only with the lipases of *S. kluyveri* BII3a and

*C. sphaerica* FII7a. Some extracellular lipases, e.g. those of *C. intermedia* BI2a, *C. kefyri* PIII1b, *C. sphaerica* FII7a and *Y. lipolytica* PII6a strains showed better abilities to release palmitic (C<sub>16</sub>) than stearic acid (C<sub>18</sub>).

Intracellular lipases of all yeast strains, similarly to extracellular enzymes, released the highest quantities of oleic acid (C<sub>18:1</sub>), which constituted 21.75 to 38.96% of all FFAs (Table 4). These enzymes liberated also high amount of palmitic acid (C<sub>16</sub>) (14.37 to 19.52%) and stearic acid (C<sub>18</sub>) (11.03 to 19.84%). On the other hand, all extracellular and intracellular lipases of investigated yeast strains released from milk fat very low quantities of short-chain fatty acids (C<sub>4</sub> to C<sub>10</sub>). These acids are responsible for the development of sharp and tangy flavor in cheese [Pandey et al. 1999]. They are located mainly at sn-3 position of TAG molecules. Many microbial lipases release preferentially fatty acids from this position of TAG, but there are only few reports on yeast lipases specific for short chain fatty acids [Hadeball 1991, Hou 1997, Regado et al. 2007]. Wyder et al. [1999] showed that during ripening of Raclette cheese inoculated with different species of yeast, *Y. lipolytica* led to the highest increase in n-butyric and n-caproic acids content. This yeast generally due to high lipolytic activity is the most promising as a ripening-accelerating agent improving the quality of cheese [Devoiyod 1990, Wyder et al. 1999]. However Ferreira, Viljoen [2003] showed that *Y. lipolytica* yeast when individually added as co-starter to Cheddar cheese contributed to the development of bitter flavors, but when it was added together with *D. hansenii* as part of starter culture, the cheese had good strong flavour even after reduced ripening period. On the other hand Lanciotti et al. [2005] evaluating suitability of four *Y. lipolytica* strains as cheese-ripening adjuncts concluded that each strain gave rise to different lipolytic patterns.

## CONCLUSION

Lipolytic enzymes both extracellular and intracellular of yeast strains originated from mould cheese Rokpol reveal differences in the level of their activity against synthetic substrates and milk fat. They also give rise to different patterns of fatty acids released from those substrates.

The most active were lipases of *Y. lipolytica* and *C. sphaerica*, preferentially releasing butyric and stearic acids from their p-nitrophenyl derivatives and oleic and palmitic acids from milk fat. Suitability of those yeast strains as adjunct cultures will be verified under real condition in cheese production.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was financially supported by the grant from the Polish Ministry of Science and Higher Education – by the State Committee for Scientific Research (KBN), the project number: 2 P06T 050 28.

**LITERATURE**

- Adamczak M., Bednarski W., 1996. Some factors affecting lipase production by yeasts and filamentous fungi. *Biotechnol. Letters*, 18, 115–1160.
- Addis E., Fleet G.H., Cox J.M., Kolak D., Leung T., 2001. The growth, properties and interactions of yeasts and bacteria associated with the maturation of Camembert and blu-veined cheese. *Int. J. Food Microbiol.*, 69, 25–36.
- Aravindan R., Anbumathi P., Viruthagiri T., 2007. Lipase applications in food industry. *Indian J. Biotechnol.*, 6, 141–158.
- Bertolini M.C., Laramée L., Thomas D.Y., Cygler M., Schrag J.D., Vernet T., 1994. Polymorphism in the lipase genes of *Geotrichum candidum* strains. *Europ. J. Biochem.*, 219, 119–125.
- Cholet O., Hénaut A., Casaregola S., Bonnarme P., 2007. Gene Expression and Biochemical Analysis of Cheese-Ripening Yeasts: Focus on Catabolism of L-Methionine, Lactate, and Lactose. *Appl. Environm. Microbiol.*, 73, 2561–2570.
- Collins Y.F., McSweeney P.L.H., Wilkinson M.G., 2003. Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. *Int. J. Food Microbiol.*, 13, 841–866.
- Corzo G., Revah S., 1999. Production and characteristics of the lipase from *Yarrowia lipolytica* 681. *Biores. Technol.*, 70, 173–180.
- Deeth H.C., Fitz-Gerald C.H., Snow A.J., 1983. A gas chromatographic method for quantitative determination of free fatty acids in milk and milk products. *J. Dairy Sci. Technol.*, 18, 230–233.
- De Freitas I., Pinon N., Maubois J-L., Lortal S.A., Thierry A., 2009. The addition of a cocktail of yeast species to Cantalet cheese changes bacterial survival and enhances aroma compound formation. *Int. J. Food Microbiol.*, 129, 37–42.
- De Wit M., Osthoff G., Viljoen B.C., Hugo A., 2005. A comparative study of lipolysis in Cheddar cheese and yeast-inoculated Cheddar cheeses during ripening. *Enz. Mikrob. Technol.*, 37, 606–616.
- Devoyod, J.J., 1990. Yeasts in cheese-making, [in:] *Yeast technology*, (eds.) J.F.T. Spencer, D.M. Spencer. Springer-Verlag.
- Faid, M., Touraibi, A., Tantaoui-Elaraki, A., Breton A., 1992. Characterization of yeasts and moulds isolated from Moroccan traditional butter. *Microbiol. Aliments Nutr.*, 10, 273–278.
- Ferreira A.D., Viljoen B.C., 2003. Yeasts as adjunct starters in matured Cheddar cheese. *Int. J. Food Microbiol.*, 86, 131–140.
- Guerzoni M.E., Lanciotti R., Vannini L., Galgano F., Favati F., Gardini F., Suzzi G., 2001. Variability of the lipolytic activity in *Yarrowia lipolytica* and its dependence on environmental conditions. *Int. J. Food Microbiol.*, 69, 79–89.
- Ghosh P.K., Saxena R.K., Gupta R., Yada R.P., Davidson V.S., 1996. Microbial lipases production and application. *Science Progress*, 79, 119–157.
- Gripon J.C., Monnet V., Lambert G., Desmazeaud M.J., 1991. Microbial enzymes in cheese ripening. *Food enzymology in cheese ripening*, vol.1 (eds.) P.F. Fox. Elsevier Science Publishers. Ltd.
- Hadeball W., 1991. Production of lipase by *Yarrowia lipolytica*. *Acta Biotechnol.*, 11, 159–167.
- Hou C.T., 1997. Characterization of new yeast lipases. *JAOCS*, 74, 1391–1394.
- Jakobsen M., Narvhus J., 1996. Yeasts and their possible beneficial and negative effects on the quality of dairy products. *Int. Dairy J.*, 6, 755–768.
- Juszczak P., Wojtatowicz M., Żarowska B., Chrzanowska J., Malicki A., 2005. Diversity of physiological and biochemical properties within yeast species occurring in Rokpol cheese. *Polish J. Food Nutrit. Sci.*, 14/55, 3, 257–261.
- Kamaly K.M., Takayama K., Marth E.H., 1990. Acylglycerol acylhydrolase (lipase) activities of *Streptococcus lactis*, *Streptococcus cremoris* and their mutants. *J. Dairy Sci.*, 73, 280–290.

- Kontkanen H., Rokka S., Kemppinen A., Miettinen H., Hellstrom J., Kruus K., Marnila P., Alatossava T., Korhonen H., 2011. Enzymatic and physical modification of milk fat. *Int. Dairy J.*, 21, 3–13.
- Lanciotti R., Vannini L., Lopez C.C., Gobbetti M., Guerzoni M.E., 2005. Evaluation of the ability of *Yarrowia lipolytica* to impart strain-dependent characteristics to cheese when used as a ripening adjunct. *Int. J. Dairy Technol.*, 58, 89–98.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J., 1951. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265–275.
- Pandey, A., Benjamin S., Soccol C.R., Nigam P., Krieger N., Soccol V.T., 1999. The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 29, 119–131.
- Pereira-Meirelles, F.V., Rocha-Leao M.H.M., Sant'Anna Jr. G.L., 1997. A stable lipase from *Candida lipolytica*: cultivation conditions and crude enzyme characteristics. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 63–65, 73–85.
- Regado M.A., Cristovao B.M., Tavaría F.K., Ferreira J.P., Moutinho C.G., Balcao V.M., Malcata F.X., 2007. Changes in the pool of free fatty acids in ovine, bovine and caprine milk fats, effected by viable cells and cell-free extracts of *Lactococcus lactis* and *Debaryomyces vanrijae*. *Food Chemistry*, 103, 1112–1118.
- Roostita R., Fleet G.H., 1996. Growth of yeasts in milk and associated changes to milk composition. *Int. J. Food Microbiol.*, 31, 205–219.
- Stead, D., 1986. Microbial lipases: their characteristics, role in food spoilage and industrial uses. *J. Dairy Res.*, 53, 481–505.
- Suzzi G., Lanorte M.T., Galgano F., Andrighetto F., Lombardi A., Lanciotta R., Garzoni M.E., 2001. Molecular characterization and metabolic activities of *Yarrowia lipolytica* isolated from cheese. *Int. J. Food Microbiol.*, 69, 147–152.
- Sztajer H., Maliszewska I., Wiczorek J., 1988. Production of exogenous lipases by bacteria, fungi and actinomycetes. *Enzym. Microbiol. Technol.*, 10, 492–497.
- Tomasini A., Bustillo G., Lebeault J.M., 1993. Fat lipolyzed with a commercial lipase for the production of blue cheese flavor. *Int. Dairy J.*, 3, 117–127.
- Vahlu J., Kour A., 2006. Yeast lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. *Electron. J. Biotechnol.*, 9, 69–84.
- Van den Tempel T., Jakobsen M., 1998. Yeast associated with Danablu, *Int. Dairy J.*, 8, 25–31.
- Van den Tempel T., Jakobsen M., 2000. The technological characteristics of *Debaryomyces hansenii* and *Yarrowia lipolytica* and their potential as starter cultures for production of Danablu. *Int. Dairy J.*, 10, 263–270.
- Wojtatowicz M., Chrzanowska J., Juszczak P., Skiba A., Gdula A., 2001. Identification and biochemical characteristics of yeast microflora of Rokpol cheese. *Int. J. Food Microbiol.*, 69, 135–140.
- Wyder M.T., Bachmann H.P., Puhan Z., 1999. Role of selected yeasts in cheese ripening: an evaluation in foil wrapped Raclette cheese. *Lebensm.-Wiss. Technol.*, 32, 333–34.

## PORÓWNANIE AKTYWNOŚCI LIPOLITYCZNEJ SZCZEPÓW DROŻDŻY WYIZOLOWANYCH Z SERA ROKPOL

**Streszczenie.** W pracy analizowano aktywność lipolityczną siedmiu szczepów drożdży *Candida famata* MII1a, *C. intermedia* BI2a, *C. kefyr* PII1b, *C. sphaerica* FII7a, *Geotrichum penicillatum* EII6a, *Saccharomyces kluyveri* BII3a i *Yarrowia lipolytica* PII6a wyizolowanych z serów pleśniowych. Szczepy te mogą zostać wykorzystane jako potencjalne kultury starterowe wspomagające produkcję serów. Aktywność zewnątrz- i wewnątrzkomórkowych lipaz pochodzących od tych drobnoustrojów oznaczana była wobec tributyriny i p-nitrofenylowych pochodnych kwasów tłuszczowych. Oznaczano także zdolność tych enzymów do hydrolizy tłuszczu mlecznego. Wykazano, że aktywność lipaz zewnątrzkomórkowych jest wyższa w porównaniu z lipazami wewnątrzkomórkowymi. Najwyższe aktywności lipolityczne oznaczono dla szczepów *Y. lipolytica* PII6a i *C. sphaerica* FII7a, które preferencyjnie hydrolizowały maślan p-nitrofenylu i uwalniały z tłuszczu mlecznego najwyższą ilość kwasu oleinowego.

**Słowa kluczowe:** drożdże, lipazy, substraty syntetyczne, tłuszcz mleczny, hydroliza, Ser Rokpol

Accepted for print – Zaakceptowano do druku: 30.06.2012

For citation – Do cytowania: Szołtysik M., Juszczyk P., Czajgucka A., Żarowska B., Dąbrowska A., Połomska X., Babij K., Wojtatowicz M., Chrzanowska J., 2012. Comparison of lipolytic activity of yeast strains isolated from rokpol cheese. *Acta Sci. Pol. Biotechnol.*, 11 (2), 27–38.

## SPIS TREŚCI CONTENTS

### **Marlena Marciniak, Małgorzata Robak**

- PCR jako narzędzie do identyfikacji i różnicowania drobnoustrojów ..... 5  
PCR as tool for identification and differentiation  
of microorganisms

### **Katarzyna Samborska, Agata Drzazga**

- Wpływ warunków przechowywania na aktywność sacharolityczną  
drożdży *Saccharomyces cerevisiae* suszonych sublimacyjnie ..... 17  
The effect of storage on the saccharolytic activity  
of freeze-dried baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*

### **Marek Szoltysik, Piotr Juszczyk, Agata Czajgucka, Barbara Żarowska, Anna Dąbrowska, Xymena Polomska, Konrad Babij, Maria Wojtatowicz, Józefa Chrzanowska**

- Comparison of lipolytic activity of yeast strains isolated from rokopol cheese ..... 27  
Porównanie aktywności lipolitycznej szczepów drożdży wyizolowanych  
z sera Rokpol