

GRZEGORZ SZCZEPANIAK, MARIA WOJTATOWICZ

DOBÓR SZCZEPÓW *YARROWIA LIPOLYTICA* I *DEBARYOMYCES HANSENII* DO SZCZEPIONKI WSPOMAGAJĄCEJ PROCES DOJRZEWANIA SERA

Streszczenie

W pracy scharakteryzowano 8 szczepów drożdży *Yarrowia lipolytica* i 13 szczepów *Debaryomyces hansenii* pod względem poziomu aktywności proteolitycznej i lipolitycznej, ograniczonych zdolności do generowania amin biogennych i pigmentu, a także wzajemnych oddziaływań między szczepami obu gatunków. Najwyższymi zdolnościami do syntezy zewnątrz- i wewnątrzkomórkowych hydrolaz charakteryzowały się szczepy drożdży *Y. lipolytica* PII6a, PII6c i JII1c. W przypadku drożdży *D. hansenii* stwierdzono jedynie niewielką wewnątrzkomórkową aktywność proteolityczną i w większości przypadków pozakomórkową aktywność lipolityczną. Zdolność do produkcji pigmentu wykazywały jedynie drożdże *Y. lipolytica*, za wyjątkiem szczepów PII6a, PII6b i PII6c. Żaden z badanych szczepów obu gatunków nie degradował histydyny do histaminy, jakkolwiek drożdże *Y. lipolytica* wykazywały zdolność do produkcji szerszej gamy amin biogennych. Wszystkie szczepy drożdży *D. hansenii* produkowały toksyny killerowe. Jedynie 3 szczepy *Y. lipolytica* (JII1a JII1b i JII1c) wykazywały odporność na te toksyny.

Słowa kluczowe: aktywność proteolityczna, drożdżowe szczepionki serowarskie, *Yarrowia lipolytica*, *Debaryomyces hansenii*

Wprowadzenie

W dojrzewaniu serów, zwłaszcza produkowanych z mleka niepasteryzowanego, często uczestniczy wtórna mikroflora, będąca zanieczyszczeniem powstającym w trakcie procesu produkcyjnego. Do ww. grupy mikroorganizmów należą m.in. drożdże, których liczba w różnych gatunkach sera waha się w granicach 10^2 - 10^8 jtk/g, przy czym najczęściej spotykane są: *Debaryomyces hansenii*, *Geotrichum candidum*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces marxianus*, *Yarrowia lipolytica*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulasporea delbrueckii*, *Trichosporon cutaneum (beigelii)* [22].

Mgr inż. G. Szczepaniak, prof. dr hab. M. Wojtatowicz, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Wydz. Nauk o Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, ul. Chelmońskiego 37/41, 51-630 Wrocław

Liczne badania dowiodły, że w większości przypadków obecność drożdży sprzyja procesowi dojrzewania sera, a ich pozytywna rola polega przede wszystkim na: zdolności syntezy szerokiej gamy enzymów proteolitycznych i lipolitycznych, umożliwiających bardziej zaawansowaną i szybszą hydrolizę protein (także niskocząsteczkowych tzw. gorzkich peptydów) oraz tłuszczu mlecznego, do prekursorów substancji aromatycznych, takich jak aminokwasy czy kwasy tłuszczowe [7]. Dzięki wydzielaniu do środowiska czynników wzrostowych (witamin z grupy B, kwasu pantotenowego, niacyny, ryboflawiny, biotyny) oraz odkwaszaniu masy serowej poprzez utylizację kwasu mlekowego oraz produkcję alkalicznych metabolitów drożdże promują wzrost mikroflory starterowych bakterii mlekowych [11]. Defekty sensoryczne serów dojrzewających spowodowane obecnością drożdży występują rzadko i należą do nich m.in.: owocowy, gorzki, drożdżowy posmak czy gazowanie masy serowej [8]. Ponadto, wiele gatunków drożdży wykazuje swoisty szlak enzymatycznej konwersji obecnej w środowisku sera tyrozyny do związków pośrednich, które ulegając spontanicznej oksydacji i polimeryzacji, pojawiają się na powierzchni sera w postaci brunatnych barwników melaninowych [2].

W wielu ośrodkach naukowych trwają badania nad stworzeniem jedno-, dwu- lub wielogatunkowych drożdżowych szczepionek serowarskich. Do drożdży wykazujących wiele pożądanых cech fizjologicznych, a jednocześnie gwarantujących bezpieczeństwo konsumenta (statut GRAS) zaliczane są m.in. gatunki *Debaryomyces hansenii* i *Yarrowia lipolytica*.

Zasadniczą rolą drożdży *D. hansenii* w procesie dojrzewania różnych gatunków sera jest odkwaszanie środowiska poprzez utylizację kwasów organicznych (głównie kwasu mlekowego). Gatunek ten oprócz niewielkiej aktywności proteolitycznej i lipolitycznej wykazuje zdolności do hamowania m.in. germinacji przetrwalników *Clostridium butyricum* oraz wzrostu niektórych gatunków grzybów pleśniowych i drożdży [12], głównie za sprawą wydzielanych do środowiska toksyn killerowych. Antagonistyczne uzdolnienia drożdży *D. hansenii* w stosunku do innych mikroorganizmów wskazują na potencjalną możliwość zastosowania tego gatunku jako czynnika biokontroli mlecznych produktów spożywczych, w tym serów.

Drożdże *Y. lipolytica* charakteryzują się wysokimi uzdolnieniami proteolitycznymi i lipolitycznymi zarówno wewnątrz-, jak i zewnątrzkomórkowymi, przez co ich obecność w dojrzewającym serze wyraźnie intensyfikuje procesy degradacyjne białka i tłuszczu [7].

Wcześniejsze badania Ferreira'y [7] świadczą o możliwości synergistycznych oddziaływań ww. gatunków drożdży, zapewniających intensyfikację procesu dojrzewania sera z równoczesnym zachowaniem pożądanых cech sensorycznych finalnego produktu.

Celem pracy był skrining szczepów *D. hansenii* i *Y. lipolytica* do skojarzonej szczepionki serowarskiej, polegający na ocenie wybranych cech fizjologicznych drożdży, istotnych pod względem technologii mleczarskiej, takich jak: aktywność zewnętrz- i wewnątrzkomórkowych enzymów proteolitycznych i lipolitycznych, ograniczona zdolność generowania amin biogennych i barwników melaninowych oraz interakcje killerowe pomiędzy badanymi szczepami obu gatunków drożdży.

Material i metody badań

Przedmiotem badań było 8 szczepów *Yarrowia lipolytica* i 13 szczepów *Debaryomyces hansenii* pochodzących z serów z przerostem pleśniowym typu Rokpol, zdeponowanych w kolekcji własnej Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu.

W celu oznaczenia aktywności proteolitycznej drożdże namnażano w podłożu YCG o składzie [g/l]: ekstrakt drożdżowy (1,7), kazeina (2,0), glukoza (10), przy różnych wartościach pH 7,0 i 5,0. Hodowle prowadzono w 50 ml pożywki w kolbach Erlenmayera o objętości 250 ml na wytrząsarce (MPW-350R) przy 160 rpm, przez 48 h, w temp. 28 °C (szczepy *Y. lipolytica*) lub 25 °C (szczepy *D. hansenii*), w dwóch powtórzeniach. Po zakończeniu hodowli biomasę oddzielano przez wirowanie (5000 g, 15 min, 4 °C; wirówka MPW-350R). Supernatant posłużył do oznaczenia enzymów zewnątrzkomórkowych. Biomasa zawieszano w 10 ml 50 mM buforu fosforanowego o pH 7,0 i trzykrotnie przemywano. Następnie komórki drożdży rozbijano za pomocą ultradźwięków (Sonifikator Sonoplus, Bandelin, Niemcy). Po wirowaniu uzyskany ekstrakt przeznaczono do oznaczenia enzymów wewnątrzkomórkowych.

Celem oznaczenia aktywności lipolitycznej drożdże hodowano w podłożu YCO-Ga o składzie: ekstrakt drożdżowy (1,7 g); kazeina (2,0 g), oliwa z oliwek (10 g), guma arabska (5,0 g) w 1 l buforu Tris-HCl o pH 7,2. Warunki hodowli i procedura otrzymania supernatantu z hodowli i ekstraktów komórkowych była analogiczna, jak w przypadku oznaczania enzymów proteolitycznych.

Zewnątrzkomórkową aktywność proteolityczną oceniano spektrofotometrycznie wobec kazeiny i kwasowo denaturowanej hemoglobiny, odpowiednio w pH 7,5 i 3,0 wg Chrzanowskiej i Kołaczkowskiej [3]. Aktywność wewnątrzkomórkowych aminopeptydaz badano metodą spektrofotometryczną względem paranitroanilidowej pochodnej leucyny Leu-pNA (Sigma) wg metody El Soda i Desmazeaud [6]. Wewnątrzkomórkową aktywność peptydazową: tri- i karboksypeptydaz oznaczano odpowiednio wobec syntetycznych peptydów Ala-Gly-Gly (Sigma) oraz Z-Glu-Tyr (Sigma) [6].

Za jednostkę aktywności (1 U) zarówno zewnętrz-, jak i wewnątrzkomórkowych proteaz przyjęto przyrost absorbancji $\Delta A = 0,01$, w przeliczeniu na 1 ml roztworu enzymatycznego w warunkach reakcji.

Aktywność zewnątrz- i wewnątrzkomórkowych enzymów lipolitycznych badano wobec syntetycznego maślanu p-nitrofenylu (Sigma) wg Shirai i wsp. [14].

Zdolność do dekarboksylacji aminokwasów (kwasu glutaminowego, histydyny, lizyny i ornityny) oznaczano w zmodyfikowanym podłożu wg Gardini i wsp. [9], o składzie [g/l]: YNB (1,34), glukoza (0,2), aminokwas (10), purpura bromokrezolowa (1,2) jako wskaźnik zmiany odczynu podłoża. Wyjściowy odczyn podłoża wynosił 5,2. Reakcji dekarboksylacji aminokwasu towarzyszyła zmiana barwy podłoża z żółtej na ciemnofioletową, na skutek alkalizacji środowiska.

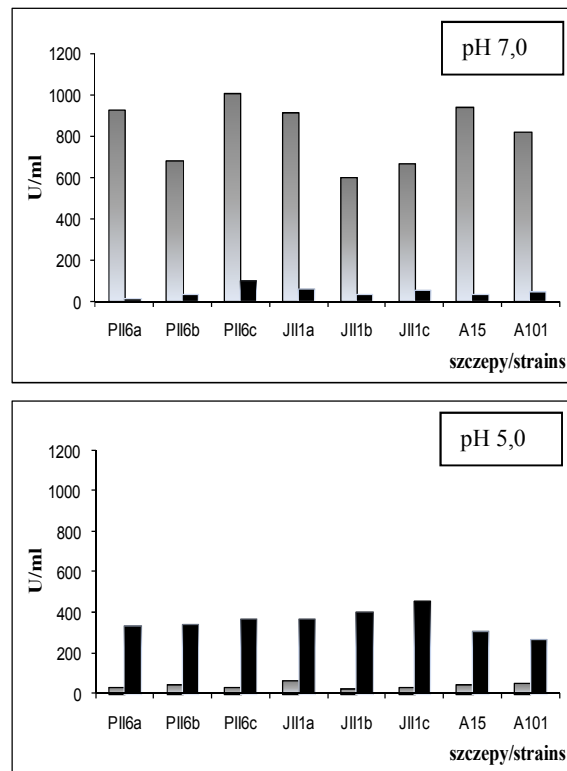
Ocenę zdolności tworzenia barwników melaninowych prowadzono metodą płytkową na agarze serowym z dodatkiem 1 % tyrozyny wg Carreiry i wsp. [2]. Płytki inkubowano w temperaturze 14 i 25 °C. Za wynik pozytywny uznawano brązowe przebarwienia wokół kolonii drożdży.

Aktywność killerową drożdży *D. hansenii* wobec szczepów *Y. lipolytica* oznaczano metodą płytkowych testów krzyżowych wg Woods i Bevan [22] w podłożu YEPG-MB o pH 4,6, zawierającym błękit metylenowy oraz 2 % dodatek NaCl, w temp. 14 °C.

Wyniki i dyskusja

Wszystkie badane szczepy drożdży *Y. lipolytica* wykazywały zdolność do syntezy dwóch typów pozakomórkowych proteaz (rys. 1). W podłożu hodowlanym o pH 7,0 przeważała synteza kazeinolitycznych proteaz zasadowych (serynowych), a ich aktywność była cechą szczepowo zależną. Jedynie 4 szczepy osiągnęły aktywność powyżej 800 U/ml, spośród których najwyższą charakteryzował się szczep PII6c (1005 U/ml). Znaczącą aktywność zewnątrzkomórkowych kwaśnych (aspartylowych) proteaz, oznaczanych wobec hemoglobiny, uzyskano dopiero w hodowlach o odczynie kwaśnym (pH 5,0). W tym przypadku stwierdzono mniej istotne różnice między szczepami, a aktywność oscylowała w granicach od 266 (szczep A101) do 451 (szczep JIII1c) U/ml (rys. 1). Uzyskane wyniki zgodne są z doniesieniami innych autorów [10, 15], wg których odczyn środowiska stymuluje rodzaj wydzielanych proteinaz przez drożdże z gatunku *Y. lipolytica*, aczkolwiek optymalne pH syntezy nie zawsze pokrywa się z optymalnym pH działania.

Tylko jeden z badanych szczepów drożdży *D. hansenii*, FI5b wykazywał zewnątrzkomórkową aktywność proteolityczną oznaczoną wobec hemoglobiny i wynoszącą 121 i 87 U/ml, odpowiednio dla hodowli w pH 7,0 i 5,0. Koreluje to z wynikami van den Tempela i Jakobsena [19], którzy uważają, że zewnątrzkomórkowa aktywność wspomnianego gatunku drożdży jest niewielka i bardzo rzadko spotykana.

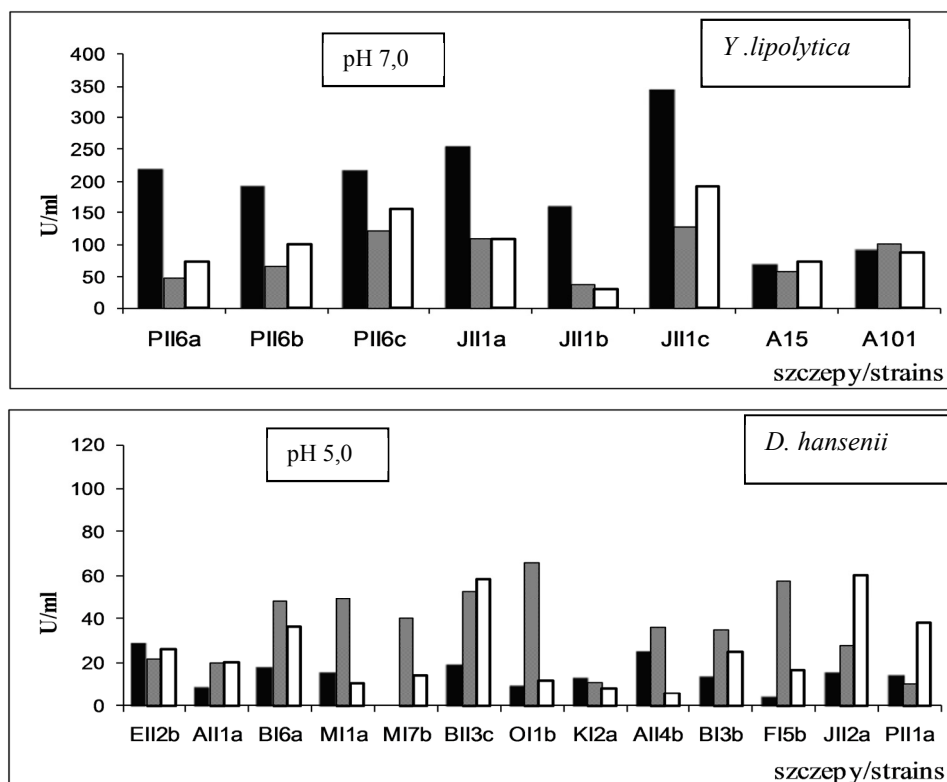


Rys.1. Poziom aktywności pozakomórkowych proteaz alkalicznych (□) i kwaśnych (■) szczepów *Y. lipolytica*, w zależności od pH podłoża hodowlanego.

Fig. 1. Activity level of extracellular alkaline (□) and acid (■) proteases of selected strains of *Y. lipolytica* depending on pH of culture medium.

W trakcie dojrzewania masy serowej istotną rolę przy usuwaniu krótkich, hydrofobowych (gorzkich) peptydów odgrywają, uwalniane podczas autolizy drożdży, wewnątrzkomórkowe enzymy: aminopeptydazy, di-, tripeptydazy, karboksypeptydazy [21]. Wszystkie badane szczepy obu gatunków drożdży wykazywały zdolność do syntezy wewnątrzkomórkowych peptydaz niezależnie od odczynu podłoża hodowlanego, aczkolwiek najwyższą ich aktywność oznaczono w ekstraktach komórek drożdży *Y. lipolytica* i *D. hansenii* pochodzących z hodowli, odpowiednio o pH 7,0 i 5,0, dlatego też tylko te wyniki przedstawiono w pracy (rys. 2). Najwyższą aktywnością amino-, karboksy- i tripeptydazową spośród wszystkich badanych izolatów charakteryzował się szczep *Y. lipolytica* JII1c, wynoszącą odpowiednio 340, 127 i 193 U/ml (rys. 2). Wyróżniające zdolności peptydazowe wykazywały także szczepy PII6c i JII1a. Aktywność wewnątrzkomórkowych peptydaz drożdży *D. hansenii* wykazywała niższy poziom, a spośród 13 badanych szczepów wyróżniały się: OI1b i FI5b (aktywność karboksypeptydazowa: 66 i 58 U/ml) JII2a (aktywność aminopeptydazowa 60 U/ml) oraz BII3c,

charakteryzujący się wyrównaną, wysoką aktywnością zarówno karboksy- i tripeptydaz, wynoszącą odpowiednio 53 i 59 U/ml (rys. 2). Wcześniejsze badania Wojtatowicz i wsp. [22] również wykazały stosunkowo niski poziom aktywności wewnątrzkomórkowych peptydaz drożdży *D. hansenii*.



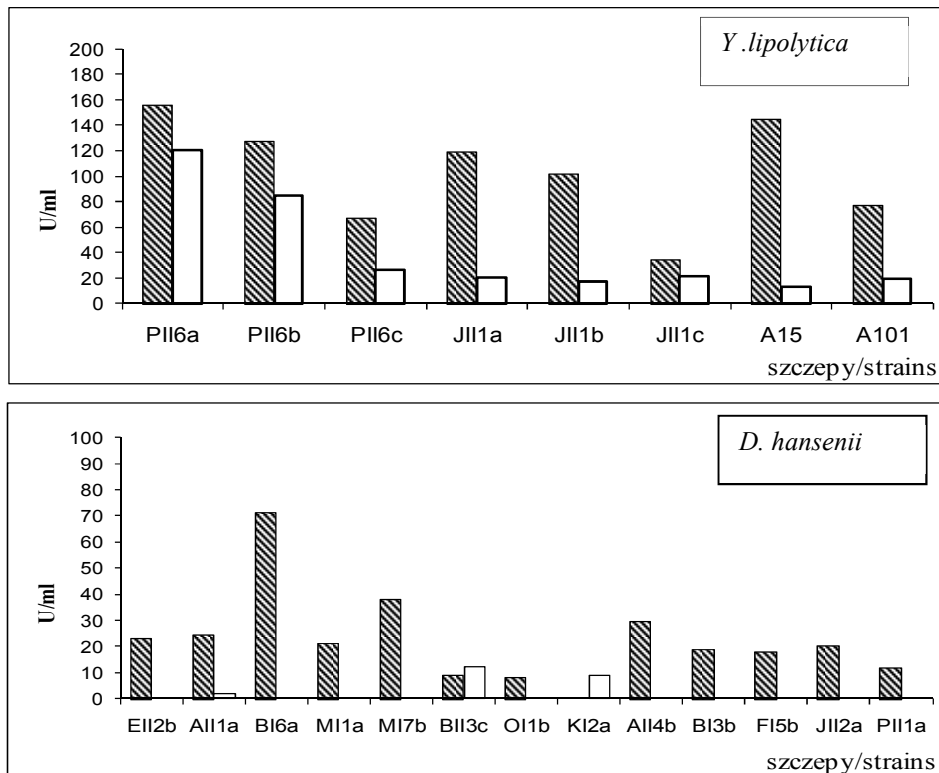
Rys. 2. Poziom aktywności aminopeptydaz (■), karboksypeptydaz (▒) i tripeptydaz (□) w ekstraktach komórkowych szczepów drożdży *Y. lipolytica* (hodowla o pH 7,0) i *D. hansenii* (hodowla o pH 5,0).

Fig. 2. Activity level of aminopeptidases (■), carboxypeptidase (▒), and tripeptidases (□) in cellular extracts of yeast strains of *Y. lipolytica* (culture at pH 7.0) and *D. hansenii* (culture at pH 5.0).

Enzymatyczny rozkład frakcji tłuszczowej dojrzewającego sera to, obok przemian proteolitycznych, najważniejszy proces aromatowórczy. Wszystkie badane szczepy *Y. lipolytica* przejawiały zdolność do hydrolizy wiązania estrowego p-nitrofenylowej pochodnej kwasu masłowego przez zewnątrz-, jak i wewnątrzkomórkowe enzymy lipolityczne. Najwyższe uzdolnienia spośród badanych izolatów tego gatunku wykazywał szczep PII6a, w przypadku którego poziom aktywności zewnątrz- i wewnątrzkomórkowych lipaz był zbliżony i wynosił odpowiednio 155 i 120 U/ml (rys. 3). Szczepy A15, PII6b, JII1a i JII1b charakteryzowały się również zadowalającym po-

ziomem aktywności lipolitycznej, głównie pozakomórkowej (rys. 3). Otrzymane wyniki potwierdzają badania innych autorów, którzy wykazali znaczne zróżnicowanie aktywności lipolitycznej w obrębie tego gatunku [17]. Z kolei różnica pomiędzy aktywnością wewnątrz- i zewnątrzkomórkową może wynikać z faktu, że sekrecja, a tym samym aktywność pozakomórkowych lipaz ściśle zależą od fazy wzrostu, jak i warunków hodowlanych [13].

Szczepy drożdży *D. hansenii* w większości przejawiały jedynie pozakomórkową aktywność lipolityczną, której poziom nie przekraczał 40 U/ml, z wyjątkiem szczepu BI6a, gdzie był wyższy (71,3 U/ml). Z kolei szczep oznaczony symbolem KI2a wykazywał wyłącznie wewnątrzkomórkową aktywność lipolityczną (rys. 3). Podobnie wcześniejsze badania Welthagen i wsp. [20] oraz van den Tempel i Jakobsen [18] wskazały na niewielkie zdolności do syntezy lipaz przez drożdże tego gatunku.



Rys. 3. Poziom aktywności zewnątrz- (▨) i wewnątrzkomórkowych (□) enzymów lipolitycznych szczepów drożdży *Y. lipolytica* i *D. hansenii*.

Fig. 3. Activity level of extra- (▨) and intracellular (□) lipolytic enzymes of yeast strains of *Y. lipolytica* and *D. hansenii*.

W środowisku dojrzewającego sera wolne aminokwasy mogą ulegać reakcjom o charakterze katabolicznym m.in. mikrobiologicznej konwersji do amin biogennych [9]. Związki te w niewielkich stężeniach powszechnie występują w żywności, jednak zbyt duże dawki mogą stać się przyczyną zatruc pokarmowych lub wielokierunkowych reakcji toksycznych o charakterze pseudoalergicznym [16].

Tabela 1

Charakterystyka szczepów drożdży *D. hansenii* i *Y. lipolytica* pod względem zdolności do produkcji pigmentu i amin biogennych.

Profile of *D. hansenii* i *Y. lipolytica* yeast strains as regards their ability to produce pigment and biogenic amines.

Szczepy Strains	Pigment 14°C/25°C	Histamina Histamine	Putrescyna Putrescine	Kadaweryna Cadaverine	Kwas γ -aminomasłowy γ -aminobutyric acid
<i>D. hansenii</i>					
EII2b	-/-	-	-	-	+
AII1a	-/-	-	-	-	+
BI6a	-/-	-	-	-	+
MI1a	-/-	-	+	-	+
MI7b	-/-	-	+	-	+
BII3c	-/-	-	-	-	+
OII1b	-/-	-	-	-	+
KI2a	-/-	-	+	-	+
AII4b	-/-	-	-	-	+
BI3b	-/-	-	-	-	+
F15b	-/-	-	-	-	+
JII2a	-/-	-	-	-	+
PII1a	-/-	-	-	-	+
<i>Y. lipolytica</i>					
PII6a	-/-	-	+	+	+
PII6b	-/-	-	+	+	+
PII6c	-/-	-	+	+	+
JII1a	+/+	-	+	+	+
JII1b	+/+	-	+	+	+
JII1c	+/+	-	+	+	+
A15	-/-	-	+	+	+
A101	+/+	-	+	+	+
+ produkcja pigmentu; dekarboksylacja aminokwasu / pigment production; amino acid decarboxylation					

Wszystkie badane szczepy obu gatunków drożdży były zdolne do dekarboksylacji kwasu glutaminowego z wytworzeniem kwasu γ -aminomasłowego (GABA), natomiast żaden nie produkował histaminy. Ponadto szczepy *Y. lipolytica* tworzyły putrescynę i kadawerynę (tab. 1). Żaden ze szczepów *D. hansenii* nie tworzył kadaweryny, a jedynie 3 szczepy (KI2a, MI7b, MI1a) wykazywały zdolność dekarboksylacji ornityny do putrescyny (tab. 1). Podobną charakterystykę obu gatunków drożdży izolowanych z sera Pecorino przeprowadził Gardini i wsp. [9], dowodząc, że dekarboksylazy drożdży *Y. lipolytica* charakteryzowały się szerszym spektrum działania niż enzymy *D. hansenii*, natomiast brak zdolności dekarboksylacji histydyny jest częstą cechą drożdży izolowanych z fermentowanych produktów mlecznych. Ponadto badacze ci wykazali, że drożdżowe dekarboksylazy cechowały się większym powinowactwem do aminokwasów alifatycznych.

Oprócz produkcji amin biogennych kolejną niepożądaną cechą drożdży, negatywnie wpływającą na jakość dojrzałego sera, jest ich zdolność do produkcji barwników melaninowych, związków o charakterze polifenolowych heteropolimerów, których prekursorem jest nagromadzona w środowisku tyrozyna [2]. Hodowle na agarze serowym wzbogaconym tyrozyną wykazały, że żaden z badanych szczepów *D. hansenii* nie produkował pigmentu, niezależnie od temperatury inkubacji. W przypadku drożdży *Y. lipolytica* jedynie szczepy A15, PII6a, PII6b i PII6c nie miały tej zdolności (tab. 1). Podobne obserwacje poczynili wcześniej Gardini i wsp. [9] oraz Williams i wsp. [21], stwierdzając, że brązowienie serów w dużej mierze powodowane jest obecnością drożdży z gatunku *Y. lipolytica*.

Gatunek *D. hansenii* często dominuje w populacjach drożdżowych rozwijających się w różnych typach serów dojrzewających. Rozwojowi tego gatunku w środowisku sera sprzyja zdolność do wzrostu w niskiej temperaturze (10 - 15 °C) oraz przy wysokim zasoleniu środowiska (5 - 15 %), a także synteza białek killerowych [23]. Ten swoisty mechanizm współzawodnictwa umożliwia zatem eliminację niepożądaną mikroflory ze środowiska dojrzewającego sera lub kontrolę liczebności populacji, których nadmierny rozwój mógłby doprowadzić do niekorzystnych zmian sensorycznych produktu finalnego.

Wszystkie badane szczepy *D. hansenii* produkowały toksyny killerowe aktywne wobec większości badanych szczepów *Y. lipolytica*. Oporność na nie wykazywały tylko trzy szczepy *Y. lipolytica*: JIII1a, JIII1b i JIII1c (tab. 2). Również wcześniejsze badania Żarowskiej i wsp. [23], dotyczące aktywności killerowej drożdży izolowanych ze środowiska serów, dowiodły obecności szczepów *Y. lipolytica* wrażliwych, jak i opornych na toksyny killerowe tworzone przez drożdże *D. hansenii*.

Tabela 2

Aktywność killerowa 13 szczepów drożdży *D. hansenii* wobec 8 szczepów *Y. lipolytica*.
Killer activity of 13 *D. hansenii* yeast strains towards 8 strains of *Y. lipolytica*.

Szczepy Strains		<i>Yarrowia lipolytica</i>							
		PII6a	PII6b	PII6c	JII1a	JII1b	JII1c	A101	A15
<i>Debaryomyces hansenii</i>	EII2b	+	+	+	-	-	-	+	+
	AII1a	+	+	+	-	-	-	+	+
	BI6a	+	+	+	-	-	-	+	+
	MI1a	+	+	+	-	-	-	+	+
	MI7b	+	+	+	-	-	-	+	+
	BII3c	+	+	+	-	-	-	+	+
	OIIb	+	+	+	-	-	-	+	+
	KI2a	+	+	+	-	-	-	+	+
	AII4b	+	+	+	-	-	-	+	+
	BI3b	+	+	+	-	-	-	+	+
	FI5b	+	+	+	-	-	-	+	+
	JII2a	+	+	+	-	-	-	+	+
	PII1a	+	+	+	-	-	-	+	+

+ aktywność killerowa szczepów *D. hansenii*; wrażliwość szczepów *Y. lipolytica* / killer activity of *D. hansenii* strains; sensitivity of *Y. lipolytica* strains

Podsumowanie

Do dalszych etapów badań nad dwugatunkową szczepionką drożdżową wspomagającą proces dojrzewania sera wytypowano 3 szczepy *Y. lipolytica*: PII6a, PII6c i JII1c oraz 2 szczepy *D. hansenii*: BII3c i BI6a.

Wskazane szczepy *Y. lipolytica* wyróżniały się wysokim poziomem aktywności enzymów proteolitycznych i lipolitycznych zarówno zewnątrz-, jak i wewnątrzkomórkowych, przy analogicznym profilu tworzonych amin biogennych, jak u pozostałych szczepów tego gatunku. Dwa pierwsze z nich (PII6a i PI6c) nie generowały barwników melaninowych na agarze serowym z tyrozyną, jednak cechowały się wrażliwością na toksyny killerowe produkowane przez szczepy *D. hansenii*, natomiast trzeci (JII1c) wykazywał przeciwstawne cechy – odporny fenotyp killerowy i tworzenie pigmentu. Z kolei szczepy *D. hansenii* BII3c i BI6a, jak wszystkie badane drożdże tego gatunku, cechowały się aktywnością killerową i brakiem zdolności generowania pigmentu, nie tworzyły amin biogennych tj. histaminy, kadaweryny czy putrescyny i wyróżniały się

aktywnością wewnątrzkomórkowych peptydaz, a szczep BII3c wykazywał ponadto stosunkowo wysoką aktywność zewnątrzkomórkowych lipaz.

Zastosowanie mieszanych kultur wytypowanych drożdży w produkcji sera pozwoli lepiej prześledzić wzajemne relacje tych drobnoustrojów w naturalnym środowisku ich rozwoju oraz synergistyczne oddziaływania na składniki sera ważne w aspekcie przyspieszenia procesu dojrzewania.

Praca wykonana pod kierunkiem naukowym prof. dr hab. Marii Wojtatowicz w ramach grantu MNiSW N N312 213036 (kierownik grantu dr inż. Marek Szoltyś).

Literatura

- [1] Capece A., Romano P.: „Pecorino di Filiano” cheese as a selective habitat for the yeast species, *Debaryomyces hansenii*. Int. J. Food Microbiol., 2009, **132**, 180-184.
- [2] Carreira A., Ferreira L.M., Loureiro V.: Brown pigments produced by *Yarrowia lipolytica* result from extracellular accumulation of homogentisic acid. Appl. Env. Microbiol., 2001, nr, 3463-3468.
- [3] Chrzanowska J., Kołaczowska M.: Production of extracellular proteolytic enzymes by *Beauveria bassiana*. Acta Mycol., 1998, **33** (2), 277-285.
- [4] Czajgucka A., Chrzanowska J., Juszczyk P., Szoltyś M., Wojtatowicz M.: Aktywność proteolityczna szczepów drożdży pochodzących z serów Rokpol. Biotechnologia, 2003, **2** (1-2), 73-81.
- [5] De Freitas I., Pinon N., Maubois J., Lortal S., Thierry A.: The addition of a cocktail of yeast species to Cantalet cheese changes bacterial survival and enhances aroma compound formation. Int. J. Food Microbiol., 2009, **129**, 37-42.
- [6] El Soda M., Desmazeaud M.J.: Les peptide-hydrolases des lactobacilles du groupe *Thermobacterium*: I. Mise en evidence de ces activites chez *Lactobacillus helveticus*, *L. acidophilus*, *L. lactis* et *L. bulgaricus*. Can. J. Microbiol., 1982, **28**, 1181-1188.
- [7] Ferreira A.D., Viljoen B.C.: Yeasts as adjunct starters in matured Cheddar cheese. Int. J. Food Microbiol., 2003, **86**, 131-140.
- [8] Fleet Graham H.: Yeasts in foods and beverages: impact on product quality and safety. Curr. Op. Biotechnol., 2007, **18**, 170-175.
- [9] Gardini F., Tofalo R., Belletti N., Iucci L., Suzzi G., Torriani S., Guerzoni M.E., Lanciotti R.: Characterization of yeasts involved in the ripening of Pecorino Crotonese cheese. Food Microbiol., 2006, **23**, 641-648.
- [10] Glover, D.J., McEwen R.K., Colin R.T., Young T.W.: pH-regulated expression of the acid and alkaline extracellular proteases of *Yarrowia lipolytica*. Microbiology, 1997, **143**, 3045-3054.
- [11] Jakobsen M., Narhvs J.: Yeast and their possible beneficial and negative effects on the quality of dairy products. Int. Dairy J., 1996, **6**, 755-768.
- [12] Liu S., Tsao M.: Biocontrol of dairy moulds by antagonistic dairy yeast *Debaryomyces hansenii* in yoghurt and cheese at elevated temperatures. Food Control, 2009, **20**, 852-855.
- [13] Pereira-Meirelles F.V., Rocha-Leão M.H.M., Sant'Anna G.L. Jr.: Lipase location in *Yarrowia lipolytica* cells. Biotechnol. Lett., 2000, **22**, 71-75.
- [14] Shirai K., Jackson R.L.: Lipoprotein lipase-catalyzed hydrolysis of p-nitrophenyl butyrate. Interfacial activation by phospholipid vesicles. J. Biol. Chem., 1982, **257**, 1253-1258.

- [15] Suzzi G., Lanorte M.T., Galgano F., Andrighetto C., Lombardi A., Lanciotti R., Guerzoni M.E.: Proteolytic, lipolytic and molecular characterisation of *Yarrowia lipolytica* isolated from cheese., Int. J. Food Microbiol, 2001, **69**, 69-77.
- [16] Szołtysik M., Żelazko M., Rak L., Połomska X., Dąbrowska A., Wojtatowicz M., Chrzanowska J.: Zdolność drożdży *Yarrowia lipolytica* pochodzących z sera do wytwarzania amin biogennych w mleku. Acta Sci. Pol. Biotechnol., 2006, **5 (1-2)**, 87-94.
- [17] Szołtysik M., Chrzanowska J., Żelazko M., Niedbalska J., Połomska X., Juszczak P., Wojtatowicz M.: Produkcja pozakomórkowych hydrolaz przez szczepy *Yarrowia lipolytica* pochodzące z sera. Acta Sci. Pol. Biotechnol., 2008, **7 (4)**, 23-34.
- [18] Van den Tempel T., Jakobsen M.: Yeast associated with Danablu. Int. Dairy J., 1998, **8**, 25-31.
- [19] Van den Tempel T., Jakobsen M.: The technological characteristics of *Debaryomyces hansenii* and *Yarrowia lipolytica* and their potential as starter cultures for production of Danablu. Int. Dairy J., 2000, **10**, 263-270.
- [20] Welthagen J.J., Viljoen B.C.: Yeast profile in Gouda cheese during processing and ripening. Int. J. Food Microbiol., 1998, **41**, 185-194.
- [21] Williams A.G., Withers S.E.: Tyrosine metabolism in pigment-forming *Yarrowia lipolytica* strains isolated from English and European speciality mould-ripened cheese exhibiting a brown discolouration defect. Int. J. Dairy Technol., 2007, **60**, 165- 174.
- [22] Wojtatowicz M., Chrzanowska J., Juszczak P., Skiba A., Gdula A.: Identification and biochemical characteristics of yeast microflora in Rokpol cheese. Int. J. Food Microbiol. 2001, **69**, 135-140.
- [23] Żarowska B., Wojtatowicz M., Połomska X., Juszczak P., Chrzanowska J.: Factors affecting killer activity of some yeast species occurring in Rokpol cheese. Folia Microbiol., 2004, **49 (6)**, 713-717.

SCREENING *YARROWIA LIPOLYTICA* AND *DEBARYOMYCES HANSENI* STRAINS FOR ADJUNCT STARTER CULTURE TO ENHANCE CHEESE RIPENING PROCESS

S u m m a r y

In this paper, some technological properties of 8 strains of *Yarrowia lipolytica* yeast and 13 strains of *Debaryomyces hansenii* yeasts were analyzed. The analysis focused on the level of their proteolytic and lipolytic activities, their limited ability to generate biogenic amines and pigment, and, also, on the mutual interactions between the strains of those two species. The yeast strains of *Y. lipolytica* (PII6a, PII6c and JII1c) demonstrated the best ability to synthesise both the extra- and the intracellular hydrolases. As regards the *D. hansenii* yeast strains, only a minor intracellular peptidase activity thereof was found, and, in the majority of cases, an extracellular lipolytic activity. Only the *Y. lipolytica* yeast strains showed an ability to produce pigment, except for the PII6a, PII6b, and PII6c strains. None of the strains of the two species analyzed degraded histidine to histamine, however, the *Y. lipolytica* yeast showed an ability to produce more biogenic amines. All the *D. hansenii* yeast strains produced killer toxins. Only three strains of *Y. lipolytica* (JII1a, JII1b, JII1c) demonstrated resistance to those killer toxins.

Key words: proteolytic activity, yeast starters in cheese making, *Yarrowia lipolytica*, *Debaryomyces hansenii* ☒