

MIKROFLORA DROŹDŹOWA NATURALNIE FERMENTOWANYCH WARZYW

Zbigniew Lazar¹, Michał Piegza¹, Ewa Walczak²,
Wojciech Barszczewski¹, Małgorzata Robak¹

¹ Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

² Państwowa Wyższa Szkoła Zawodowa im. Witelona w Legnicy

Streszczenie. W prezentowanej pracy postanowiono ustalić, które gatunki drożdży zasiedlają domowe fermentowane produkty: kiszzone ogórki, kiszoną kapustę oraz kiszone mieszane warzywa. Z wybranych do badań kiszzonek wyizolowano 75 szczepów drożdży, które zidentyfikowano na podstawie o testu API (bioMerieux), amplifikacji wybranych regionów genów rDNA (NS3-ITS4) i analizy restrykcyjnej oraz skanowania genomu w poszukiwaniu sekwencji mikrosatelitarnych. Za dominującą mikroflorę wszystkich kiszzonych produktów uznano drożdże *Saccharomyces cerevisiae* (38,7% izolatów) i *Yarrowia lipolytica* (25,6% izolatów). Z kiszonych produktów wyizolowano także szczepy należące do następujących gatunków: *Pichia etchellsii*, *P. ohmerii*, *Candida holmii*, *C. pelliculosa* i *Shizosaccharomyces japonicus*. Wykorzystując API 32C, niektóre izolaty zidentyfikowano tylko do rodzaju, a z uwagi na ubogie bazy danych szczepów wzorcowych nie wszystkie izolaty udało się jednoznacznie zidentyfikować na poziomie gatunku technikami molekularnymi. Wyniki badań pozwoliły na rozbudowanie tworzonej bazy danych o nowe szczepy drożdży (szczepy o odmiennych profilach restrykcyjnych), co w przyszłości powinno ułatwić prowadzenie prac identyfikacyjnych.

Słowa kluczowe: drożdże, RAPD, PCR, RLFP, kiszzonki

WSTĘP

Drożdże są powszechnie obecne w środowisku, jednak mało jest danych dotyczących izolatów występujących w żywności tradycyjnie fermentowanej czy ukwaszanej. W Polsce, kraju o dużej tradycji kiszenia warzyw, brak jest opublikowanych danych dotyczących

© Copyright by Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Badania wykonano w ramach grantu MNiSW Nr N N312 140733

Adres do korespondencji – Corresponding author: Zbigniew Lazar, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, 51-630 Wrocław, ul. J. Chełmońskiego 37/41, e-mail: zbigniew.lazar@up.wroc.pl

gatunków drożdży występujących w naturalnie kiszonych ogórkach i kapuście. Identyfikację drożdży można przeprowadzić z wykorzystaniem klasycznych metod opierających się na charakterystyce morfologicznej i fizjologicznej, którą otrzymujemy dla danego izolatu po wykonaniu wielu testów. Pewnym uproszczeniem są dostępne zestawy identyfikacyjne (np. API 32C, bioMerieux, Francja), które często wystarczają do określenia gatunku. Nie gwarantują one jednak otrzymania pewnych, jednoznacznych wyników, ponieważ „mierzą” metabolizm komórki i nie umożliwiają różnicowania szczepów należących do tego samego gatunku. Przy użyciu technik biologii molekularnej identyfikacja drożdży na poziomie gatunku, a także różnicowanie poszczególnych szczepów, jest bardziej dokładne. Uzyskanie miarodajnych efektów wymaga jednak posiadania adekwatnych wyników dla szczepów wzorcowych. Metody molekularne znalazły już zastosowanie do badania drożdży występujących w młeczarstwie [Andrighetto i in. 2000, Lopandic i in. 2006], browarnictwie [Robak i in. 2005, Cocolin i in. 2011] oraz innych fermentowanych produktach żywnościowych [Tominaga 2004, Raspor i in. 2006, Mercado i in. 2007, Vogel i Ehrmann 2008, Rantsiou i Cocolin 2008, Abriouel i in. 2008, Hublot i Guyot 2008]. Umożliwiają nawet śledzenie zachodzących podczas fermentacji zmian różnorodności populacji mikrobiologicznej [Giraffa i Carminati 2008]. Dzięki tym metodom możliwe jest dokładne określenie gatunków dominujących na danym etapie fermentacji i kwaszenia.

Celem badań było poznanie gatunków drożdży występujących w Polsce, w tradycyjnie fermentowanej kapuście, ogórkach i mieszankach warzywnych. Do identyfikacji gatunku oraz zróżnicowania szczepów zastosowano galerie API 32C (bioMerieux), analizę restrykcyjną powielonego fragmentu NS3-ITS4 rDNA (PCR-RFLP rDNA) oraz skanowanie genomu poprzez losową amplifikację polimorficznego DNA (RAPD) z czterema starterami mikrosatelitarnymi.

MATERIAŁ I METODY

Szczepy drożdży

Kiszone ogórki, kapusta oraz mieszanki warzywne pochodziły z domowych gospodarstw z terenu Dolnego Śląska, Kołobrzegu i Rybnika. Szczegółowy wykaz pobranych do badań próbek przedstawiono w tabeli 1. Z próbek tych izolowano szczepy i wstępnie identyfikowano za pomocą testów API 32C (bioMerieux) oraz z wykorzystaniem metod molekularnych. Jako podłoże izolacyjne stosowano podłoże OGY (zawierające oksytetracyklinę (Sigma), glukozę (POCH), ekstrakt drożdżowy (DIFCO)). Wzrost drożdży prowadzono w temperaturze 28°C przez 3–7 dni. Poszczególne izolaty przeszczepiano na skosy agarowe z podłożem YM (ekstrakt drożdżowy 5g/l i ekstrakt słodowy 3g/l). Izolaty pozyskane z kiszonych ogórków, kiszonej kapusty i kiszonych mieszanych warzyw zdeponowano w kolekcji własnej Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. W pracy wykorzystano też posiadane w kolekcji następujące szczepy wzorcowe: *Yarrowia lipolytica* A-101, *Y. lipolytica* A-101-1.31, *Y. lipolytica* A-101-1.22, *Y. lipolytica* ATCC 8661S, *Y. lipolytica* ATCC 32338A, *S. cerevisiae* PCM 2103, *S. cerevisiae* CLIB 251, *Saccharomyces pastorianus* 1244, *S. pastorianus* CLIB 537, *S. pastorianus* CLIB 276, *S. bayanus* 320 oraz *Schizosaccharomyces pombe* 356 i *Sch. japonicus* 354. Wzorcowe szczepy wykorzystano w molekularnej iden-

tyfikacji i analizie podobieństwa. Niektóre ze szczepów wzorcowych zostały wcześniej pozyskane z uznanych światowych kolekcji (ATCC – American Type Culture Collection; PCM – Polish Collection of Microorganismes; CLIB – Collection de Levures d’Intérêt Biotechnologique).

Tabela 1. Pochodzenie analizowanych szczepów drożdży, liczba izolatów oraz oznaczenie
Table 1. Provenance of analyzed yeast strains, number of isolates and nicknames

Gospodarstwo Farm	Liczba wyizolowanych szczepów Number of isolated strains	Oznaczenie Nickname
Kiszzone ogórki – Pickled cucumbers		
Świdnica/1	4	1.1; 1.3–1.5
Świdnica/2	3	1.III–1.V
Jastrzębie Zdrój/1	6	2.1–2.6
Jastrzębie Zdrój/2	5	2.I–2.V
Borynia/1	4	3.1–3.4
Borynia/2	3	3.I–3.III
Kaczyce	6	4.1–4.6
O1	6	5.1–5.5;5.7
O2	5	6.1– 6.5
Σ	42	
Kiszona kapusta – Sauerkraut		
Kaczyce	4	4.I–4.III; 4.P
Świdnica	4	5.III–5.VI
Rybnik	3	6.I–6.III
K1	4	7.1–7.4
K2	3	8.1–8.3
Σ	18	
Kiszona mieszanka warzywna – Pickled vegetables		
Świdnica/1	5	7.I–7.V
Świdnica/2	3	8.I–8.III
Lwówek Śląski	2	9.1–9.2
Kołobrzeg	3	9.I–9.III
S1	2	10.1–10.2
Σ	15	
Ogólna liczba Total	75	

Izolacja DNA

Kultury drożdży hodowano przez 20 godzin w płynnym podłożu YM (ekstrakt drożdżowy 5g/l i ekstrakt słodowy 3 g/l), w temperaturze 28°C z wykorzystaniem wstrząsarki (New Brunswick Co.). Hodowle wirowano przez 20 minut przy 12 000 obr./min (wirówka 3-16K, Sigma). Odwirowana biomasa drożdży po przemyciu sterylną wodą destylowaną i ponownym odwirowaniu posłużyła do izolacji DNA według zmodyfikowanej metody Hoffmana i Winstona opisaną przez Barszczewskiego i Robak [2004].

PCR i analiza restrykcyjna uzyskanego produktu amplifikacji: PCR-RFLP rDNA

Z wykorzystaniem starterów NS3 – ITS4 amplifikowano część genu rybosomalnego DNA zawierającą obydwa fragmenty rozdzielające (ITS1, ITS2), cały fragment 5,8S rDNA oraz fragment obejmujący 18S rDNA. Reakcję PCR prowadzono w termocyklerze (Biometra) w warunkach podanych w pracy Walczak i in. [2007]. Wielkość uzyskanego produktu amplifikacji określano po elektroforezie w 1% żelu agarozowym (aparatury Midi, Sigma) i dokumentowano poprzez wykonanie zdjęcia w systemie BioCapt (Wilber Lourmat). Produkty PCR trawiono przez 2 godz. z udziałem następujących endonukleaz: *HaeIII*, *MspI*, *ScrFI* (Fermentas, 37°C w buforze firmowym) w odpowiednich buforach. Ilość i wielkość produktów hydrolizy oceniano elektroforetycznie (nanoszono 10 µl/ścieżkę i rozdzielano przez 1,5 godz. przy stałym napięciu 120 V) oraz dokumentowano w postaci zdjęcia. Otrzymane profile porównywano z profilami 34 szczepów referencyjnych i na tej podstawie zidentyfikowano nieznany izolant.

RAPD

W metodzie losowej amplifikacji polimorficznego DNA (RAPD) wykorzystano startery mikrosatelitarne o sekwencjach typu: (GTG)₅, (GAC)₅, (GACA)₄ oraz fragment sekwencji faga M13 (5'-GAGGGTGGCGTTCT-3'). Reakcje powielenia materiału genetycznego przeprowadzono w termocyklerze (Biometra) według Walczak i in. [2007]. Elektroforezę uzyskanych fragmentów DNA oraz dokumentację uzyskanych profili prowadzono w warunkach analogicznych do warunków zastosowanych w przypadku PCR-RFLP rDNA.

Analiza uzyskanych profili DNA i wprowadzanie do bazy danych

Zdjęcia profili DNA dokumentowane za pomocą oprogramowania BioCapt (Wilber Lourmat) przenoszono w postaci plików graficznych (*.tif) do oprogramowania BioGene (Wilber Lourmat). Program ten umożliwia precyzyjną analizę wielkości DNA oraz badanie podobieństw pomiędzy profilami zarówno w obrębie jednego żelu, jak i pomiędzy kilkoma zapisanymi zdjęciami. Dodatkowo, w ramach programu istnieje możliwość precyzyjnego określania podobieństwa, przy wykorzystaniu zaprogramowanych formuł matematycznych (współczynnik Dice). Na podstawie uzyskanych współczynników utworzono dendrogramy podobieństwa szczepów drożdży w odniesieniu do posiadanych wzorców. W celu utworzenia sumarycznego dendrogramu opartego na wynikach analizy restrykcyjnej i kilku analizach RAPD opracowano autorską aplikację WEPA (Wilgosz Excel Pstryczek Application) [Walczak i in. 2007].

WYNIKI

Kolonie, które izolowano z podłoża z oksytetracykliną, w pierwszej kolejności zidentyfikowano na podstawie wykorzystywanych źródeł węgla i programu identyfikacyjnego producenta galerii API 32C, (bioMerieux), a następnie metodami molekularnymi. Wyniki tak przeprowadzonej identyfikacji przedstawiono w tabelach 2–4. Dominującą mikroflorą drożdżową okazały się szczepy z gatunku *S. cerevisiae* oraz *Y. lipolytica*, stanowiące odpowiednio 38,7 i 16% ogólnej liczby izolatów. W przypadku 18 szczepów identyfikacja gatunku nie była możliwa. Trudności dotyczyły dyskryminacji pomiędzy *C. utilis*, a *C. pelliculosa* dla pięciu szczepów z kiszonych ogórków (1.1; 1.3; 4.1; 5.1; 6.2),

czterech z kiszonej kapusty (4.II; 4.III; 8.2; 8.3) i dwóch z kiszonej mieszanki warzywnej (7.V; 8.I) oraz pomiędzy *C. guilliermondi* i *C. famata* dla trzech szczepów z kiszonych ogórków (1.4; 4.2; 5.2), dwóch z kiszonej kapusty (4.P; 7.2) oraz dwóch z kiszonej mieszanki warzywnej (9.I; 9.II).

Testy API nie umożliwiają identyfikacji gatunku w przypadku rodzaju *Geotrichum* czy *Schizosaccharomyces* i dlatego w tabeli 2 podano tylko rodzaj. Dla szczepów zaznaczonych gwiazdką (tab. 2, 4) w identyfikacji molekularnej uzyskano odmienne wyniki niż w identyfikacji fizjologicznej. Dla wszystkich szczepów wykonano analizę PCR-RFLP - rDNA oraz RAPD z czterema starterami. Wyniki w postaci poszczególnych elektroforegramów przedstawiono na rysunkach (rys. 1, 2).

Tabela 2. Zidentyfikowane testem API 32C gatunki drożdży wyizolowane z kiszonych ogórków oraz częstość ich występowania (% ogólnej liczby izolatów)

Table 2. API 32C identification of yeasts strains isolated from pickled cucumber and frequency of occurrence (% of all isolated strains)

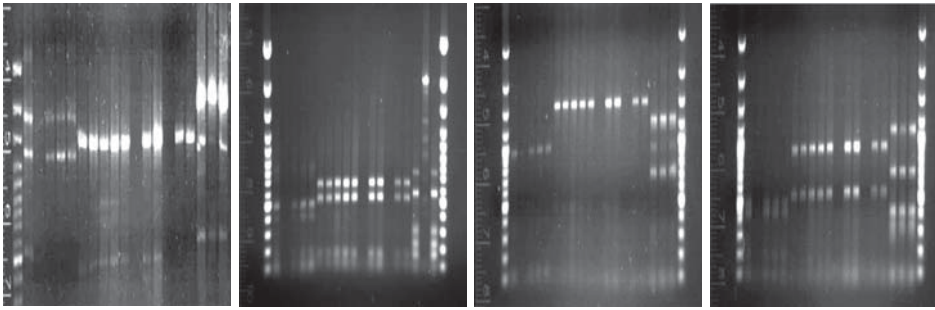
Gatunek Species	Szczep Strain	Procent z ogólnej liczby szczepów [%] Percentage according to total strains number
<i>C. utilis/C. pelliculosa</i>	1.1 ^a ; 1.3 ^a ; 4.1 ^{a*} ; 5.1; 6.2	12,2
<i>C. guilliermondi/C. famata</i>	1.4 ^a ; 4.2 ^{b*} ; 5.2	7,3
<i>S. cerevisiae</i>	1.5 ^c ; 3.2 ^c ; 3.1 ^d ; 3.II; 3.III ^d ; 4.3 ^{b*} ; 4.4 ^{e*} ; 5.3; 5.4; 5.7; 6.1 ^f ; 6.3 ^f ; 6.5 [*]	31,0
<i>C. pelliculosa</i>	1.III ^a ; 1.IV ^a	4,9
<i>P. etchellsii</i>	1.V; 4.5 ^{e*} ; 4.6 ^{e*}	7,3
<i>C. lipolytica/Yarrowia lipolytica</i>	2.1; 2.2; 2.4; 2.5; 2.6; 2.I; 2.II; 2.III; 2.IV; 2.V; 6.4 ^{e*}	11/26,8
<i>P. ohmeri</i>	2.3 [*] ; 3.4	2/4,9
<i>C. holmii</i>	3.1; 3.3	2/4,9
<i>Geotrichum</i> sp.	5.5 ^g	1/2,4

* odmiennie zidentyfikowane w analizie molekularnej – differently identified in molecular analysis

^{a-g} izolaty wykazujące wzajemnie wysokie podobieństwo w analizie molekularnej – strains showing mutually high similarity in molecular analysis

Kiszone ogórki

Wśród izolatów z fermentowanych ogórków w identyfikacji API 32C dominowały szczepy *S. cerevisiae* (13) oraz *C. lipolytica* (11) stanowiące odpowiednio 31 i 25,6% izolowanych drożdży (tab. 2). Trzy szczepy zidentyfikowano jako *P. etchellsii*, po dwa jako *C. pelliculosa*, *P. ohmerii*, *C. holmii*. Dziewięć szczepów zidentyfikowano metodą API32 tylko do rodzaju *Candida* (8 izolatów: *C. utilis/C. pelliculosa/C. guilliermondi/C. famata*) i *Geotrichum* (1 szczep). Zbiorcza analiza PCR-RFLP rDNA izolatów z kiszonych ogórków wykazała bardzo wysokie podobieństwo szczepów zidentyfikowanych testami API jako *C. lipolytica/Y. lipolytica* (rys. 3). Pośród 11 szczepów podobnych w 99% znalazł się jeden (2.3) zidentyfikowany w testach API jako *P. ohmerii*. Należy zatem uznać, że identyfikacja API 32C dla tego szczepu nie była prawidłowa. Szczep 6.4, zidentyfikowany z wykorzystaniem testów API 32C jako *C. lipolytica/Y. lipolytica*, wykazał z kolei najwyższe podobieństwo do szczepu 5.5 (81%), zidentyfikowanego w testach API jako *Geotrichum* sp.



PCR NS3-ITS4

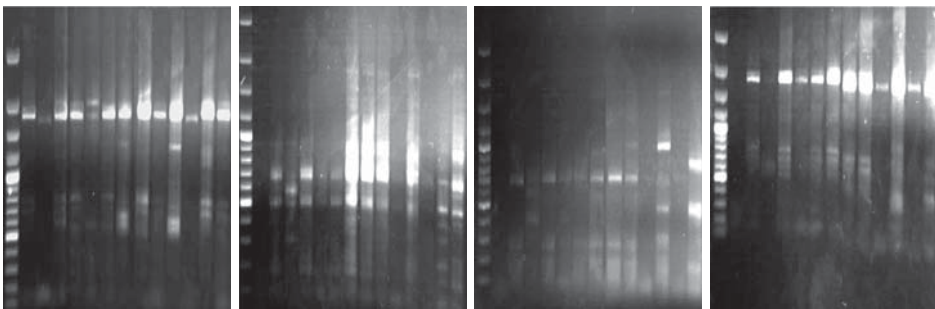
Hae III

Msp I

Scr FI

Kolejność ścieżek od lewej: marker oraz szczepy – Order of the paths from the left: marker and strains

1.1; 1.3; 1.4; 1.III; 1.IV; 2.1; 2.2; 2.3; 2.4; 2.5; 2.6; 2.I; 2.II; 2.III; 2.IV; 2.V; 3.I; 3.II; 3.III



PCR NS3-ITS4

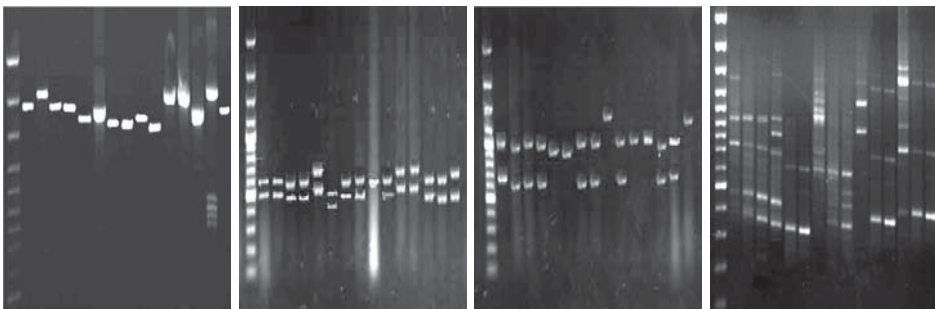
Hae III

Msp I

Scr FI

Kolejność ścieżek od lewej: marker oraz szczepy – Order of the paths from the left: marker and strains

4.I; 5.I; 5.III; 5.IV; 5.V; 5.VI; 7.1; 7.2; 7.3; 7.4; 8.1; 8.2; 8.3



PCR NS3-ITS4

Hae III

Msp I

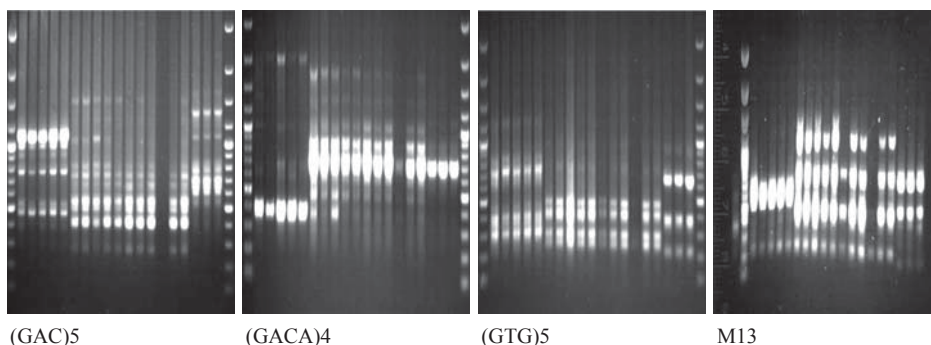
Scr FI

Kolejność ścieżek od lewej: marker oraz szczepy – Order of the paths from the left: marker and strains

7.I; 7.II; 7.III; 7.IV; 7.V; 8.I; 8.II; 8.III; 9.1; 9.2; 9.I; 9.II; 9.III; 10.1; 10.2

Rys. 1. Amplifikacja i analiza restrykcyjna fragmentu NS3-ITS4 genu rDNA niektórych szczepów drożdży wyizolowanych z kiszonych ogórków (A), z kiszonej kapusty (B) oraz kiszonych warzyw (C)

Fig. 1. Amplification and analysis of restrictions place of NS3-ITS4 rDNA gen some of the yeast strains isolated from: pickled cucumber (A), sauerkraut (B) and pickled vegetables (C)



Kolejność ścieżek od lewej marker oraz szczepy – Order of the paths from the left marker and strains
1.1; 1.3; 1.4; 1.III; 1.IV; 2.1; 2.2; 2.3; 2.4; 2.5; 2.6; 2.I; 2.II; 2.III; 2.IV; 2.V; 3.1; 3.II; 3.III

Rys. 2. Analiza RAPD z czterema starterami dla wybranych szczepów izolowanych z kiszonych ogórków

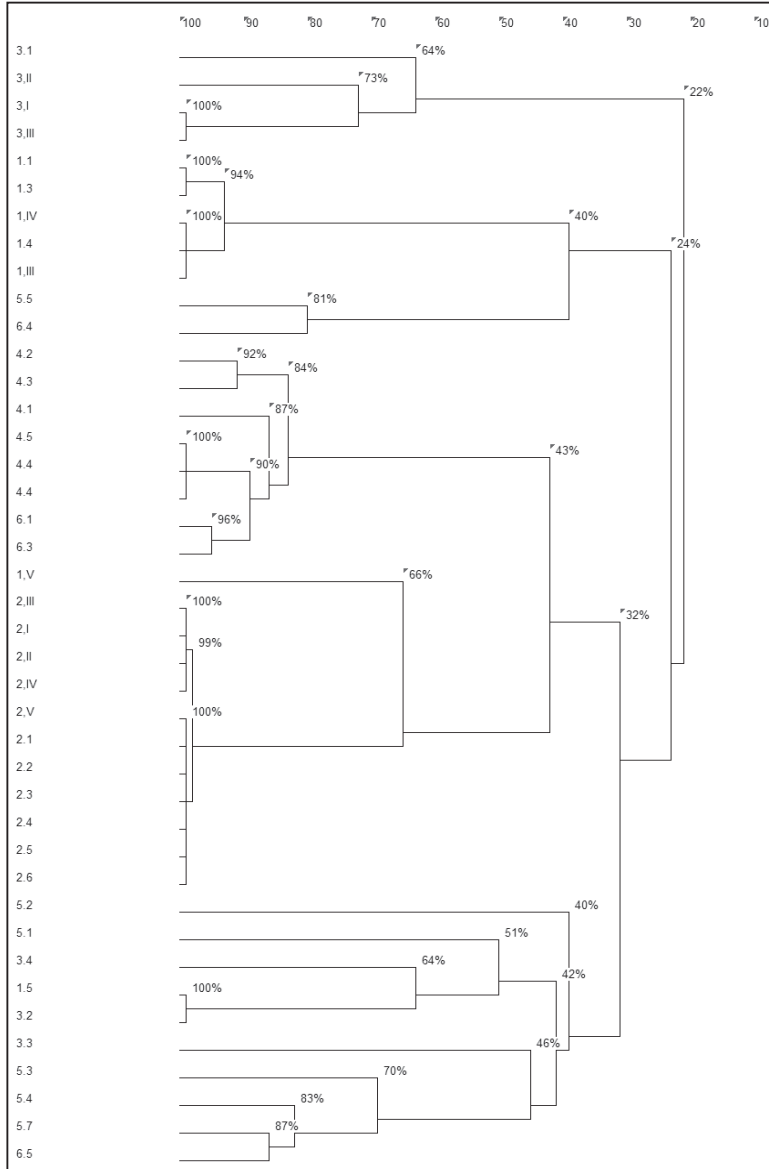
Fig. 2. RAPD analysis with four different starters for the strains isolated from pickled cucumber

Wśród izolatów z fermentowanych ogórków w identyfikacji API 32C dominowały szczepy *S. cerevisiae* (13) oraz *C. lipolytica* (11) stanowiące odpowiednio 31 i 25,6% izolowanych drożdży (tab. 2). Trzy szczepy zidentyfikowano jako *P. etchellsii*, po dwa jako *C. pelliculosa*, *P. ohmerii*, *C. holmii*. Dziewięć szczepów zidentyfikowano metodą API32 tylko do rodzaju *Candida* (8 izolatów: *C. utilis*/*C. pelliculosa*/*C. guilliermondi*/*C. famata*) i *Geotrichum* (1 szczep). Zbiorcza analiza PCR-RFLP rDNA izolatów z kiszonych ogórków wykazała bardzo wysokie podobieństwo szczepów zidentyfikowanych testami API jako *C. lipolytica*/*Y. lipolytica* (rys. 3). Pośród 11 szczepów podobnych w 99% znalazł się jeden (2.3) zidentyfikowany w testach API jako *P. ohmerii*. Należy zatem uznać, że identyfikacja API 32C dla tego szczepu nie była prawidłowa. Szczep 6.4, zidentyfikowany z wykorzystaniem testów API 32C jako *C. lipolytica*/*Y. lipolytica*, wykazał z kolei najwyższe 81% podobieństwo do szczepu 5.5 zidentyfikowanego jako *Geotrichum* sp. Wszystkie szczepy z kiszonych ogórków z Kaczyc (4.1–4.6), pomimo zaklasyfikowania na podstawie wyników testów API 32C do różnych gatunków (tab. 2), wykazywały wysokie 84% podobieństwo (rys. 4) i należałyby je zaliczyć do jednego gatunku (*S. cerevisiae*). Wiele badanych izolatów wykazywało wzajemnie 96–100% podobieństwo (rys. 3). Podobne izolaty zgrupowano w siedem zespołów (a–g). Poszczególne zespoły obejmują następujące szczepy: a – 1.1/1.3/1.IV/1.4/1.III; b – 4.2/4.3; c – 1.5/3.2; d – 3.1/3.III; e – 4.5/4.4/4.6; f – 6.1/6.3 oraz g – 6.4/5.5 (tab. 2). Na podstawie tak wysokiego podobieństwa należy uznać, że szczepy z danej grupy przynależą do tego samego gatunku.

Gatunkowa przynależność wybranych szczepów izolowanych z ogórków nie została w pełni potwierdzona zastosowanym protokołem analitycznym. Powielając metodą PCR fragment rDNA (NS3-ITS4), uzyskano produkty różniące się wielkością oraz odmiennym wzorem w analizie restrykcyjnej. Przykładowe wyniki analizy restrykcyjnej (PCR-RFLP rDNA) wskazują na odmienność izolatów zidentyfikowanych testami API jako *Y. lipolytica* od wzorców tego gatunku dostępnych w WEPABAZ (rys. 4A). Wykazują one tylko 56% podobieństwa do wzorców i 100% pomiędzy sobą. Identyczny profil dla izolatów i wzorców otrzymano w analizie ampikonów po trawieniu enzymem restrykcyjnym *MspI* (rys. 1A), natomiast odmienny po trawieniu enzymem *ScrFI*. Enzym ten hydrolizuje produkt amplifikacji wybranego regionu rDNA (1590/1600 pz) izolatów *Y. lipolytica* na

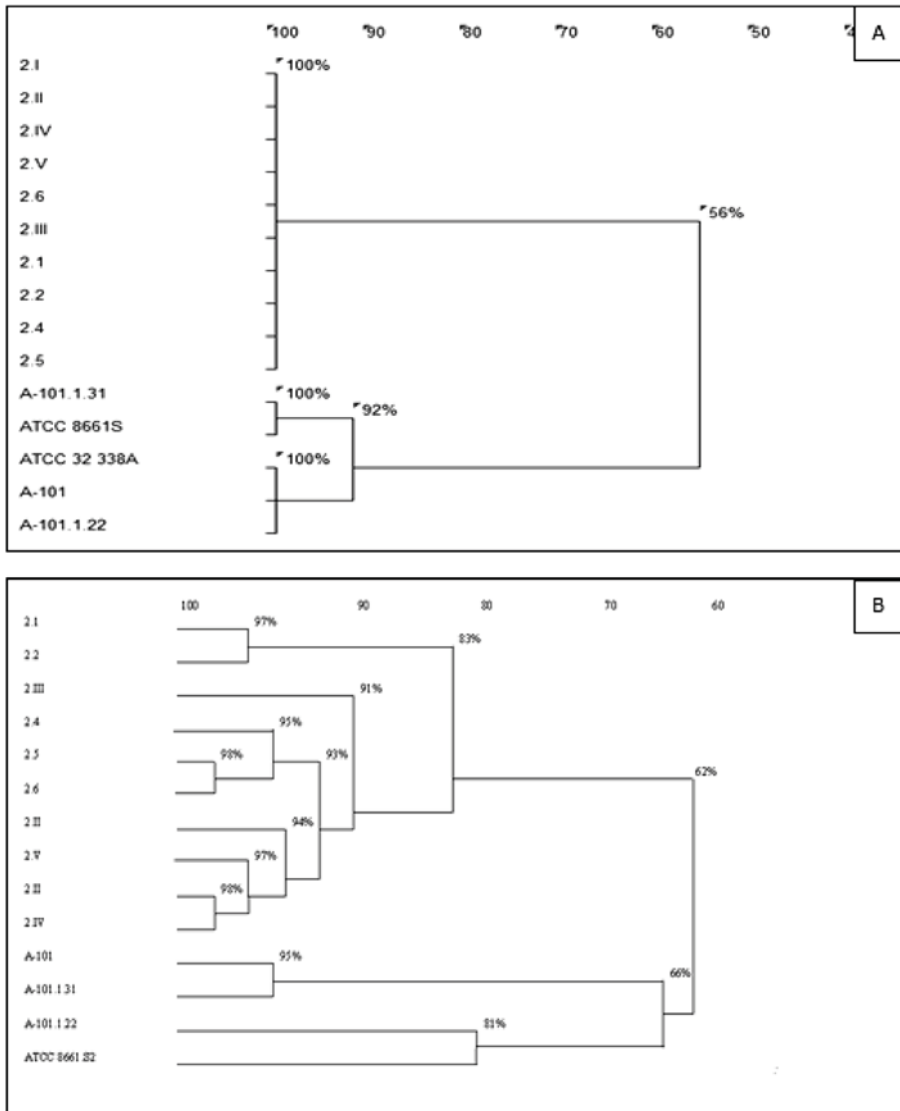
dwa duże fragmenty (1000 pz i 580 pz), podczas gdy w przypadku wzorców odcięcie dotyczy małego fragmentu nie obserwowanego w elektroforezie (poniżej 150 pz).

W analizie RAPD z czterema starterami izolaty *Y. lipolytica* wykazywały od 83 do 98% podobieństwa (rys. 4B). Można je zatem uznać za identyczne, chociaż ich profil różnił się od profili wzorców wykorzystywanych w pracy.



Rys. 3. Podobieństwo szczepów wyizolowanych z kiszonych ogórków na podstawie wyników analizy PCR-RFLP rDNA

Fig. 3. Similarity of strains isolated from pickled cucumbers on the basis of the results of PCR-RFLP rDNA analysis



Rys. 4. Podobieństwo szczepów *Y. lipolytica* (wzorców i izolatów) na podstawie (A) analizy PCR-RFLP rDNA oraz (B) zbiorczej PCR-RFLP rDNA plus RAPD z czterema starterami
 Fig. 4. The similarity of *Y. lipolytica* strains on the basis of PCR-RFLP rDNA analysis (A) and (B) global: PCR-RFLP rDNA and four starter's RAPD analysis (B)

Kiszona kapusta

Wśród izolatów z kiszonej kapusty w identyfikacji API 32C wykazano osiem szczepów *S. cerevisiae* oraz po jednym z gatunków: *C. holmii*, *P. ohmerii*, *P. etchellsii* (tab. 3). Tylko cztery izolaty zidentyfikowano do rodzaju *Candida* (*C. utilis*/*C. pelliculosa*/*C. guilliermondi*/*C. famata*). Szczepy te były bardzo zróżnicowane w analizie PCR-RFLP rDNA (rys. 5). Izolaty 4.P oraz 6.I wykazały natomiast 100% podobieństwo, pomimo różnej identyfikacji metodą API 32C.

Tabela 3. Zidentyfikowane testem API 32C gatunki drożdży wyizolowane z kiszonej kapusty oraz częstość ich występowania (% ogólnej liczby izolatów).

Table 3. API 32C identification of yeasts strains isolated from sauerkraut and the frequency of occurrence (% of all isolated strains)

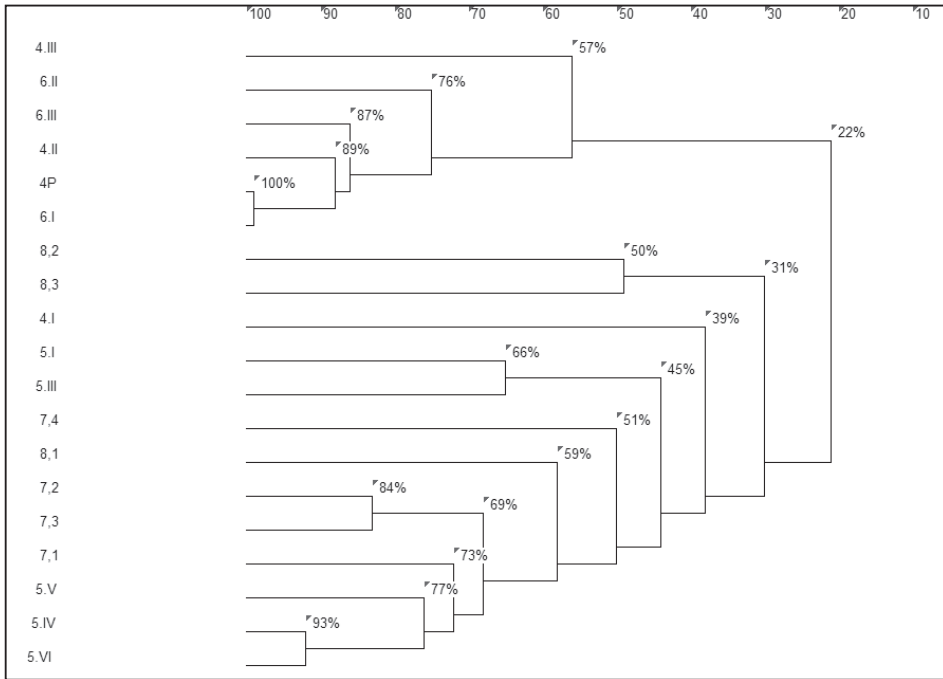
Gatunek Species	Szczepy Strains	Procent z ogólnej liczby szczepów [%] Percentage according to total strains number
<i>S. cerevisiae</i>	4.I; 5.I; 5.IV; 5.V; 6.II; 7.1; 7.3; 7.4	42,1
<i>C. utilis</i> / <i>C. pelliculosa</i>	4.II; 4.III; 8.2; 8.3	21,1
<i>C. guilliermondi</i> / <i>C. famata</i>	4.P*; 7.2	10,5
<i>C. holmii</i>	5.VI; 6.III	10,5
<i>C. lipolytica</i> / <i>Yarrowia lipolytica</i>	6.I	5,3
<i>P. ohmerii</i>	8.1	5,3

*odmiennie zidentyfikowane w analizie molekularnej – differently identified in molecular analysis

W odniesieniu do izolatów z kiszonych sałatek, zidentyfikowanych metodą API jako *S. cerevisiae* (tab. 4), sytuacja była podobna jak w przypadku szczepów zidentyfikowanych jako *C. lipolytica*/*Y. lipolytica*. Izolaty te wykazywały od 68 do 97% podobieństwa pomiędzy sobą (rys. 6A) i tylko 47% podobieństwa do innych gatunków z grupy *Saccharomyces sensu stricto* (rys. 6B). Należy jednak podkreślić, że w pracy jako wzorce stosowano głównie kolekcyjne szczepy o innej etiologii (browarne). Ponadto, porównując izolaty browarne i szczepy z fermentowanej żywności, zwrócono uwagę na to, że powielony fragment genu rDNA (NS3-ITS4) o wielkości ok. 2000 pz w przypadku obu ww. grup po trawieniu enzymem *MspI* dawał dwa fragmenty (rys. 1C). W przypadku izolatów pozyskanych w pracy fragmenty te były jednak o około 200 pz zasad mniejsze. Wskazuje to zatem na obecność w genomie izolatów z fermentowanej żywności, dodatkowych (co najmniej 2) miejsc restrykcji dla tego enzymu i odcięciu krótkich fragmentów nie obserwowanych w elektroforezie.

Kiszone mieszanki warzywne

W kiszonej sałatce warzywnej dominowały z kolei szczepy należące do gatunku *S. cerevisiae* (55,3%) oraz z rodzaju *Candida* (33,3%). W sałatkach tych nie wykryto szczepów z gatunku *Y. lipolytica*. Dla szczepu 7.IV wyizolowanego z fermentowanej sałatki warzywnej potwierdzenie przynależności gatunkowej, aczkolwiek odmiennej niż oznaczono z wykorzystaniem API 32C, uzyskano w dwustopniowej analizie opartej na RFLP-PCR rDNA. W pierwszej wykazano 47% podobieństwa do grupy reprezentowanej przez *Schizosaccharomyces pombe* (rys. 7A), a drugiej 100% podobieństwo do *Sch. japonicus* (rys. 7B).



Rys. 5. Podobieństwo szczepów izolowanych z kiszonej kapusty na podstawie analizy PCR-RFLP rDNA

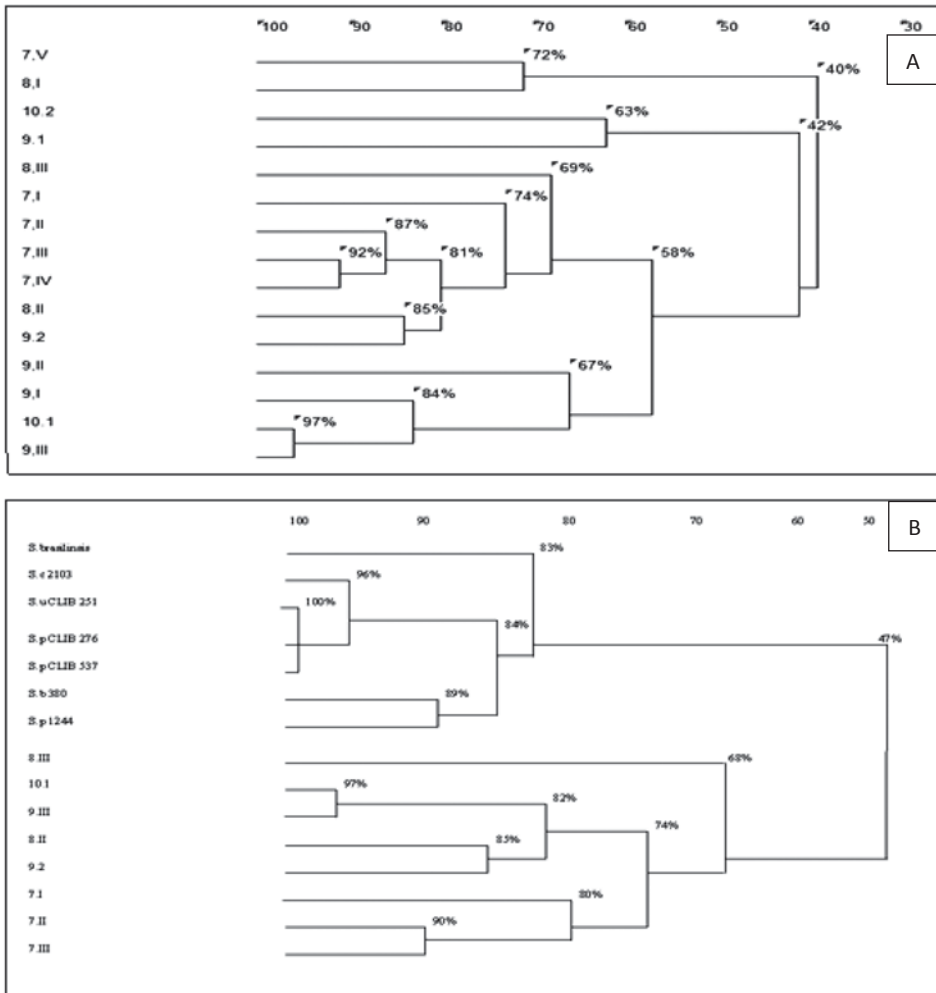
Fig. 5. Similarity of strains isolated from sauerkraut based on of PCR-RFLP rDNA analysis

Tabela 4. Zidentyfikowane testem API 32C gatunki drożdży wyizolowane z kiszonej mieszanki warzywnej oraz częstość ich występowania (% ogólnej liczby izolatów)

Table 4. API 32C identification of yeasts strains isolated from pickled vegetables and the frequency of occurency (% of all isolated strains)

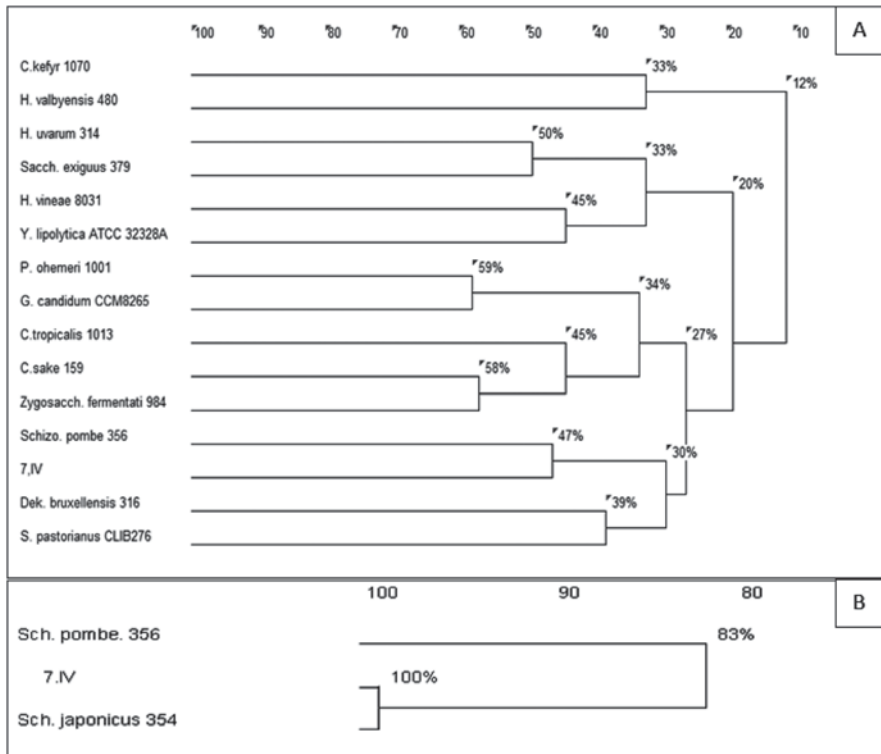
Gatunek Species	Szczepy Strains	Procent z ogólnej liczby szczepów [%] Percentage according to total strains number
<i>S. cerevisiae</i>	7.I; 7.II; 7.III; 8.II; 8.III; 9.2; 9.III; 10.1*	53,3
<i>P. ohmerii</i>	7.IV*	6,7
<i>C. ulilis/C. pelliculosa</i>	7.V;8.1	13,3
<i>C. holmii</i>	9.1*	6,7
<i>C.guilliermondi/C. famata</i>	9.I; 9.II	13,3
<i>P. etchellsii</i>	10.2*	6,7

*odmiennie zidentyfikowane w analizie molekularnej – differently identified in molecular analysis



Rys. 6. Podobieństwo szczepów izolowanych z kiszonych sałatek warzywnych na podstawie analizy PCR-RFLP rDNA. (A) podobieństwo wszystkich izolatów; (B) podobieństwo szczepów identyfikowanych w API jako *S. cerevisiae* do siedmiu wzorcowych szczepów z rodzaju *Saccharomyces*

Fig. 6. Similarity of strains isolated from pickled vegetables on the basis of PCR-RFLP rDNA analysis. (A) similarity between all strains; (B) similarity of strains identified by API test as a *S. cerevisiae* to seven type strains of *Saccharomyces* genus



Rys. 7. Molekularna identyfikacja szczepu 7.IV do rodzaju (A) oraz do gatunku (B) oparta na analizie PCR-RFLP rDNA

Fig. 7. Molecular identification of 7.IV strain to the genus (A) and species (B) based on PCR-RFLP rDNA analysis

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Wysoco czule i powtarzalne metody oparte na technikach analizujących materiał genetyczny są coraz bardziej popularne jako metody różnicowania szczepów mikroorganizmów. W badaniu drożdży najczęściej wykorzystywane są dwie techniki: polimorfizm długości fragmentów restrykcji (RFLP) genów rDNA oraz losowo amplifikowany polimorficzny DNA (RAPD) [Abriouel i in. 2008]. Pierwsza z nich, bazująca na analizie restrykcyjnej genów rRNA (PCR-RFLP rDNA), pozwala na różnicowanie szczepów należących do tego samego rodzaju [Yamagishi i in. 1999, Loureiro i Querol 1999], a często nawet do tego samego gatunku [Baleiras-Couto i in. 1996, Perez i in. 2001, Raspor i in. 2006]. W metodzie tej wykorzystana jest budowa genu 45S pre-rRNA kodującego jednocześnie trzy rybosomalne kwasy nukleinowe (18S rRNA; 5,8S rRNA i 26S rRNA) i zawierającego sekwencje niekodujące (ITS1, ITS2) [Gromadka i Rytka 2000]. Gen ten występuje w wielu kopiach w genomie jądrowym komórki eukariotycznej. U kilkunastu gatunków drożdży kodujące obszary tego genu są wysoce homologiczne (od 87–99%), podczas gdy obszary niekodujące różnią się zarówno wielkością, jak i sekwencją nukleotydową [de Barros Lopes i in. 1996, Souciet i in. 2000, Las Heras-Vazquez i in. 2003, Lopandic i in.

2006, Senses-Ergul i in. 2006]. Pham i in. [2011] stosując technikę PCR-RFLP rDNA opartą na analizie restrykcyjnej regionów ITS1 oraz ITS2 z wykorzystaniem 3 endonukleaz (*CfoI*, *HaeIII*, *HinfI*), wykazali obecność 59 szczepów drożdży „dzikich” (nie *Saccharomyces* i nie browarnych *Saccharomyces*) skażających proces produkcji piwa, a także obecność izolatów z rodzaju *Pichia*. W tej pracy także wykazano odmienność niekodujących fragmentów (ITS1 i ITS2).

Druga z ww. technik biologii molekularnej RAPD jest odmianą PCR. Jak dotąd była ona wykorzystywana m.in. do różnicowania drożdży górnej i dolnej fermentacji [Tournai-Lehoczki i Dlauchy 2000] oraz drożdży występujących w różnych produktach żywnościowych [Robak i in. 2005, Piegza i in. 2006, Walczak i in. 2007]. Fakharedine i in. [2011] zastosowali mikrosatelitarny starter (GTG)₅ do różnicowania drożdży zawartych w ściekach z pochodzących z wyłaczarni oleju z oliwek. Guenaoui i in. [2013] z kolei wykorzystali technikę RAPD w badaniu pokrewieństwa odmian czosnku dzikiego (*Allium ampeloprasum*). W porównaniu z PCR jedyna różnica w wykonaniu polega na zastosowaniu jednego, a nie dwóch starterów reakcji amplifikacji fragmentu (ów) materiału genetycznego. W RAPD powieleniu ulegają przypadkowe odcinki DNA rozpoczynające się sekwencją komplementarną do zastosowanego startera i kończące sekwencją użytego startera. „Losowe” przyłączanie się starterów podczas PCR zachodzi na całej długości matrycy i dlatego przeprowadzamy w ten sposób „skanowanie” całego genomu. Wadą tej metody jest stosunkowo niska powtarzalność analiz przeprowadzanych przez różne laboratoria [Marciniak i Robak 2013]. Specyficzność RAPD jest ściśle związana z sekwencją wykorzystanego startera i dlatego w celu poprawnego różnicowania często stosuje się kilka amplifikacji z różnymi starterami [Robak i in. 2005]. Wielkość produktów jest także uwarunkowana zastosowanym czasem etapu elongacji podczas PCR. Im jest on krótszy, tym krótsze odcinki ulegają powieleniu. Zmienność produktów w RAPD jest także uwarunkowana zastosowaną polimerazą, dobraną temperaturą annealingu, a nawet wykorzystanym termocyklerem. Dlatego w metodzie RAPD tak istotne jest wybranie odpowiedniego profilu temperaturowo-czasowego podczas reakcji powielania DNA i stosowanie tej samej polimerazy. Niemniej, jest to najtańsza metoda, nieuwarunkowana wcześniejszym poznaniem sekwencji genomu czy wybranych genów.

Metodologia oparta na RAPD sprawdziła się także w przypadku oceny zmian genetycznych jakie zaszły w genomie transformantów *Y. lipolytica*. W czterech analizach RAPD ze starterami M13, (GTG)₅, (GAC)₅ i (GACA)₄ transformanty, w których doszło do homologicznej lub heterologicznej integracji wprowadzanej kasyety, podzieliły się na dwie grupy [Walczak 2009, praca doktorska, dane niepublikowane].

Uzyskane profile elektroforetyczne porównywano ze zgromadzonymi w WEPABAZ wzorcami [Barszczewski i in. 2006]. Nie zawsze uzyskiwano jednak jednoznaczne wyniki. Także klasyczna identyfikacja oparta na testach wzrostowych nie zawsze umożliwiła dokonanie pełnej identyfikacji. Verweij i in. [1999] porównali siedem systemów identyfikacji fizjologicznej drożdży, uzyskując właściwy wynik dla 59,6–80,8% badanych szczepów drożdży klinicznych. Biorąc pod uwagę wyniki badań własnych oraz prac innych autorów, należy zatem stwierdzić, że w wielu przypadkach dopiero zderzenie różnych metod umożliwia poprawną identyfikację.

PODSUMOWANIE

Zastosowana metodologia badawcza (identyfikacja fizjologiczna i molekularna) umożliwiła identyfikację i ocenę pokrewieństwa drożdży izolowanych z kiszonych produktów warzywnych. Populacja drożdży izolowanych z fermentowanej żywności cechuje się odmiennymi, od szczepów browarnych czy serowarskich, sekwencjami genomu. W wyniku przeprowadzonych badań wzbogacono kolekcję drożdży w Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności o nowe szczepy, pozyskane w Polsce z naturalnie fermentowanych kiszzonek warzywnych.

WNIOSKI

1. Dominującą mikroflorą drożdżową w kiszonych warzywach są przedstawiciele gatunku *Saccharomyces cerevisiae* i *Yarrowia lipolytica*.

2. Na podstawie analizy profili elektroforetycznych uzyskanych w PCR-RFLP rDNA oraz RAPD wykazano wysokie podobieństwo pośród izolatów zidentyfikowanych jako *S. cerevisiae* oraz izolatów zidentyfikowanych jako *Y. lipolytica*.

3. Szczepy izolowane z fermentowanej żywności wykazują odmienne względem szczepów kolekcyjnych, browarnych i serowarskich właściwości genomu (dodatkowe miejsca restrykcji).

4. W przypadku kilku szczepów molekularna identyfikacja nie potwierdziła przynależności gatunkowej ustalonej na podstawie testów API 32C.

5. Szczepy wyizolowane z jednej partii ogórków, zidentyfikowane jako różne gatunki na podstawie wyników analizy API 32C, w analizie RFLP-PCR rDNA wykazały 84% podobieństwo.

6. Obie zastosowane metody nie dają 100% pewności co do uzyskanych wyników identyfikacji.

7. Metody molekularne jednoznacznie ukazują podobieństwo izolatów należących do tego samego gatunku.

PIŚMIENNICTWO

- Abriouel H., Omar N.B., Pulido R.P., Lopez L.R., Ortega E., Canamero M.M., Galvez A., 2008. Vegetable fermentations [in:] Molecular techniques in the microbial ecology of fermented foods, (eds.) Cocoli L., Ercolini D., Springer, NY. 145–161.
- Andrighetto C., Psomas E., Tzanetakis N., Suzzi G., Lombardi A., 2000. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) for the identification of yeasts isolated from dairy products. Letters in Applied Microbiology, 30, 5–9.
- Baleiras-Couto M.M., Eijssma B., Hofsta H., Huisin't Veld J.H., van der Vossen J.M. B.M., 1996. Evaluation of molecular typing techniques to assign genetic diversity among *Saccharomyces cerevisiae* strains. Applied and Environmental Microbiology, 62, 41–46.
- Barszczewski W., Robak M., 2004. Differentiation of contaminating yeasts in brewery by PCR-based techniques. Food Microbiology 21, 227–231.
- Barszczewski W., Robak M., 2006. PCR-based differentiation and homology of brewing and type strains of the genus *Saccharomyces*. J. Inst. Brew., 112(2), 165–172.
- Bougnoux M-E., Aanensen D.M., Morand S., Theraud M., Spratt B.G., d'Enfert Ch., 2004. Multilocus sequence typing of *Candida albicans*: strategies, data exchange and applications. Infection, Genetics and Evolution, 4, 243–252.

- Cocolin L., Campolongo S., Gorra R., Rolle L., Rantsiou K., 2011. *Saccharomyces cerevisiae* biodiversity during the brewing process of an artisanal beer: A preliminary study. *J. Inst. Brew.* 117(3), 352–358.
- de Barros Lopes M., Soden A., Henschke P.A., Langridge P., 1996. PCR differentiation of commercial yeast strains using intron splice site primers. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 4514–4520.
- Giraffa G., Carminati D., 2008. Molecular techniques in food fermentation: principles and applications [in:] *Molecular techniques in the microbial ecology of fermented foods* (eds.) Cocolin L., Ercolini D., Springer, NY. 1–30.
- Fakharedine N., Ouadghiri M., Amar M., Winterton P., Hafidi M., Ouhdouch Y., 2011. Isolation and identification of a yeast strain involved in the degradation of Marrakech olive mill wastewater. *Eurasia J. Biosci.* 5, 127–137.
- Gromadka R., Rytka J., 2000. Ribosome biogenesis and nucleolar function in yeast. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 5, 191–216.
- Guenauoui C., Mang S., Figliuolo G., Neffati M., 2013. Diversity in *Allium ampeloprasum*: from small and wild to large and cultivated. *Genet. Resour. Crop Evol.* 60, 97–114.
- Hublot C., Guyot J-P., 2008. Other fermentations [in:] *Molecular techniques in the microbial ecology of fermented foods* (eds.) Cocolin L., Ercolini D., Springer, NY. 208–224.
- Jacobsen M.D., Bounoux M-E., d'Enfert Ch., Odds F.C., 2008. Multilocus sequence typing of *Candida albicans* isolates from animals, *Research in Microbiology*, 159, 436–440.
- Las Heras-Vazquez F.R., Mingorance-Cazorla L., Clemente-Jimenez C., Rodriguez-Vico F., 2003. Identification of yeast species from orange fruit and juice by RFLP and sequence analysis of the 5.8S rRNA gene and the two internal transcribed spacer. *FEMS Yeast Research*, 3, 3–9.
- Lopandic K., Zelger S., Bánszky L.K., Eliskases-Lechner F., Prillinger H., 2006. Identification of yeasts associated with milk products using traditional and molecular techniques. *Food Microbiology*, 23(4), 341–350.
- Loureiro V., Querol A., 1999. The prevalence and control of spoilage yeasts in food and beverages. *Trends in Food Science and Technology*, 10, 356–365.
- Marciniak M., Robak M., 2012. PCR jako narzędzie do identyfikacji i różnicowania drobnoustrojów. *Acta Sci. Pol. Biotechnologia* 11(2), 5–16.
- Mercado L., Dalcer A., Masuelli R., Combina M., 2007. Diversity of *Saccharomyces* strains on grapes and winery surfaces: Analysis of their contribution to fermentative flora of Malbec wine from Mendoza (Argentina) during two consecutive years. *Food Microbiology*, 24(4), 403–412.
- Perez M.A., Gallego F.J., Hidalgo P., 2001. Evaluation of molecular techniques for the genetic characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains. *FEMS Microbiology Letters*, 205, 375–378.
- Pham T., Wimalasena T., Box W.G., Koivuranta K., Storgards E., Smart K.A., Gibson B.R., 2011. Evaluation of ITS PCR and RFLP for differentiation and identification of brewing yeast and brewery 'Wild' yeast contaminants. *J. Inst. Brew.* 117(4), 556–568.
- Piegza M., Barszczewski W., Witkowska D., Stempniewicz R., Robak M., 2006. Scanning of *Geotrichum candidum* genome by RFLP-PCR of rDNA and RAPD. *EJPAU, Biotechnology*, 9(3), art. 21.
- Pitarch A., Abian J., Carrascal M., Sanchez M., Nombela C., Gil C., 2004. Proteomics-based identification of novel *Candida albicans* anti-gens for diagnostic of systematic candidiasis in patient with underlying hematological malignancies. *Proteomics*, 10, 3084–3106.
- Połomska X., Juszczak 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. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 57(2), 221–226.
- Rantsiou K., Cocolin L., 2008. Fermented meat products [in:] *Molecular techniques in the microbial ecology of fermented foods* (eds.) Cocolin L., Ercolini D., Springer, NY. 91–118.

- Robak M., Baranowska K., Barszczewski W., Wojtatowicz M., 2005. RAPD jako metoda różnicowania i identyfikacji drożdży. *Biotechnologia*, 4(71), 143–156.
- Senses-Ergul S., Agoston R., Belak A., Deak T., 2006. Characterization of some yeasts isolated from foods by traditional and molecular tests. *Int. J. Food Microbiol.*, 108(1), 120–124.
- Souciet J-L. i wsp., 2000. A set of yeast species for molecular evolution studies. *FEBS Letters*, 487, 1–10.
- Tominaga T., 2004. Rapid identification of pickle yeasts by fluorescent PCR and microtemperature-gradient gel electrophoresis. *FEMS Microbiology Letters*, 238(1), 43–48.
- Tornai-Lehoczki J., Dlauchy D., 2000. Delimitation of brewing yeast strains using different molecular techniques. *Int. J. Food Microbiol.*, 62, 37–45.
- Vogel R.F., Ehrmann M.A., 2008. Sourdough fermentations, [in:] *Molecular techniques in the microbial ecology of fermented foods*. (eds) Cocolin L., Ercolini D., Springer, NY. 119–144.
- Walczak E., Czaplńska 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.
- Yamagishi H., Otsuta Y., Funahashi W., Ogata T., Sakai K., 1999. Differentiation between brewing and non-brewing yeasts using a combination of PCR and RFLP. *J. Appl. Microbiol.*, 86, 505–513.
- Zaręba D., Ziarno M., 2011. Alternatywne probiotyczne napoje warzywne i owocowe. *Bromat. Chem. Toksykol.* XLIV(2), 160–168.

YEASTS MICROFLORA OF NATURALLY FERMENTED VEGETABLES

Abstract. This research aims at determining which yeast types can be encountered in the following home products: pickled cucumbers, sauerkraut and mixed pickled vegetables. Seventy-five strains of yeast have been isolated from the pickles selected for the research. These strains have been identified on the basis of API tests (bioMerieux), amplification of the selected regions of rDNA genes (NS3-ITS4) and restrictive analysis, as well as genome scanning, performed in order to detect microsatellite sequences. Yeast *Saccharomyces cerevisiae* (38.7% isolates) and *Yarrowia lipolytica* (25.6% isolates) have been determined as a dominant microflora for the pickles. There have been also isolated strains belonging to the following types: *Pichia etchellsii*, *P. ohmerii*, *Candida holmii*, *C. pelliculosa* and *Shizosaccharomyces japonicus*. With the use of API 32C, some isolates have been identified merely in accordance to their type, and due to a limited data base of model strains, not all the isolates have been possible to be classified on the level on their type with the support of molecular techniques. The obtained results of the research allowed to supply the database with new yeast strains (strains of different restrictive profiles), which should consequently facilitate conducting the identifying works.

Key words: yeast, RAPD, PCR, RLFP, pickles

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 30.03.2013

Do cytowania – For citation: Lazar Z., Piegza M., Walczak E., Barszczewski W., Robak M., 2013. Mikroflora drożdżowa naturalnie fermentowanych warzyw, *Acta Sci. Pol. Biotechnol.*, 12 (1), 19–36.