

## OCENA PRZYDATNOŚCI SZCZEPÓW DROŻDŻY WYZOLOWANYCH Z KEFIRÓW DO SYNTEZY POLIMERÓW ZEWNĄTRZKOMÓRKOWYCH

Iwona Gientka, Anna Madejska

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

**Streszczenie.** Celem niniejszej pracy było scharakteryzowanie zdolności do wytwarzania polimerów zewnątrzkomórkowych przez szczepy drożdży kefirowych. Zakres pracy obejmował izolację szczepów drożdży z kefirów, ich identyfikację, badanie ilości wytworzonych EPS i analizę morfologii komórek w czasie 48-godzinnej hodowli wytrząsanych w podłożach YPD oraz YM. Wyzolowano 11 różnych szczepów, wśród których zidentyfikowano: 2 szczepy *Candida guilliermondii* oraz *Candida famata*, *Candida kefir*, *Candida inconspicua*, *Cryptococcus humicolus*, *Cryptococcus albidus*, *Kluyveromyces lactis*, *Saccharomyces cerevisiae* oraz *Geotrichum penicillatum*. Wszystkie badane drożdże wytworzyły polimery zewnątrzkomórkowe, a ich zawartość w płynach pochodowlanych zależała od rodzaju szczepu i podłoża. Najwięcej polimerów, około 1200 mg w jednym dm<sup>3</sup> podłoża YPD, oznaczono po hodowli szczepów *Geotrichum penicillatum*, *Saccharomyces cerevisiae* oraz szczepu nr 11. Skład podłoża YM niekorzystnie wpływał na syntezę EPS, ale jednocześnie był przyczyną zwiększonego plonu biomasy wszystkich badanych szczepów. W podłożu YPD uzyskano większą wartość EPS w przeliczeniu na 1 g s.s. biomasy.

**Słowa kluczowe:** drożdże kefirowe, polimery zewnątrzkomórkowe, EPS

### WSTĘP

Określeniem EPS (ang. *extracellular polymeric substances*) definiuje się substancje o charakterze polimerów wydzielane przez drobnoustroje na zewnątrz komórki. Najczęściej zbudowane są z cukrów i gromadzone na powierzchni komórek w postaci śluzów lub wydzielone do podłoża mogą tworzyć struktury wyższego rzędu [Czarczyk i Myszka 2007]. Polisacharydy takie jak ksantan, dekstran, gellan czy pullulan są

---

Adres do korespondencji – Corresponding author: Iwona Gientka, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Wydział Nauk o Żywności, Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Oceny Żywności, ul. Nowoursynowska 159c, 02-787 Warszawa, e-mail: iwona\_gientka@sggw.pl

produkowane przemysłowo i znajdują szerokie zastosowanie w produkcji żywności, farmaceutyków, kosmetyków. Wykorzystywane są jako zagęstniki, środki żelujące, emulgatory, substancje pianotwórcze czy czynniki klarujące [Kuncheva i in. 2007]. Drożdże z rodzajów *Aureobasidium*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula* i *Sporobolomyces* są zdolne do syntezy EPS. Wytwarzanie egzopolisacharydów związane jest z metabolizmem wtórnym, a ich struktura i właściwości fizyczne zależą od wielu czynników, do których zaliczane są skład podłoża fermentacyjnego, rodzaj źródła węgla i azotu, pH, temperatura i stężenie tlenu [Grigorova i in. 1999, Pavlova i in. 2004, Gniewosz i Duszkiewicz-Reinhard 2008, Poli i in. 2010]. W przypadku niektórych EPS pochodzenia drożdżowego stwierdzono właściwości prozdrowotne. Zewnątrzkomórkowy glukomannan wytwarzany przez *Candida utilis*, dzięki zdolności do tworzenia kompleksów z jonami metali i do wychwytywania różnych reaktywnych form tlenu, posiada właściwości antyoksydacyjne i przeciwnowotworowe [Van Bogaert i in. 2009]. Innym przykładem może być opatentowany polimer pochodzącego z hodowli *Cryptococcus laurentii*, który zmniejsza stężenie cholesterolu i trójglicerydów w surowicy krwi. Ponadto niektóre polisacharydy wykazują właściwości immunomodulacyjne [Khachigian i Parish 2004]. Warto zatem poszukiwać wydajnych drożdżowych producentów unikalnych polisacharydów.

Kefir produkowany jest z mleka poddanego mieszanej fermentacji mlekowo-alkoholowej zachodzącej za pomocą charakterystycznej mikroflory ziaren kefirowych, na którą składają się bakterie fermentacji mlekowej, bakterie octowe i drożdże [Simova i in. 2002]. Zgodnie z zaleceniami FAO i WHO, 1 g kefiru powinien zawierać minimum  $10^4$  jtk drożdży [FAO/WHO Food Standards, CODEX STAN 243-2003]. Mikroflora drożdżowa stanowiąca ok. 10–17% ziaren kefirowych składa się w przewadze z drożdży niefermentujących laktozy [Simova i in. 2002]. Do tej pory nieznanne są możliwości biosyntezy EPS przez drożdże kefirowe.

Celem niniejszej pracy było scharakteryzowanie zdolności do wytwarzania polimerów zewnątrzkomórkowych przez szczepy drożdży kefirowych. Zakres pracy obejmował izolację szczepów drożdży z kefirów, ich identyfikację, badanie ilości wytworzonych EPS i analizę morfologii komórek w czasie 48-godzinnej hodowli wytrząsanych w podłożach YPD oraz YM.

## MATERIAŁ I METODY

### Izolacja szczepów drożdży

Materiałem badawczym, z którego izolowano szczepy drożdży, były kefir naturalne i owocowe pochodzące od 18 polskich producentów. Wszystkie produkty zostały poddane badaniu w terminie przydatności do spożycia. Po otwarciu w jałowych warunkach, próbkę kefiru (10 g) zawieszano w  $90 \text{ cm}^3$  soli fizjologicznej i z pierwszego rozcieńczenia wykonywano posiew  $1 \text{ cm}^3$  na podłożu Sabourauda z chloramfenikolem, a następnie inkubowano w temperaturze  $28^\circ\text{C}$  przez 48 godzin. Po tym czasie dokonywano mikroskopowej oceny wzrostu i kolonie drożdżowe przesiewano posiewem redukcyjnym na

podłoże Sabourauda i inkubowano w warunkach poprzednio opisanych. Otrzymane kolonie przeszczepiano posiewem redukcijnym na podłoże YPD (o składzie glukoza 20 g/l, pepton 20 g/l, ekstrakt drożdżowy 10 g/l, agar 2%, pH 5,5). Uzyskane w ten sposób szczepy przechowywano na podłożu YPD o pH 5,6 w lodówce, co 3–4 tygodnie przenosząc na świeże podłoże.

### **Identyfikacja szczepów drożdży**

Identyfikacji dokonano badając zdolności asymilacyjne szczepów z wykorzystaniem testów Api 20 AUX (BioMeriux, Francja).

### **Podłoża i warunki hodowli**

100 cm<sup>3</sup> płynnych podłoży YPD (o składzie glukoza 20 g·dm<sup>-3</sup>, pepton 20 g·dm<sup>-3</sup>, ekstrakt drożdżowy 10 g·dm<sup>-3</sup>, pH 5,5) oraz YM (o składzie glukoza 10 g·dm<sup>-3</sup>, pepton 5 g·dm<sup>-3</sup>, ekstrakt drożdżowy 3 g·dm<sup>-3</sup>, ekstrakt słodowy 3 g·dm<sup>-3</sup>, pH 5,5) w kolbach okrągłych z płaskim dnem szczepiono ze skosu i hodowano na wytrząsarce (MaxQ 4000, Barnstead) przy 200 obr./min przez 48 godzin w temperaturze 28°C. Składniki tworzące wszystkie stosowane pożywki pochodziły z firmy BTL, Polska.

### **Badanie morfologii komórek**

Badanie kształtu i wielkości komórek prowadzono z wykorzystaniem mikroskopu (Opta-Tech 300, Polska) i kamery mikroskopowej Opta-Tech z zintegrowanym programem OptaWiew7 (V:2.1). W 48. godzinie hodowli wykonywano preparaty przyżyciowe, zdjęcia i mierzono długość (dłuższy wymiar komórki), szerokość (krótszy wymiar komórki) oraz powierzchnię minimum 100 komórek.

### **Oznaczenie plonu biomasy**

W celu oznaczenia plonu biomasy do wysuszonej i zważonej gilzy pobierano 25 cm<sup>3</sup> płynu pohodowlanego i wirowano przez 10 minut przy 6000 obr./min (Centrifuge 5804R Eppendorf). Supernatant zlewano, dwukrotnie przemywano osad biomasy jałową solą fizjologiczną, a następnie suszono w 80°C (suszarka SML 32/250 Zelmed, Polska) do uzyskania stałej masy (RADWAG PS 750/X, Polska). Wynik podawano w gramach suchej substancji na decymetr sześcienny (g s.s.·dm<sup>-3</sup>) podłoża.

### **Oznaczanie ilości polimerów zewnątrzkomórkowych**

Po zakończonej inkubacji płyn pohodowlany odwirowano przez 30 minut przy 6000 x g (Centrifuge 5804R Eppendorf). Do supernatantu (25 cm<sup>3</sup>) dodawano (50 cm<sup>3</sup>) 96% etanolu i pozostawiano na 24 godziny w temperaturze 4°C w celu wytrącenia polimerów. Po tym czasie EPS odwirowano przez 10 minut przy 6000 x g [Pavlova i in. 2005]. Supernatant usuwano a osad przemywano etanolem i suszono w temperaturze 80°C aż do uzyskania stałej masy. Wysuszony osad ważono z dokładnością ±0,00001 g (RADWAG PS 750/X, Polska). Wynik podawano w mg s.s. EPS·dm<sup>-3</sup> oraz w przeliczeniu na 1 g s.s. biomasy.

## Analiza statystyczna

Analizę statystyczną wyników prowadzono z wykorzystaniem programu STATISTICA Ver.10. Zastosowano dwuczynnikową analizę wariancji. Grupy homogenne wyznaczono przy użyciu testu Tukeya na poziomie istotności  $\alpha \leq 0,05$ .

## WYNIKI I DYKUSJA

Wyizolowano 11 szczepów drożdży kefirowych, spośród których, za pomocą systemu API 20 AUX, udało się zidentyfikować 10. Przynależność gatunkowa izolatów była następująca: *Candida guilliermondii* 1, *Candida guilliermondii* 2, *Candida famata*, *Candida kefyry*, *Candida inconspicua*, *Cryptococcus humicolus*, *Cryptococcus albidus*, *Kluyveromyces lactis*, *Saccharomyces cerevisiae* oraz *Geotrichum penicillatum*. Większość zidentyfikowanych w niniejszych badaniach szczepów już wcześniej izolowano z kefiru bądź ziaren kefirowych [Fleet 1990, Lopitz-Otsoa i in. 2006, Lattore-Garcia i in. 2007]. Nie opublikowano dotąd informacji potwierdzającej występowania w kefirach drożdży *Candida guilliermondii* oraz *Cryptococcus albidus*.

Wymiary komórek poszczególnych szczepów przedstawiono w tabeli 1. Najmniejszą długością i szerokością charakteryzowały się komórki obydwu szczepów *Candida guilliermondii* w podłożu YPD. W podłożu YM najmniejsza była powierzchnia komórek szczepu niezidentyfikowanego. Najdłuższymi komórkami charakteryzował się *Geotrichum penicillatum*. Szerokość komórek poszczególnych szczepów wynosiła od 1,59 do 2,58  $\mu\text{m}$ , a rozrzut wyników tego parametru był dużo mniejszy niż w przypadku wymiaru definiowanego jako długość. Porównując wielkość komórek otrzymanych podczas hodowli w podłożu YM do tych, które otrzymano w podłożu YPD, najbardziej istotną różnicę zaobserwowano w przypadku *Geotrichum penicillatum*. Średnie wymiary komórek tego szczepu to  $12,8 \times 2,2$  [ $\mu\text{m} \times \mu\text{m}$ ] w podłożu YPD i tylko  $5,2 \times 2,8$  [ $\mu\text{m} \times \mu\text{m}$ ] w podłożu YM.

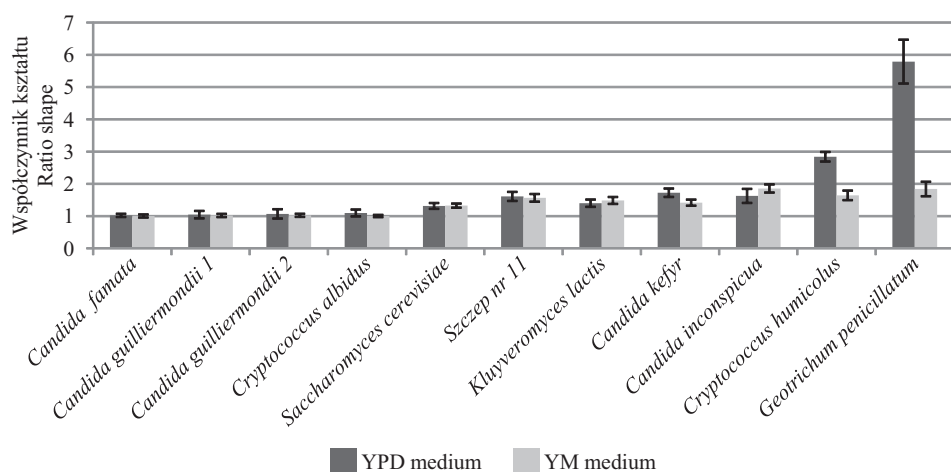
Definiując współczynnik kształtu jako iloraz długości komórki do szerokości, oznaczono wpływ podłoża na zmiany morfologii komórek. Wartość współczynnika kształtu komórek najbardziej zbliżonych do kuli wynosiła 1. Taki parametr, niezależnie od rodzaju podłoża, charakteryzował oba szczepy *C. guilliermondii*, *C. famata* oraz *Cr. albidus*. Szczepy, których współczynnik kształtu komórek zawierał się pomiędzy 1 do 2, to: *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis*, *Candida kefyry*, *Candida inconspicua* oraz niezidentyfikowany. Ich komórki charakteryzowały się formą owalną lub elipsoidalną. Zmiany wartości współczynnika kształtu komórek, w zależności od podłoża, zaobserwowano tylko w przypadku szczepów *C. kefyry*, *Cr. humicolus* oraz *G. penicillatum*. Komórki bardziej wydłużone występowały w podłożu YPD, co szczególnie widoczne jest dla *Geotrichum penicillatum*. W podłożu YPD średnia wartość współczynnika kształtu komórek tego szczepu wynosiła ponad 5,5, z kolei w podłożu YM nie przekraczała 2 (rys. 1).

Największymi i jednocześnie zbliżonymi plonami biomasy (średnio ponad 14 g s.s. $\cdot\text{dm}^{-3}$ ) charakteryzowały się hodowle *Candida famata*, *Cryptococcus humicolus* oraz dwóch szczepów *Candida guilliermondii* w podłożu YM (rys. 2). W drugim badanym podłożu średnie plony biomasy tych szczepów były istotnie niższe i wynosiły

Tabela 1. Średnie wymiary komórek w 48-godzinnej hodowli wytrząsanych w podłożach YPG oraz YM

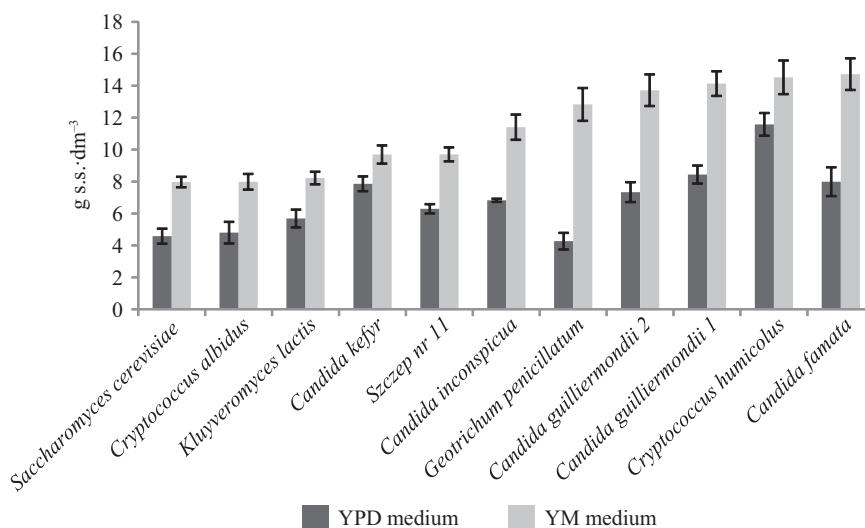
Table 1. Mean dimensions of the cells after 48th hour of shaken cultures in YPG and YM media

Szczep Strain	YPG medium			YM medium		
	Długość Length [μm]	Szerokość Width [μm]	Powierzchnia Area [μm <sup>2</sup> ]	Długość Length [μm]	Szerokość Width [μm]	Powierzchnia Area [μm <sup>2</sup> ]
<i>Candida guilliermondii</i> 2	1,79 ±0,35	1,75 ±0,45	2,47 ±1,20	2,25 ±0,32	1,77 ±0,21	3,67 ±1,03
<i>Candida guilliermondii</i> 1	1,84 ±0,45	1,80 ±0,45	2,88 ±1,22	2,01 ±0,39	1,99 ±0,45	3,54 ±1,33
<i>Candida famata</i>	2,03 ±0,34	1,99 ±0,35	3,42 ±1,04	1,96 ±0,46	1,95 ±0,37	3,38 ±1,27
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2,42 ±0,51	1,89 ±0,38	3,30 ±1,24	2,56 ±0,62	1,92 ±0,38	3,81 ±1,76
<i>Cryptococcus albidus</i>	2,46 ±0,47	2,27 ±0,42	4,75 ±1,42	2,31 ±0,29	2,31 ±0,32	4,51 ±1,12
Szczep nr 11	2,53 ±0,39	1,59 ±0,23	3,04 ±0,76	2,11 ±0,43	1,65 ±0,22	2,26 ±0,80
<i>Kluyveromyces lactis</i> 1	2,86 ±0,55	2,04 ±0,25	4,57 ±1,29	2,87 ±0,65	2,10 ±0,25	4,67 ±1,21
<i>Candida kefir</i>	2,90 ±0,64	1,68 ±0,32	3,87 ±1,39	2,57 ±0,64	1,82 ±0,43	3,67 ±1,75
<i>Candida inconspicua</i>	3,04 ±0,72	1,86 ±0,32	4,45 ±1,62	3,41 ±0,71	1,83 ±0,32	5,05 ±1,71
<i>Cryptococcus humicolus</i>	6,22 ±2,68	2,58 ±0,52	13,14 ±5,43	4,61 ±0,81	2,83 ±0,36	10,25 ±2,36
<i>Geotrichum penicillatum</i>	12,77 ±5,78	2,19 ±0,39	26,16 ±8,32	5,24 ±2,16	2,84 ±0,55	12,58 ±6,96



Rys. 1. Średnie wartości współczynnika kształtu komórek (długość : szerokość) po 48. godzinie hodowli wytrząsanej w podłożach YPD oraz YM

Fig. 1. Mean values of shape coefficient of cells (length : width) after 48th hour of shaken culture in YPD and YM media



Rys. 2. Plon biomasy [g s.s.·dm<sup>-3</sup>] oznaczony w 48. godzinie hodowli wytrząsanej w podłożach YPD oraz YM

Fig. 2. Biomass yield [g d.m.·dm<sup>-3</sup>] determined at 48th hour of shaken culture in YPD and YM media

ok. 8 g s.s.·dm<sup>-3</sup> a dla *C. humicolus* ponad 11 g s.s.·dm<sup>-3</sup>. Najmniej biomasy po hodowli wytrząsanej w podłożu YPD oznaczono w przypadku szczepów *S. cerevisiae*, *Cr. albidus*, *K. lactis* oraz *G. penicillatum*. Wszystkie szczepy wytworzyły większą ilość biomasy w podłożu YM niż w YPD, przy czym plon biomasy *G. penicillatum* był najbardziej zależny od rodzaju podłoża.

Zastosowane podłoża YPD oraz YM mają charakter namnażających i różniły się zawartością glukozy (odpowiednio 2 i 1%). Obecny w obydwu pożywkach, ale w różnym stężeniu pepton był źródłem azotu i aminokwasów, a ekstrakt drożdżowy źródłem makro- i mikroelementów, witamin oraz aminokwasów. Ekstrakt maltozowy w podłożu YM stanowił dodatkowe źródło węgla i białek. Fakt, że obserwowano zwiększone wartości plonu biomasy wszystkich szczepów w podłożu YM w porównaniu do YPD można wytłumaczyć tym, iż jest ono bogatsze w składniki odżywcze, a zwłaszcza aminokwasy.

Wszystkie badane drożdże wytworzyły polimery zewnątrzkomórkowe, a ich zawartość w płynach pohodowlanych zależała od rodzaju szczepu i podłoża. Najwięcej, około 1200 mg w jednym dm<sup>3</sup> podłoża YPD, oznaczono po hodowli szczepów *Geotrichum penicillatum*, *Saccharomyces cerevisiae* oraz szczepu nr 11, przy czym nie stwierdzono między nimi istotnych różnic (tab. 2). Słabszymi producentami polimerów w tej samej pożywce były szczepy: *Cryptococcus humicolus*, *Candida famata*, *Kluyveromyces lactis*. W 1 dm<sup>3</sup> podłoża doświadczalnego wytworzyły one odpowiednio 0,45, 0,55 i 0,69 g EPS. Większość badanych szczepów wytworzyła znacznie mniej EPS w podłożu YM. Wyjątek stanowiły *Cr. albidus* oraz *G. penicillatum*, jednak w porównaniu do najbardziej produktywnych szczepów w warunkach hodowli w podłożu YPD różnica nie była istotna. Z 1 g s.s. biomasy wszystkich badanych szczepów uzyskano istotnie mniej egzopolisa-

Tabela 2. Średnia zawartość polimerów zewnątrzkomórkowych po 48 godzinach hodowli w podłożach YPD oraz YM

Table 2. Mean content of exopolymers after 48 hours of culturing in YPD and YM media

Szczep Strain	Podłoże YPD YPD medium		Podłoże YM YM medium	
	mg EPS·dm <sup>-3</sup>	mg EPS/g s.s.	mg EPS·dm <sup>-3</sup>	mg EPS/g s.s.
<i>Candida famata</i>	550 <sup>d</sup>	120 <sup>B</sup>	ślady/traces	ślady/traces
<i>Candida guilliermondii 1</i>	750 <sup>c</sup>	156 <sup>A</sup>	580 <sup>cd</sup>	43 <sup>E,F</sup>
<i>Candida guilliermondii 2</i>	700 <sup>c</sup>	123 <sup>B</sup>	430 <sup>d</sup>	31 <sup>F</sup>
<i>Candida inconspicua</i>	995 <sup>b</sup>	126 <sup>B</sup>	ślady/traces	ślady/traces
<i>Candida kefir</i>	993 <sup>b</sup>	157 <sup>A</sup>	680 <sup>cd</sup>	70 <sup>D</sup>
<i>Cryptococcus albidus</i>	767 <sup>c</sup>	112 <sup>B</sup>	1375 <sup>a</sup>	95 <sup>C,D</sup>
<i>Cryptococcus humicolus</i>	452 <sup>d</sup>	106 <sup>C</sup>	190 <sup>f</sup>	24 <sup>F</sup>
<i>Geotrichum penicillatum</i>	1214 <sup>a</sup>	165 <sup>A</sup>	1561 <sup>a</sup>	122 <sup>B</sup>
<i>Kluyveromyces lactis</i>	684 <sup>c</sup>	81 <sup>D</sup>	505 <sup>d</sup>	61 <sup>E</sup>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1227 <sup>a</sup>	105 <sup>C</sup>	112 <sup>f</sup>	15 <sup>G</sup>
Strain no 11	1180 <sup>a</sup>	147 <sup>A</sup>	375 <sup>e</sup>	39 <sup>E,F</sup>

Wartości oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie statystycznie przy  $\alpha = 0,05$ .

Values marked by the same letter are not different at  $\alpha = 0,05$ .

charydów w podłożu YM. Największe różnice między produktywnością 1 g suchej substancji w zależności od rodzaju podłoża obserwowano w przypadku szczepów *Candida inconspicua* oraz *Candida famata*, gdzie po hodowli w pożywce wzbogaconej oznaczono jedynie ślady EPS. Podobne różnice ponad 100 mg EPS/1 g s.s. stwierdzono także dla *Candida guilliermondii* oraz szczepu niezidentyfikowanego.

W niniejszych badaniach wykazano, że drożdże kefirowe mogą produkować polimery zewnątrzkomórkowe. Wydajność szczepów o największych uzdolnieniach do produkcji EPS – *Geotrichum penicillatum*, *Saccharomyces cerevisiae* i szczepu 11 oraz *Cryptococcus albidus* – można porównać z wydajnością *Rhodotorula acheniorum*. Ilość wytworzonych polisacharydów przez ten szczep w zbliżonych warunkach (2% glukozy i 0,25% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) wyniosła 1,25 g·dm<sup>-3</sup> [Grigorova i in. 1999]. Na ilość EPS produkowanych przez wyizolowane szczepy miał wpływ rodzaj podłoża. Różnice w ilości wydzielonych polisacharydów w badanych podłożach są wynikiem innego stosunku molowego C : N. Korzystniejsze dla syntezy EPS proporcje tych pierwiastków były w podłożu YPD. Optymalnym źródłem węgla do syntezy EPS jest sacharoza. W stężeniu 5-procentowym okazała się najlepszym źródłem węgla do produkcji polisacharydów przez *Sporobolomyces salmonicolor* [Pavlova i in. 2004], *R. acheniorum* MC (6,2 g EPS·dm<sup>-3</sup> po 96 h) [Pavlova i in. 2005] oraz *Cryptococcus laurentii* AL<sub>100</sub> [Poli i in. 2010]. Oprócz źródła węgla na syntezę EPS wpływa rodzaj i stężenie źródła azotu, a polecany jest (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> w stężeniu 0,25% [Pavlova 2004]. Przyczyną zmniejszonej ilości wytworzonych EPS przez badane drożdże kefirowe w podłożu YM w stosunku do YPD mogła być obecność większej ilości organicznych źródeł (aminokwasów) azotu w tym pierwszym. Polimery zewnątrzkomórkowe są produktem metabolizmu wtórnego, a ich synteza zaczyna się podczas stacjonarnej fazy hodowli [Grigorova i in. 1999]. Na ilość wytworzonych egzopolisacharydów ma

wpływ czasu hodowli. Optymalny czas hodowli szczepów charakteryzujących się zdolnością do wytwarzania dużych ilości EPS zależy od ich rodzaju i wynosi od 72 do 120 godzin [Pavlova i in. 2009]. W dalszych badaniach należy zbadać wpływ czasu trwania i innych parametrów hodowli na ilość wytworzonych polimerów zewnątrzkomórkowych przez drożdże kefirowych. Przeprowadzone badania pokazały istotną zmienność w zakresie zdolności poszczególnych szczepów do produkcji polimerów zewnątrzkomórkowych w identycznych warunkach hodowlanych. Otrzymane wyniki nie dają informacji na temat składu, budowy chemicznej oraz struktury wytworzonych polimerów. Prawdopodobnie będą one miały charakter polisacharydów, podobnie jak inne zewnątrzkomórkowe polimery pozyskiwane z drożdży.

## WNIOSKI

1. Współczynnik kształtu komórek większości badanych szczepów drożdży kefirowych nie zmieniła się niezależnie od podłoża. Jedynie komórki szczepów *Geotrichum penicillatum*, *Cryptococcus humicolus* oraz *Candida kefyr* były istotnie dłuższe w podłożu YPD.
2. Wszystkie szczepy drożdży wyizolowane z kefirów wytworzyły polimery zewnątrzkomórkowe, a ich ilość zależała od szczepu oraz rodzaju pożywki.
3. Więcej EPS uzyskano po hodowli w podłożu YPD, natomiast hodowla w podłożu YM charakteryzowała się większym plonem biomasy.

## LITERATURA

- Czaczyk K., Myszką K., 2007. Biosynthesis of extracellular polymeric substances (EPS) and its role in microbial biofilm formation. Polish J. Environ. Stud. 16 (6), 799–806.
- FAO/WHO Food Standard, CODEX STAN 243-2003.
- Fleet G.H., 1990. Yeast in dairy products. J. Appl. Bacteriol. 68, 199–211.
- Gniewosz M., Duszkiewicz-Reinhard W., 2008. Comparative studies on pullulan synthesis, melanin synthesis and morphology of white mutant *Aureobasidium pullulans* B-1 and parent strain A.p.-3. Carbohydrate Polym. 72, 431–438.
- Grigorova D., Pavlova K., Panchev I., 1999. Preparation and preliminary characterization of exopolysaccharides by yeast *Rhodotorula acheniorum* MC. Appl. Biochem. Biotechnol. 81 (3), 181–191.
- Khachigian L.M., Parish C.R., 2004. Phosphomannopentaose sulfate (PI-88): Heparan sulfate mimetic with clinical potential in multiple vascular pathologies. Cardiovasc. Drug Rev. 22 (1), 1–6.
- Kuncheva M., Pavlova K., Panchev I., Dobreva S., 2007. Emulsifying power of mannan and glucomannan produced by yeast. Int. J. Cosmetic Sci. 29, 377–384.
- Lattore Garcia L., Castillo-Agudo L., Polaina J., 2007. Taxonomical classification of yeast isolated from kefir based on the sequence of their ribosomal RNA genes. World J. Microbiol. Biotechnol. 23 (6), 785–791.
- Lopitz-Otsoa F., Rementiera A., Elguezabal N., Garaizar J., 2006. Kefir: a symbiotic yeast-bacteria community with alleged healthy capabilities. Rev. Iberoam. Micol. 23 (2), 67–74.
- Pavlova K., Koleva L., Krachanova M., Panchev I., 2004. Production and characterization of an exopolysaccharide by yeast. World J. Microbiol. Biotechnol. 20 (4), 435–439.



- Pavlova K., Panchev I., Hristozova T.S., 2005. Physico-chemical characterization of exomannan from *Rhodotorula acheniorum* MC. World J. Microbiol. Biotechnol. 21 (3), 279–283.
- Pavlova K., Panchev I., Krachanova M., Gocheva M., 2009. Production of an exopolysaccharides by antarctic yeast. Folia Microbiol. 54 (4), 343–548.
- Poli A., Anzelmo G., Tommonaro G., Pavlova K., Casaburi A., Nicolaus B., 2010. Production and chemical characterization of an exopolysaccharide synthesized by psychrophilic yeast strain *Sporobolomyces salmonicolor* AL<sub>1</sub> isolated from Livingston Island, Antarctica. Folia Microbiol. 55 (6), 576–581.
- Simova E., Beshkova D., Angelov E., Hristozova T., Frengova G., Spasov Z., 2002. Lactic acid bacteria and yeasts in kefir grains and kefir made from them. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 28 (1), 1–6.
- Van Bogaert I.N.A., De Maeseneire S.L., Vandamme E.J., 2009. Extracellular polysaccharides produced by yeasts and yeast-like fungi (Chapter 29). W: Satyanarayana T., Kunze G.: Yeast Biotechnology: Diversity and Applications. Springer Science + Business Media B.V.

## EVALUATE THE ABILITY OF THE YEAST STRAINS ISOLATED FROM KEFIR FOR THE SYNTHESIS OF EXTRACELLULAR POLYMERS

**Summary.** The aim of this study was to characterize the ability to produce extracellular polymers by strains of yeast kefir. The work included the isolation of yeasts from kefir, their identification, examination of the amounts of EPS and analysis of cell morphology during 48 h shake culture in YPD and YM medias. It was isolated 11 different strains and identified: two strains of *Candida guilliermondii* and *Candida famata*, *Candida kefir*, *Candida inconspicua*, *Cryptococcus humicolus*, *Cryptococcus albidus*, *Kluyveromyces lactis*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Geotrichum penicillatum*. All tested strains produced extracellular polysaccharides and their contents after incubation depend on the type of strain and substrate. About 1200 mg exopolymers in one dm<sup>3</sup> of YPD medium were determined after cultivation of strains of *Geotrichum penicillatum*, *Saccharomyces cerevisiae* and strain no. 11. The composition of the substrate YM adversely affect the synthesis of EPS but also increased the biomass yield of all the tested strains. Compare to YM medium from 1 g d.m. biomass on YPD medium was more exopolymers obtained.

**Key words:** kefir's yeast, exopolysaccharides, EPS