

ACTA SCIENTIARUM POLONORUM

Czasopismo naukowe założone w 2001 roku przez polskie uczelnie rolnicze

Biotechnologia

Biotechnologia

Biotechnology

8(4) 2009



Bydgoszcz Kraków Lublin Olsztyn
Poznań Siedlce Szczecin Warszawa Wrocław

Rada Programowa *Acta Scientiarum Polonorum*

Kazimierz Banasik (Warszawa), Janusz Falkowski (Olsztyn),
Florian Gambuś (Kraków), Franciszek Kluza (Lublin),
Janusz Prusiński (Bydgoszcz), Jerzy Sobota (Wrocław) – przewodniczący,
Stanisław Socha (Siedlce), Waldemar Uchman (Poznań)

Rada Naukowa serii *Biotechnologia*

Danuta Witkowska (Wrocław) – przewodnicząca, Włodzimierz Bednarski (Olsztyn),
Włodzimierz Grajek (Poznań), Anna Maraz (Budapeszt, Węgry),
Zdzisław Targoński (Lublin), Vesna Zechner-Krpan (Zagrzeb, Chorwacja)

Opracowanie redakcyjne i korekta:
Elżbieta Winiarska-Grabosz
Janina Szydłowska

Łamanie
Alina Gebel

Projekt okładki
Daniel Morzyński

ISSN 1644-065X

*Wydanie publikacji dofinansowane ze środków
Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu*

© Copyright by Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu,
Wrocław 2009

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

Nakład 200 + 16 egz. Ark. wyd. 2,6. Ark. druk. 2,5.
Druk i oprawa: EXPOL, P. Rybiński, J. Dąbek, Spółka Jawna
ul. Brzeska 4, 87-800 Włocławek

ACTA SCIENTIARUM POLONORUM

Biotechnologia

RECENZENCI

2007–2009

1. Dr hab. Anna Rodziewicz, prof. nadzw.– Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
2. Prof. dr hab. inż. Tadeusz Miśkiewicz – Uniwersytet Ekonomiczny we Wrocławiu
3. Prof. dr hab. inż. Ewelina Dziuba – Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
4. Prof. dr hab. Tadeusz Lachowicz – ul. Bujwida 37/1, 50-345 Wrocław
5. Dr hab. inż. Zbigniew Garncarek – Uniwersytet Ekonomiczny we Wrocławiu
6. Dr hab. Jolanta Bryjak – Politechnika Wrocławska
7. Dr hab. Wanda Peczyńska-Czoch, prof. nadzw. – Politechnika Wrocławska
8. Prof. dr hab. Antoni Polanowski – Uniwersytet Wrocławski
9. Dr hab. Jerzy Pietkiewicz, prof. nadzw.– Uniwersytet Ekonomiczny we Wrocławiu
10. Dr hab. Edmund Cibis, prof. nadzw. – Uniwersytet Ekonomiczny we Wrocławiu
11. Prof. dr hab. inż. Waldemar Rymowicz – Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
12. Dr hab. Małgorzata Robak, prof. nadzw. – Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
13. Prof. dr hab. Maria Wojtatowicz – Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
14. Prof. dr hab. Ewa Sawicka-Sienkiewicz – Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

NAUKOWE, EKONOMICZNE I SPOŁECZNO-PRAWNE UWARUNKOWANIA PRODUKCJI I SPRZEDAŻY ŻYWNOŚCI GENETYCZNIE MODYFIKOWANEJ W POLSCE

Marek Kramarz¹, Karol Kramarz²

¹Uniwersytet Ekonomiczny we Wrocławiu

²Uniwersytet Wrocławski

Streszczenie. Opisano zagadnienia dotyczące wprowadzania do środowiska i do obrotu handlowego organizmów genetycznie modyfikowanych w Polsce, Unii Europejskiej i w innych krajach świata. Przedstawiono korzyści wynikające z zastosowania organizmów genetycznie modyfikowanych w produkcji: żywności, leków i enzymów. Podkreślono znaczenie znakowania żywności modyfikowanej genetycznie w celu wyeliminowania uprzedzeń i niechęci konsumentów wobec tych produktów. Oceniono stan świadomości społecznej w dziedzinie GMO oraz oficjalne stanowisko władz w Polsce.

Słowa kluczowe: GMO, żywność genetycznie modyfikowana, żywność transgeniczna

WSTĘP

Problematyka organizmów genetycznie modyfikowanych – GMO (Genetically Modified Organisms) budzi liczne kontrowersje w środowiskach naukowych oraz wśród odbiorców i konsumentów tych produktów. Przyjmuje się, że twórcami GMO byli w 1973 r. Stanley Cohen z Uniwersytetu Stanforda i Herbert Boyer z Uniwersytetu Kalifornijskiego, którzy opracowali łatwą metodę wymiany genów pomiędzy różnymi organizmami [Benson 2009], to jednak pierwszym, który już w 1972 r. zastosował metody inżynierii genetycznej do modyfikacji bakterii *Pseudomonas*, był Chakrabarta – patent US nr 4 259 444 [1972]. Otrzymał mikroorganizm zdolny do biodegradacji węglowodorów zanieczyszczających środowisko w wyniku np. awarii tankowców. Dzięki osiągnięciom inżynierii genetycznej w latach osiemdziesiątych ubiegłego wieku uzyskano zmodyfikowane ludzkim genem, odpowiedzialnym za produkcję insuliny, komórki drożdży piekarskich i bakterie *E. coli*, które zostały następnie wykorzystane do

Adres do korespondencji – Corresponding author: Katedra Bioutylizacji Odpadów Rolno-Spożywczych, Uniwersytet Ekonomiczny we Wrocławiu, ul. Komandorska 118-120, 53-345 Wrocław, e-mail: marek.kramarz@ue.wroc.pl

produkcji insuliny [Keen i in. 1980]. W 1998 r. Office of Naval Research opatentowało genetycznie zmodyfikowany mikroorganizm niszczący odpadowy poliuretan, metale, plastyki, gumę i paliwa. Wyniki tych badań zostały jednak utajnione.

Pierwszym transgenicznym produktem żywnościowym, wprowadzonym w USA do obrotu handlowego w 1994 roku przez firmę Calgene, były pomidory o nazwie handlowej Flavr Savr [Kramer i Redenbaugh 1994]. Pomidory te dłużej zachowywały świeżość, były większe i bardziej czerwone oraz łatwiejsze w transporcie. Do genomu pomidora Flavr Savr wprowadzono odwrócony gen poligalakturonazy – enzymu rozkładającego ścianę komórkową, odpowiedzialnego za proces dojrzewania i mięknięcia owocu. RNA powstałe w wyniku transkrypcji odwróconego genu łączyło się komplemencie z transkrypcyjnym prawidłowego genu PG, co uniemożliwiało przyłączenie się rybosomu, i ostatecznie syntezę enzymu.

Uważa się, że pomidory transgeniczne są bardziej wartościowe, ponieważ nie są zrywane z krzaka w stadium dojrzałości przemysłowej, ale w momencie gdy są jeszcze twarde i zielone. W tym samym roku otrzymano w Campbell Institute for Research and Technology w Davis transgeniczne pomidory o podwyższonej zawartości suchej masy, pozwalające uzyskać więcej koncentratu [Martineau i in. 1995]. Jako wektora wprowadzającego do rośliny gen *ipt*, kodującego transferazę izopentenylu, który odpowiada za szybszy wzrost masy, użyto symbiotycznego szczepu *Agrobacterium tumefaciens* [de la Riva i in. 1998]. Pomidory mają nie tylko większą masę (przeciętnie o 10%), ale odznaczają się też wyższą zawartością cukrów i kwasów organicznych.

TRADYCYJNE I NOWOCZESNE TECHNIKI MODYFIKACJI GENETYCZNYCH

Od tysięcy lat rolnicy i hodowcy dążą do uzyskiwania udoskonalonych odmian roślin i zwierząt, stosując metody krzyżowania, czy hybrydyzacji. W rezultacie tych, najczęściej przypadkowych, pozalaboratoryjnych doświadczeń w zakresie kombinacji genetycznych i selekcji najlepszych osobników, dzisiejsze rośliny uprawne są zdecydowanie inne od ich historycznych odpowiedników. Przodek kukurydzy w niczym nie przypomina współczesnej rośliny. Truskawka powstała w wyniku skrzyżowania poziołki amerykańskiej z dziką truskawką, a jej dorodne i słodkie owoce zdecydowanie nie przypominają tych z pierwotnej dzikiej rośliny [Darrow 1966].

Współczesne techniki modyfikacji genetycznych oparte na metodach inżynierii genetycznej, odznaczają się kilkoma zasadniczymi zaletami. Dają możliwość wykorzystania bakterii, po wprowadzeniu do ich komórek genu eukariotycznego w uproszczonej formie, jako fabryk wytwarzających oczekiwany produkt białkowy. Wprowadzenie obcego genu do komórki zwierzęcej jest ważne dla badania działania genu i może być podstawą terapii genowej. Rośliny są często wzbogacane w dodatkowe geny, dzięki czemu mogą nabierać odporności na szkodniki lub warunki środowiska, albo produkować w większej ilości składniki odżywcze. Manipulacje genami eukariotycznymi stawiają jednakże przed współczesną biotechnologią wiele problemów natury etycznej [Berg i in. 2007].

Strategie transformacji genetycznej są zróżnicowane, ogólnie można podzielić je na techniki wektorowe i bezwektorowe (bezpośrednie). W metodach wektorowych wykorzystuje się organizm pośredniczący (wektor), przenoszący transgen do komórki biorcy. Komórki zwierzęce transformuje się między innymi przy użyciu wirusów. W przypadku

roślin często używany jest do transformacji plazmid Ti. Jest on izolowany z powszechnie występujących bakterii glebowych *Agrobacterium tumefaciens*, które zakażają rośliny i wprowadzają do nich obce geny. Pochodne plazmidu Ti mogą być używane jako wektory do wprowadzania obcych genów do komórek roślinnych [de la Riva i in. 1998]. W technikach bezpośrednich stosuje się szereg różnych metod ułatwiających transgenowi pokonanie bariery, jaką jest błona komórkowa biorcy. Elektroporacja, czyli przenikanie DNA wspomaganie impulsem elektrycznym, metody biolistyczne – gene gun, wstrzykiwanie DNA do jądra – mikroiniekcja, makroiniekcja, środki zwiększające przepuszczalność błony komórkowej, np. glikol polietylenowy [How Bacillus...2000].

ŚWIATOWE TENDENCJE W PRODUKCJI ŻYWNOŚCI TRANSGENICZNEJ

W ciągu 10 lat areal uprawny roślin transgenicznych na świecie wzrósł z 44 do ponad 100 mln ha, w tym ponad 70% to uprawy w USA, gdzie 90% produkcji roślinnej stanowią rośliny genetycznie modyfikowane. W USA hoduje się prawie 75% wszystkich transgenicznych roślin na świecie, których odmiany powstały w laboratoriach wielkich przedsiębiorstw biotechnologicznych, jak Monsanto, Pioneer, Cargill, Basf. Koncerny te oferują swoje chronione licznymi patentami produkty krajom rozwijającym się, odczuwającym deficyt żywności i przewidują wzrost swoich obrotów do poziomu 200 mld dolarów.

Cele modyfikacji genetycznych organizmów, których efektem są nowe produkty transgeniczne, w tym przede wszystkim żywność, trafiające następnie do obrotu handlowego, są różnorodne, wśród których można wyróżnić [Twardowska i Twardowski 1997]:

1. Konieczność wzrostu produkcji żywności w związku z wysokim tempem przyrostu ludności, przede wszystkim w krajach południowej półkuli. Charakterystyczne jest, że bogate i dysponujące nadmiarem żywności kraje Europy nie są zainteresowane we wprowadzaniu upraw roślin genetycznie modyfikowanych.
2. Wzrost odporności roślin na zarazy i szkodniki, czyli wzrost odporności na stresy biotyczne. Do większości genetycznie modyfikowanych roślin wbudowuje się gen bakterii *Bacillus thuringensis* kodujący substancję toksyczną dla insektów. Bakteria ta jest całkowicie nieszkodliwa dla człowieka, badania nie wykazały również negatywnego wpływu produkowanych przez nią endotoksyn na ludzi [How Bacillus... 2000]. Rośliny mające gen, odpowiedzialny za produkcję endotoksyn nie wymagają stosowania insektycydów.
3. Wzrost odporności roślin na herbicydy o szerokim spektrum działania. Dotyczy to głównie kukurydzy, soi i rzepaku, ziemniaków. Firma Monsanto opracowała transgeniczną soję odporną na działanie produkowanego przez siebie herbicydu oraz ziemniaki zawierające toksynę BT, na których nie żeruje stonka. Genetyczna modyfikacja kukurydzy uodparnia ją na groźnego szkodnika roślin łądogowatych, zwanego European corn borer, bo przybyłego do USA z Europy. Agr Evo i Ciba-Geigy produkują kukurydzę odporną na wytwarzane przez te firmy uniwersalne herbicydy. Uprawa takiej kukurydzy jest łatwiejsza i mniej pracochłonna, przy czym przyjmuje się, że jest przez to średnio o 20% tańsza niż uprawa roślin niemodyfikowanych. Ma to szczególne znaczenie w przypadku produkcji biopaliwa na przykład z rzepaku, wpływając znacząco na cenę biodiesla.

4. Wzrost tolerancji na niekorzystne warunki środowiska. Taka modyfikacja roślin umożliwia ich uprawę na terenach skażonych chemicznie, zasolonych, zanieczyszczonych metalami ciężkimi – fitoremediacja. Możliwa jest również uprawa roślin genetycznie modyfikowanych niewrażliwych na warunki pogodowe, odpornych na tzw. stresy abiotyczne: suszę (np. pszenica) lub niskie temperatury (truskawki). W konsekwencji produkcję żywności można przybliżyć konsumentowi, obniżając dzięki temu koszty transportu i straty żywności.
5. Modyfikacja mikroorganizmów do efektywniejszej produkcji żywności lub metabolitów uzyskiwanych w przemyśle np. farmaceutycznym. Genetycznie modyfikowana chymozyna z drożdży zastępuje podpuszczkę, tradycyjnie izolowaną z żołądków cieląt, stosowaną do ścinania mleka w procesie produkcji sera. Transplantacja genu STA2 z jednego ze szczepów drożdży gorzelnicznych, odpowiedzialnego za rozkład dekstryn, do drożdży piwowskich, pozwoliła na lepsze wykorzystanie niesymilowanych cukrów z podłoża, dekstryn powstających w procesie zacierania siodu. Zmodyfikowane drożdże są stosowane w browarze w Nutfield w Wielkiej Brytanii i pozwalają otrzymać jasne piwo, dolnej fermentacji, o większej o 1% zawartości alkoholu, charakteryzujące się pełnym smakiem, z lekko owocowym aromatem. Przemysł farmaceutyczny wykorzystuje w procesie produkcji insuliny bakterie *Escherichia coli* ze wszczepionym genem ludzkim, odpowiedzialnym za wytwarzanie tego enzymu. Bakteria *E. coli* nie jest groźna dla ludzi – bytuje w warunkach naturalnych w przewodzie pokarmowym a wyprodukowana insulina ma w pełni właściwości enzymu ludzkiego [Keen i in. 1980].
6. Produkcja żywności o wyższych wartościach. Opracowano nową odmianę ryżu – Golden rice, z myślą o dzieciach azjatyckich cierpiących na niedobór witaminy A, z transplantowanym genem z żonkila, podnoszącym poziom beta-karotenu. Ryż ma ponadto złocisty kolor, wywołujący pozytywny odbiór u klientów [Beyer i in. 2002].
7. Wzrost odporności roślin na warunki i czas składowania, transport, ciemnienie, poudzerzenie, opóźnienie okresu dojrzewania, zwłaszcza owoców. Poprawia to wartość odżywczą i sensoryczną produktów żywnościowych przez zmniejszenie strat białek, niezbędnych aminokwasów, witamin, składników mineralnych oraz polepszenie składu kwasów tłuszczowych.

STAN PRAWNY W ZAKRESIE PRODUKCJI I WPROWADZANIA DO OBROTU HANDLOWEGO ŻYWNOCI TRANSGENICZNEJ

Pierwsze uregulowania prawne pojawiły się w Polsce w 1997 roku w postaci zmiany ustawy o ochronie i kształtowaniu środowiska, a na skutek obligatoryjnego dostosowania przepisów naszego prawa do wymogów unijnych [Dyrektywa Parlamentu...2001] została uchwalona ustawa z 22.06.2001 o organizmach genetycznie modyfikowanych [Ustawa...2001]. Ustawa reguluje kwestie zamkniętego wykorzystania GMO, zamierzonego uwolnienia do środowiska w celach innych niż wprowadzanie produktów do obrotu, wywóz za granicę i tranzyt produktów GMO, postanowienia organów administracji rządowej wobec spraw GMO. Wprowadzenie produktu zawierającego GMO do obrotu handlowego na terytorium Polski wymaga zezwolenia ministra środowiska na czas określony – nie dłuższy niż 10 lat. Zezwolenie jest niezbędne, jeśli udział GMO

w produkcie jest większy niż 1% masy produktu. Spod jurysdykcji tej ustawy zostały wyłączone kwestie dotyczące genomu człowieka i zagadnienie dotyczące własności intelektualnej [Ustawa...2001].

Wprowadzanie do środowiska i obrotu handlowego organizmów genetycznie modyfikowanych i produktów, w tym żywnościowych, transgenicznych wywołuje kontrowersje pomiędzy zwolennikami i przeciwnikami GMO. Jednakże stanowisko rządu z 18.11.2008 dotyczące organizmów genetycznie modyfikowanych wydaje się jednostronnie zbyt daleko idące i zajęte pod naciskiem tej części opinii publicznej, która jest przeciwna GMO [Rozporządzenie Parlamentu...1997]. Rząd opowiada się za prowadzeniem prac nad zamkniętym użyciem GMO, ale jednocześnie podkreśla dążenie do uzyskania przez Polskę statusu kraju wolnego od GMO, za zakazem wprowadzania do obrotu GMO (żywność, pasze lub inne produkty) oraz uprawy roślin genetycznie modyfikowanych. Jednocześnie rząd potwierdza wolę respektowania przepisów unijnych w zakresie GMO jako nadrzędnych ponad ustaleniami krajowymi, zaznaczając, że na forum Unii Europejskiej będzie wyrażał negatywne stanowisko, głosując przeciw wprowadzeniu do obrotu z możliwością uprawy nowych roślin genetycznie modyfikowanych.

Reperkusje zasady „Polska wolna od GMO” są najlepiej widoczne na przykładzie katastrofalnego wpływu ewentualnego zakazu użycia roślin genetycznie modyfikowanych w produkcji pasz, który miał wejść w życie 12.08.2008, na hodowlę drobiu, trzody chlewnej i bydła. Podstawowym składnikiem pasz przemysłowych jest śruta sojowa importowana z trzech krajów: Argentyny, Brazylii i USA. W USA i Argentynie całość upraw soi, a w Brazylii większość stanowią odmiany genetycznie modyfikowane. W konsekwencji 95% światowego eksportu śruty sojowej i nasion soi stanowią produkty GMO. Polska importuje rocznie 2 mln ton soi, przede wszystkim z Argentyny (90%), a więc prawie w całości wykorzystujemy śrutę sojową GMO. A zatem realizując zasadę „Polska wolna od GMO” należałoby zaimportować 2 mln ton śruty sojowej non-GMO, o 20% droższej i trudno dostępnej na rynkach światowych. W tym stanie rzeczy nieuchronny jest wzrost popytu na śrutę sojową wolną od GMO, co spowoduje, zgodnie z prawami rynku, wzrost cen pasz, ich niedobór i w konsekwencji drastyczny wzrost cen mięsa i jego przetworów oraz import tańszego mięsa z krajów UE wyprodukowanego na bazie pasz z GMO.

Świadomość groźących skutków zakazu stosowania pasz GMO spowodowała wprowadzenie 5-letniego moratorium do 12.08.2012 r., zezwalającego na używanie roślin genetycznie modyfikowanych do produkcji pasz.

ZNAKOWANIE ŻYWNOŚCI

Organizacje ekologiczne na czele z Greenpeace, prowadzą szeroko zakrojoną kampanię pod hasłem STOP – GMO, przeciw wprowadzaniu go do środowiska i obrotu handlowego. Wydaje się, że wyjściem z ustawicznego konfliktu pomiędzy zwolennikami i przeciwnikami, jest prowadzenie akcji informacyjnej, w tym czytelne znakowanie wyrobów zawierających GMO. W USA nie ma obowiązku znakowania genetycznie modyfikowanej żywności, ale niektórzy producenci robią to celowo, ponieważ jest grupa konsumentów poszukująca na półkach sklepowych właśnie takich produktów. Grupa ta jest słusznie przekonana, że wyroby zawierające GMO są bezpieczniejsze od żywności konwencjonalnej, ponieważ zawierają mniej chemicznych zanieczyszczeń, są gruntownie przetestowane i przebadane pod względem ewentualnej szkodliwości dla

zdrowia. Amerykanie od lat konsumują zmodyfikowane genetycznie pomidory, soję, ziemniaki i kukurydzę. Argentyna jest przykładem kraju, który, ze względów ekonomicznych, wdraża produkcję GMO i wprowadza do środowiska (tylko w 1997 r. dokonano 80 komercyjnych wprowadzeń GMO do środowiska).

W Unii Europejskiej jest nakaz odpowiedniego oznakowania produktów zawierających obce geny, które zostały wprowadzone do rośliny w celu jej ulepszenia. Jeśli zaś produkty białkowe wprowadzonych genów zostały wyeliminowane w czasie obróbki przemysłowej i nie są bezpośrednio obecne w sprzedawanym produkcie, nie ma konieczności znakowania go. Na przykład nie znakuje się cukru otrzymanego z modyfikowanych genetycznie buraków cukrowych, oleju uzyskanego z rzepaku genetycznie zmodyfikowanego, ale trzeba znakować soję, kukurydzę oraz wszelkie ich przetwory [Rozporządzenie ...1997, 1998, 2000]. Polska ustawa z 11.05.2001 dostosowana do przepisów rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady nr 258/97 określa jako nową żywność (novel food): substancje i mieszaniny zawierające lub składające się z genetycznie zmodyfikowanych organizmów. Nowa żywność, która zawiera GMO, powinna być dodatkowo oznakowana na etykietach w następujący sposób: „produkt ten zawiera organizmy genetycznie modyfikowane” lub w przypadku gdy składniki żywności genetycznie zmodyfikowanej zawierają białko lub DNA z organizmów genetycznie zmodyfikowanych powinna być umieszczona przy tym składniku informacja „genetycznie zmodyfikowana”. Obowiązek znakowania żywności nie dotyczy takiej, która zawiera mniej niż 1% GMO lub produktów uzyskanych z GMO [Ustawa z 2001].

PODSUMOWANIE

Podczas gdy świat z początkiem XXI w. zmierza w kierunku rozwoju dziedziny nauki jaką jest biotechnologia, akcentując potrzebę komercjalizacji prac także w zakresie GMO, w Polsce prowadzona jest kampania przeciwko każdej próbie wprowadzania GMO zarówno do środowiska, czy do obrotu handlowego. Nie ma znaczenia fakt, że od wielu lat kupujemy produkty GMO albo zawierające składniki genetycznie zmodyfikowanej żywności (pomidory, soja, kukurydza, izolaty białkowe z soi w produktach mięsnych). Pomijając stanowisko ośrodków opiniujących takich jak PAN, środowiska wyższych uczelni i wydziałów specjalizujących się w badaniach w zakresie biotechnologii, biologii, hodowli roślin, zwierząt, chemii i technologii żywności (w tym pasz), władze przyjęły pod naciskiem niekompetentnych zrzeszeń oraz koalicji, populistyczne hasło dla swoich poczynań „Polska wolna od GMO” [Ramowe stanowisko...2008]. Pomimo przewidywalnych i wymiernych korzyści płynących z modyfikowania genomu organizmów, występują liczne kontrowersje rozpowszechniane przez sceptyków i przeciwników ingerowania w informację genetyczną organizmów przez człowieka. Spektakularne akcje prowadzone przez członków Greenpeace i innych organizacji ‘Anty-GMO’ mają wzbudzać publiczną niechęć i brak akceptacji w stosunku do produktów opatrzonych oznaczeniem ‘modyfikowane genetycznie’. Dość powszechne stało się zjawisko polegające na wywoływaniu wśród społeczeństwa europejskiego lęku przed produktami biotechnologicznymi, chociaż nie ma żadnych dowodów, poza pojedynczymi przypadkami, uczuleń na białko. Geny wprowadzone do roślin są w całości trawione przez nasz organizm, podobnie jak kwasy nukleinowe z tradycyjnych materiałów roślinnych. Nie ma zatem możliwości wbudowania do organizmu ludzkiego obcych genów konsumowanych z żywnością transgeniczną. Istnieją natomiast zasadnicze kontrargumenty opu-

blikowane na przykład we wrześniu 2008 przez Wspólnotowe Centrum Badawcze (JRC) wykazujące, że nie ma żadnych przesłanek o szkodliwości żywności modyfikowanej genetycznie dla zdrowia ludzi i zwierząt. Pomimo prowadzonych badań w Polsce w zakresie GMO i rokujących sukces wyników tych poszukiwań, nie ma w perspektywie możliwości ich komercjalizacji, w warunkach oficjalnego obowiązywania hasła „Polska wolna od GMO”.

PIŚMIENNICTWO

- Benson A., 2009. *Great Lives from History: Inventors and Inventions*, Vol. 1 Salem Press.
- Berg J., Tymoczko J., Stryer L., 2007. *Biochemia*. PWN.
- Beyer P., Al-Babili S., Ye X., Lucca P., Schaub P., Welsch R., Potrykus I., 2002. Golden rice: Introducing the β -Carotene biosynthesis pathway into rice endosperm by genetic engineering to defeat vitamin A deficiency. *Journal of Nutrition*.
- Chakrabarta A., 1972. Microorganisms having multiple compatible degradative energy-generating plasmids and preparation thereof, Patent US nr 4259 444.
- Darrow G., 1966., *The Strawberry: History, Breeding and Physiology*. New York.
- de la Riva G., González-Cabrera J., Vázquez-Padrón R., Ayra-Pardo C., 1998. *Agrobacterium tumefaciens*: a natural tool for plant transformation. *Electronic Journal of Biotechnology*.
- Dyrektywa Parlamentu Europejskiego i Rady nr 18 z dnia 12.03.2001 o zamierzonym uwolnieniu do środowiska genetycznie zmodyfikowanych organizmów i uchylająca dyrektywę Rady nr 220/90. *Dziennik Urzędowy L*, nr 106.
- How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world 2000. <http://npic.orst.edu/factsheets/BTgen.pdf>
- Keen H., Glynn A., Pickup J., 1980. Human insulin produced by recombinant DNA technology: safety and hypoglycaemic potency in healthy men, *Lancet*.
- Kramer M., Redenbaugh K., 1994. Commercialization of a tomato with an antisense polygalacturonase gene: The FLAVR SAVR™ tomato story, *Euphytica*.
- Kwapich E., Twardowski T., 2003. *Biotechnologia a prawo*. Agencja Edytor.
- Martineau B., Summerfelt K., Adams D., DeVerna J., 1995. Production of High Solids Tomatoes Through Molecular Modification of Levels of the Plant Growth, Regulator Cytokinin Bio/Technology.
- Ramowe stanowisko Rządu RP dotyczące organizmów genetycznie modyfikowanych (GMO). Dokument przyjęty przez Radę Ministrów w dniu 18.11.2008., 1–9.
- Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady nr 258 z dnia 27.01.1997 dotyczące nowej żywności (novel foods) i nowych składników żywności. *Dziennik Urzędowy L*, nr 43.
- Rozporządzenie Rady nr 1139 z 26.05.1998 w sprawie obowiązkowego umieszczania na etykietach niektórych artykułów spożywczych wyprodukowanych z genetycznie zmodyfikowanych organizmów. *Dziennik Urzędowy L*, nr 159 i ze zmianą nr 6 z roku 2000.
- Rozporządzenie Komisji nr 50 z 10.01.2000 w sprawie etykietowania artykułów spożywczych zawierających dodatki i aromaty, które zostały genetycznie zmodyfikowane lub zostały wyprodukowane z genetycznie zmodyfikowanych organizmów. *Dziennik Urzędowy nr 6*.
- Twardowska A., Twardowski T., Żywność pochodząca z genetycznie modyfikowanych organizmów – żywność transgeniczna. Wynalazczość i Ochrona Własności Intelektualnej. Zbiór referatów z seminarium Rzeczników Patentowych Szkół Wyższych, Cedzyna 16–20.09.1997, *Z. 17*. 145–164.
- Ustawa z 22.06.2001 o organizmach genetycznie zmodyfikowanych. *Dziennik Ustaw nr 76*. poz. 811.
- Ustawa z 11.05.2001 o warunkach zdrowotnych żywności i żywienia. *Dziennik Ustaw nr 63*. poz. 634.

**THE SCIENTIFIC, ECONOMIC AND SOCIALLY-LEGAL
PRODUCTION AND SALE CONDITIONS OF GENETICALLY
MODIFIED FOOD IN POLAND**

Abstract. The problem of introduction genetically modified organisms – GMO into biotope and market in Poland, European community and in the other countries of the world was discussed. Then the advantages from the application of GMO in the production of foods and medicines were shown. The meaning of food's marking for elimination consumer's prejudices against this products was emphasized. The social consciousness state of the genetically modified organisms was evaluated and the official standpoint to the question of GMO of government in Poland was presented.

Key words: genetically modified organisms, GMO, genetically modified foods, transgenic foods, novel foods

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 15.12.2009

Do cytowania – For citation: Kramarz M., Kramarz K., 2009. Naukowe, ekonomiczne i społeczno-prawne uwarunkowania produkcji i sprzedaży żywności genetycznie modyfikowanej w Polsce. *Acta Sci. Pol. Biotechnol.* 8(4), 5–12.

POŚREDNIE WYKORZYSTANIE DROŹDŹY *YARROWIA LIPOLYTICA* DO POPRAWY CECH SENSORYCZNYCH SERÓW NISKOTŁUSZCZOWYCH*

Marek Szoltysik, Marta Pokora, Emilia Sławska,
Joanna Niedbalska, Anna Dąbrowska, Xymena Połomska,
Maria Wojtatowicz, Józefa Chrzanowska

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Streszczenie. W badaniach oceniano możliwość poprawy cech jakościowych serów o obniżonej do 30% zawartości tłuszczu w suchej masie poprzez dodatek preparatu smakowo-zapachowego otrzymanego z udziałem drożdży *Yarrowia lipolytica* J11c. Preparat przygotowano poprzez zaszczerpienie wydzielonej z mleka parakazeiny kulturą drożdżową do uzyskania końcowego stężenia 10^8 j.t.k. · g⁻¹ i poddanie jej czterodniowej inkubacji w temp. 30°C. Homogeny preparat po uprzednim spasteryzowaniu wprowadzono w ilości 3% do mleka serowarskiego, z którego następnie wyprodukowano sery zawierające 1,5 i 3% soli i poddano je 8-tygodniowemu dojrzewaniu. Przebieg procesu dojrzewania śledzono na podstawie analiz zmian podstawowego składu chemicznego oraz zmian degradacyjnych białek i tłuszczu. Przeprowadzone badania wykazały, że w serach, do których wprowadzono preparat, zaszły głębsze przemiany degradacyjne ich głównych składników niż w serach kontrolnych. W serach zawierających 1,5% soli były one większe niż w serach o 3,3% zawartości soli. Efektem tych przemian w serach była wyższa zawartość drobnocząsteczkowych związków azotowych, wolnych kwasów tłuszczowych oraz lotnych związków zapachowych. Przeprowadzona po zakończeniu dojrzewania ocena organoleptyczna potwierdziła, że zastosowanie preparatu wpłynęło na zmianę cech jakościowych serów niskotłuszczowych.

Słowa kluczowe: drożdże, *Yarrowia lipolytica*, parakazeina, degradacja, sery niskotłuszczowe, dojrzewanie

*Praca wykonana w ramach projektu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego Nr N N312213036.

Adres do korespondencji – Corresponding author: Marek Szoltysik, Katedra Technologii Surowców Zwierzęcych i Zarządzania Jakością, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, ul. C.K. Norwida 25/27, 50-375 Wrocław, e-mail: marek.szoltysik@up.wroc.pl

WSTĘP

Sery dojrzewające stanowią wartościowy produkt w żywieniu człowieka, dostarczający wielu składników budulcowych oraz posiadających różne funkcje regulacyjne. Cechuje je wysoka zawartość pełnowartościowego białka oraz wapnia o dużej biodostępności [McSweeney i in. 2000]. Zawierają one też znaczne ilości fosforu, potasu i magnezu oraz niektórych witamin [Kunachowicz i in. 2005]. Jednak ze względu na wysoką zawartość tłuszczu są produktami bardzo kalorycznymi. Jest to przyczyną malejącego zainteresowania tymi produktami konsumentów, którzy mają coraz większą świadomość tego, że spożywanie żywności niskokalorycznej może ograniczać ryzyko występowania chorób dietozależnych [Küçüköner i in. 2006]. Przemysł mleczarski, chcąc sprostać wymaganiom konsumentów, rozwija i modyfikuje technologię produkcji serów m.in. poprzez wytwarzanie serów niskotłuszczowych. Jednak ze względu na fakt, iż tłuszcz w serach nie pełni jedynie roli składnika odżywczego, ale jest czynnikiem kształtującym ich cechy sensoryczne i funkcjonalne, sery niskotłuszczowe wykazują ubogi profil smakowo-zapachowy [Ritvanen 2005, Liu i in. 2008, Rogers i in. 2009]. Rozwiązaniem tego problemu może być wprowadzanie różnorodnych modyfikacji w ich procesie technologicznym. Szczególnie zadowalające efekty uzyskano, stosując dodatek kultur wspomagających lub enzymów pochodzenia mikrobiologicznego [Azarnia i in. 2006, Hassan i in. 2007]. Jako kultury wspomagające przydatne okazały się niektóre gatunki drożdży naturalnie zasiedlające produkty mleczarskie, np.: *Debaryomyces hansenii*, *Y. lipolytica*, które cechuje wysoka aktywność zewnątrzkomórkowych enzymów hydrolitycznych, dzięki czemu mogą one uczestniczyć w kształtowaniu cech smakowo-zapachowych serów [Ferreira i in. 2003, Vakhlu i Kour 2006]. W wielu badaniach [Kilcawley i in. 1998, Hannon i in. 2006, Noronha i in. 2008] stwierdzono, że kompleksową poprawę cech jakościowych serów niskotłuszczowych można osiągnąć przez wprowadzenie preparatu smakowo-zapachowego lub tzw. enzymatycznie modyfikowanego sera, który uzyskuje się na drodze głębokiej hydrolizy białek i tłuszczu mlecznego pod wpływem proteaz i lipaz [Noronha i in. 2008]. Preparat taki stanowi źródło prekursorów związków smakowo-zapachowych sera w postaci: niskocząsteczkowych peptydów, wolnych aminokwasów i wolnych kwasów tłuszczowych [Hannon i in. 2006].

Celem pracy było określenie możliwości podwyższenia atrakcyjności sensorycznej serów niskotłuszczowych przy wykorzystaniu preparatu zdegradowanej, z udziałem kultury drożdży *Y. lipolytica* J11c, parakazeiny.

MATERIAŁ I METODY

Przygotowanie kultury drożdży: drożdże *Y. lipolytica* J11c namnożono w podłożu YCG zawierającym ($g \cdot l^{-1}$): ekstrakt drożdżowy – 1,7; kazeinę – 2,0; glukozę – 10. Po 48 godz. hodowli prowadzonej w temp. 28°C metodą wstrząsaną odwirowano biomasę, którą następnie wprowadzono do preparatu parakazeiny w ilości 10^8 j.t.k. $\cdot g^{-1}$.

Oznaczanie ogólnej liczby drożdży: wykonano na podłożu OGY agar, o składzie ($g \cdot l^{-1}$): ekstrakt drożdżowy (Difco)-5; glukoza-20; agar (Difco)-15; chlorowodorek oksytetracykliny (Merck)-0,1. Płytki inkubowano 3 dni w temp. 30°C.

Przygotowanie preparatu smakowo-zapachowego wg procedury Wyder i Puhan [1999]: do parakazeiny wydzielonej przy użyciu podpuszczki (Ch. Hansen) z mleka mikrofiltrowanego o zawartości tłuszczu 2% i spasteryzowanej w temp. 85°C przez 15 min, wprowadzono w warunkach sterylnych kulturę drożdży i poddano inkubacji w temp. 30°C

przez okres 4 dni. Bezpośrednio po zaszczepieniu, a także po zakończeniu inkubacji preparatu parakazeinowego z *Y. lipolytica*, oznaczono liczbę drożdży, podstawowy skład chemiczny, kwasowość oraz zawartość produktów degradacji białek i tłuszczu.

Produkcja serów: sery niskotłuszczowe typu holenderskiego o zawartości tłuszczu 30% w s.m. oraz soli 1,5 i 3,3% produkowano w warunkach laboratoryjnych w dwóch seriach z mleka poddanego niskiej pasteryzacji. Jako kulturę starterową zastosowano szczepionkę kwasząco-aromatyzującą mezofilnych paciorkowców mlekowych (Chr. Hansen). Przy produkcji serów doświadczalnych do mleka serowarskiego wprowadzono preparat smakowo-zapachowy w ilości 3%. Kontroli poddano sery produkowane bez dodatku preparatu. Proces dojrzewania serów trwał 8 tygodni w temp. 15°C, przy wilgotności względnej powietrza 85%.

Poziom proteolizy w preparacie smakowo-zapachowym oraz serze oceniono poprzez analizy zawartości azotu rozpuszczalnego w wodzie (WSN) wg Kuchroo i Fox [1982], wolnych grup aminowych oznaczanych przy użyciu kwasu trinitrobenzenosulfonowego (TNBS, Sigma) wg zmodyfikowanej metody Kuchroo i in. [1983], tak we frakcji rozpuszczalnej w wodzie, jak i wydzielonej z niej wg Jarret i in. [1982] frakcji rozpuszczalnej w kwasie fosfowolframowym (PTA, Fluka). Stopień zaawansowania procesów proteolizy śledzono także metodą elektroforezy w żelu poliakrylamidowym wg Andrews [1983].

Poziom lipolizy oceniono, analizując zawartości wolnych kwasów tłuszczowych (WKT) wydzielonych z preparatu smakowo-zapachowego i sera wg Deeth i in. [1983] i oznaczanych metodą chromatografii gazowej w aparacie firmy Agilent Technologies zaopatrzonego w detektor masowy (GC/MS). Rozdział prowadzono w warunkach: kolumna 60 m×250 μm×0,25 μm, temperatura kolumny 70°C (5 min) do 240°C (4°C/min), gaz nośny hel.

Analiza lotnych związków. Związki zapachowe ekstrahowano z wodnego homogenatu sera (1:1 w/v) metodą mikroekstrakcji do fazy stałej (SPME). Rozdział prowadzono metodą GC/MS, stosując następujące warunki: kolumna 60 m×250 μm×0,25 μm, temperatura kolumny 40°C (5 min) do 240°C (4°C/min), gaz nośny – hel (20 cm³/s), split 1:1. Identyfikację analizowanych związków lotnych wykonano na podstawie analizy porównawczej widm masowych z komercyjną biblioteką widm NIST.

Ocenę organoleptyczną wyprodukowanych serów przeprowadzono po zakończeniu dojrzewania. Obejmowała ona następujące wyróżniki jakościowe: zapach, smak, słoność, konsystencja i tekstura. Oceny dokonał 10-osobowy zespół w skali 5-punktowej.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

W podstawowym składzie chemicznym preparatu parakazeiny zaszczepionym drożdżami *Y. lipolytica* JIIIc zawartość suchej masy wynosiła 24,8%, w tym białka 12,8% i tłuszczu 7,4%. W preparacie po 4 dniach inkubacji nastąpił nieznaczny wzrost liczebności komórek drożdży z $1,2 \times 10^8$ do $7,3 \times 10^8$ j.t.k. · g⁻¹. Towarzyszył mu też przyrost zawartości produktów degradacji białek i tłuszczu (tab. 1). Poziom azotu rozpuszczalnego wyrażonego jako procent azotu ogólnego zwiększył się w preparacie ok. 12-krotnie i wyniósł po tym czasie 36,35%. Natomiast zawartość wolnych grup aminowych we frakcji rozpuszczalnej w wodzie i kwasie fosfowolframowym osiągnęły poziom odpowiednio 6782 i 751 μM Gly/100 g. Uzyskane wyniki potwierdzają wysoką aktywność proteolityczną drożdży *Y. lipolytica*, które przejawiają zdolność syntezy pozakomórkowych proteaz aktywnych zarówno w środowisku kwaśnym, jak i zasadowym [Van den Tempel i Jakobsen 2000, Suzzi i in. 2001, Gdula i in. 2002, Bankar i in. 2009]. Przyrost

zawartości wolnych kwasów tłuszczowych z 591 do 2666 mg·kg⁻¹ świadczy też o intensywnych zmianach lipolitycznych zachodzących w preparacie parakazeinowym. Jest to konsekwencją działania zewnątrzkomórkowych lipaz uwalnianych przez drożdże *Y. lipolytica*. Inni autorzy [Guerzoni i in. 2001, Lanciotti i in. 2005, Czajgucka i in. 2006] stwierdzali również, że drożdże *Y. lipolytica* w środowisku sera generują znaczne ilości wolnych kwasów tłuszczowych, które w istotnym stopniu wpływają na kształtowanie pożądanych cech smakowo-zapachowych tych produktów.

Tabela 1. Zawartość produktów degradacji białek i tłuszczu w preparacie parakazeinowym na początku i po 4 dniach inkubacji z drożdżami *Y. lipolytica* JIIIc

Table 1. Contents of protein and fat degradation products at the beginning and after 4 days of incubation of yeast *Y. lipolytica* JIIIc with paracasein preparation

Parametr Parameter	Czas inkubacji [dni] Incubation time [days]	
	0	4
WSN [% azotu ogólnego] WSN [% total nitrogen]	3,17 ± 0,22	36,35 ± 0,11
Wolne grupy aminowe – we frakcji rozpuszczalnej w H ₂ O Free amino groups – in water soluble fraction [μM Gly/100 g]	921 ± 18	6982 ± 191
Wolne grupy aminowe – we frakcji rozpuszczalnej w PTA Free amino groups – in PTA soluble fraction [μM Gly/100 g]	0	751 ± 31
WKT [mg·kg ⁻¹] FFA	591 ± 29	2666 ± 44

±SD (odchylenie standardowe) – standard deviation

Uzyskany preparat zdegradowanej parakazeiny jako preparat smakowo-zapachowy wykorzystano, po termicznej inaktywacji drożdży, do produkcji serów o obniżonej do 30% zawartości tłuszczu. Sery te zawierały sól w stężeniu 1,5 i 3,3%. Po 8 tygodniach dojrzewania ich podstawowy skład chemiczny był zbliżony (tab. 2). Sery o wyższym stopniu zasolenia różniły się o ok. 1–1,5% większej ilości suchej masy i o pH = 5,94 od serów zawierających 1,5% soli i o pH = 6,19. Natomiast zawartości białka i tłuszczu w suchej masie badanych serów wyniosły ok. 30%.

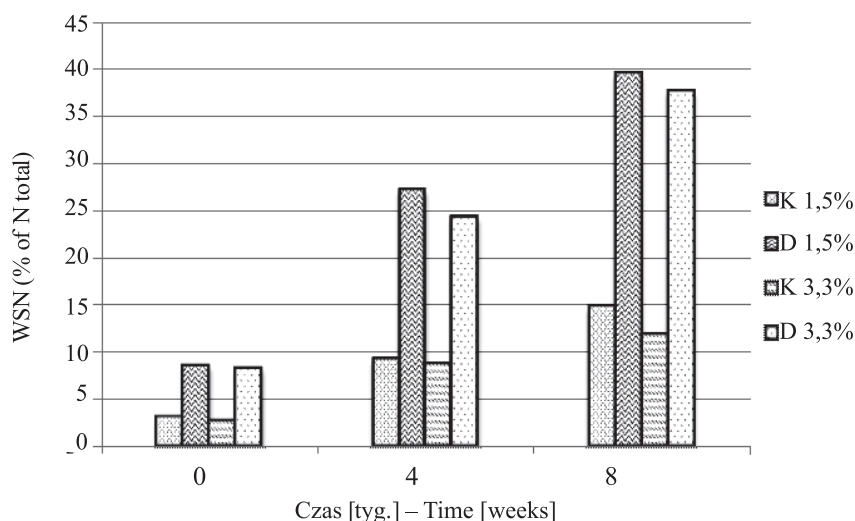
Tabela 2. Podstawowy skład chemiczny i pH serów niskotłuszczowych wyprodukowanych z dodatkiem preparatu zdegradowanej parakazeiny po 8 tygodniach dojrzewania

Table 2. Chemical composition and pH of low fat cheeses, produced with preparation of degraded paracasein after 8 weeks of ripening

Ser [% NaCl] Cheese	Sucha masa [%] Dry matter	Białko [%] Protein	Tłuszcz [%] Fat	pH
Kontrolny [1,5] Control	49,9±0,19	29,49±0,26	30,9 ± 0,12	5,62±0,05
Doświadczalny [1,5] Experimental	51,0±0,03	30,29±0,25	30,5 ± 0,17	6,19±0,10
Kontrolny [3,3] Control	51,81±0,11	29,46±0,21	32,1 ± 0,08	5,41±0,08
Doświadczalny [3,3] Experimental	52,47±0,05	30,21±0,20	31,4 ± 0,11	5,94±0,08

±SD (odchylenie standardowe) – standard deviation

Poziom proteolizy w serach w kolejnych okresach dojrzewania określono na podstawie oznaczeń zawartości azotu rozpuszczalnego w wodzie (rys. 1). W serach otrzymanych z dodatkiem preparatu zdegradowanej parakazeiny odnotowano wyższy stopień rozkładu białek w porównaniu do serów kontrolnych. W 8 tygodniu dojrzewania zawartość WSN w serach o zawartości soli 1,5 i 3,3% wyniosła odpowiednio 39,54 i 37,67%, podczas gdy w serach kontrolnych stanowiła odpowiednio 14,75 i 11,85% azotu ogólnego. Zawartość wolnych grup aminowych we frakcji rozpuszczalnej w wodzie oraz we frakcji rozpuszczalnej w kwasie fosfowolframowym (PTA) była również wyższa w serach zawierających preparat parakazeinowy (rys. 2). W serach o niższej zawartości soli wynosiła odpowiednio 9905 i 5631 $\mu\text{M Gly}/100\text{ g}$, a w serach o wyższym nasoleniu 8986 $\mu\text{M Gly}/100\text{ g}$ i 4697 $\mu\text{M Gly}/100\text{ g}$.

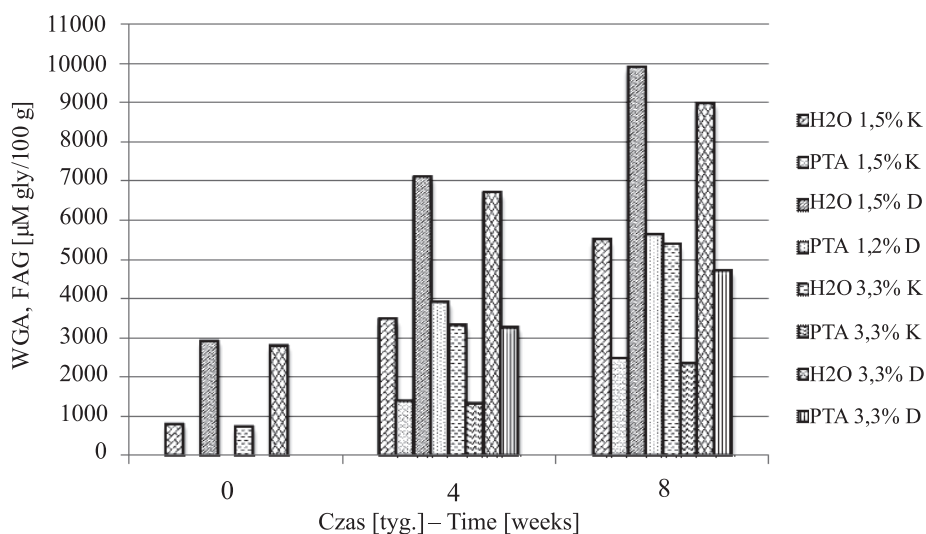


Rys. 1. Zmiany zawartości WSN w serach podczas dojrzewania (K – ser kontrolny, D – ser doświadczalny)

Fig. 1. Changes of WSN in cheeses during ripening (K – control cheese, D – experimental cheese)

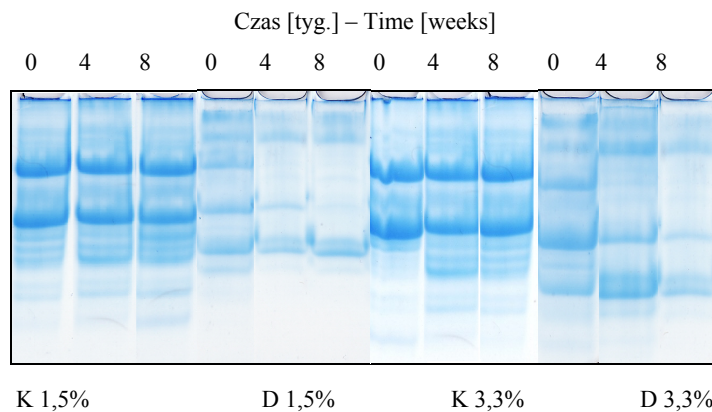
Wyniki uzyskane metodą elektroforezy w żelu poliakrylamidowym potwierdziły głębszy rozkład białek w tych serach (rys. 3). Po 8 tygodniach stwierdzono w nich niemal całkowity zanik frakcji α_{s1} - i β -kazeiny. W serach kontrolnych natomiast nie notowano widocznych zmian degradacyjnych kazeiny. W przeprowadzonych badaniach zaznaczyły się wyraźnie różnice w poziomie proteolizy w zależności od stężenia NaCl w serach. Należy to tłumaczyć tym, że wzrost zawartości soli związany z obniżeniem aktywności wody wpływa hamująco na procesy biochemiczne zachodzące podczas dojrzewania serów, tak proteolizy jak i lipolizy [McSweeney i Sousa 2000, Sousa i in. 2001].

Po ośmiotygodniowym dojrzewaniu w badanych serach stwierdzono też wyższy poziom wolnych kwasów tłuszczowych (WKT) niż w serach kontrolnych otrzymanych bez dodatku preparatu parakazeinowego (tab. 3). W serach o stężeniu 1,5% soli ich zawartość wynosiła 1965,6 mg/kg, a w serach zawierających 3,3% NaCl 1576,7 mg/kg, podczas gdy w serach kontrolnych odpowiednio 1022,2 i 881,6 mg/kg.



Rys. 2. Zmiany zawartości wolnych grup aminowych (WGA) we frakcji rozpuszczalnej w wodzie i PTA w serach podczas dojrzewania (K – ser kontrolny, D – ser doświadczalny)

Fig. 2. Changes in free amino groups contents in fraction soluble in water and PTA in cheeses during ripening (K – control cheese, D – experimental cheese)



Rys. 3. Rozdział elektroforetyczny białek serów podczas dojrzewania (K – ser kontrolny, D – ser doświadczalny)

Fig. 3. Protein degradation in cheeses during ripening (K – control cheese, D – experimental cheese)

Tabela 3. Zawartość wolnych kwasów tłuszczowych (WKT) w serach po 8 tygodniach dojrzewania
 Table 3. Concentration of free fatty acids (FFA) contents in cheeses after 8 weeks of ripening

Ser [% NaCl] Cheese	WKT [mg · kg ⁻¹] FFA										Suma Total
	C ₄	C ₆	C ₈	C ₁₀	C ₁₂	C ₁₄	C ₁₆	C _{18:0}	C _{18:1}	C _{18:2}	
Kontrolny [1,5] Control	45,3	28,4	23,1	43,5	64,3	164,2	195,2	123,6	278,3	56,3	1022,2
Doświadczalny [1,5] Experimental	79,6	52,5	63,7	93,8	234,5	367,4	239,4	395,0	345,6	94,1	1965,6
Kontrolny [3,3] Control	34,8	23,5	19,8	37,6	58,9	145,6	178,5	112,6	235,6	34,7	881,6
Doświadczalny [3,3] Experimental	67,4	54,5	64,5	91,1	227,3	298,7	225,8	267,8	195,2	84,4	1576,7

W badanych serach na najwyższym poziomie uwalniane były długołańcuchowe kwasy tłuszczowe: kwas mirystynowy (C₁₄), palmitynowy (C₁₆), stearynowy (C_{18:0}) i oleinowy (C_{18:1}). Krótko- i średniołańcuchowe kwasy tłuszczowe, takie jak: masłowy (C₄), kapronowy (C₆), kaprylowy (C₈), kaprynowy (C₁₀) i laurynowy (C₁₂) uwalniane były w mniejszych ilościach. Mniejszy ogólnie udział tych kwasów w serach dojrzewających w porównaniu do długołańcuchowych kwasów tłuszczowych potwierdzają Collins i in. [2003]. Jakkolwiek krótko- i średniołańcuchowe kwasy tłuszczowe mają największy udział w tworzeniu cech smakowo-zapachowych serów spośród wszystkich kwasów tłuszczowych obecnych w serze. Powstające w wyniku lipolizy tłuszczu mlecznego WKT nie tylko uczestniczą w tworzeniu cech smakowo-zapachowych serów, ale też są prekursorami licznych związków nadających aromat takich jak: metyloketony, estry, laktony, alkohole [Delgado i in. 2009; McSweeney i Sousa 2000, Collins i in. 2003, Szoltyś i in. 2008].

W analizie lotnych związków zapachowych po wcześniejszej ekstrakcji do fazy stałej odnotowano obecność związków z grupy ketonów, alkoholi, kwasów karboksylowych, estrów i alkanów (tab. 4). Najwyższe stężenie lotnych związków zapachowych stwierdzono w serach, do których wprowadzono preparat parakazeinowy podany inkubacji z komórkami drożdży *Y. lipolytica* JII1c. W liczbie zidentyfikowanych związków dominowały kwasy karboksylowe i ketony. Ich udział procentowy po zakończeniu dojrzewania wynosił odpowiednio: 70,23 i 13,57% w serach o stężeniu NaCl 1,5%, natomiast w serach zawierających 3,3% NaCl 48,19 i 8,43%. Najwięcej przy tym wśród kwasów było kwasu kaprylowego, a wśród ketonów: 2-heptanonu i undekanonu.

W analizie organoleptycznej sery wzbogacone preparatem zdegradowanej parakazeiny zostały ocenione wyżej pod względem konsystencji i tekstury niż cech smakowo-zapachowych (tab. 5). Jakkolwiek sery z dodatkiem preparatu o stężeniu chlorku sodu 1,5%, uzyskały wyższe noty za smak i zapach niż sery bardziej nasolone. Inni autorzy stwierdzali również, że sery o obniżonej zawartości soli na skutek intensywniejszego przebiegu dojrzewania cechują lepsze walory smakowo-zapachowe [Wiśniewska i 1999]. Niższa ocena tych serów w porównaniu z serami kontrolnymi wynikała

z gorzkiego ich posmaku. Przyczyną mogły być zbyt daleko posunięte procesy degradacji białek i uwalnianie gorzkich peptydów [Sousa i in. 2001, Ferreira i Viljoen 2003]. Według Pluty i in. [2006] sery niskotłuszczowe przy stosunkowo dużej zawartości wody (47–48%) powinny dojrzewać krócej, aby nie pogorszyły się ich cechy w ostatnim okresie dojrzewania.

Tabela 4. Udział procentowy lotnych związków zapachowych w serach (kontrolnych – K i doświadczalnych – D) po 8 tygodniach dojrzewania

Table 4. Relative concentration of volatile aroma compounds in cheeses (control – C and experimental – E) after 8 weeks of ripening

Związek Compound	Ser [%NaCl] Cheese				
	K 1,5 C 1,5	D 1,5 E 1,5	K3,3 C 3,3	D 3,3 E 3,3	
Ketony Ketones	2-heptanon	–	10,90	22,19	9,58
	2-nonanon	16,63	1,70	7,98	–
	2-undekanon	–	3,12	–	3,47
	2-undecanon	–	–	–	–
	4-metyloheksanon 4-methylhexanon	–	0,89	–	0,63
Alkohole Alcohols	1-nonanol	20,60	1,63	4,62	1,69
Kwasy karboksy- lowe Carboxylic acids	kwas masłowy butyric acid	36,22	6,16	14,48	6,67
	kwas kapronowy capronic acid	26,55	10,81	–	22,79
	kwas kaprylowy caprylic acid	–	52,45	–	37,62
	kwas kaprynowy caprynic acid	–	5,24	–	10,14
	kwas palmitynowy palmitic acid	–	0,58	–	–
	kwas stearynowy stearic acid	–	0,65	–	0,99
	Estry Esters	ester etylowy kwasu masłowego butanoic acid etyl ester	–	3,88	–
ester trimetylowy kwasu undekawanowego undecanoic acid trimethyl ester		–	0,89	–	–
eikozan eicosane		–	–	8,07	–
Alkany Alkanes	heksakozan hecsacosane	–	1,10	42,67	6,41

Tabela 5. Ocena organoleptyczna serów po 8 tygodniach dojrzewania
Table 5. Organoleptic evaluation of cheeses after 8 weeks of ripening

Ser [% NaCl] Cheese	Parametr/punkty Parameter/points					Ogółem Total
	zapach smell	smak taste	słoność saltnes	konsystencja consistence	tekstura texture	
Kontrolny [1,5] Control	4,4	3,8	4,3	3,4	3,4	19,3
Doświadczalny [1,5] Experimental	3,3	3,6	4,1	4,3	4,2	19,5
Kontrolny [3,3] Control	4,5	3,7	3,1	3,8	3,5	18,6
Doświadczalny [3,3] Experimental	3,1	3,2	3,3	4	4,2	17,9

WNIOSKI

1. Szczep *Y. lipolytica* JII1c ze względu na wysoką aktywność hydrolityczną może być wykorzystany do przygotowania atrakcyjnego dla serowarstwa preparatu smakowo-zapachowego, jakkolwiek warunki jego przygotowania (zwłaszcza czas inkubacji) powinny być zmienione.

2. Wprowadzenie preparatu zdegradowanej przez drożdże *Y. lipolytica* JII1c parakazeiny do serów o obniżonej zawartości tłuszczu wpływa na intensyfikację przemian biochemicznych zachodzących podczas ich dojrzewania.

3. Stopień nasolenia serów ma wpływ na poziom degradacji białek i tłuszczu oraz powstawanie lotnych związków zapachowych.

4. Poprawa cech sensorycznych serów niskotłuszczowych przy użyciu preparatu zdegradowanej przez drożdże *Y. lipolytica* JII1c parakazeiny wymaga optymalizacji tak dawki tego preparatu, jak i czasu dojrzewania serów.

PISMIENICTWO

- Azarnia, S., Robert, N., and Lee, B.-H. 2006. Biotechnological methods to accelerate Cheddar cheese ripening. *Critical Rev. Biotechnol.*, 26: 121–143.
- Andrews, A.T., 1983. Proteinases in normal bovine milk and their action on caseins, *J. Dairy Res.*, 50: 45–55.
- Bankar A.V., Kumar A.R., Zinjarde S.S., 2009. Environmental and industrial applications of *Yarrowia lipolytica*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 84: 847–865.
- Collins Y.F., McSweeney P.L.H., Wilkinson M.G., 2003. Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. *Inter. Dairy J.*, 13: 841–866.
- Czajgucka A., Chrzanowska J., Juszczyk P., Szołtysik M., Połomska X., Wojtatowicz M., 2006. Wzrost drożdży w modelowym serze i ich wpływ na degradację białek i tłuszczu. *Acta Sci. Pol., Biotechnol.*, 5(1-2): 95–103.
- Deeth H.C., Fitz-Gerald C.H., Snow A.J., 1983. A gas chromatographic method for the quantitative determination of free fatty acids in milk and milk products. *J. Dairy Sci. Technol.*, 18: 230–233.

- Delgado F.J., Gonzalez-Crespo J., Ladero L., Cava R., Ramirez R., 2009. Free fatty acids and oxidative changes of a Spanish soft cheese (PDO 'Torta del Casar') during ripening. *Inter. J. Food Sci. Technol.*, 44: 1721–1728.
- Ferreira A.D., Viljoen B.C., 2003. Yeasts as adjunct starters in matured Cheddar cheese. *Inter. J. Food Microbiol.*, 86: 131–140.
- Gdula A., Chrzanowska J., Szoltysik M., Kieźel X., Wojtatowicz M., 2002. Factors affecting hydrolytic enzymes production by *Yarrowia lipolytica* strains. *Acta Sci. Pol., Biotechnologia*, 1 (102): 81–88.
- Guerzoni M., Lanciotti R., Vannini L., Galgano F., Favati F., Gardin F., Suzzi G., 2001. Variability of the lipolytic activity in *Yarrowia lipolytica* and its dependence on environmental conditions. *Inter. J. Food Microbiol.*, 69: 79–89.
- Hannon J.A., Klicawley K.N., Wilkinson M.G., Delahunty C.M., Beresford T.P., 2006. Production of ingredient – type Cheddar cheese with accelerated flavor development by addition of enzyme-modified cheese powder. *J. Dairy Sci.*, 89: 3749–3762.
- Hassan A.N., Awad S., Mistry V.V., 2007. Reduced fat process cheese made from young reduced fat cheddar cheese manufactured with exopolysaccharide-producing cultures. *J. Dairy Sci.*, 90: 3604–3612.
- Jarret W.D., Aston J.W., Dulley J.R., 1982. A simple method for estimating free amino acids in Cheddar cheese, *Aust. J. Dairy Technol.*, 6: 55–58.
- Kilcawley K.N., Wilkinson M.G., Fox P.F., 1998. Review. Enzyme-Modified Cheese. *Inter. Dairy J.*, 8: 1–10.
- Küçüköner E., Haque Z.U., 2006. Physicochemical properties of low-fat and full-fat Cheddar cheeses. 2006 *Inter. J. Dairy Technol.*, 3(59): 166–170.
- Kunachowicz H., Nadolna I., Iwanow K., Przygoda B., 2005. Wartość odżywcza wybranych produktów spożywczych i typowych potraw. Wydanie IV. Wydawnictwo lekarskie PZWL, Warszawa.
- Kuchroo C.N., Fox P.F., 1982. Soluble nitrogen in Cheddar cheese: comparison of extraction procedures. *Milchwiss.*, 37: 331–335.
- Kuchroo C.N., Rahilly J., Fox P.F., 1983. Assessment of proteolysis in cheese by reaction with trinitrobenzene sulphonic acid. *Inter. J., Food Sci. Technol.*, 7: 129–133.
- Lanciotti R., Vannini L., Chaves Lopez 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. *International J. of Dairy Technol.*, 58(2): 89–99.
- Liu H., Xu X.M., Guo S.D., 2008. Comparison of full-fat and low-fat cheese analogues with or without pectin gel through microstructure, texture, rheology, thermal and sensory analysis. *International Journal of Food Science and Technology*, 43: 1581–1592.
- McSweeney P.L.H., Sousa M.J., 2000. Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: A review. *Lait*, 80: 293–324.
- Noronha N., Cronin D.A., O’Riordan E.D., O’Sullivan M., 2008. Flavouring of imitation cheese with enzyme-modified cheeses (EMCs): Sensory impact and measurement of aroma active short chain fatty acids (SCFAs). *Food Chemistry*, 106: 905–913.
- Pluta A., Berthold A., Kielak J., 2006. Zmiany wybranych cech fizykochemicznych, reologicznych i sensorycznych w czasie dojrzewania sera typu holenderskiego o różnej zawartości tłuszczu. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2(47): 255–261.
- Ritvanen T., Lampolahti S., Lilleberg L., Tupasela T., Isoniemi M., Appelbye U., Lyytikäinen T., Eerola S., Uusi-Rauva E., 2005. Sensory evaluation, chemical composition and consumer acceptance of full fat and reduced fat cheeses in the Finnish market. *Food Quality and Preference*, 16: 479–492.

- Rogers N.R., Drake M.A., Daubert C.R., McMahon D.J., Bletsch T.K., Foegeding E.A., 2009. The effect of aging on low-fat, reduced-fat, and full-fat Cheddar cheese texture. *J. Dairy Sci.*, 92: 4756–4772.
- Sousa M.J., Ardó Y., McSweeney P.L.H., 2001. Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *Inter. Dairy J.*, 11: 327–345.
- Suzzi G., Lanorte M.T., Galgano F., Andrighetto C., Lombardi A., Lanciotti M., Guerzoni M.E., 2001. Proteolytic, lipolytic and molecular characterization of *Yarrowia lipolytica* isolated from cheese. *Inter. J. Food Microbiol.*, 69: 69–77.
- Szołtysik M., Żelazko M., Połomska X., Wojtatowicz M., Chrzanowska J., 2008. Wzrost i enzymatyczna aktywność drożdży w mleku różnych gatunków przeżuwaczy. *Acta Sci. Pol., Biotechnol.*, 7(2): 27–41.
- Vakhlu J., Kour A., 2006. Yeast lipases: enzyme purification, biochemical properties and gene cloning. *J. Biotechnol.*, 9(1): 69–85.
- 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. *Inter. Dairy J.*, 10: 263–270.
- Wiśniewska K., Rejs A., Jarmul I., Iwańczak M., 1999. Ripening of rennet cheeses with different content of salt. *Natural Sciences*, 3: 95–107.
- Wyder M.T., Puhani Z., 1999. Role of selected yeasts in cheese ripening: an evaluation in aseptic cheese curd slurries. *Inter. Dairy J.*, 9: 117–124.

INDIRECT APPLICATION OF YEAST *YARROWIA LIPOLYTICA* FOR IMPROVING OF SENSORY PARAMETERS OF LOW FAT CHEESES

Abstract. The aim of the study was to evaluate possibility of improving quality of low fat cheeses (content of fat was reduced to 30% in dry matter) by introduction of aroma preparation obtained with yeast *Yarrowia lipolytica* JII1c. The preparation was prepared by introduction of yeast culture to paracasein at concentration 10^8 cfu·g⁻¹ and incubation at temp. 30°C for four days. Afterwards pasteurized and homogenous preparation was added to cheese milk at concentration of 3%. Following low fat cheeses of 1,5 and 3,3% NaCl were produced and ripened for 8 weeks. It was shown that application of degraded paracasein into cheeses caused increase of proteolytic and lipolytic changes. However they were more advanced in cheeses of lower salt content. But comparing to control cheeses produced without preparation the experimental cheeses contained higher amounts of low nitrogen compounds, free fatty acids and volatile aroma compounds. Their sensory parameters appeared also different in comparison to control.

Key words: yeast, *Yarrowia lipolytica*, paracasein, degradation, low fat cheeses, ripening

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 15.12.2009

Do cytowania – For citation: Szołtysik M., Pokora M., Sławska E., Niedbalska J., Dąbrowska A., Połomska X., Wojtatowicz M., Chrzanowska J., 2009. Pośrednie wykorzystanie drożdży *Yarrowia lipolytica* do poprawy cech sensorycznych serów niskotłuszczowych. *Acta Sci. Pol. Biotechnol.* 8(4), 13–24.

WZROST Z SACHAROZY KLONÓW DROŹDŹY *YARROWIA LIPOLYTICA* Z GENEM INWERTAZY Z *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Ewa Walczak, Małgorzata Robak

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Streszczenie. Celem badań była ocena wzrostu potencjalnych producentów heterologicznych białek: klonów Suc^+ drożdży *Yarrowia lipolytica* A-101. Wzrost z sacharozy oceniano dla 26 transformantów, dla szczepu wyjściowego (dzikiego) A-101 i referencyjnego rekombinowanego szczepu W29 *ura3-302*. Badane transformanty różniły się zdolnością do wzrostu z sacharozy (długość trwania lag fazy, moment osiągnięcia fazy stacjonarnej wzrostu). Natomiast bez względu na typ przeprowadzonej modyfikacji nie odnotowano różnic we wzroście z fruktozy i glukozy. Oceniano także wpływ początkowego pH hodowli (6,8) oraz dodatku peptonu (0,1 i 0,01%) na indukcję promotora *XPR2*. Wykazano, że KLON1 oraz KLON10 wyrastają obficie z sacharozy już przy minimalnej dawce peptonu (0,01%). Z kolei stabilizacja pH w początkowym okresie wzrostu na poziomie 6,8 wpłynęła pozytywnie na przebieg hodowli. Nawet w podłożu zawierającym 30% sacharozy, pomimo dłuższej lag fazy, klony wyrastały lepiej z buforem niż bez.

Słowa kluczowe: *Yarrowia lipolytica*, Suc^+Ura^+ , Suc^+Ura^- , sacharoza, *XPR2*, Bioscreen C

WSTĘP

Obecnie wiodącymi gatunkami, wykorzystywanymi w badaniach nad produkcją heterologicznych białek, są: *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Kluyveromyces lactis*, *Hansenula polymorpha*, *Arxula adeninivorans* oraz *Yarrowia lipolytica* [Gellissen i in. 2005, Robak i Walczak 2009]. Ten ostatni jest kolejnym gatunkiem, zdobywającym popularność jako gospodarz w produkcji obcych białek. W oparciu o różne systemy ekspresji szczepu *Y. lipolytica* mogą wydzielać na litr podłoża nawet kilka gramów białek, pochodzących od bakterii, grzybów, roślin lub ssaków, w tym ludzi [Juretzek i in. 2001, Nicaud i in. 2002].

Od lat 80. intensywnie rozwijają się badania dotyczące udoskonalenia szczepów *Y. lipolytica*, w celu wydajnej produkcji heterologicznych białek. Dotychczas opisano

Adres do korespondencji – Corresponding author: Małgorzata Robak, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, ul. C.K. Norwida 25, 50-375 Wrocław, e-mail: malgorzata.robak@up.wroc.pl

zaledwie 16 rekombinowanych szczepów *Y. lipolytica*, potencjalnych producentów obcych białek. Szczepy te posiadają markery genetyczne, głównie w postaci auktotrofii leucynowej i uranilowej, umożliwiające dalszą selekcję transformantów [Madzak i in. 2005].

Stosunkowo łatwą selekcję producentów heterologicznych białek z wklonowanym obcym genem stanowi zdolność do utylizacji nietypowych dla tego gatunku źródeł węgla. Jednym z nich jest sacharoza, ulegająca hydrolizie pod wpływem inwertazy, enzymu kodowanego przez gen *SUC2* u *S. cerevisiae*. Dzięki zdolności do wzrostu z sacharozy, rekombinowane szczepy *Y. lipolytica* mogą wykorzystywać substraty zawierające sacharozę (niehydrolizowana melasa, cukier spożywczy i inne) [Nicaud i in. 1989, Wojtatowicz i in. 1997]. Taką zdolność do wzrostu z sacharozy wykazuje zaledwie osiem rekombinowanych szczepów *Y. lipolytica* [Madzak i in. 2005].

Rekombinowane szczepy należące do tego gatunku drożdży znacznie różnią się wydajnością produkcji obcych białek. Na wydajność produkcji heterologicznego białka wpływa wydajność ekspresji genów (siła promotora, regulacja transkrypcji i translacji), potranslacyjne modyfikacje oraz sposób wydzielania białka [Watson i in. 2008]. Stosowanie indukcyjnych promotorów umożliwia kontrolę zarówno momentu, jak i poziomu ekspresji genu. Promotor *XPR2*, wykorzystany w wielu projektach zakładających produkcję heterologicznych białek, jest najlepiej poznanym i najczęściej stosowanym spośród znanych promotorów *Y. lipolytica* [Nicaud i in. 1989, Hamsa i in. 1994, Park i in. 1997].

Pomimo pozyskania przez niezależne laboratoria szczepów będących potencjalnymi producentami obcych białek wciąż poszukiwani są nowi gospodarze, pochodzący od szczepów dzikich izolowanych z naturalnych źródeł. Takim szczepem jest izolat *Y. lipolytica* A-101 zdeponowany w kolekcji kultur w Katedrze Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, który poddano transformacji, uzyskując liczne klonów o fenotypie Suc^+ [Walczak i in. 2007a,b].

Celem pracy była ocena zdolności do wzrostu z sacharozy, glukozy i fruktozy klonów *Y. lipolytica* o fenotypie Suc^+Ura^+ oraz Suc^+Ura^- posiadających gen inwertazy z *S. cerevisiae*. Analizowano także wpływ dodatku peptonu w dawce 0,1 i 0,01% oraz buforu fosforanowego o pH 6,8 jako czynników indukujących promotor *XPR2*, warunkującego ekspresję genu *SUC2*.

MATERIAŁ I METODY

Mikroorganizmy. Przedmiotem badań było 26 zmodyfikowanych genetycznie szczepów drożdży *Yarrowia lipolytica*, otrzymanych na drodze transformacji szczepu dzikiego *Y. lipolytica* A-101 ($MATA,Ura^+Suc^-$) ekspresyjną kasetą drożdżową z plazmidu pINA302. Kasetą drożdżową integrującą w obrębie genu *URA3*, zawierała sekwencję genu *SUC2* drożdży *S. cerevisiae* znajdującego się pod kontrolą promotora indukcyjnego i terminatora genu *XPR2* drożdży *Y. lipolytica*. Pozyskane klonów wykazywały fenotyp Suc^+Ura^- lub Suc^+Ura^+ i były wynikiem integracji kasety drożdżowej odpowiednio w homologiczne lub przypadkowe (heterologiczne) miejsce genomu. Zestawione w tabeli 1 szczepy drożdży otrzymano w 2007 roku [Walczak i in. 2007a,b].

Mikrohodowle prowadzono w analizatorze Bioscreen C, umożliwiającym wykonanie równoległe 200 mikrohodowli oraz pomiar gęstości optycznej ($OD_{420-580\text{ nm}}$) co 15 min. Do mikrostudzienek kasety wprowadzono 300 μ l podłoża płynnego z tiaminą (MMT). Źródło węgla stanowiła glukoza (1%), fruktoza (1%) lub sacharoza (1–30%).

Tabela 1. Stosowane szczepy *Y. lipolytica*Table 1. Applied *Y. lipolytica* strains

Lp. No.	Szczep <i>Y. lipolytica</i> Strain <i>Y. lipolytica</i>	Genotyp Genotype	Fenotyp Phenotype
1.	A-101 WT	MATA <i>URA3</i>	Suc ⁺ Ura ⁺
2.	W 29 <i>ura3-302</i> ref.	MATA, <i>ura3-302:pXPR2::SUC2</i>	Suc ⁺ Ura ⁻
3.	A-101 A18	MATA, <i>ura3-302:pXPR2::SUC2</i>	Suc ⁺ Ura ⁻
4.	A-101 B55-3	MATA, <i>ura3-302:pXPR2::SUC2</i>	
5.	A-101 B54-6	MATA, <i>ura3-302:pXPR2::SUC2</i>	
6.	A-101 B57-4	MATA, <i>ura3-302:pXPR2::SUC2</i>	
7.	A-101 KLON 1	MATA, X-302: <i>pXPR2::SUC2</i>	Suc ⁺ Ura ⁺
8.	A-101 KLON 10	MATA, X-302: <i>pXPR2::SUC2</i>	
9.	A-101 B7-6	MATA, X-302: <i>pXPR2::SUC2</i>	
10.	A-101 B14-6	MATA, X-302: <i>pXPR2::SUC2</i>	
11.	A-101 B10A-5	MATA, X-302: <i>pXPR2::SUC2</i>	
12.	A-101 B56-5	MATA, X-302: <i>pXPR2::SUC2</i>	
13.	A-101 B58-2	MATA, X-302: <i>pXPR2::SUC2</i>	
14.	A-101 B59-3	MATA, X-302: <i>pXPR2::SUC2</i>	
15.	A-101 B60-4	MATA, X-302: <i>pXPR2::SUC2</i>	
16.	A-101 B61-5	MATA, X-302: <i>pXPR2::SUC2</i>	
17.	A-101 B62-1	MATA, X-302: <i>pXPR2::SUC2</i>	Suc ⁻ Ura ⁺
18.	A-101 KLON 11	MATA	
19.	A-101 KLON 12	MATA, X-302: <i>pXPR2::SUC2</i>	Suc ⁺ Ura ⁺
20.	A-101 KLON 14	MATA, X-302: <i>pXPR2::SUC2</i>	
21.	A-101 KLON 17	MATA, X-302: <i>pXPR2::SUC2</i>	
22.	A-101 KLON 19	MATA <i>URA3</i>	
23.	A-101 KLON 26	MATA	
24.	A-101 KLON 29	MATA	
25.	A-101 KLON 34	MATA	
26.	A-101 KLON 35	MATA	
27.	A-101 KLON 38	MATA	
28.	A-101 KLON 41	MATA	

W celu indukcji promotora *XPR2* dodano do podłoża 0,1 lub 0,01% peptonu oraz w wybranych wariantach hodowli 50 mM bufor fosforanowy o pH 6,8. Uracyl ($20 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) dodawano w hodowli klonów niezdolnych do syntezy uracylu (fenotyp Ura⁻). Inokulum ($50 \mu\text{l}$) stanowiła 24-godz. hodowla wstrząsana drożdży, prowadzona w podłożu YPG, w temp. 28°C, standaryzowana w sterylnym płynie fizjologicznym do gęstości zawierającej około $4 \cdot 10^6$ komórek w mL. Gęstość wyznaczono z równania krzywej zależności OD₅₅₀ od ilości komórek obecnych w 1 ml. Komórki drożdży liczone w komorze Thoma, zliczając komórki w trzech preparatach mikrobiologicznych. Hodowlę prowadzono w temp. 25°C, przez 72–96 godz., przy ciągłym wstrząsaniu. Każdy wariant hodowli wykonano w trzech powtórzeniach. Kontrolę czystości stanowiło 300 μL podłoża bez inokulum. Zastosowanie programu BioLink umożliwiło śledzenie krzywych wzrostu w trakcie prowadzenia hodowli. Dla wybranych klonów i wariantów podłoża wyznaczono: maksymalny przyrost OD w czasie ($\Delta\text{OD}_{\text{max}}, \text{h}^{-1}$), plon biomasy (OD_{max}), czas trwania lag fazy (h) oraz czas wzrostu (h).

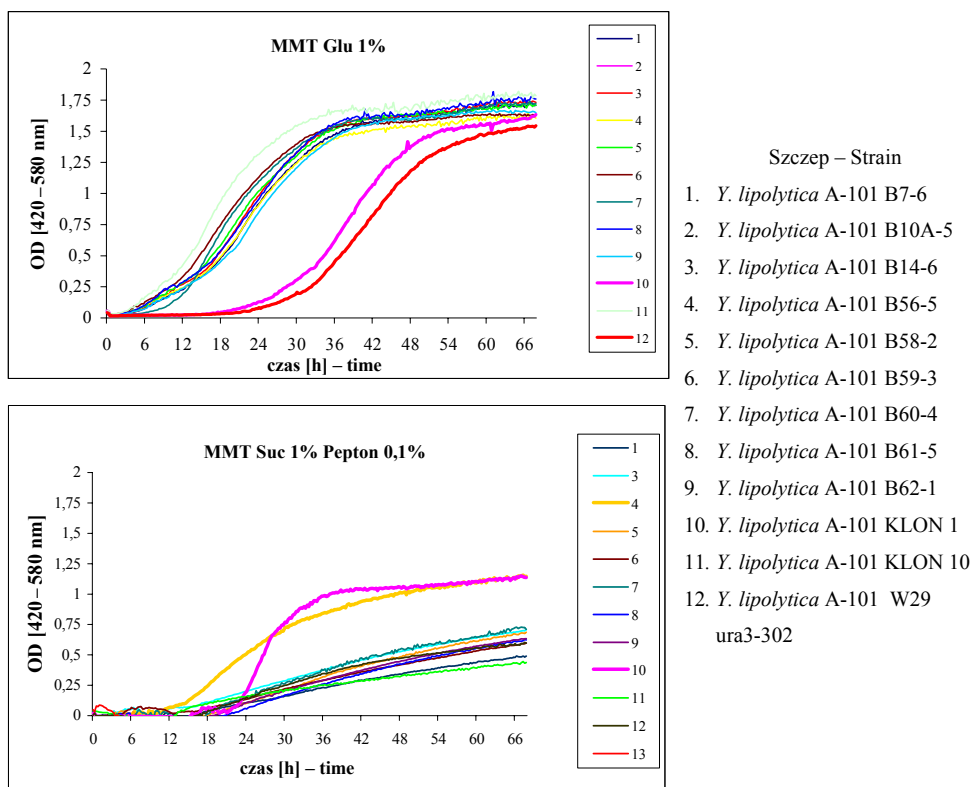
Oznaczenie glukozy, fruktozy i sacharozy. Cukry oznaczano metodą HPLC na kolumnie Animex HPX 87H połączonej z detektorem RI w temperaturze pokojowej. Szybkość przepływu fazy ciekłej (0,01N H₂SO₄) wynosiła $0,6 \text{ ml} \cdot \text{h}^{-1}$. Ubytek substratu (sacharozy) oraz przyrost i ubytek produktów (glukozy i fruktozy) obliczono z powierzchni piku, w odniesieniu do standardów [Rywińska 2008].

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Wszystkie badane klony o fenotypie Suc⁺Ura⁺ wykazywały zbliżone wartości plonu biomasy w mikrohodowli prowadzonej w podłożu MMT z 1% glukozy (rys. 1). Pewne zróżnicowanie widoczne było w długości trwania lag fazy poszczególnych szczepów. Najwyższy plon biomasy (1,78), przy najkrótszym czasie lag fazy (4 h) oraz maksymalnej szybkości wzrostu równej $0,091 \text{ h}^{-1}$ odnotowano dla genotypu transformanta KLON10. Najdłuższy czas lag fazy (~24 h) odnotowano dla szczepu referencyjnego W29ura3-302 oraz dla szczepu KLON1. Ten ostatni oraz B56-5 wyrastały najlepiej w podłożu MMT z 1% sacharozy i 0,1% peptonu, osiągając podobną ilość biomasy ($\text{OD} =$ odpowiednio 1,13 i 1,14), przy maksymalnym przyroście OD w czasie: $0,12 \text{ h}^{-1}$ i $0,057 \text{ h}^{-1}$ (rys. 1). Krzywe wzrostu pozostałych klonów miały przebieg liniowy, a maksymalny plon biomasy nie przekroczył 0,7 (OD). Szczep wyjściowy nie wyrastał w warunkach doświadczenia.

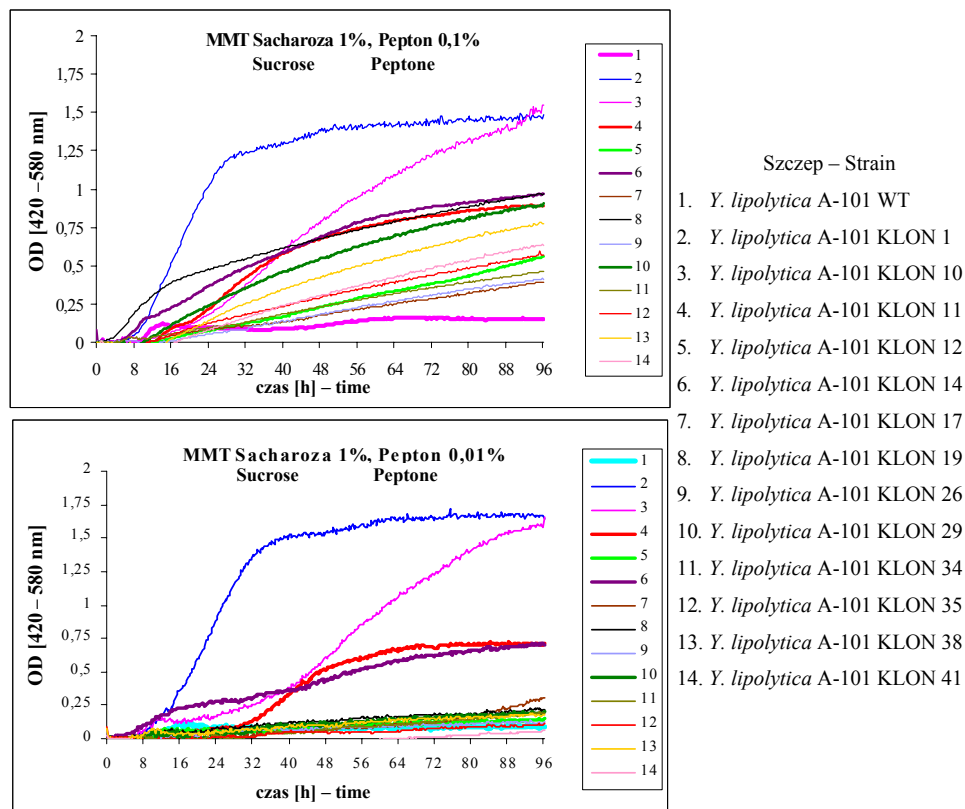
W odrębnym doświadczeniu stwierdzono, że poszczególne klony o fenotypie Suc⁺Ura⁺ w zróżnicowany sposób wyrastają w podłożu MMT z 1% sacharozy i 0,1% peptonu (rys. 2). Oceniano wzrost szczepu wyjściowego oraz 13 klonów. Krzywe sporządzone dla większości transformantów, a zwłaszcza dla KLON10, obrazują liniowy wzrost drożdży i wskazują jednocześnie na zróżnicowany metabolizm szczepów. Tym razem najwyższy plon biomasy odnotowano dla KLON1 i KLON10. Wynosił on 1,48 i 1,55 wartości OD, przy maksymalnym przyroście w czasie $0,11 \text{ h}^{-1}$ i $0,06 \text{ h}^{-1}$, odpowiednio dla pierwszego i drugiego z opisywanych klonów. Wartość maksymalnej szybkości wzrostu szczepu KLON1, wyznaczona w dwóch doświadczeniach była podobna ($0,12 \text{ h}^{-1}$ oraz $0,11 \text{ h}^{-1}$). Niemniej szybkość wzrostu transformantów była ponad dwukrotnie niższa niż wartość wyznaczona przez Robak [2007] dla szczepu wyjściowego (dzikiego)

A-101 i jego mutantów octanowych wyrastających w podłożu MMT z glukozą. Szczep dziki (A-101) oraz mutanty octanowe w zróżnicowany sposób wyrastały także w podłożu z glicerolem, octanem sodu, etanolem. Zatem nieukierunkowane zmiany w genomie, czyli mutacje spowodowane naświetlaniem w UV, prowadzą do pozyskania szczepów o zróżnicowanych właściwościach metabolicznych. Możliwe jest, że obserwowane różnice we wzroście pozyskanych klonów o fenotypie Suc^+ , uzyskanych po transformacji jednego szczepu wyjściowego tą samą sekwencją, mogły być spowodowane integracją kasety w odmienne miejsca genomu. Może to być związane z wpływem „sąsiedztwa” różnych sekwencji na regulację ekspresji genu inwertazy lub obecnością dwóch kopii wprowadzonego genu *SUC2* potwierdzoną w badaniach dla B56-5 (wyniki przygotowywane do druku). Efektem tego może być zróżnicowana indukcja promotora *XPR2* u różnych szczepów. Bez peptonu klony *Y. lipolytica* z genem inwertazy nie są zdolne do wzrostu w podłożu z sacharozą. Indukcję peptonem promotora *XPR2* odnotowali już w 1989 roku Nicaud i in., a potwierdzili Blanchin-Roland i in. [1994] oraz Madzak i in. [2000], wykazując jednocześnie wpływ pH na regulację jego ekspresji.



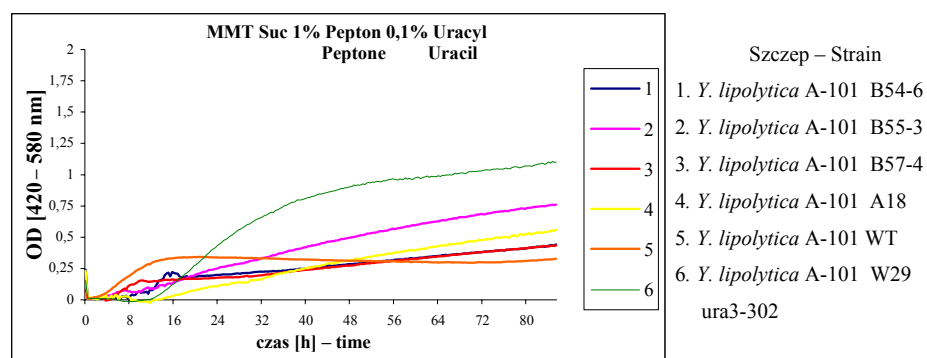
Rys. 1. Wzrost klonów o fenotypie Suc^+Ura^+ na podłożu MMT z 1% glukozy oraz z 1% sacharozy i 0,1% peptonu

Fig. 1. Suc^+Ura^+ clones growth on MMT medium with 1% glucose and 1% sucrose and 0,1% peptone



Rys. 2. Wzrost wybranych szczepów o fenotypie Suc^+Ura^+ na podłożu MMT z 1% sacharozy oraz 0,1 lub 0,01% peptonu

Fig. 2. Growth of Suc^+Ura^+ selected strains on MMT medium with 1% sucrose and 0,1 or 0,01% peptone



Rys. 3. Wzrost klonów o fenotypie Suc^+Ura^- na podłożu MMT z 0,1% peptonu, 1% sacharozy i uracylem

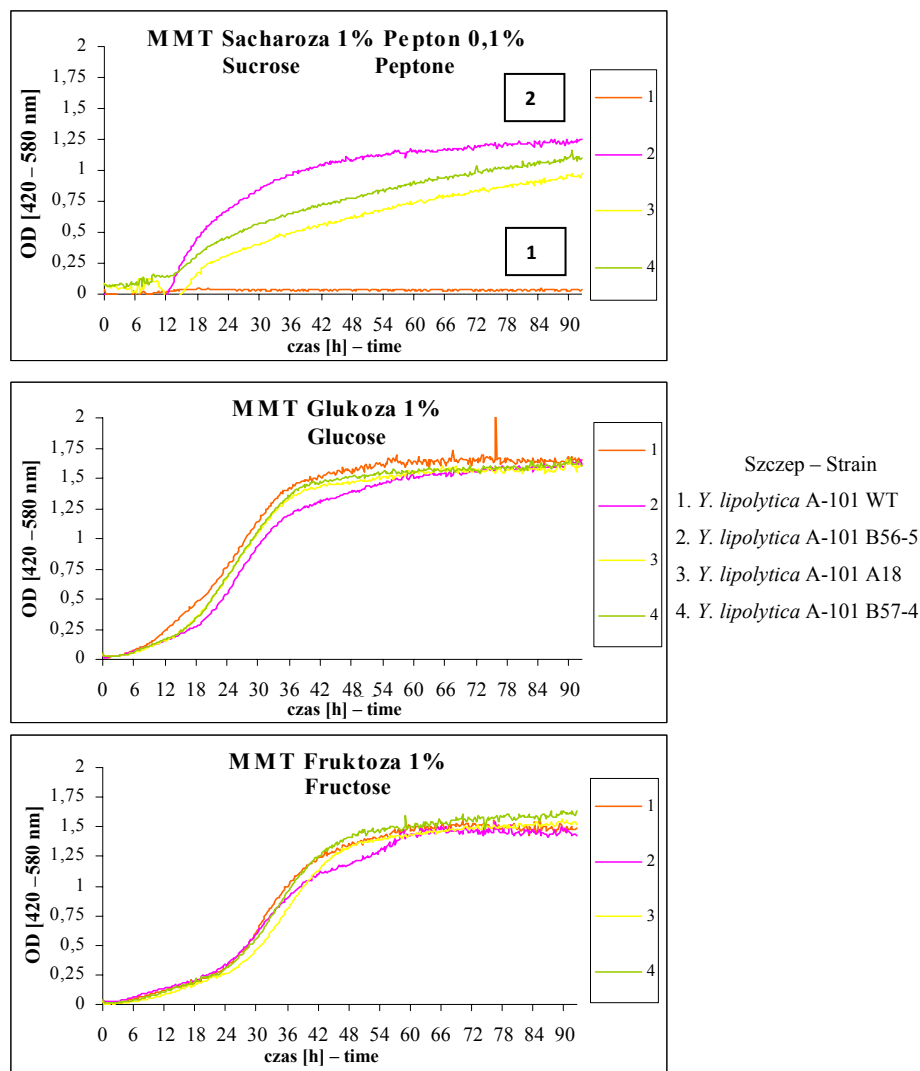
Fig. 3. Growth of Suc^+Ura^- strains on MMT medium with 0,1% peptone, 1% sucrose and uracil

Wadą stosowania tego promotora w produkcji białka prowadzonej na skalę przemysłową jest konieczność regulacji jego aktywności, wymagająca obecności peptonu lub utrzymania odpowiedniego pH środowiska. Dlatego dąży się do pozyskania klonów, u których już minimalna dawka peptonu warunkuje aktywność promotora. W przypadku badanych transformantów zastosowano dwie dawki peptonu: 0,01 i 0,1%. Z danych przedstawionych na rysunku 2 wynika, że przy dawce 0,1% wyrastają wszystkie klony, a niektórym do wzrostu z sacharozy wystarcza już 0,01% peptonu. Zatem dla pozyskanych klonów wystarczająca dawka induktora jest od 1,7 do 50 razy mniejsza, niż dawka odnotowana przez innych badaczy [Nicaud i in. 1989, Förster i in. 2007]. W niezależnych badaniach stwierdzili oni, że niezbędna dawka peptonu, warunkująca ekspresję inwertazy wynosi od 0,17 do 0,5%. W warunkach doświadczenia przy 0,01% dodatku peptonu dobrze wyrastały dwa transformanty: KLON1 i KLON10. Wysoki był plon biomasy (odpowiednio 1,69 i 1,65 OD) i zadowalający przyrost OD w czasie (odpowiednio 0,11 i 0,094 h⁻¹) (rys. 2). Czas trwania lag fazy dla KLON1 był taki sam jak w hodowli z 0,1% peptonu, a dla KLON10 był krótszy o ponad 3 godziny. Wydaje się więc, że promotor *XPR2* u tych dwóch klonów jest w inny sposób regulowany niż u pozostałych transformantów, które przy 0,01% peptonu nie były zdolne do wzrostu z sacharozy. Prawdopodobnie indukcja samego promotora u tych klonów jest głównie wynikiem działania pH, a mniej peptonu. Podobne spostrzeżenia odnotowali Förster i in. [2007].

W kolejnym doświadczeniu analizowano wzrost w podłożu MMT z 1% sacharozy i 0,1% peptonu klonów o fenotypie Suc⁺Ura⁻. Wyrastały one słabiej z sacharozy niż klony o fenotypie Suc⁺Ura⁺ (rys. 3). Najwyższy plon biomasy, równy 1,09 OD, przy średnim maksymalnym przyroście OD 0,054 h⁻¹, stwierdzono dla szczepu referencyjnego W29ura3-302. Spośród pozyskanych transformantów najwyższy plon biomasy (OD 0,751), największy maksymalny przyrost OD w czasie (0,072 h⁻¹) i najkrótszy okres lag fazy (4 h) odnotowano dla klonu B55-3. Pozostałe klony wyrastały słabiej i nie osiągnęły stacjonarnej fazy wzrostu.

Kolejną mikrohodowlę prowadzono dla szczepu wyjściowego, klonów o fenotypie Suc⁺Ura⁺ (B56-5) oraz Suc⁺Ura⁻ (A18 oraz B57-4). Jako źródło węgla zastosowano 1% sacharozy, 1% fruktozy lub 1% glukozy. Jednolity wzrost klonów odnotowano na podłożu z 1% glukozy oraz 1% fruktozy (rys. 4). Szczep wyjściowy (dziki) oraz B57-4 wyrastały najlepiej z glukozy, osiągając plon biomasy (OD) 1,67 i 1,64. Dla pozostałych klonów wartość ta była minimalnie niższa. Dla wszystkich szczepów oraz rodzica można zaobserwować, że wzrost logarytmiczny transformantów trwał 12–24 godzin hodowli na glukozie i 18–30 h hodowli na fruktozie, co świadczy o tym, że przeprowadzone modyfikacje nie wpłynęły na szybkość wykorzystania glukozy i fruktozy. Natomiast przeprowadzona analiza ponownie wykazała zróżnicowaną zdolność wybranych klonów do hydrolizy sacharozy (rys. 4). Szczep B56-5 osiągał największy plon biomasy oraz wykazywał największy przyrost OD w czasie.

W badaniach z wykorzystaniem promotora *XPR2* warunkiem jego indukcji jest dodatek peptonu oraz utrzymanie pH 6,8 hodowli np. przez dozowanie 2,5–10 N NaOH. Dlatego w następnym cyklu mikrohodowli analizowano wpływ buforu fosforanowego pH 6,8 na plon biomasy, szybkość przyrostu OD oraz długość lag fazy szczepu wyjściowego i trzech klonów o fenotypie Suc⁺Ura⁺: KLON1, B56-5 oraz B60-4.

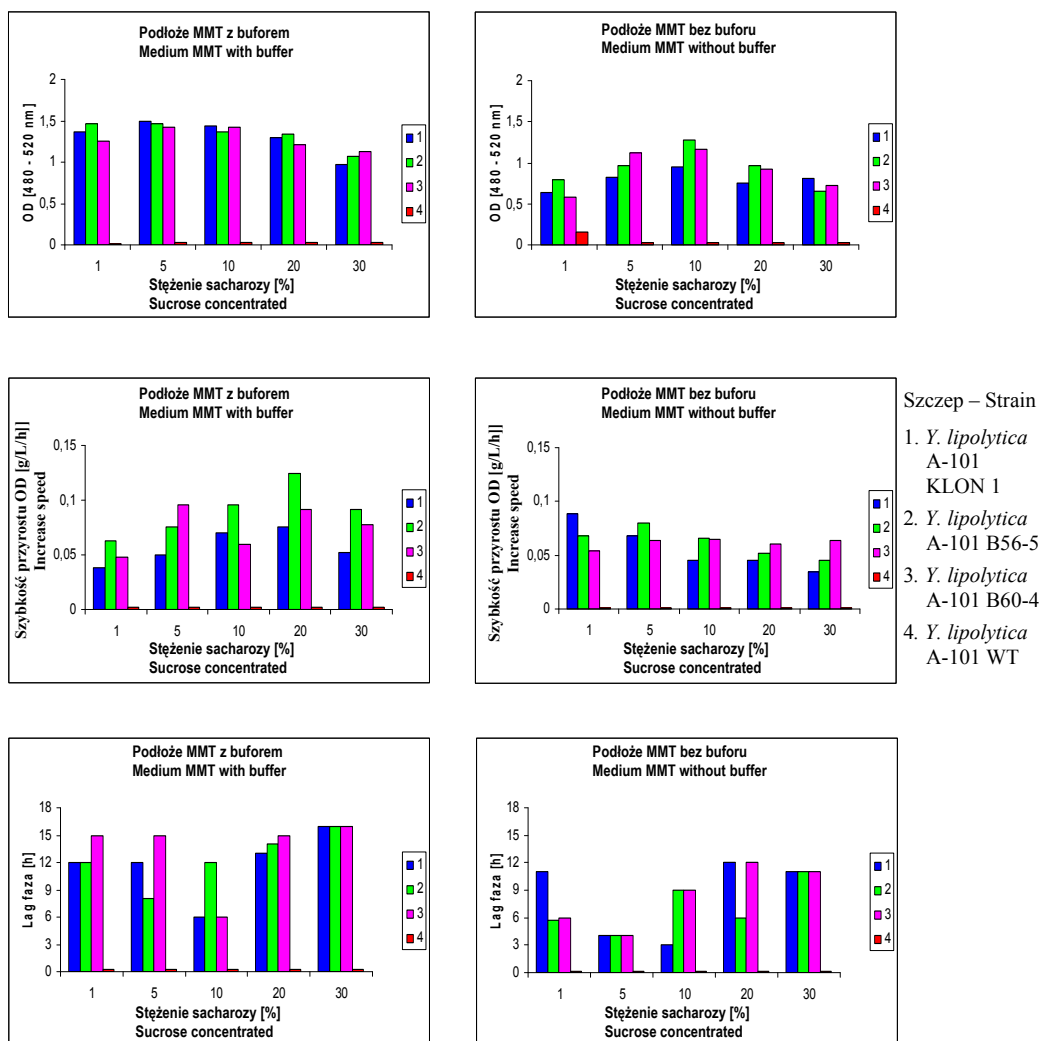


Rys. 4. Wzrost wybranych klonów na podłożach MMT z 1% sacharozy i 0,1% peptonu; 1% glukozy oraz 1% fruktozy

Fig. 4. Growth of selected strains on MMT medium with 1% sucrose and 0,1% peptone; 1% glucose and 1% fructose

Zastosowano podłoże MMT z sacharozą w ilości od 1 do 30%, z 0,1% dodatkiem peptonu oraz buforem fosforanowym pH 6,8. Obecność buforu pozytywnie wpłynęła na plon biomasy uzyskanej w podłożu z różnymi dawkami sacharozy. Wszystkie klony wyrastały lepiej w zbuforowanym podłożu (rys. 5). Nie odnotowano znacznych zmian we wzroście w podłożu zawierającym od 1 do 10% sacharozy, a największy plon biomasy (OD = 1,493) uzyskano dla KLON1 w podłożu z 5% sacharozy. Dopiero przy 20 i 30% dawce źródła węgla obserwowano niższy wzrost klonów. W podłożu bez dodatku buforu fosforanowego pH 6,8 najwyższy plon biomasy (OD = 1,281) uzyskano dla

B56-5 w podłożu z 10% sacharozy, w którym także pozostałe szczepy wyrastały najlepiej. Największy wpływ obecności buforu na plon biomasy dla wszystkich klonów odnotowano w podłożu z 1 i 5% sacharozy. Odnotowano aż 0,7 punktu różnicy OD. Natomiast jednocześnie ze wzrostem stężenia sacharozy malał wpływ buforu na plon biomasy. Prawdopodobnie zastosowany układ buforowy był za słaby w stosunku do ilości wydzielanego kwasu cytrynowego i obserwowano zahamowanie wzrostu drożdży. Drożdże te są znane z biosyntezy cytrynianu, znacznie zakwaszającego podłoże [Wojtatowicz i in. 1997].



Rys. 5. Wzrost klonów o fenotypie Suc⁺Ura⁺ na podłożu MMT z 1–30% sacharozy, 0,1% peptonu oraz buforem fosforanowym o pH 6,8

Fig. 5. Growth of Suc⁺Ura⁺ strains on MMT medium with 1–30% sucrose, 0,1% peptone and phosphate buffer pH 6,8

Stwierdzono pozytywny wpływ obecności buforu fosforanowego o pH 6,8 na szybkość wzrostu i to bez względu na stężenie sacharozy w podłożu. W zbuforowanym podłożu MMT szybkość przyrostu OD dla KLON1 i B56-5 rosła wraz z gradacją stężenia sacharozy, osiągając maksymalną wartość w podłożu z 20% sacharozy (odpowiednio 0,076 i 0,124 h⁻¹) (rys. 5). Dla szczepu B60-4 maksymalną szybkość przyrostu OD odnotowano w podłożu z 5% sacharozy (0,096 h⁻¹). W przypadku drożdży hodowanych w podłożu bez buforu fosforanowego, maksymalne szybkości przyrostu OD były mniejsze i to bez względu na stężenie źródła węgla. Najwyższe wartości przyrostu OD (0,088 i 0,08 h⁻¹) odnotowano przy 1 i 5% sacharozy, odpowiednio dla KLON1 oraz B56-5.

Dodatek buforu miał także wpływ na długość trwania lag fazy klonów. Obecność buforu fosforanowego spowodowała wydłużenie lag fazy dla wszystkich klonów (rys. 5). Jedynie klon B60-4 w podłożu z 10% sacharozy miał krótszy czas lag fazy niż w podłożu bez buforu. W podłożu MMT bez dodatku buforu czas lag fazy był zdecydowanie krótszy, a wzrost stężenia sacharozy powodował jego wydłużenie do 10–12 godzin. Największe różnice w czasie trwania lag fazy (8–11 h), ze względu na obecność lub brak buforu obserwowano w podłożu z 5 i 20% sacharozy.

WNIOSKI

1. Transformanty drożdży *Yarrowia lipolytica* A-101 o fenotypie Suc⁺Ura⁺ oraz Suc⁺Ura⁻ w różny sposób wyrastały z sacharozy. Wynika to prawdopodobnie z integracji ekspresyjnej kasyety drożdżowej w różne miejsca genomu oraz odmiennej indukcji promotora *XPR2*.

2. Dwa klony o fenotypie Suc⁺Ura⁺ wyrastały z sacharozy, przy nie opisanej dotąd bardzo niskiej dawce peptonu (0,01%). Dla pozostałych klonów niezbędne było stosowanie dziesięciokrotnie większej dawki induktora.

3. Stwierdzono także, że w zbuforowanym środowisku (pH 6,8) komórki intensywnie się dzieliły, nie osiągając stacjonarnej fazy wzrostu.

4. Badane klony nie różniły się we wzroście z glukozy oraz fruktozy. Wprowadzone modyfikacje genetyczne nie wpłynęły na komórkowy metabolizm tych źródeł węgla.

PIŚMIENNICTWO

- Blanchin-Roland S., Cordero Otero R.R., Gaillardin C., 1994. Two upstream activating sequence control the expression of the *XPR2* Gene in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Mol. Cell Biol.*, 14 (1): 327–338.
- Förster A., Aurich A., Mauersberger S., Barth G., 2007a. Citric acid production from sucrose using a recombinant strain of the *Yarrowia lipolytica*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 75 (6): 1409–1417.
- Gellissen G., Kunze G., Gaillardin C., Cregg J.M., Berardi E., Veenhuis M., van der Klei I., 2005. New yeast expression platforms based on methylotrophic *Hansenula polymorpha* and *Pichia pastoris* and on dimorphic *Arxula adenivorans* and *Yarrowia lipolytica* – A comparison. *FEMS Yeast Res.*, 5: 1079–1096.

- Hamsa P.V., Chattoo B.B., 1994. Cloning and growth-regulated expression of the gene encoding the hepatitis B virus middle surface antigen in *Yarrowia lipolytica*. *Gene*, 143: 165–170.
- Juretzek T., Le Dall M.T., Mauersberger S., Gaillardin C., Barth G., Nicaud J.M., 2001. Vectors for gene expression and amplification in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Yeast*, 30, 18(2): 97–113.
- Madzak C., Nicaud J.M., Gaillardin C., 2005. *Yarrowia lipolytica*, [in:] Gellissen G., (Ed), Production of recombinant proteins. Novel Microbial and Eukaryotic Expression System. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KgaA.
- Madzak C., Treton B., Blanchin-Roland S., 2000. Strong hybrid promoters and integrative expression/secretion vectors for quasi-constitutive expression of heterologous proteins in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 2(2): 207–216.
- Nicaud J.M., Fabre E., Gaillardin C., 1989. Expression of invertase activity in *Yarrowia lipolytica* and its use as a selective marker. *Curr. Genet.*, 16 (4): 253–260.
- Nicaud J.M., Madzak C., van der Broek P., Gysler C., Duboc P., Niederberger P., Gaillardin C., 2002. Protein expression and secretion in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *FEMS Yeast Res.*, 2: 371–379.
- Park C.S., Chang C.C., Kim J.Y., Ogrzydziak D.M., Ryu D.Y., 1997. Expression, secretion, and processing of rice α -Amylase in the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J. Biol. Chem.*, 272: 6876–6881.
- Robak M., 2007. *Yarrowia lipolytica* specific growth rate on acetate medium supplemented with glucose, glycerol, ethanol. *Acta Sci. Pol., Biotechnol.*, 6(1): 23–31.
- Robak M., Walczak E., 2009. Niekonwencjonalne drożdże w produkcji heterologicznych białek, *Biotechnologia*, 49(87): 46–65.
- Rywińska A., 2008. Wykorzystanie glicerolu odpadowego do biosyntezy kwasu cytrynowego przez *Yarrowia lipolytica* Wratislavia AWG7. *Acta Sci. Pol., Biotechnol.* 7(4): 13–22.
- Walczak E., Robak M., Mauersberger S., 2007a. Transformacja szczepu niekonwencjonalnych drożdży *Yarrowia lipolytica*. III Krajowy Kongres Biotechnologii, 09–12 września 2007a, Poznań.
- Walczak E., Robak M., Mauersberger S., 2007b. Gene disruption, transformants selection and physiologic properties of *Yarrowia lipolytica* A101 clones. 8th International Symposium on Biocatalysis and Biotransformations –BIOTRANS 2007. 08–13.07.2007b, Oviedo, Hiszpania.
- Watson J.D., Baker T.A., Bell S.P., Gann A., Levine M., Losick R., 2008. Molecular biology of the gene (6th Edition). Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Wojtatowicz M., Rymowicz W., Robak M., Żarowska B., Nicaud J.M., 1997. Kinetics of cell growth and citric acid production by *Yarrowia lipolytica* Suc⁺ transformants in sucrose media. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 6/47: 4, 49–54.

GROWTH ON SUCROSE OF *YARROWIA LIPOLYTICA* YEASTS CLONES WITH INVERTASE GENE FROM *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Abstract. The aim of the study was to evaluate the growth of potential heterologous proteins producers: Suc⁺ clones of *Yarrowia lipolytica* A-101. Growth of 26 transformants, parental strain (wild) and reference strain W29ura3-302 was studied. Transformants showed differences in the ability of growth on sucrose (biomass, lag time duration, beginning of stationary phase). Beside the type of transformation, no differences in yeasts growth were observed on glucose and fructose.

Influence of pH (6,8) and peptone addition (0,01 and 1%) on *XPR2* promoter induction was analyzed. Both inducers were effective, allowing yeasts growth on sucrose. Growth of two transformants: KLON1 and KLON10 on sucrose was abundant, even with minimal peptone dose (0,01%). Stabilization of pH at 6,8 in the first hours of yeasts growth had a positive effect on culture. Clones grew better with buffer in the medium with 30 % sucrose, a substrate concentration which has induced longer lag phase.

Key words: *Yarrowia lipolytica*, Suc⁺Ura⁺, Suc⁺Ura⁻, sucrose, *XPR2*, Bioscreen C

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 15.12.2009

Do cytowania – For citation: Walczak E., Robak M., 2009. Wzrost z sacharozy klonów drożdży *Yarrowia lipolytica* z genem inwertazy z *Saccharomyces cerevisiae*. Acta Sci. Pol. Biotechnol. 8(4), 25–36.

SPIS TREŚCI CONTENTS

Marek Kramarz, Karol Kramarz

- Naukowe, ekonomiczne i społeczno-prawne uwarunkowania produkcji i sprzedaży żywności genetycznie modyfikowanej w Polsce 5
The scientific, economic and socially-legal production and sale conditions of genetically modified food in Poland

Marek Szoltysik, Marta Pokora, Emilia Sławska, Joanna Niedbalska, Anna Dąbrowska, Xymena Polomska, Maria Wojtatowicz, Józefa Chrzanowska

- Pośrednie wykorzystanie drożdży *Yarrowia lipolytica* do poprawy cech sensorycznych serów niskotłuszczowych 13
Indirect application of yeast *Yarrowia lipolytica* for improving of sensory parameters of low fat cheeses

Ewa Walczak, Małgorzata Robak

- Wzrost z sacharozy klonów drożdży *Yarrowia lipolytica* z genem inwertazy z *Saccharomyces cerevisiae* 25
Growth on sucrose of *Yarrowia lipolytica* yeasts clones with invertase gene from *Saccharomyces cerevisiae*