

KATARZYNA RAJKOWSKA, ALINA KUNICKA

## ANALIZA PROFILI FERMENTACYJNYCH I CECH GENOTYPOWYCH MEZOFILNYCH SZCZEPÓW DROŹDŹY WINIARSKICH

### Streszczenie

Celem badań było określenie aktywności fermentacyjnej oraz analiza cech genotypowych mezofilnych szczepów drożdży winiarskich gatunków *Saccharomyces cerevisiae* i *Saccharomyces bayanus*. Drożdże charakteryzowały się zróżnicowaną aktywnością fermentacyjną. Statystycznie istotne różnice dotyczyły wydajności produkcji etanolu i glicerolu, zawartości dwutlenku siarki oraz wykorzystania cukrów. Parametry win, zgodne z wymaganiami normatywnymi, świadczyły o wysokiej przydatności technologicznej badanych szczepów. Drożdże cechowały się zdolnością wydajnej biodegradacji kwasu L-jabłkowego w warunkach beztlenowych, zmniejszając jego zawartość o 65,6–68,4%. Testowane szczepy wykazywały polimorfizm genomowego DNA, a profile elektroforetyczne chromosomalnego i mitochondrialnego DNA różniły się liczbą, położeniem oraz intensywnością prążków. Jednoznaczne rozróżnienie szczepów możliwe było na podstawie analizy genetycznej z równoczesnym zastosowaniem dwóch technik biologii molekularnej: kariotypowania oraz analizy restrykcyjnej mtDNA. Zawartość DNA w komórkach drożdży wyznaczona metodą cytometrii przepływowej wskazywała na ich diploidalność bądź aneuploidalność. Różnice cech fizjologicznych i genetycznych dowodziły wyraźnej odmienności drożdży, nie pozwoliły jednak na jednoznaczne taksonomiczne zakwalifikowanie szczepów do gatunków *S. cerevisiae* i *S. bayanus*, co może wskazywać na hybrydyzację drożdży w obrębie rodzaju *Saccharomyces* w środowisku naturalnym.

**Słowa kluczowe:** drożdże winiarskie, aktywność fermentacyjna, kariotypowanie, analiza restrykcyjna mtDNA, cytometria przepływowa

### Wprowadzenie

Stosowana w technologii winiarskiej inokulacja moszczów czystymi kulturami wyselekcjonowanych ras drożdży prowadzi do uzyskania win o zdefiniowanych walorach sensorycznych. Starterowe kultury drożdży powinny charakteryzować się zdolnością wydajnego prowadzenia procesu fermentacji alkoholowej oraz wytwarzania ubocznych produktów korzystnie wpływających na jakość wina [21, 28]. W polskim winiarstwie jednym z istotnych problemów jest wysoka kwasowość moszczów i win owocowych, spowodowana m.in. nadmiarem kwasu jabłkowego w surowcu [11, 28]. Uzyskanie produktu o odpowiednich walorach smakowych wymaga zmniejszenia

zawartości tego kwasu, zatem szczepy przemysłowe powinny dodatkowo charakteryzować się zdolnością biodegradacji kwasu L-jabłkowego. Ze względu na zróżnicowanie cech drożdży winiarskich, właściwy dobór ras produkcyjnych zależy od przeprowadzenia dokładnej charakterystyki cech fizjologicznych i genetycznych szczepu. Identyfikacja drożdży klasycznymi metodami mikrobiologicznymi związana jest z ograniczeniami wynikającymi z braku genetycznej jednolitości i stabilności szczepów przemysłowych [1, 2, 15, 27]. Z tego powodu w klasyfikacji drożdży coraz powszechniej stosowane są techniki badania polimorfizmu DNA (analiza restrykcyjna mtDNA, kariotypowanie) [3, 4, 14, 22, 25]. Techniki te oraz badanie ploidalności ras przemysłowych umożliwiają identyfikację szczepów i prognozowanie ich stabilności.

Celem przeprowadzonych badań była analiza cech genotypowych mezofilnych szczepów drożdży winiarskich, ocena aktywności fermentacyjnej oraz zdolności tych szczepów do biodegradacji kwasu L-jabłkowego.

## **Materiał i metody badań**

### *Materiał biologiczny*

Materiał biologiczny stanowiły cztery szczepy drożdży gatunku *Saccharomyces cerevisiae*: Syrena, W-13, Y.00911, Y.00925; szczep gatunku *Saccharomyces bayanus* Cz-2; oraz haploidalne szczepy markerowe: Cm a, Gm  $\alpha$ .

Szczepy: Syrena, W-13, Cz-2 pochodziły z Kolekcji Czystych Kultur Instytutu Technologii Fermentacji i Mikrobiologii Politechniki Łódzkiej ŁOCK105. Szczepy: Y.00911 oraz Y.00925 pochodziły z National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms University of Horticulture and Food Science w Budapeszcie, a szczepy markerowe Cm a i Gm  $\alpha$  – z Kolekcji Instytutu Nauk Rolniczych w Zamościu.

### *Analiza win*

Aktywność fermentacyjną szczepów badano w wystandaryzowanym moszczu jabłkowym, zawierającym 6,94 g x dm<sup>-3</sup> kwasu L-jabłkowego oraz 192 g x dm<sup>-3</sup> sacharozy. Nie stosowano związków siarki do konserwacji moszczu. Inokulum 48-godzinnej hodowli drożdży w moszczu jabłkowym stanowiło 5% objętościowych nastawu. Próby fermentacyjne inkubowano w temp. 25°C, a za moment zakończenia procesu uznano ustabilizowanie masy prób. Próby prowadzono w trzech równoległych powtórzeniach. Kwasowość ogólną wina, zawartość cukrów i dwutlenku siarki oznaczano zgodnie z Polską Normą [17-20]. Do oznaczenia poziomu etanolu oraz wybranych ubocznych produktów fermentacji: kwasu mlekowego, bursztynowego, octowego i glicerolu zastosowano wysokosprawną chromatografię cieczową HPLC [8]. Zawartość kwasu L-jabłkowego w nastawie i winie określono metodą enzymatyczną (testy Test-Combination L-Malic acid, Boehringer Mannheim) [7].

### *Analiza chromosomalnego DNA*

Izolację jądrowego DNA przeprowadzono za pomocą zestawu preparacyjnego CHEF Genomic DNA Plug Kit (Bio-Rad) według metodologii referencyjnej [24]. Chromosomy rozdzielono metodą elektroforezy pulsacyjnej PFGE przy użyciu aparatu CHEF-DR II (Bio-Rad) w 0,8% żelu agarozowym. Elektroforezę prowadzono w buforze 0,5 x TBE schłodzonym do temp. 10°C, w ciągu 28 godz., przy napięciu 6 V/cm i liniowo wzrastającym czasie trwania pulsu od 110 do 220 s. Po rozdziale żel wybarwiono w roztworze bromku etydyny (0,5 µg/ml).

### *Analiza mitochondrialnego DNA*

Izolację całkowitego DNA komórkowego oraz analizę restrykcyjną mitochondrialnego DNA prowadzono wg metody Querol i wsp. [22]. Do trawienia mtDNA zastosowano enzym restrykcyjny *Hinf*I (Roche Diagnostic), a rozdział prowadzono w 0,7% żelu agarozowym, w buforze 0,5 x TBE, przy napięciu 60 V, w ciągu 5 godz.

### *Oznaczenie ploidalności szczepów*

Zawartość DNA wyznaczano w komórkach wybarwionych jodkiem propidyny przy użyciu cytometru przepływowego Becton-Dickinson FACSCalibur, wyposażonego w 15 mW laser argonowy (488 nm) [13]. Oznaczenie przeprowadzono w trzech niezależnych powtórzeniach, a do analizy danych zastosowano program WinMDI 2.8.

### *Statystyczne opracowanie wyników*

Do testowania statystycznej istotności różnic pomiędzy średnimi wartościami parametrów chemicznych win zastosowano test Newmana-Keulsa ( $p < 0,05$ ), używając programu Statistica wersja 5.5.

## **Wyniki i dyskusja**

Stosowane w badaniach przemysłowe rasy drożdży zostały wyselekcjonowane jako przydatne do fermentacji środowisk modelowych o podwyższonej zawartości kwasu jabłkowego. W prezentowanych badaniach sprawdzono ich aktywność fermentacyjną w moszczu jabłkowym o nieregulowanej kwasowości, zawierającym  $6,94 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$  kwasu L-jabłkowego. Parametry chemiczne uzyskanych win wskazują na znaczące zróżnicowanie międzyszczepowe badanych drożdży (tab. 1).

Stwierdzono statystycznie istotne różnice zawartości etanolu w wytworzonych winach, co związane było z wyraźnie odmienną dynamiką wykorzystania cukrów podczas fermentacji (dane niepublikowane).

Poziom dwutlenku siarki był niski i nie przekraczał  $17,9 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ , chociaż obserwowano wyraźne zróżnicowanie zależnie od szczepu drożdży. Ocena statystyczna poziomu  $\text{SO}_2$  nie wykazała różnic jedynie pomiędzy szczepami Y.00911 i

Y.00925. Pomimo nieobowiązywania Polskich Norm, oznaczone parametry były zgodne z podanymi w PN dla win owocowych [16].

Tabela 1

Wyniki analizy chemicznej win.

Results of the chemical analysis of wine types.

Drożdże Yeast	Etanol Ethanol	Glicerol Glycerol	Ekstrakt bezcukrowy Sugar-free extract	Cukry redukujące Reducing sugars	SO <sub>2</sub> ogółem Total SO <sub>2</sub>	SO <sub>2</sub> wolny Free SO <sub>2</sub>
	[% obj.]		[g x dm <sup>-3</sup> ]		[mg x dm <sup>-3</sup> ]	
Syrena	14,76 ± 0,01	6,69 ± 0,05	27,03 ± 0,89	13,16 ± 0,96	17,2 ± 0,1	11,2 ± 0,1
W-13	13,97 ± 0,65	7,19 ± 0,22	19,07 ± 0,94	15,58 ± 0,60	10,6 ± 0,2	6,7 ± 0,2
Y.00911	10,72 ± 0,65	4,71 ± 0,04	31,27 ± 0,34	27,70 ± 0,30	8,9 ± 0,1	4,5 ± 0,6
Y.00925	13,07 ± 0,11	4,78 ± 0,01	26,35 ± 0,65	24,17 ± 0,27	8,3 ± 0,0	4,8 ± 0,1
Cz-2	15,73 ± 0,15	5,65 ± 0,01	17,34 ± 0,69	1,66 ± 0,39	17,9 ± 0,0	10,2 ± 0,0

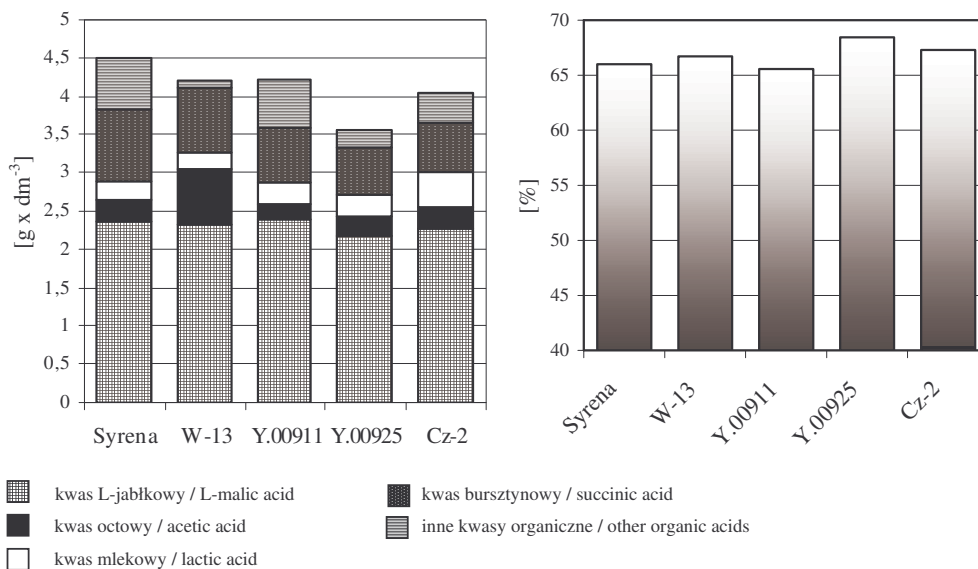
Kwasowość ogólna win różniła się w zależności od stosowanego szczepu (rys. 1a). Spośród oznaczonych kwasów organicznych – jabłkowego, octowego, mlekowego i bursztynowego – największy udział w kwasowości ogólnej miał kwas jabłkowy. Stwierdzono brak statystycznie istotnych różnic pomiędzy szczepami *S. cerevisiae* Y.00925 i *S. bayanus* Cz-2 pod względem poziomu produkcji kwasu bursztynowego oraz pomiędzy drożdżami *S. cerevisiae*: Syrena, Y.00911, Y.00925 w tworzeniu kwasu mlekowego. Po fermentacji przy udziale szczepu W-13 obserwowano trzykrotnie wyższy poziom kwasu octowego niż przy użyciu pozostałych drożdży.

Obniżenie kwasowości środowiska po fermentacji było głównie wynikiem rozkładu kwasu jabłkowego. Drożdże fermentowały od 65,6 do 68,4% L-jabłczanu (rys. 1b). Testowane szczepy charakteryzowały się wysoką zdolnością biodegradacji kwasu L-jabłkowego w porównaniu z danymi literaturowymi [26]. Zwykle biologiczny rozkład kwasu L-jabłkowego przez drożdże winiarskie z rodzaju *Saccharomyces* jest niecałkowity i zależnie od szczepu wynosi od 5 do 48% [26]. Jednocześnie badane przez nas szczepy produkowały kwas mlekowy na niskim poziomie, nie przekraczającym 0,46 g x dm<sup>-3</sup>, podczas gdy niektóre rasy drożdży z gatunku *S. cerevisiae* zdolne są wytwarzać kwas mlekowy w ilościach dochodzących do 5 g x dm<sup>-3</sup> [28].

Na jakość wina silny wpływ wywiera kwas octowy, którego optymalna zawartość w winie powinna wynosić pomiędzy 0,2 a 0,7 g x dm<sup>-3</sup> [12]. Ilość kwasu octowego w analizowanych winach zawierała się w podanych granicach, przy czym – zgodnie z podziałem wprowadzonym przez Delfini i Cervetti [6] – szczep W-13 wytwarzał kwas octowy na wysokim poziomie, a pozostałe szczepy produkowały niewielkie jego ilości.

a.

b.



Rys. 1a. Udział kwasów organicznych w ogólnej kwasowości win.

Fig. 1a. Content of organic acids and their effect on the overall wine acidity.

Rys. 1 b. Wykorzystanie kwasu L-jabłkowego po fermentacji moszczu jabłkowego.

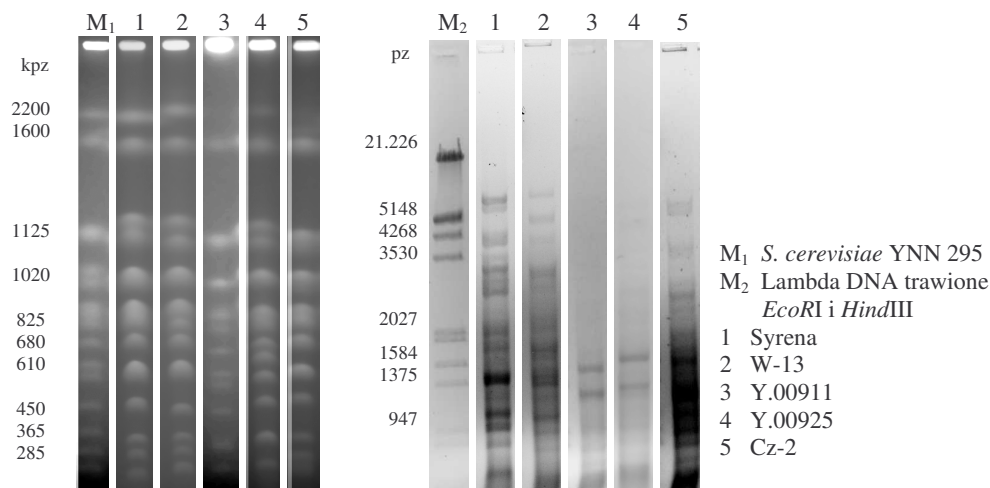
Fig. 1b. Utilization of L-malic acid after the apple must fermentation performed.

Dodatkowo, na sensoryczną jakość wina wpływa glicerol, który już w stężeniu  $5,2 \text{ g x dm}^{-3}$  nadaje winu wrażenie lekkiej słodyczy [23]. Zawartość glicerolu w winach wytworzonych przez badane drożdże, poza szczepami Y.00911 i Y.00925, przekraczała graniczne stężenie, korzystnie wpływając na jego walory smakowe. Mała zawartość kwasu octowego, stosunkowo duża ilość glicerolu oraz inne wymienione powyżej parametry win odpowiadają wymaganiom normatywnymi i świadczą o ich wysokiej jakości.

Analiza chromosomalnego DNA metodą elektroforezy w zmiennym polu pulsacyjnym umożliwiła uzyskanie obrazu kariotypów badanych drożdży (rys. 2a). Wszystkie szczepy zakwalifikowano do rodzaju *Saccharomyces*, a w ich profilach elektroforetycznych obserwowano od 11 do 13 prążków o wielkości molekularnej w zakresie 200–2200 kpz. Wg danych literaturowych [4], analogiczne rezultaty uzyskano w przypadku 65 szczepów drożdży winiarskich należących do grupy *Saccharomyces sensu stricto*.

a.

b.



Rys. 2 a. Rozdział elektroforetyczny chromosomalnego DNA.

Fig. 2 a. Electrophoretic separation of the chromosomal DNA.

Rys. 2 b. Profile elektroforetyczne mitochondrialnego DNA trawionego enzymem *Hinf*I.

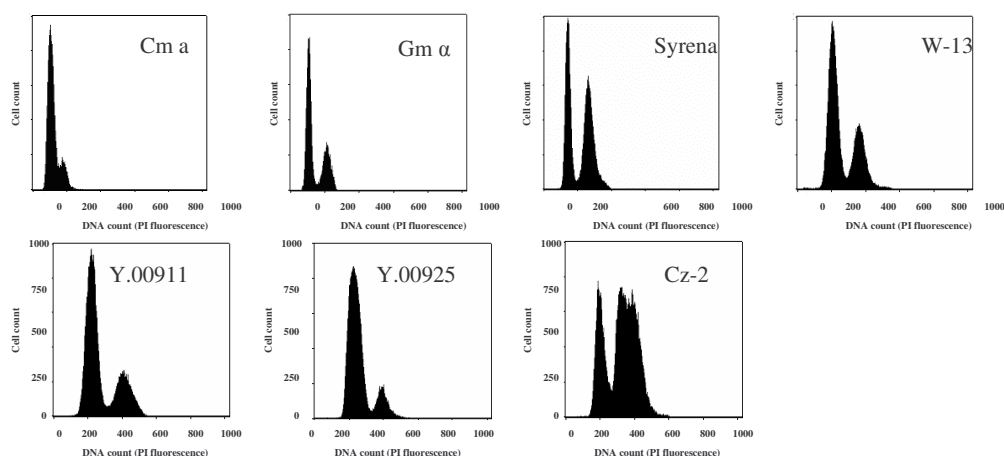
Fig. 2 b. Electrophoretic profiles of the mitochondrial DNA digested by the *Hinf*I enzyme.

Profile chromosomalne badanych szczepów różniły się liczbą i położeniem prążków odpowiadających największym chromosomom szczepu markerowego *S. cerevisiae* YNN 295. Szczepy Y.00911 oraz Cz-2 charakteryzowały się występowaniem jednego prążka o masie molekularnej 1600 kpc, podczas gdy w profilach pozostałych szczepów obserwowano po dwa prążki: 2200 i 1600 kpc. Istotne różnice stwierdzono także w grupie chromosomów o masie molekularnej 450–225 kpc. Poza drożdżami Y.00911 i Y.00925, profile pozostałych szczepów wykazywały obecność trzech prążków w tym regionie. Nie obserwowano wyraźnych różnic pomiędzy obrazami elektroforetycznymi chromosomalnego DNA szczepów Syrena oraz W-13, przy jednocześnie występujących różnicach w profilach mtDNA (rys. 2b). Zastosowanie enzymu *Hinf*I w analizie restrykcyjnej mtDNA pozwoliło na uzyskanie od 15 do 17 prążków w przypadku drożdży Syrena, W-13 i Cz-2. Odmienne profile elektroforetyczne, charakteryzujące się występowaniem jedynie 2 prążków, otrzymano w przypadku szczepów Y.00911 oraz Y.00925.

Profile elektroforetyczne chromosomalnego i mitochondrialnego DNA badanych szczepów drożdży prezentują wyraźne różnice liczby, położenia, jak i intensywności wybarwionych prążków, co wskazuje na polimorfizm genomowego DNA. Nie jest jednak możliwe jednoznaczne klasyfikowanie analizowanych szczepów do gatunków *S. bayanus* i *S. cerevisiae* tylko na podstawie ich kariotypów. Wg Naumova i wsp. [14] jedynie dla *S. cerevisiae* charakterystyczne są trzy prążki w regionie 225–365 kpc, podczas gdy wyniki naszych badań wskazują na występowanie takiego układu zarówno u drożdży *S. cerevisiae* (Syrena, W-13), jak i *S. bayanus* (Cz-2). Profile elektroforetyczne testowych szczepów nie potwierdzają także doniesień o obecności w

obrazach kariotypów drożdży *S. bayanus* dwóch wyraźnie rozdzielonych prążków o wielkości 2200 i 1300 kpz [25]. Uzyskane dane są zgodne z teorią o braku możliwości różnicowania gatunków z rodzaju *Saccharomyces* w oparciu o obecność pojedynczego prążka albo grupy prążków w obrazach elektroforetycznych chromosomalnego DNA [2–4]. Wg danych literaturowych [5, 22], rozróżnienie szczepów możliwe jest na podstawie analizy genetycznej z równoczesnym zastosowaniem przynajmniej dwóch technik biologii molekularnej, co potwierdzają wyniki prezentowane w niniejszej pracy. Ze względu na brak wyraźnych różnic w kariotypach drożdży Syrena i W-13, zróżnicowanie tych szczepów jest możliwe jedynie w oparciu o wspólną analizę chromosomalnego i mitochondrialnego DNA.

Zawartość DNA w komórkach drożdży wyznaczono metodą cytometrii przepływowej, stosując laboratoryjne szczepy Cm a i Gm  $\alpha$  jako haploidalne wzorce (rys. 3). Biorąc pod uwagę średnie z trzech niezależnych powtórzeń oraz odchylenia standardowe, wnioskowano o diploidalności szczepów: *S. cerevisiae* W-13 oraz *S. bayanus* Cz-2. Szczepy *S. cerevisiae* Syrena, Y.00911 oraz Y.00925 uznano za aneuploidalne (tab. 3).



Rys. 3. Zawartość DNA wyznaczona metodą cytometrii przepływowej.

Fig. 3. Contents of DNA determined by a flow cytometry analysis.

Rasy przemysłowe drożdży są zwykle diploidalne, poliploidalne lub aneuploidalne [1, 9]. Prezentowane przez nas wyniki świadczą o diploidalności lub aneuploidalności badanych szczepów drożdży. Jednak zawartości DNA w komórce na poziomie 2C nie zawsze odzwierciedla diploidalność genomu jądrowego. Organizacja genomu diploidalnych drożdży może być bardziej złożona i charakteryzować się monosomią, disomią albo polisomią pojedynczych chromosomów [10].

Tabela 2

Zawartość DNA w komórkach drożdży.  
Content of DNA in wine yeast strain cells.

Drożdże Yeast	Zawartość DNA* DNA content*	Ploidalność Ploidy
Cm a	1,01 ± 0,01	haploidalny
Gm α	1,06 ± 0,09	haploidalny
Syrena	1,36 ± 0,04	aneuploidalny
W-13	2,06 ± 0,16	diploidalny
Y.00911	2,15 ± 0,03	aneuploidalny
Y.00925	2,23 ± 0,03	aneuploidalny
Cz-2	2,03 ± 0,06	diploidalny

\* – zawartość DNA wyrażona we względnych jednostkach w odniesieniu do ilości DNA w komórkach haploidalnych szczepów Cm a oraz Gm α;

\* – The content of DNA is expressed in relative units in relation to the DNA quantities as contained in the haploid cells of the Cm a and Gm α strains.

### Wnioski

1. Badane przemysłowe szczepy drożdży charakteryzowały się wysoką przydatnością technologiczną, a ocena parametryczna wytwarzanych win odpowiadała wymaganiom normatywnym, pomimo że nie są one obowiązujące.
2. Drożdże cechowały się zdolnością wydajnej biodegradacji kwasu L-jabłkowego, zmniejszając jego zawartość o 65,6–68,4% w zależności od szczepu.
3. Różnice profili elektroforetycznych chromosomalnego i mitochondrialnego DNA wskazywały na polimorfizm genomowego DNA wśród testowanych szczepów.
4. Rozróżnienie szczepów możliwe było na podstawie analizy genetycznej z równoczesnym zastosowaniem dwóch technik biologii molekularnej: kariotypowania oraz analizy restrykcyjnej mtDNA.
5. Badane szczepy drożdży uznano za diploidalne (*S. cerevisiae* W-13, *S. bayanus* Cz-2) bądź aneuploidalne (*S. cerevisiae* Syrena, Y.00911, Y.00925).
6. Pomimo stwierdzonych różnic fizjologicznych i genetycznych pomiędzy drożdżami, nie było możliwe jednoznaczne taksonomiczne zakwalifikowanie szczepów do gatunków *S. cerevisiae* oraz *S. bayanus*.

### Literatura

- [1] Bakalinsky A.T., Snow R.: The chromosomal constitution of wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 1990, **6**, 367-382.
- [2] Briones A.I., Ubeda J., Grando M.S.: Differentiation of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from fermenting musts according to their karyotype patterns. *Int. J. Food Microbiol.*, 1996, **28**, 369-377.
- [3] Canas P.M.I., Iranzo J.F., Perez A.I.B.: Study of the karyotype of wine yeasts isolated in the region of Valdepenas in two consecutive vintages. *Food. Microbiol.*, 1997, **14**, 221-225.
- [4] Cardinali G., Martini A.: Electrophoretic karyotypes of authentic strains of the sensu stricto group of the genus *Saccharomyces*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 1994, **44**, 791-797.
- [5] Cavalieri D., Barberio C., Casalone E., Pinzauti E., Sebastiani F., Mortimer R.K., Polsinelli M.: Genetic and molecular diversity in *Saccharomyces cerevisiae* natural populations. *Food Technol. Biotechnol.*, 1998, **36**, 45-50.
- [6] Delfini C., Cervetti F.: Metabolic and technological factors affecting acetic acid production by yeasts during alcoholic fermentation. *Vitic. Enol. Sci.*, 1991, **46**, 142-150.



- [7] Elkins E.R., Heuser J.R.: Detection of adulteration in apple juice by L-malic/total malic acid ratio. J. Assoc. Off. Anal. Chem. Intern., 1994, **77**, 411-415.
- [8] Frayne R.F.: Direct analysis of the major organic components in grape must and wine using HPLC. Am. J. Enol. Vitic., 1986, **37**, 281-287.
- [9] Guijo S., Mauricio J.C., Salmon J.M., Ortega J.M.: Determination of the relative ploidy in different *Saccharomyces cerevisiae* strains used for fermentation and 'flor' film ageing of dry sherry-type wines. Yeast, 1997, **13**, 101-117.
- [10] Ibeas I.I., Jimenez J.: Genomic complexity and chromosomal rearrangements in wine-laboratory yeast hybrids. Curr. Genet., 1996, **30**, 410-416.
- [11] Kunicka A., Szopa J.S.: Otrzymywanie międzyrodzajowych hybrydów drożdży *Saccharomyces cerevisiae* i *Schizosaccharomyces pombe* na drodze fuzji protoplastów. Biotechnologia, 1998, **1**, 167-177
- [12] Lambrechts M.G., Pretorius I.S.: Yeast and its importance to wine aroma – a review. S. Afr. J. Enol. Vitic., 2000, **21**, 97-128.
- [13] [13] Nadal D., Carro D., Fernandez-Larrea J., Pina B.: Analysis and dynamics of the chromosomal complements of wild sparkling-wine yeast strains. Appl. Environ. Microbiol., 1999, **65**, 1688-1695.
- [14] Naumov G.I., Masneuf I., Naumova E.S., Aigle M., Dubourdiou D.: Association of *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* with some French wines: genetic analysis of yeast populations. Res. Microbiol., 2000, **151**, 683-691.
- [15] Pataro C., Guerra J.B., Petrillo-Peixoto M.L., Mendonca-Hagler L.C., Linardi V.R., Rosa C.A.: Yeast communities and genetic polymorphism of *Saccharomyces cerevisiae* strains associated with artisanal fermentation in Brazil. J. Appl. Microbiol., 2000, **89**, 24-31.
- [16] PN-80/A-79121. Wino owocowe.
- [17] PN-90/A-79120/05. Wina i miody pitne. Przygotowanie próbek i metody badań. Oznaczanie zawartości ekstraktu całkowitego i bezcukrowego.
- [18] PN-90/A-79120/06 Wina i miody pitne. Przygotowanie próbek i metody badań. Oznaczanie zawartości cukrów.
- [19] PN-90/A-79120/07 Wina i miody pitne. Przygotowanie próbek i metody badań. Oznaczanie kwasowości ogólnej.
- [20] PN-90/A-79120/10 Wina i miody pitne. Przygotowanie próbek i metody badań. Oznaczanie zawartości dwutlenku siarki (SO<sub>2</sub>).
- [21] Pretorius I.S., Bauer F.: Meeting the consumer challenge through genetically customized wine-yeast strains. Trends Biotechnol., 2002, **20**, 426-432.
- [22] Querol A., Barrio E., Ramon D.: A comparative study of different methods of yeast strain characterization. System. Appl. Microbiol., 1992, **15**, 439-446.
- [23] Romano P., Caruso M., Capece A., Lipani G., Paraggio M., Fiore C.: Metabolic diversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains from spontaneously fermented grape must. World J. Microbiol. Biotechnol., 2003, **19**, 311-315.
- [24] Schwartz DC, Cantor C: Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. Cell, 1984, **37**, 67-75.
- [25] Tornai-Lehoczki J., Dlauchy D.: An opportunity to distinguish species of *Saccharomyces sensu stricto* by electrophoretic separation of the larger chromosomes. Lett. Appl. Microbiol., 1996, **23**, 227-230.
- [26] Volschenk H., van Vuuren H.J.J., Viljoen-Bloom M.: Malo-ethanolic fermentation in *Saccharomyces* and *Schizosaccharomyces*. Curr. Genet., 2003, **43**, 379-391.
- [27] Vaughan-Martini A., Martini A., Cardinali G.: Electrophoretic karyotyping as a taxonomic tool in the genus *Saccharomyces*. Antonie van Leeuwenhoek, 1993, **63**, 145- 156.
- [28] Wzorek W., Pogorzelski E.: Technologia winiarstwa owocowego i gronowego. Sigma NOT. Warszawa 1997.

### THE ANALYSIS OF FERMENTATION PROFILES AND SOME GENETIC PROPERTIES OF MESOPHILIC WINE YEAST STRAINS

The objective of this study was to analyze fermentation activity and some genetic traits of mesophilic wine yeast strains representing two species: *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus*. The yeast strains analyzed were characterized by a varying physiological activity. Statistical differences were to be attributed to the production of ethanol and glycerol, as well as to the SO<sub>2</sub> level and sugar consumption. Chemical properties of wine fulfilled the standard recommendations, thus, they proved the high technological usefulness of the strains examined. The yeasts were also characterized by a good ability to biodegrade L-malic acid under the anaerobic conditions, after the wine fermentation completed, and they reduced the content of this acid by 65,6 to 68,4%. The yeast strains tested showed a polymorphism of the genome's DNA, and electrophoretic profiles of the chromosomal and mitochondrial DNA patterns differed in their number, location, and intensity of stripes. It was possible to unambiguously differentiate between individual wine yeast strains on the basis of genetic analysis applied simultaneously with two other techniques from the domains of molecular biology: karyotyping and mtDNA restriction analysis. The DNA contents in yeast cells as determined by a flow cytometry indicated that yeast strains were either diploid or aneuploid. Differences in the physiological and genetic properties of the yeast strains tested proved clear dissimilarities among them; however, those dissimilarities did not allow for the definite, taxonomical classification of the yeast strains to *S. cerevisiae* and *S. bayanus* groups; this fact may confirm the hybridization of yeast within a *Saccharomyces* group in a natural environment.

**Key words:** wine yeast, fermentation activity, karyotyping, mtDNA restriction analysis, flow cytometry 