

SELEKCJA SZCZEPÓW DROŹDZY Z RODZAJÓW *CANDIDA* ORAZ *CRYPTOCOCCUS* W KIERUNKU BIOSYNTETY ZEWNĄTRZKOMÓRKOWYCH POLIMERÓW W PODŁOŻACH Z SACHAROZĄ

Iwona Gientka, Anna M. Kot, Stanisław Błażejczak
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Streszczenie. Celem badań było wyselekcjonowanie najlepszego producenta zewnątrzkomórkowych polimerów spośród wybranych szczepów drożdży z rodzajów *Candida* oraz *Cryptococcus*. Hodowle prowadzono na wytrząsarce w temperaturze 28°C, w podłożach: mineralnym – MS oraz zawierającym organiczne źródła azotu – YPS. Źródłem węgla była sacharoza w stężeniu 5%. W trakcie hodowli oznaczano zawartość polimerów zewnątrzkomórkowych metodą precypitacji z etanolem, pH oraz plon biomasy. W podłożach doświadczalnych wszystkie szczepy wykazały zdolność wzrostu. Plon biomasy szczepów był istotnie większy z podłoża YPS. Badane szczepy wytworzyły polimery zewnątrzkomórkowe, przy czym ich zawartość zależała od szczepu, rodzaju podłoża oraz czasu hodowli. Wszystkie szczepy wytworzyły więcej egzopolimerów w podłożu mineralnym i jednocześnie istotnie obniżyły kwasowość czynną podłoża. Hodowle badanych drożdży w podłożu zawierającym organiczne źródła azotu charakteryzowały się większym plonem biomasy, ale niską zawartością EPS. Czas hodowli istotnie wpływał na ilość wytworzonych egzopolimerów. Jako najlepszych producentów zewnątrzkomórkowych polimerów w podłożu z sacharozą wyselekcjonowano dwa szczepy: *Candida guilliermondii* 1 oraz *Candida famata*.

Słowa kluczowe: polimery zewnątrzkomórkowe, EPS, *Candida*, *Cryptococcus*

WSTĘP

Do rodzaju *Candida* należą liczne i różnorodne gatunki drożdży. Są to formy anamorficzne grzybów *Pichia*, *Torulopsis* czy *Kluyveromyces*. Drożdże *Candida* stanowią mikroflorę kefiru [Gientka i in. 2013], a niektóre z nich, np. *Candida kefir* czy *C. famata*,

są zdolne do asymilacji laktozy [Gientka i Klusek 2013] i mogą być wykorzystywane do zagospodarowania serwatki. Ich biomasa może być źródłem białka paszowego SCP. Drożdże *Candida* są producentem enzymów o aktywności lipolitycznej [Krzyczkowska i in. 2008] o różnym przeznaczeniu, w tym do otrzymywania biodiesla [Watanabe i in. 2000, Bélafi-Bakó i in. 2002], witamin [EU patent] czy biosurfaktantów [Mulligan 2005]. Drożdże z rodzaju *Cryptococcus* charakteryzują się brakiem zdolności do fermentacji cukrów, mają natomiast szerokie zdolności do ich asymilacji. Teleomorficzne formy rodzaju *Cryptococcus* są znane jako *Filobasidiella* i dotychczas były izolowane z kefirów [Witthuhn i in. 2005, Gientka i in. 2013].

Drożdże z rodzajów *Candida* oraz *Cryptococcus* wytwarzają pozakomórkowe polimery [Chiura i in. 1982, Pavlova i in. 2009]. Wszystkie są polimerami cukrowymi i w związku z tym określa się je jako polisacharydy zewnątrzkomórkowe, egzopolisacharydy bądź skrótem EPS (ang. *exopolysaccharides*). Pozakomórkowe polimery wytwarzają także drożdże z rodzajów *Lipomyces*, *Pichia*, *Rhodotorula* i *Sporobolomyces* [Grigorova i in. 1999, Van Bogaert i in. 2009, Poli i in. 2010]. Roztwory wodne biopolimerów drożdżowych charakteryzują się dużą lepkością i pseudoplastycznością, co stwarza możliwości ich zastosowania w przemyśle spożywczym, farmaceutycznym czy kosmetycznym [Pavlova i in. 2004, Kuncheva i in. 2007]. Egzopolisacharydy drożdżowe często są strukturalnie podobne do cząstek tworzących ściany komórkowe [Van Bogaert i in. 2009]. Prawdopodobnie główną funkcją EPS jest ochrona komórek drobnoustrojów przed niekorzystnymi warunkami środowiska, takimi jak gwałtowna zmiana temperatury bądź stres osmotyczny [Pavlova i in. 2009]. Udowodniono, że zaledwie kilka gatunków drożdży posiada odpowiednie enzymy umożliwiające hydrolizę egzopolimerów. W takich przypadkach EPS stanowią zapasowe źródło węgla i energii [Breierova i in. 2005, Badel i in. 2011].

Oprócz cennych właściwości reologicznych i właściwości zagęszczających polimery zewnątrzkomórkowe wytwarzane przez drożdże wykazują aktywność biologiczną. Wytworzony przez *Rhodotorula glutinis* polimer zbudowany z mannozy, glukozy i arabinozy wykazał działanie antyoksydacyjne, antywirusowe i antynowotworowe [Ibrahim i in. 2012]. Polimery pochodzące z hodowli *Rhodotorula rubra* również charakteryzowały się działaniem przeciwnowotworowym u zwierząt doświadczalnych, a ich siarczanowe formy stymulowały powstawanie przeciwciał [Van Bogaert i in. 2009]. Zewnątrzkomórkowy fosfomannan syntetyzowany przez *Pichia holstii* wykorzystano do produkcji leku PI-88 [Khachigian i Parish 2004]. Jest to polisacharydowy inhibitor heparanazy, który wykazuje wyraźną aktywność przeciwnowotworową [Basche i in. 2006]. Mannan wytwarzany przez *R. glutinis* AHU 3479 może być przydatny jako immunoreaktywny antygen w serologicznej diagnostyce leptospirozy [Matsuo i in. 2000].

Źródłem drożdży charakteryzujących się potencjałem wytwarzania biopolimerów zewnątrzkomórkowych może być gleba, np. wydajne szczepy z rodzaju *Rhodotorula* izolowano z ziemi ogrodowej [Ibrahim i in. 2012]. Pod kątem zdolności do wytwarzania egzopolisacharydów testowano szczepy drożdży zimnolubnych, w tym z rodzaju *Cryptococcus*, które wyizolowano z arktycznej gleby oraz z piór pingwinów [Pavlova i in. 2004, Pavlova 2009]. Drożdżowych producentów EPS izolowano także z porostów oraz mchów [Pavlova i in. 2004, Rusinova-Videva i in. 2011].

Celem badań było wyselekcjonowanie najlepszego producenta zewnątrzkomórkowych polimerów spośród wybranych szczepów drożdży z rodzajów *Candida* oraz *Cryptococcus*.

MATERIAŁ I METODY

Materiał biologiczny stanowiły szczepy: *Candida utilis* ATCC 9905, *Candida lipolytica* KKP 332, *Candida humicola*, *Candida famata*, *Candida guilliermondii* 1, *Candida guilliermondii* 2, *Candida kefyr*, *Cryptococcus albidus* oraz *Cryptococcus humicolus* pochodzące z Muzeum Czystych Kultur Zakładu Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności SGGW. Szczepy *Candida famata*, *Candida guilliermondii* 1, *Candida guilliermondii* 2, *Candida kefyr*, *Cryptococcus albidus* oraz *Cryptococcus humicolus* pierwotnie wyizolowano z kefirów [Gientka, Madejska 2013].

W badaniach zastosowano dwa rodzaje pożywki – podłoże mineralne MS o składzie: sacharoza – $50 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – $2,0 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$, KH_2PO_4 – $1,0 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ – $0,5 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$, $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – $0,1 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$, NaCl – $0,1 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$, ekstrakt drożdżowy – $1,0 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ oraz podłoże YPS o składzie: sacharoza – $50 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$, pepton – $20 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ i ekstrakt drożdżowy – $10 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$. Początkowe pH podłoży ustalano na 5,6. Podłoża szczepiono kolonią drożdży, uzyskaną po 48 godzinach hodowli w temperaturze 28°C na zestalonym podłożu YPD (BTL, Polska) o pH 5,5.

Hodowle właściwe prowadzono w 100 cm^3 każdej z pożywek w kolbach okrągłych z płaskim dnem i hodowano na wytrząsarce (MaxQ 4000, Barnstead) przy 200 obr./min przez 72 godziny w temperaturze 28°C . Oznaczano pH, plon biomasy i zawartość polimerów zewnątrzkomórkowych.

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

Zawartość polimerów zewnątrzkomórkowych oznaczano metodą precipitacji z etanolem i w tym celu po zakończonej inkubacji płyn pohodowlany odwirowywano przez 30 minut przy $6000\times \text{g}$ (Centrifuge 5804R Eppendorf). Do supernatantu (25 cm^3) dodawano (50 cm^3) 96% etanolu (cz.d.a. POCH S.A.) i pozostawiano na 24 godziny w temperaturze 4°C w celu wytrącenia polimerów. Po tym czasie EPS odwirowano przez 10 minut przy $6000\times \text{g}$ [Pavlova i in. 2005]. Supernatant usuwano, a osad przemywano etanolem i suszono w temperaturze 80°C do stałej masy. Wysuszony osad ważono z dokładnością $\pm 0,00001 \text{ g}$ (RADWAG PS 750/X, Polska). Wynik podawano w $\text{mg s.s. EPS}\cdot\text{dm}^{-3}$ oraz w przeliczeniu na 1 g s.s. biomasy.

Analizę statystyczną wyników prowadzono z wykorzystaniem programu STATISTICA ver.10. Zastosowano dwuczynnikową analizę wariancji. Wnioskowanie prowadzono przy zastosowaniu testu Tukeya na poziomie istotności $\alpha = 0,05$.

WYNIKI I DYSKUSJA

W podłożach doświadczalnych zawierających sacharozę jako źródło węgla wszystkie szczepy wykazały zdolność wzrostu. Plon biomasy zależał od szczepu drożdży, rodzaju podłoża oraz czasu hodowli. Najmniejszy plon biomasy uzyskano po hodowli *Candida lipolytica*, *Candida utilis*, *Candida inconspicua* – po 48 godzinach hodowli nie przekroczył on $3 \text{ g s.s.} \cdot \text{dm}^{-3}$ podłoża mineralnego (tab. 1). Drożdże *Cryptococcus humicola* wyróżniły się spośród badanych szczepów największym plonem wynoszącym ponad $7 \text{ g s.s.} \cdot \text{dm}^{-3}$ w podłożu MS oraz $11 \text{ g s.s.} \cdot \text{dm}^{-3}$ w podłożu YPS. Plon biomasy szczepów był istotnie większy z podłożu YPS, z wyjątkiem szczepu *Candida lipolytica*, który wykazał się słabym wzrostem w obu badanych podłożach. Obecność łatwo przyswajalnych i organicznych źródeł azotu w formie peptonu oraz witamin w postaci ekstraktu drożdżowego należy uznać za przyczynę lepszego wzrostu komórek badanych szczepów w pożywce YPS.

Tabela 1. Plon biomasy, zawartość polisacharydów (EPS) oraz produktywność specyficzną oznaczoną w 48. godzinie hodowli wytrząsanej w podłożu MS oraz YPS

Table 1. Biomass yield, EPS and specific productivity determined at 48th hour of shaken culture in MS and YPS media

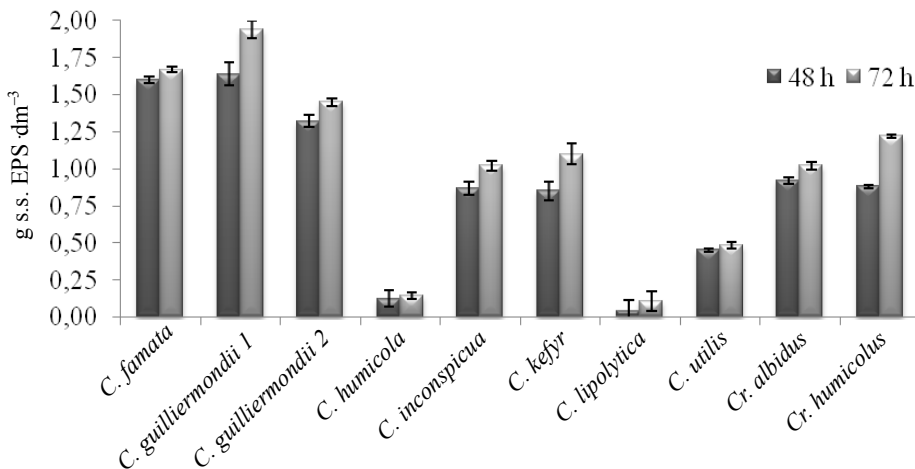
Szczep – Strain	Plon biomasy [g s.s.·dm ⁻³] Biomass yield [g d.m.·dm ⁻³]		EPS [g·dm ⁻³]		Produktywność specyficzną Specific productivity	
	Podłoże – Medium					
	MS	YPS	MS	YPS	MS	YPS
<i>C. famata</i>	3,45 ^{d, e}	9,44 ^k	1,596 ^l	0,976 ^G	0,463	0,103
<i>C. guilliermondii</i> 1	5,13 ^h	8,95 ^k	1,640 ^l	0,929 ^G	0,310	0,103
<i>C. guilliermondii</i> 2	3,93 ^{c, f}	5,91 ⁱ	1,320 ^H	0,656 ^{C, D}	0,330	0,111
<i>C. humicola</i>	4,29 ^{f, g}	5,88 ⁱ	0,124 ^A	0,139 ^A	0,020	0,020
<i>C. inconspicua</i>	2,92 ^c	4,28 ^{f, g}	0,970 ^G	0,714 ^{D, E, F}	0,330	0,167
<i>C. kefyra</i>	4,46 ^g	7,38 ^j	0,847 ^{E, F, G}	0,574 ^{B, C, D}	0,180	0,077
<i>C. lipolytica</i>	0,64 ^a	1,06 ^a	0,038 ^A	0,052 ^A	0,050	0,040
<i>C. utilis</i>	2,26 ^b	3,06 ^{c, d}	0,451 ^B	0,511 ^{B, C}	0,191	0,160
<i>Cr. albidus</i>	3,65 ^e	5,59 ^{h, i}	0,921 ^G	0,684 ^{C, D, E}	0,252	0,128
<i>Cr. humicola</i>	7,22 ^j	11,09 ^l	0,880 ^{F, G}	0,416 ^B	0,122	0,037

Wartości oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie przy $\alpha = 0,05$ / Values marked by the same letter are not different at $\alpha = 0.05$.

Najmniejszą zawartość polimerów zewnątrzkomórkowych (tab. 1) stwierdzono po hodowli szczepu *Candida lipolytica*, a ich zawartość nieprzekraczającą 55 mg EPS w 1 dm³ obu badanych pożywek należy uznać za śladową. Niewiele polimerów wytworzył również szczep *Candida humicola*. W przypadku tych drożdży nie stwierdzono istotnych różnic w zależności od zastosowanego podłoża. Podczas hodowli pozostałych szczepów stwierdzono istotnie większą zawartość EPS w podłożu mineralnym – ich średnia

zawartość oznaczona w drugiej dobie hodowli wynosiła od 0,45 do 1,64 g·dm⁻³ w zależności od szczepu. Najwięcej egzopolimerów wytworzyły szczepy *Candida guilliermondii* 1 oraz *Candida famata*. Do 48. godziny inkubacji wyprodukowały one odpowiednio 1,640 i 1,596 g s.s.·dm⁻³. Zdolność produkcji EPS przez 1 g s.s. biomasy wyliczono jako specyficzną produktywność biomasy ($Y_{p/x}$). Średnia produktywność biomasy otrzymanej z hodowli w podłożu YPS wynosiła do 0,16, a w podłożu MS do 0,463. Produktywność biomasy najlepszych producentów EPS była 3 i 4-krotnie większa w podłożu mineralnym. Dla innych szczepów współczynnik ten nie różnił się w zależności od podłoża bądź był niewiele większy. Świadczy to o istotnym wpływie składników podłoża na wydajność biosyntezy EPS. Podłoże YPS, mimo iż przyczyniło się do dużych plonów biomasy, zawierało składniki, które niekorzystnie wpływały na biosyntezę polimerów zewnątrzkomórkowych. Zastosowane podłoża jako źródło węgla zawierały sacharozę w tym samym stężeniu, istotny wpływ na biosyntezę EPS miała zatem zawartość i źródło azotu. W podłożu mineralnym źródłem azotu był siarczan amonu w stężeniu 0,2%, a stosunek C : N wynosił 25. Taki skład podstawowych elementów pożywki uznaje się za korzystny do syntezy EPS przez drożdże. Zasobniejsze w organiczne, łatwo przyswajalne formy azotu podłoże YPS spowodowało zmniejszenie wytwarzania polimerów. Niekorzystny wpływ organicznych źródeł azotu na syntezę egzopolimerów obserwowano także podczas hodowli innych drożdży, m.in. z rodzaju *Rhodotorula* [Cho i in. 2001]. Wykorzystany w niniejszych badaniach szczep *Candida famata* wytworzył ok. 0,5 g egzopolimerów w 1 dm³ podłoża YPD, a hodowany w bogatym w pepton, ekstrakt drożdżowy oraz ekstrakt słodowy podłożu YM [Gientka i Madejska 2013] wytwarzał tylko ich śladowe ilości. Potwierdzono, że podłoża zawierające organiczne źródła azotu są niekorzystne do syntezy EPS przez drożdże z rodzajów *Candida* i *Cryptococcus*.

Stwierdzono, że zawartość oznaczonych polimerów zależała od czasu hodowli, i dla wszystkich badanych drożdży wzrastała w trzeciej dobie inkubacji (rys. 1). Najwię-



Rys. 1. Średnia zawartość polimerów zewnątrzkomórkowych po 48 i 72 godzinach hodowli w podłożu MS

Fig. 1. Mean content of exopolymers after 48 and 72 hours of culturing in MS medium

szy przyrost zawartości EPS między 48. a 72. godziną hodowli odnotowano dla szczepu *Cryptococcus humicolus* w podłożu mineralnym. Dla szczepów wytwarzających śladowe ilości EPS różnice te były nieistotne. W przypadku najwydajniejszych szczepów *Candida famata* oraz *Candida guilliermondii* 1 wydłużenie czasu hodowli do trzeciej doby skutkowało istotnym przyrostem zawartości polimerów, przy czym ostatecznie drożdże *Candida guilliermondii* 1 wytworzyły najwięcej polimerów. Po 72 godzinach hodowli ich zawartość wynosiła $1,94 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$. Ustalenie maksymalnej zawartości polimerów podczas hodowli pozwala na optymalizację czasu hodowli wyselekcjonowanych szczepów w kierunku biosyntezy EPS.

Podczas hodowli *Candida utilis* ATCC 42402 w warunkach podobnych do zastosowanych, maksimum syntezy egzopolisacharydów następowało w 72. godzinie hodowli [Chiura i in. 1982]. Optymalny czas biosyntezy EPS przez drożdże z rodzaju *Rhodotorula* był natomiast uzależniony od szczepu i wynosił od 72 do 120 godzin [Pavlova i in. 2009].

Podczas hodowli zaobserwowano istotne zmiany pH w zależności od zastosowanego podłoża. Kwasowość czynna podłoża mineralnego oznaczana w drugiej dobie była znacznie większa od ustalonej na początku hodowli i wartość pH z początkowej 5,6 obniżyła się do 2,01–2,64. Wydłużenie czasu hodowli o dalsze 24 godziny spowodowało już niewielkie obniżenie pH. W podłożu MS szczep *Candida lipolytica* KKP 322, jako jedyny spośród badanych, wykazał zdolność do lekkiej alkalizacji.

Tabela 2. Zmiany pH podczas hodowli

Table 2. Changes of pH during shaken cultures

Szczep Strain	0 h	Podłoże MS MS medium		Podłoże YPS YPS medium	
		48 h	72 h	48 h	72 h
<i>C. famata</i>		2,62 ± 0,08 ^c	2,54 ± 0,02 ^d	5,62 ± 0,02 ^e	5,49 ± 0,02 ^e
<i>C. guilliermondii</i> 1		2,41 ± 0,02 ^c	2,40 ± 0,06 ^c	5,77 ± 0,03 ^h	5,80 ± 0,02 ^h
<i>C. guilliermondii</i> 2		2,35 ± 0,06 ^c	2,32 ± 0,16 ^c	5,81 ± 0,01 ^h	5,91 ± 0,03 ^{h,i}
<i>C. humicola</i>		2,07 ± 0,04 ^{a,b}	1,99 ± 0,10 ^a	5,78 ± 0,02 ^h	5,80 ± 0,02 ^h
<i>C. inconspicua</i>	5,6 ± 0,10	2,64 ± 0,10 ^e	2,42 ± 0,11 ^c	5,41 ± 0,02 ^e	5,42 ± 0,04 ^e
<i>C. kefyry</i>		2,13 ± 0,04 ^b	2,06 ± 0,02 ^{a,b}	6,29 ± 0,01 ^j	6,29 ± 0,03 ^j
<i>C. lipolytica</i>		6,42 ± 0,03 ^k	6,41 ± 0,05 ^k	6,45 ± 0,01 ^k	6,45 ± 0,04 ^k
<i>C. utilis</i>		2,46 ± 0,17 ^{c,d}	2,34 ± 0,04 ^c	6,15 ± 0,02 ⁱ	6,15 ± 0,02 ⁱ
<i>Cr. albidus</i>		2,27 ± 0,06 ^b	2,21 ± 0,10 ^b	4,82 ± 0,02 ^f	4,82 ± 0,01 ^f
<i>Cr. humicolus</i>		2,01 ± 0,10 ^a	1,94 ± 0,04 ^a	7,80 ± 0,01 ^l	7,81 ± 0,02 ^l

Wartości oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie przy $\alpha = 0,05$ / Values marked by the same letter are not different at $\alpha = 0,05$.

W podłożu zawierającym pepton i ekstrakt drożdżowy podczas hodowli nie stwierdzono silnego zakwaszenia środowiska. Niewielkie obniżenie pH w stosunku do początkowej wartości nastąpiło tylko w hodowlach *Candida inconspicua* oraz *Cryptococcus albidus*. Pozostałe szczepy zalkalizowały podłoże YPS, przy czym największymi uzdolnieniami

w tym zakresie charakteryzował się szczep *Cryptococcus humicolus* i końcowe pH podłoża (w trzeciej dobie) YPS wynosiło 7,81. Zdolność do alkalizacji podłoża przez *Cryptococcus humicolus* potwierdzają badania innych autorów, np. w hodowli, której celem było zbadanie możliwości degradacji antybiotyków przez ten szczep [Kwon 2002]. Zakwaszanie podłoża mineralnych podczas syntezy EPS przez wydajne szczepy obserwowano także wcześniej. Uważa się, że prawdopodobną przyczyną tego zjawiska jest wydzielanie protonów przez komórki po szybkim wykorzystaniu jonu amonowego [Cho 2001].

WNIOSKI

1. Badane szczepy drożdży z rodzajów *Candida* oraz *Cryptococcus* wytworzyły polimery zewnątrzkomórkowe, przy czym ich zawartość zależała od szczepu, rodzaju podłoża oraz czasu hodowli.

2. Wszystkie szczepy wytworzyły więcej egzopolimerów w podłożu mineralnym i jednocześnie istotnie obniżyły kwasowość czynną podłoża. Hodowle wszystkich badanych drożdży w podłożu zawierającym organiczne źródła azotu charakteryzowały się większym plonem biomasy, ale niską zawartością EPS.

3. Czas hodowli istotnie wpływał na ilość wytworzonych egzopolimerów, a jego wydłużenie do 72 godzin skutkowało zwiększeniem zawartości EPS.

4. Jako najlepszych producentów zewnątrzkomórkowych polimerów w podłożu z sacharozą wyselekcjonowano dwa szczepy: *Candida guilliermondii* 1 oraz *Candida famata*.

LITERATURA

- Badel S., Laroche C., Gardarin C., Petit E., Bernardi T., Michaud P., 2011. A new method to screen polysaccharide cleavage enzymes. *Enz. Microb. Technol.* 48, 248–252.
- Basche M., Gustafson D.L., Holden S.N., O'Bryant C.L., Gore L., Witta S., Schultz M.K., Morrow M., Levin A., Creese B.R., Kangas M., Roberts K., Nguyen T., Davis K., Addison R.S., Moore J.C., Eckhardt S.G., 2006. A phase I: Biological and pharmacological study of the heparanase inhibitor PI-88 in patients with advanced solid tumors. *Clin. Cancer Res.* 12, 5471–5480.
- Bélafi-Bakó K., Kovács F., Gubicza L., Hancsók J., 2002. Enzymatic biodiesel production from sunflower oil by *Candida antarctica* lipase in a solvent-free system. *Biocatal. Biotrans.* 20, 437–439.
- Breierova E., Hromadkova Z., Stratilova E., Sasinkova V., Ebringerova A., 2005. Effect of salt stress on the production and properties of extracellular polysaccharides produced by *Cryptococcus laurentii*. *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung*, Tübingen 60c, 444–450.
- Chiura H., Iizuka M., Yamamoto T., 1982. A glucomannan as an extracellular product of *Candida utilis*. I. Production and characterization of a glucomannan *Agric Biol. Chem.* 46 (7), 1723–1731.
- Cho D.H., Chae H.J., Kim E.Y., 2001. Synthesis and characterization of a novel extracellular polysaccharide by *Rhodotorula glutinis*. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 95 (3), 183–193.
- European Patent. 1993. A fermentation process for riboflavin-producing organisms. EP 0539507 A1.

- Gientka I., Klusek E., 2013. Kefir jako źródło drożdży tolerujących duże stężenia etanolu. ZPPNR 575, 43–51.
- Gientka I., Madejska A., 2013. Ocena przydatności szczepów drożdży wyizolowanych z kefirów do syntezy polimerów zewnątrzkomórkowych. ZPPNR 574, 19–27.
- Grigorova D., Pavlova K., Panchev I., 1999. Preparation and preliminary characterization of exopolysaccharides by yeast *Rhodotorula acheniorum* MC. Appl. Biochem. Biotechnol. 81 (3), 181–191.
- Ibrahim G.S., Mahmoud M.G., Asker M.M.S., Ghazy E.A., 2012. Production and biological evaluation of exopolysaccharides from isolated *Rhodotorula glutinis*. Austral J. Basic Appl. Sci 6 (3), 401–408.
- Khachigian L.M., Parish C.R., 2004. Phosphomannopentaose sulfate (PI-88): Heparan sulfate mimetic with clinical potential in multiple vascular pathologies. Cardiovasc. Drug Rev. 22 (1), 1–6.
- Krzyczkowska J., Stolarzewicz I., Ballok D., Białecka-Florjańczyk E., 2008. Wpływ modyfikacji pożywki na biokatalityczne właściwości drożdży. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość 5 (60), 299–306.
- Kuncheva M., Pavlova K., Panchev I., Dobрева S., 2007. Emulsifying power of mannan and glucomannan produced by yeast. Int. J. Cosmetic Sci. 29, 377–384.
- Kwon H.K., Woo S.H., Park J.M., 2002. Degradation of tetracyanonickelate (II) by *Cryptococcus humicola* MCN2. FEMS Microbiol Lett. 214 (2), 211–216.
- Matsuo K., Isogai E., Araki Y., 2000. Utilization of exocellular mannan from *Rhodotorula glutinis* as an immunoreactive antigen in diagnosis of leptospirosis. J. Clin Microb. 38 (10), 3750–3754.
- Mulligan C.N., 2005. Environmental applications for biosurfactants. Environ. Poll. 133, 183–198.
- Pavlova K., Koleva L., Krachanova M., Panchev I., 2004. Production and characterization of an exopolysaccharide by yeast. World J. Microbiol. Biotechnol. 20 (4), 435–439.
- Pavlova K., Panchev I., Hristozova T.S., 2005. Physico-chemical characterization of exomannan from *Rhodotorula acheniorum* MC. World J. Microbiol. Biotechnol. 21 (3), 279–283.
- Pavlova K., Panchev I., Krachanova M., Gocheva M., 2009. Production of an exopolysaccharides by antarctic yeast. Folia Microbiol. 54 (4), 343–548.
- Poli A., Anzelmo G., Tommonaro G., Pavlova K., Casaburi A., Nicolaus B., 2010. Production and chemical characterization of an exopolysaccharide synthesized by psychrophilic yeast strain *Sporobolomyces salmonicolor* AL₁ isolated from Livingston Island, Antarctica. Folia Microbiol. 55 (6), 576–581.
- Rusinova-Videva S., Pavlova K., Georgieva K., 2011. Effect of different carbon sources on biosynthesis of exopolysaccharides from Antarctic strain *Cryptococcus laurentii* AL₆₂. Biotechnol. Biotechnol. Equip. 25, 80–84.
- Van Bogaert I.N.A., De Maeseneire S.L., Vandamme E.J., 2009. Extracellular polysaccharides produced by yeasts and yeast-like fungi (Chapter 29). W: Satyanarayana T., Kunze G.: Yeast Biotechnology: Diversity and Applications. Springer Science + Business Media B.V.
- Watanabe Y., Shimada Y., Sugihara A., Noda H., Fukuda H., Tominaga Y., 2000. Continuous production of biodiesel fuel from vegetable oil using immobilized *Candida antarctica* lipase. J. Am. Oil Chem. Soc. 77, 355–360.
- Witthuhn R.C., Schoeman T., Britz T.J., 2005. Characterization of the microbial population at different stages of kefir production and kefir grain mass cultivation. Int. Dairy J. 15 (4), 383–389.

SELECTION FROM *CANDIDA* AND *CRYPTOCOCCUS* YEAST STRAINS THE PRODUCER OF EXTRACELLULAR POLYMERS IN MEDIUM CONTAINING SUCROSE

Summary. Extracellular polymers produce yeasts from genera of *Lipomyces*, *Pichia*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula* and *Sporobolomyces*. Aqueous solutions of these exopolymers are characterized by high viscosity and pseudoplasticity, which creates the possibility of their use in the food, pharmaceutical or cosmetic industry. Some of extracellular polysaccharides from *Rhodotorula* or *Pichia* yeast have an antioxidant, antiviral and anticancer characteristics. In addition, extracellular mannans produced by *R. glutinis* can be useful as an immunoreactive antigens in serological diagnostics. The aim of the study was to select the best producer of extracellular polymers from yeast from *Candida* and *Cryptococcus* yeast strains. The cultures were performed on a shaker appropriate at 200 rpm at 28°C. Two medias was used: mineral medium MS containing ammonium sulfate and YPS containing peptone as sources of nitrogen. Sucrose at a concentration of 5% was the carbon source in both media. During the incubation the content of the extracellular polymer was determined by precipitation with ethanol, and the pH of the biomass yield. All strains have been shown to the growth in the experimental media. The biomass yield of all strains were significantly higher in YPS medium. The presence of easily digestible organic source of nitrogen in the form of peptone and vitamins as an yeast extract should be regarded as the reason of the improved growth of the cells in YPS medium. *Candida* and *Cryptococcus* strains produced extracellular polymers, wherein contents of exopolymers dependent on the strain, the type of substrate and the time of culture. All strains produced significantly more exopolymers in mineral medium (from 0.038 to 1.64 g·dm⁻³ during 48 h) than in medium with peptone (max. 0.976 g·dm⁻³). The maximum productivity of biomass in YPS medium was 0.167 while in the MS medium 0.463. The productivity of the best producers biomass was 3 and 4-fold higher in MS medium. The organic nitrogen sources should be considered as unfavorable substrate to the synthesis of EPS. A significant decrease of pH during cultivation in the mineral medium was observed. Depending on the strain initial pH value of 5.6 was reduced to 2.01–2.64. However, during the cultivation in a medium with peptone and yeast extract, there was no strong acidification of the environment. The best producers of extracellular polymers were *Candida guilliermondii* 1 and *Candida famata* strains. After 72 hours of culturing in one liter of mineral medium respectively produced 1.94 and 1.67 g of EPS.

Key words: extracellular polymers, EPS, *Candida*, *Cryptococcus*