

## CHARAKTERYSTYKA DROŹDŹ WYIZOLOWANYCH Z RÓŻNYCH ŚRODOWISK NATURALNYCH POD WZGLĘDEM WŁAŚCIWOŚCI KILLEROWYCH

**Katarzyna Piasecka-Józwiak, Beata Chabłowska**

Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. W. Dąbrowskiego  
ul. Rakowiecka 36, 05-362 Warszawa  
katarzyna.piasecka@ibprs.pl

### Streszczenie

Drożdże, wykazujące antagonizm wobec innych drobnoustrojów, mogą być wykorzystywane jako startery do inicjowania niektórych procesów fermentacyjnych, ponieważ przeciwdziałają rozwojowi drobnoustrojów niepożądanych. Synteza i wydzielanie toksyn killerowych stanowi jedną z możliwości wykluczenia przez drożdże innych drożdży ze środowiska. Celem niniejszej pracy było scharakteryzowanie grupy szczepów drożdży wyizolowanych z różnorodnych środowisk pod względem aktywności killerowej. W badanej grupie drożdży zaobserwowano stosunkowo dużą liczbę szczepów przejawiających właściwości killerowe (14 spośród badanych 35 szczepów drożdży), jednak była to aktywność słaba. Silne właściwości killerowe stwierdzono jedynie w przypadku w szczepu drożdży *Candida tropicalis* K1. Nie stwierdzono aktywności killerowej żadnego ze szczepów wyizolowanych z winogron i fermentujących moszczy; wszystkie szczepy wyizolowane z winogron i moszczy szczepów należały do wrażliwych.

**Słowa kluczowe:** drożdże, właściwości killerowe

### CHARACTERISTIC OF YEAST ISOLATED FROM VARIOUS NATURAL ENVIRONMENTS IN TERMS OF THEIR KILLERS ABILITIES

#### Summary

Yeasts that exhibit antagonism to other microorganisms can be used as starter cultures to initiate some fermentation processes as they counteract the growth of undesirable microorganisms. Synthesis and secretion of killer toxins are one of the features which enables yeast eliminate other yeasts from the environment. The purpose of this work was to characterize a group of yeast strains isolated from various natural environments in terms of killer activity. A relatively high number of strains exhibiting killer properties (14 of the

35 yeast tested) were observed in the yeast group, but this activity was a weak. Strong killer properties were found only in *Candida tropicalis* K1 yeast strain. No killer activity was found for any of the grape and fermenting musts isolates, all of which were sensitive.

**Key words:** yeast, killer abilities

## WPROWADZENIE

Coraz większe zainteresowanie ekologią i troska o zachowanie naturalnej równowagi w środowisku prowadzą między innymi do poszukiwania biologicznych metod konserwacji i kontroli zagrożeń bezpieczeństwa żywności. Kontrola ta polega na wykorzystaniu metabolitów syntetyzowanych przez niektóre mikroorganizmy do ochrony upraw i żywności przed zepsuciem spowodowanym rozwojem innych mikroorganizmów. Stanowi to alternatywę dla stosowania chemicznych środków ochrony i jest zgodne z tendencją polegającą na ograniczaniu dodatków syntetycznych w produkcji żywności i pasz oraz stosowaniu tradycyjnych metod produkcji żywności.

W ten nurt wpisują się badania nad występowaniem aktywności antymikrobiologicznej drożdży w celu wykorzystania jej do hamowania wzrostu mikroorganizmów niepożądanych, na przykład w takich procesach jak fermentacja wina, produkcja pieczywa, przechowywanie ziarna zbóż. Drożdże, wykazujące antagonizm wobec innych drobnoustrojów, mogą być z powodzeniem wykorzystywane jako startery do inicjowania niektórych procesów fermentacyjnych, ponieważ stanowią skuteczną konkurencję w środowisku [Buzzini i in. 2007; Commitini i in. 2011]. Zastosowanie drożdży killerowych na przykład w produkcji win może skutkować ograniczeniem potrzeby dodawania dwutlenku siarki [Fernández de Ullivarri i in. 2011].

W mechanizmie współzawodnictwa jedną z możliwości wykluczenia przez drożdże innych drożdży ze środowiska jest synteza i wydzielanie toksyn killerowych. Aktywność killerowa jest dobrze poznaną właściwością drożdży. Jej występowanie nie jest cechą gatunkową tylko szczepową i częstość jej wykrywania zależy między innymi od środowiska, z którego pochodzą drożdże. Aktywność killerową wykryto wśród szczepów drożdży należących do gatunku *Saccharomyces cerevisiae*, izolowanych z winogron i urządzeń w winiarni w różnych regionach świata (Europa z Rosją, Australia, Ameryka Południowa i Północna, Afryka) i wśród szczepów winiarskich jest to cecha stosunkowo często spotykana. Stwierdzono, że w warunkach fermentacji winiarskiej dominują drożdże o fenotypie killerowym (Petering i in. 1991). Z późniejszych badań wynika, że proporcja fenotypu killerowego drożdży *Sacharomyces cerevisiae* do neutralnego i wrażliwego wzrasta podczas

fermentacji. Z zafermentowanych moszczy izolowano z kolei drożdże killerowe należące do innych gatunków [Guitérrez i in. 2001; Sangorin i in. 2007; Maqeda i in. 2012]. Odmienne wyniki, w odniesieniu do częstości występowania typu killerowego, uzyskali Abranches i wsp. [1997], którzy badali drożdże izolowane z różnych tropikalnych środowisk. Wykazali oni, że występowanie aktywności killerowej wśród takich szczepów jest rzadkie, ponieważ tylko 13 spośród 944 izolatów charakteryzowało się zdolnością do syntezy toksyn killerowych. Wszystkie zbadane dotychczas toksyny drożdżowe to proteiny lub glikoproteiny o masie molekularnej od 5000 do 100000 Da. Większość tych toksyn cechuje niska stabilność w temperaturach 30-35°C i pH powyżej 5,0.

W procesach biotechnologicznych najkorzystniejsza, ze względu na wykorzystanie do hamowania mikroorganizmów niepożądanych, byłaby kultura starterowa w postaci kombinacji kilku szczepów drożdży wykazujących zróżnicowane właściwości antimikrobiologiczne. Dane literaturowe wskazują na większą częstość występowania reakcji wrażliwości na toksyny killerowe pomiędzy drożdżami izolowanymi z różnych lokalizacji i środowisk.

Celem niniejszej pracy było scharakteryzowanie aktywności killerowej drożdży, wyizolowanych z różnych środowisk podczas realizacji wcześniejszych prac badawczych.

## MATERIAŁY I METODY BADAŃ

### Mikroorganizmy

Materiał mikrobiologiczny stanowiły szczepy drożdży wyizolowane z różnych środowisk (odchody zwierząt gospodarskich żywionych metodami tradycyjnymi, kiszonki paszowe, owoce świeże i sfermentowane – jabłka, czereśnie, truskawki, wiśnie, porzeczki, winogrona, świeże mleko i spontanicznie fermentujące przetwory mleczne oraz mąka żytnia i jęczmienna, zakwasy piekarskie). Drożdże należały do gatunków *Saccharomyces cerevisiae*, *Hanseniaspora uvarum*, *Pichia fermentans*, *Issatchenkia orientalis*, *Candida kefir*, *Candida quilliermondii*, *Candida zeylanoides*, *Candida tropicalis*, *Candida utilis*, *Candida sphaerica*, *Candida pelliculosa*, *Candida krusei*, *Candida magnoliae*. Przynależność gatunkową szczepów drożdży określono na podstawie testu API 32 ID BioMérieux, następnie przeprowadzono identyfikację poprzez analizę 18S rDNA i ITS.

Wyniki aktywności killerowej porównywano z aktywnością wzorcowego szczepu killerowego *Wiliopsis saturnus* var. *mrakii* ATCC 10743 pierwotnie wyizolowanego z gleby.

**Tabela 1.** Drożdże stosowane w badaniach – źródło ich izolacji

Symbol w kolekcji	Źródło izolacji	Identyfikacja genetyczna
KKP 1619	mleko surowe	<i>Candida kefir</i>
MJ D <sub>2</sub>	mąka jęczmienna	<i>Candida krusei</i>
ZFD 03	zakwas piekarski	<i>Candida krusei</i>
ZFD 10	zakwas piekarski	<i>Candida krusei</i>
KKP 1621 T <sub>1</sub>	truskawki	<i>Candida quilliermondii</i>
KKP 1622 T2/12	truskawki	<i>Candida quilliermondii</i>
ZFD 16	zakwas piekarski	<i>Candida pelliculosa</i>
Jc	jabłka	<i>Candida sphaerica</i>
Sw 3	odchody świni	<i>Candida tropicalis</i>
K 1	odchody kozy	<i>Candida tropicalis</i>
Jr	jabłka	<i>Candida utilis</i>
K 3	mleko kozie	<i>Candida zeylanoides</i>
ZFD 04	mąka żytnia	<i>Candida zeylanoides</i>
KKP 1781	mleko	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
KKP 1778	obornik krowi	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
KKP 1775	porzeczki	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
KKP 1773	śliwki	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
KKP 1771	jabłka	<i>Issatchenkia orientalis</i>
KKP 1772	jabłka	<i>Issatchenkia orientalis</i>
KKP 1776	obornik krowi	<i>Issatchenkia orientalis</i>
KKP 1777	obornik krowi	<i>Issatchenkia orientalis</i>
KKP 1623 T7	truskawki	<i>Issatchenkia orientalis</i>
Champion	jabłka	<i>Kloeckera sp.</i>
KKP 905	NCAIM	<i>Kluyweromyces lactis</i>

KKP 1779	kiszonki paszowe	<i>Pichia fermentans</i>
KKP 1615	czereśnie	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
KKP 1616	czereśnie	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
KKP 1617 cz11	czereśnie	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
KKP 512	drożdże piekarskie	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
KKP 1780	mleko	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Pr 4	porzeczki	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
KKP 1774	porzeczki	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
KKP 1783	ser	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
KKP 1782	śmietana	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Regent	winogrona	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Solaris	winogrona	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Ws F3	wiśnie	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
ATCC 10743	gleba	<i>Wiliopsis saturnus var. mrakii</i>

### Podłoża

Do oceny aktywności killerowej i w celu optymalizacji warunków syntezy toksyn killerowych stosowano podłoża:

- YEPD (YPD): 2% glukoza, 1% ekstrakt drożdżowy, 2% pepton, 2% agar; pH 4,5,
- Podłoże MB to znaczy podłoże YEPD z dodatkiem błękitu metylenowego, w ilości 0,003%, którego pH doprowadzano, przy użyciu 0,2M buforu cytrynianowo-fosforanowego, do wartości 4,0; 4,2; 4,5 [Sangorrin i wsp. 2001; Sangorrin i wsp. 2007; Gulbinienė i wsp. 2004].

Toksyny wydzielane przez szczepy killerowe do podłoża agarowego zawierającego błękit metylenowy powodują powstawanie stref rozjaśnienia.

- YEPD z dodatkiem chlorku sodu, w stężeniach 1 i 8% [Hernandez i wsp. 2008].

## **Metody**

Szczepy drożdży przechowywane były w atmosferze ciekłego azotu, w temperaturze  $-195,8^{\circ}\text{C}$ . Hodowle drożdży do badań przygotowywano w podłożu płynnym YPD, w temperaturze  $30^{\circ}\text{C}$ . Inokulum stanowiły komórki drożdży z 24-godzinnych hodowli, napowietrzanych poprzez wytrząsanie.

Każdy szczep drożdży poddawano ocenie zarówno pod względem zdolności do syntezy toksyn killerowych, jak i wrażliwości na nie (fenotyp killerowy, fenotyp wrażliwy).

Oznaczanie aktywności killerowej albo wrażliwości na toksyny killerowe prowadzono w podłożach zawierających szczep drożdży testowany pod względem wrażliwości na toksyny, na które nanoszono szczepy potencjalnie killerowe. Liczebność komórek drożdży wprowadzanych do podłoża włącznie i nanoszonych powierzchniowo podano poniżej.

Podłoża (YEPD, MB) zaszczepiano drożdżami badanymi **pod względem wrażliwości** na toksyny killerowe, tak aby ich liczba wynosiła w zależności od serii doświadczeń  $10^3$  j.t.k./ml,  $10^5$  j.t.k./ml,  $10^6$  j.t.k./ml lub  $10^7$  j.t.k./ml.

Drożdże testowane pod względem **aktywności killerowej** nanoszono powierzchniowo w postaci liniowego posiewu eż i kropli ( $10\ \mu\text{l}$ ) zawiesiny drożdży zawierającej  $10^6$  j.t.k./ml [Sangorin i wsp.2001].

W celu porównania aktywności killerowej szczepów, na podłoże zaszczepione drożdżami potencjalnie wrażliwymi nanoszono zawiesiny drożdży ( $10\ \mu\text{l}$ ) zawierające wzrastającą liczbę komórek od  $10^4$  do  $10^{10}$  j.t.k./ml badanych pod względem właściwości killerowych.

Ocenę aktywności killerowej prowadzono w temperaturze  $20^{\circ}\text{C}$  i  $25^{\circ}\text{C}$ .

Efekt killerowy próbowano wzmocnić poprzez wprowadzenie do podłoża czynnika stresogenego w postaci chlorku sodu, w stężeniach 1% i 8% [Hernandez i in. 2008].

## **WYNIKI I DYSKUSJA**

Każdy z badanych szczepów drożdży oceniono zarówno pod względem aktywności killerowej, jak i wrażliwości na toksyny killerowe, kojarząc w doświadczeniach każdy szczep ze wszystkimi pozostałymi według wszystkich przedstawionych powyżej metod.

Wyniki otrzymane w efekcie wszystkich przeprowadzonych doświadczeń przedstawiono w tabeli 2., biorąc pod uwagę tylko szczepy drożdży przejawiające aktywność killerową.

**Tabela 2.** Aktywność killerowa i wrażliwość na toksyny killerowe drożdży

Fenotyp drożdży	killery	wrażliwe														
		<i>C. krusei</i> KKP 1776	<i>C. quilliermondii</i> KKP1622	<i>C. tropicalis</i> Sw.3	<i>C. tropicalis</i> K1	<i>H. uvarum</i> KKP 1773	<i>H. uvarum</i> KKP 1775	<i>I. orientalis</i> KKP 1623	<i>I. orientalis</i> KKP 1771	<i>P. fermentans</i> KKP 1779	<i>S. cerevisiae</i> KKP 1615	<i>S. cerevisiae</i> KKP 1616	<i>S. cerevisiae</i> KKP 1774	<i>S. cerevisiae</i> KKP 1780	<i>S. cerevisiae</i> KKP1782	<i>W. saturnus</i> ATCC 10743
<i>C. krusei</i> KKP 1776		+++			++											
<i>C. quilliermondii</i> KKP1622			+++													
<i>C. tropicalis</i> Sw.3				+++												++
<i>C. tropicalis</i> K1				+	+++											
<i>H. uvarum</i> KKP 1773						+++										
<i>H. uvarum</i> KKP 1775					+		+++									
<i>I. orientalis</i> KKP 1623				+				+++								
<i>I. orientalis</i> KKP 1771									+++							
<i>P. fermentans</i> KKP 1779				+						+++						+
<i>S. cerevisiae</i> KKP 1615											+++					++
<i>S. cerevisiae</i> KKP 1616												+++				++
<i>S. cerevisiae</i> KKP 1774		++											+++			++
<i>S. cerevisiae</i> KKP 1780														+++		+
<i>S. cerevisiae</i> KKP1782															+++	++
<i>W. saturnus</i> ATCC 10743																+++

+++ bardzo silne działanie killerowe

++ silne działanie killerowe

+ słabe działanie killerowe

- brak efektu killerowego

Zgodnie z literaturą próbowano wzmocnić efekt killerowy poprzez stosowanie podłoża z dodatkiem chlorku sodu. Nie zaobserwowano jednak pozytywnego wpływu NaCl na

właściwości killerowe badanych szczepów drożdży, natomiast stwierdzono, że dodatek soli powodował w niektórych przypadkach zahamowanie wzrostu drożdży. Można przypuszczać, że wzmożona synteza toksyn killerowych dotyczy drożdży halotolerancyjnych (opornych na wysokie stężenie soli w podłożu), ponieważ zaobserwowano to zjawisko w przypadku drożdży izolowanych z fermentowanych oliwek, w którym to procesie stosowana jest sól [Llorente i in. 1997; Hernandez i in. 2008].

Stwierdzono, że aktywność killerową, w różnym stopniu i wobec zróżnicowanej liczby szczepów, przejawiało 14 spośród badanych 39 drożdży, wyizolowanych z różnych środowisk. Najwyższą aktywnością killerową charakteryzował się szczep referencyjny *Wiliopsis saturnus* var. *mrakii* ATCC 10743, wyizolowany z gleby, ale i w przypadku tego szczepu nie wszystkie badane szczepy były wrażliwe na syntetyzowaną toksynę (4 spośród 14). Pozostałych 10 szczepów drożdży, zaprezentowanych w tabeli 2., przejawiało wrażliwość na toksynę *W. mrakii* w różnym stopniu. Najbardziej wrażliwe okazały się cztery szczepy należące do gatunku *Saccharomyces cerevisiae*, to jest: *S. cerevisiae* KKP 1774, *S. cerevisiae* KKP1782, *S. cerevisiae* KKP 1615, *S. cerevisiae* KKP 1616, a także *C. tropicalis* S, *P. fermentans* KKP 1779. Trzy spośród wrażliwych szczepów *S. cerevisiae* zostały wyizolowane z owoców.

Wiele szczepów reprezentuje fenotyp wrażliwy/killerowy, syntetyzując toksyny killerowe i same będąc wrażliwymi na toksyny killerowe innych drożdży. Dotyczy to m.in. szczepów drożdży wyizolowanych w winiarniach [Sangorin i in. 2001; Sagorin i in. 2007; Kapsopoulou i in. 2008]. Według Sangorin i współpracowników [2007] drożdże winiarskie charakteryzują się dość dużą niejednorodnością pod względem reprezentowanego typu killerowego. Według danych literaturowych aktywność killerową stwierdza się średnio wśród 2–25% izolatów winiarskich. Taka rozbieżność danych świadczy o różnicach w wynikach doświadczeń wśród badaczy [Van Vuuren, Jacobs 1992; Sangorin i in. 2007; Kapsopoulos i in. 2008; Barrajon i in. 2011].

Stosunkowo szeroka reprezentacja fenotypu wrażliwy/killerowy (5 spośród 12 szczepów) wśród drożdży gatunku *S. cerevisiae* badanych w niniejszej pracy w stosunku do innych gatunków jest zgodna z danymi literaturowymi.

Pośród omawianych szczepów drożdży fenotyp killerowy najsilniej przejawiał się w przypadku szczepów *Candida tropicalis* K1, *I. orientalis* KKP 1623, *C. tropicalis* Sw.3. Z kolei szczep *S. cerevisiae* KKP 1782 wykazywał słabszą aktywność killerową, ale wobec szerokiego spektrum szczepów wrażliwych. Szczep *C. krusei* KKP 1776 charakteryzował się

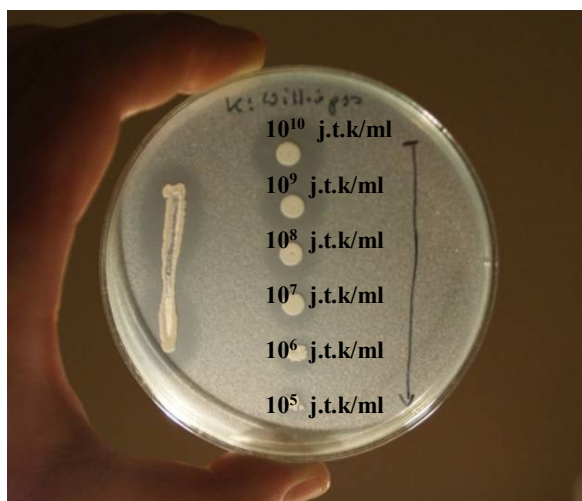


bardzo wysoką aktywnością antagonistyczną wobec szczepu *S. cerevisiae* KKP 1774 i słabą wobec trzech innych szczepów drożdży.

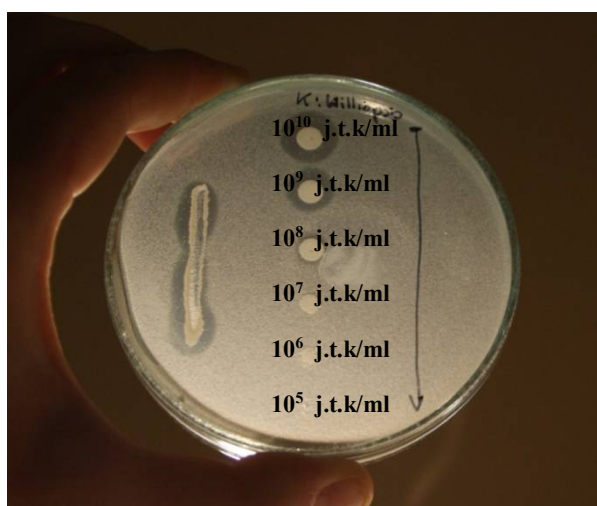
W wielu badaniach stwierdzono, że szczepy drożdży należące do tego samego gatunku różnią się fenotypem killerowym/wrażliwości na toksyny killerowe. Jako gatunki, wśród których znajdowano szczepy drożdży killerowych, najczęściej wymieniane są *Pichia anomala* (obecnie *Wickerhamomyces anomalus*), *Pichia kluyveri*, *Candida krusei*, *Kluyveromyces lactis*, *Pichia membranifaciens*, *Pichia guilliermondii*, *Debaromyces hansenii*, z kolei szczepów wrażliwych najwięcej było wśród gatunków *Saccharomyces cerevisiae*, *Dekkera bruxellensis*, *Sacharomyces ludwigii*, *Torulaspora delbrueckii* [Abranches i in.1997; Yap i in. 2000; Santos, Marquina 2004; Sangorriin i in. 2007; Hernandez i in. 2008]. Podane powyżej nazwy gatunków przytoczono zgodnie z pisownią w cytowanych publikacjach, jakkolwiek ich klasyfikacja aktualnie mogła ulec zmianie.

Biorąc pod uwagę uwarunkowaną czynnikami środowiska – pH, temperatura, obecność soli – możliwość ujawnienia się fenotypu killerowego/wrażliwości na toksyny killerowe, dobór warunków badania i szczepów wzorcowych (killerów i wrażliwych), w przypadku niektórych szczepów może spowodować niedoszacowanie lub nawet niestwierdzenie aktywności/oporności szczepów drożdży. Detekcja powinna zatem dotyczyć specyficznych zależności par szczep wrażliwy/killerowy oraz warunków badania [Hernandez i in. 2008].

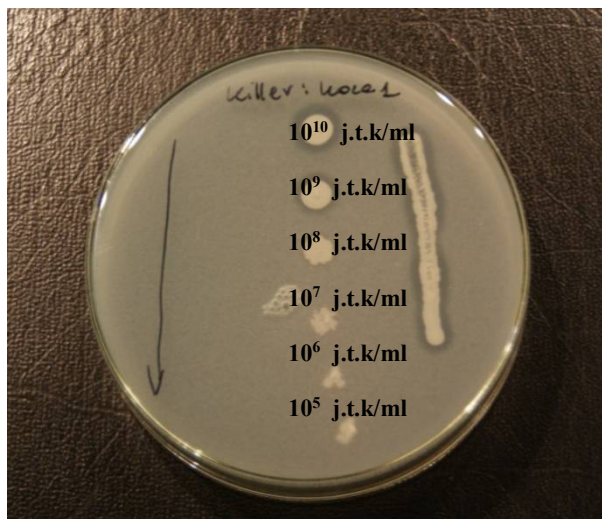
Podczas badań stwierdzono wyraźną zależność pomiędzy liczbą drożdży badanych pod względem aktywności killerowej a możliwością wykazania tej aktywności w sposób jednoznaczny. W przypadku niektórych szczepów dopiero stosunkowo duża liczba drożdży (rzędu  $10^9$ – $10^{10}$  j.t.k/ml) była niezbędna do zaobserwowania hamowania wzrostu drożdży wrażliwych. Efekt killerowy zależny od liczby drożdży w nanoszonej powierzchniowo zawieszynie a strefą zahamowania wzrostu drożdży wrażliwych w podłożu z buforem cytrynowo-fosforanowym przedstawiono na zdjęciach poniżej (fotografie 1, 2 i 3).



**Fotografia 1.** Aktywność killerowa *W. saturnus* var *mrakii* S. ATCC 10743 wobec szczepu *Saccharomyces cerevisiae* Solaris, efekt widoczny przy liczbie komórek drożdży naniesionych  $10^{10}$  j.t.k/ml,  $10^9$  j.t.k/ml aż do  $10^5$  j.t.k/ml



**Fotografia 2.** Aktywność killerowa *W. saturnus* var *mrakii* S. ATCC 10743 wobec szczepu *Hanseniaspora uvarum* KKP 1778, efekt widoczny przy liczbie komórek drożdży naniesionych  $10^{10}$  j.t.k/ml,  $10^9$  j.t.k/ml i  $10^8$  j.t.k/ml



**Fotografia 3.** Aktywność killerowa *Candida tropicalis* K1 wobec szczepu *Candida sphaerica* Jc, efekt widoczny przy liczbie komórek drożdży naniesionych  $10^{10}$  j.t.k/ml,  $10^9$  j.t.k/ml

Przedstawione fotografie pokazują ponadto, że nawet w przypadku szczepu referencyjnego *Williopsis saturnus* var. *mrakii* ATCC 10743 możliwość wykazania efektu killerowego zależy w dużym stopniu od wrażliwości drugiego szczepu stosowanego do badań. Fotografie 1. i 2. ilustrują różnice w aktywności killerowej szczepu *W. saturnus* var. *mrakii* S. ATCC 10743 badanej w tych samych warunkach doświadczalnych wobec drożdży *S. cerevisiae* Solaris i *Hanseniaspora uvarum* KKP1778.

Prowadzenie badań nad drożdżami killerowymi jest związane z ich potencjalnym zastosowaniem jako czynnika biokonserwującego w procesach produkcji żywności przebiegających z udziałem drożdży. Wyniki niniejszej pracy sugerują, że występowanie właściwości killerowych wśród drożdży izolowanych ze środowisk innych niż moszcze winiarskie nie jest powszechne.

### WNIOSKI

1. W badanej grupie drożdży, obejmujących szczepy wyizolowane z różnych środowisk, zaobserwowano stosunkowo dużą liczbę szczepów drożdży przejawiających właściwości killerowe (14 spośród badanych 39 drożdży), jednak była to aktywność słaba. Silne właściwości killerowe stwierdzono jedynie w przypadku w szczepu drożdży *Candida tropicalis* K1, wyizolowanego z odchodów kozy.
2. Wykonane badania potwierdziły spostrzeżenia innych autorów, że aktywność killerowa drożdży jest właściwością ujawniającą się w określonych warunkach hodowli, a także zależną od liczebności i wzajemnych proporcji drożdży potencjalnie killerowych

i wrażliwych. Dlatego też dobór metod badawczych istotnie wpływa na możliwość wykrycia aktywności killerowej każdego z badanych szczepów drożdży.

3. Wbrew danym literaturowym nie stwierdzono aktywności killerowej żadnego ze szczepów wyizolowanych z winogron i fermentujących moszczy, natomiast wszystkie te drożdże należały do wrażliwych. Prawdopodobnie przebadana pula szczepów drożdży pochodzących z tych środowisk była zbyt mała.

## PIŚMIENNICTWO

1. Abranches J., Morais P., Rosa C., Mendonça-Hagler L., Hagler A. (1997). The incidence of killer activity and extracellular proteases in tropical yeast communities. *Can. J. Microbiol.*, 43, 328-336
1. Barrajón N., Arévalo-Villena M., Úbeda J. (2011). Enological properties in wild and commercial *Saccharomyces cerevisiae* yeasts: relationship with competition during alcoholic fermentation. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 27, 2703-2710
2. Buzzini P., Martini A. (2001). Large scale screening of selected *Candida maltosa*, *Debaromyces hansenii* and *Pichia anomala* killer toxin activity against pathogenic. *Med. Mycol.*, 39, 479-482
3. Comitini F., Gobbi M., Domizio P., Romani C., Lencioni L., Mannazzu I., Ciani M. (2011). Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiol.*, 28, 873-882
4. Mendoza L., Raya R. R., Fariás M. (2011). Killer phenotype of indigenous yeasts isolated from Argentinian wine cellars and their potential starter cultures for winemaking. *Biotechnol. Lett.*, 33, 2177-2183
5. Gulbinienė G., Kondratienė L., Jokantaite T., Servienė E., Malvydas V., Petkuniene E. (2004). Occurrence of killer strains in fruit and berry wine yeast populations. *Food Techn. Biotechnol.*, 42 (3), 159-163
6. Gutiérrez A., Epifanio S., Garijo P., Lopez R., Santamaria P. (2001). Killer yeasts: incidence in the ecology of spontaneous fermentation. *Am. J. Enology Viticul.*, 52, 352-356
7. Hernandez A., Martin A., Cordoba M., Banito M., Arnada E., Perez-Nevado F. (2008). Determination of killer activity in yeast isolated from elaboration seasoned greek table olives. *In. J. Food Microbiol.*, 121, 178-188

8. Kapsopoulou K., Barouti E., Makrioniti A., Kostaki K. (2008). Occurrence of *Saccharomyces cerevisiae* killer yeasts in wine-producing areas of Greece. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 24, 1967-1971
9. Llorente P., Marquina D., Santos A., Peinado JM., Spencer-Martins I. (1997). Effect of salt on the killer phenotype of yeast from olive brine. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 1165-1167
10. Maqueda M., Zamora E., Álvarez M., Ramírez M. (2012). Characterization, Ecological Distribution, and Population Dynamics of *Saccharomyces Sensu Stricto* Killer Yeasts in the Spontaneous Grape Must Fermentations of Southwestern Spain. *Appl. Environ. Microbiol.*, 78 (3), 735-743
11. Petering J., Symons M., Langridge P., Henschke P. (1991). Determination of killer yeast activity in fermenting grape juice by using a marked *Saccharomyces* wine yeast Strain. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 3232-3236
12. Sangorrín M., Zajonskovsky I., Lopes C., Rodríguez M., Giraud M, Caballero A. (2001). Killer behaviour in wild wine yeasts associated with Merlot and Malbec type musts spontaneously fermented from Northwestern Patagonia (Argentina). *J Basic Microbiol.*, 41, 105-113
13. Sangorrin M., Lopes C., Giraud M., Caballero A. (2007). Diversity and killer behaviour of indigenous yeasts isolated from the fermentation vat surfaces in four Patagonian wineries. *Int. J. Food Microbiol.*, 119, 351-357
14. Santos A., Marquina J., Leal J., Peinado M. (2000). (1-6)-beta-D-glukan as Cell wall receptor for *Pichia membranifaciens* killer toxin. *Appl. Environ. Microbiol.*, 66, 1809-1813
15. Yap N. A., de Barros Lopes M., Langridge P., Henschke P. A. (2000). The incidence of killer activity of non-*Saccharomyces* yeasts towards indigenous yeast species of grape must: potential application in wine fermentation. *J. Appl. Microbiol.*, 89, 381-389
16. Van Vuuren, H., Jacobs C. (1992). Killer yeasts in the wine industry: a review. *Am. J. Enology Viticult.*, 43, 119-128