

Ewelina Pawlikowska\*, Dorota Kręgiel

Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii, Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności, Politechnika Łódzka

Wpłynęło w marcu, zaakceptowano w maju 2017 r.

1. Wstęp. 2. Taksonomia. 3. Ekologia. 4. Morfologia i fizjologia. 5. Cykl paraseksualny. 6. *Metschnikowia pulcherrima* – aktywność biochemiczna oraz potencjał aplikacyjny. 7. Podsumowanie

#### Non-conventional yeast *Metschnikowia pulcherrima* and its application in biotechnology

**Abstract:** *Metschnikowia* spp. are extensively studied “non-conventional” yeasts. Strains belonging to these genera are considered as non-pathogenic and safe. The unique properties of *Metschnikowia* spp. allow us to look at these microorganisms as a promising subject for evolutionary genetics, taxonomy, ecology, as well as a natural biocontrol agent in biotechnology. This article provides a synthesis of the systematics, morphology, ecology and physiology of *Metschnikowia* spp., with special attention to *M. pulcherrima*. These yeasts are able to produce a number of important metabolites, including organic acids, aroma compounds, oil or pulcherrimic acid. In addition, this review discusses possible applications of these non-conventional yeasts in biotechnology.

1. Introduction. 2. Taxonomy. 3. Ecology. 4. Morphology and physiology. 5. Parasexual cycle. 6. *Metschnikowia pulcherrima* – biochemical activity and application potential. 7. Summary

**Słowa kluczowe:** *Metschnikowia pulcherrima*, fermentacja, lipidy, biokontrola, pulcherrimina

**Key words:** *Metschnikowia pulcherrima*, fermentation, lipids, biocontrol, pulcherrimin

## 1. Wstęp

Drożdże są wykorzystywane przez człowieka już od starożytności. Pod względem badań oraz wykorzystania przemysłowego dominują konwencjonalne szczepy *Saccharomyces* sp., jednak w ostatnich latach można zaobserwować coraz większe zainteresowanie drożdżami należącymi do innych rodzajów. Drożdże niekonwencjonalne wykazują lepsze właściwości adaptacyjne do zmiennych warunków środowiskowych, są zdolne do metabolizowania nietypowych źródeł węgla, a więc i biosyntezy wielu unikalnych produktów.

## 2. Taksonomia

Drożdże *Metschnikowia* sp. zostały wyizolowane po raz pierwszy w 1884 roku. Wtedy to Ilja Metschnikoff w czasopiśmie „*Archiv für Pathologische Anatomie und Physiologie und für Klinische Medizin*” opisał pewien gatunek mikroorganizmów i nazwał go *Monospora bicuspidata*. Szczególną uwagę zwrócił on na charakterystyczne zarodniki w kształcie igieł, które jak później wykazano, stanowiły istotny element pasożytnictwa tych drożdży w organizmie rozwielitek *Daphnia* sp. [31, 43, 48, 73]. W 1899 roku Kamiński zmienił nazwę rodzajową *Monospora* na *Metschnikowia*, ponie-

waż pierwsza z nich była już stosowana w nazewnictwie glonów. Gdy okazało się, że nazwa *Metschnikowia* była również stosowana wcześniej dla innej grupy organizmów, w 1913 roku Genkel zaproponował zmianę nazwy na *Metschnikowiella* [44]. Prace nad taksonomią tych mikroorganizmów rozwijały się systematycznie od lat 20. XX wieku, ale warto zauważyć, że do lat 70. stosowano aż cztery nazwy rodzajowe dla tych charakterystycznych drożdży: *Metschnikowiella*, *Monosporrella*, *Monospora* oraz *Metschnikowia* [67]. Taksonomia szczepów w obrębie rodzaju *Metschnikowia* podlegała ciągłym, dynamicznym zmianom. Mikrobiolodzy Miller i Phaff w 4. edycji „*The Yeasts. A Taxonomic Study*” opisali 10 gatunków należących do *Metschnikowia* sp.: *M. agaves*, *M. australis*, *M. bicuspidata*, *M. gruessii*, *M. hawaiiensis*, *M. krissii*, *M. lunata*, *M. pulcherrima*, *M. reukaufii*, *M. zobelii* [44]. Trzydzieści lat później 5. edycja tego wydawnictwa opisywała już dodatkowe 29 gatunków: *M. aberdeeniae*, *M. andauensis*, *M. arizonensis*, *M. borealis*, *M. cerradonensis*, *M. chrysoperlae*, *M. colocasiae*, *M. continentalis*, *M. corniflorae*, *M. dekoratum*, *M. drosophilae*, *M. fructicola*, *M. hamakuensis*, *M. hibisci*, *M. kamakouana*, *M. koreensis*, *M. kunwiensis*, *M. lachancei*, *M. lochheadii*, *M. mauinuiana*, *M. noctiluminum*, *M. orientalis*, *M. santaceciliae*, *M. shanxiensis*, *M. similis*, *M. sinensis*, *M. vanudenii*, *M. viticola*, *M. ziziphicola* [30]. Obecnie analizując rodzaj *Metschnikowia*

\* Autor korespondencyjny: Ewelina Pawlikowska, Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii, Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności, Politechnika Łódzka, ul. Wólczajska 171/173, 90-924 Łódź; e-mail: ewelina.pawlikowska@dokt.p.lodz.pl

można doliczyć się aż 49 gatunków, gdyż do rodzaju *Metschnikowia* dołączyły: *M. bowlesiae*, *M. caudata*, *M. chrysomelidarum*, *M. cibodasensis*, *M. colchici*, *M. cubensis*, *M. drakensbergensis*, *M. henanensis*, *M. ipomoeae*, *M. laotica*, *M. matae*, *M. shivogae*, *M. unicuspidata* [22, 23, 53]. Rodzaj *Metschnikowia* tworzy zasadniczą część rodziny *Metschnikowiaceae*, obok kilkudziesięciu innych gatunków z rodzajów *Clavispora* i *Candida*, których taksonomia wymaga wyjaśnienia i weryfikacji na podstawie pełnych danych genomów [21, 31].

Wraz z rozwojem prac nad taksonomią drobnoustrojów miał miejsce również systematyczny postęp w procedurach diagnostycznych [33, 53]. Od czasów badań Ilji Metschnikoff'a aż do lat 60. XX wieku procedury identyfikacyjne polegały wyłącznie na ocenie cech morfologicznych i fizjologicznych mikroorganizmów. Warto tu jednak wspomnieć, że szczepy z rodzaju *Metschnikowia* wykazują wiele cech wspólnych do gatunków z rodzaju *Clavispora*, *Pichia* czy *Chlamydomyza*. Podobne cechy morfologiczne i fizjologiczne wykazują także niektóre gatunki *Candida* sp. (*C. hawaiiiana* i *C. kipukae*, *C. kofuensis*) [32, 52].

Jeden z podstawowych elementów diagnostycznych drożdży, jakim jest udział zasad G+C w genomowym DNA, ocenia się obecnie jako mało precyzyjny, ze względu na fakt występowania u drożdży wartości bardzo zróżnicowanych, wynoszących od 27 mol% do nawet 70 mol%. Zatem sytuacja, w której ma miejsce „nakładanie się” tych wartości wśród niespokrewnionych gatunków jest nieunikniona. Udział G+C w DNA u drożdży z gromady *Ascomycota* wynosi 27–50 mol%, natomiast wśród *Basidiomycota* 50–70 mol%. Ze względu na dość wąski zakres wartości wspólnych (48–52 mol%) diagnostykę drożdży można uzupełnić poprzez analizę struktury ściany komórkowej za pomocą transmisyjnego mikroskopu elektronowego lub poprzez wykorzystanie klasycznego testu B z błękitem diazoniowym. Zakres zawartości zasad G+C wśród gatunków w obrębie rodzaju *Metschnikowia* wynosi często mniej niż 10 mol%. Rodzaje, u których zakres tych par zasad jest większy niż 10 mol% mogą być uznane za polifiletyczne, jednak warto podkreślić, że węższy zakres nie decyduje o monofiletyzmie [28].

Analizę genetyczną można wykonać także w oparciu o rybosomalny RNA. W 1993 roku Mendonça-Hagler i wsp. dokonali analizy filogenetycznej gatunków przypisanych do rodzaju *Metschnikowia*, badając sekwencje rybosomalnego rRNA [42]. Stwierdzili oni różnice u gatunków należących do tego rodzaju w porównaniu do innych *Ascomycetes* powstałe w wyniku delecji w dużej podjednostce rRNA (25S), obejmującej nukleotydy od 434 do 483. Podobne prace były prowadzone w Japonii przez zespół Yamada, który analizował relacje filogenetyczne między gatunkami rodzaju *Metschnikowia* na podstawie analizy 18S i 26S rRNA [72].

Obecnie stosowane metody molekularne, pozwalające na dokonanie możliwie najbardziej precyzyjnej charakterystyki taksonomicznej drożdży, opierają się także na analizie konserwatywnych sekwencji DNA i białek. Najczęściej stosowane są te sekwencje powtórzeń fragmentów rDNA, gdyż powszechnie przyjmuje się, że są one identyczne w obrębie gatunku, a więc mogą być wykorzystywane do szacowania przynależności gatunkowej drożdży [15]. Sipiczki i wsp. wykazali jednak, że sekwencje gatunkowe rDNA u *Metschnikowia* sp. nie są homogenne i mogą składać się z różnych powtórzeń oraz zmian w domenach D1/D2 [61]. Z kolei Seino i wsp. analizowali powtarzające się kilkunukleotydowe sekwencje DNA u *M. reukaufii*, a wykryte różnice świadczyły o zmienności osobniczej w obrębie gatunku [58]. Zatem analiza filogenetyczna drożdży z rodzaju *Metschnikowia*, zwłaszcza tych nowo izolowanych, może okazać się trudna, zwłaszcza gdy izolaty pochodzą z różnych środowisk geograficznych, znacznie od siebie odległych [34].

### 3. Ekologia

Drożdże z rodzaju *Metschnikowia*, podobnie jak inne rodzaje drożdży, nie występują losowo w całej biosferze, lecz tworzą zbiorowiska, w skład których wchodzi mikroorganizmy należące do różnych rodzajów i gatunków. Niektóre gatunki są typową mikrobiotą roślin i owadów, a inne są patogenami zwierząt wodnych (Tabela I) [11]. Warto również wspomnieć, że niektóre gatunki *Metschnikowia* sp. są izolowane w każdej strefie klimatycznej, zaś inne charakteryzuje skrajny endemizm, gdyż zajmują jedynie określone, bardzo specyficzne nisze ekologiczne [31].

Mendonça-Hagler i wsp., analizując już w latach 90. różnice filogenetyczne w obrębie rodzaju *Metschnikowia*, uznali znane wówczas gatunki *M. australis*, *M. bicuspidata*, *M. krissii* i *M. zobellii* za typowo „wodne”, tzn. bytujące w wodach morskich i słodkich, natomiast gatunki *M. hawaiiensis*, *M. lunata*, *M. pulcherrima* i *M. reukaufii* jako typowo „lądowe”, występujące jako naturalna mikrobiota kwiatów, owoców i owadów [42]. W 2011 roku Naumow wyróżnił już 3 odrębne grupy drożdży z rodzaju *Metschnikowia*. Pierwsza z nich obejmuje gatunki bytujące w środowiskach wodnych: *M. bicuspidata*, *M. australis*, *M. zobellii* i *M. krissii*, druga to gatunki najczęściej izolowane jako mikrobiota owoców, kwiatów i owadów: *M. pulcherrima*, *M. reukaufii*, *M. andauensis*, *M. chrysoperlae*, *M. fruticola*, *M. shanxiensis*, *M. koreensis*, *M. lachancei*, *M. noctiluminum*, *M. vanudenii* oraz *M. viticola*. Dodatkowo można dołączyć do tej grupy drożdże tworzące niewielkie zarodniki: *M. corniflorae*, *M. kunwiensis* i *M. lunata*. Trzecią grupę stanowią gatunki klimatu tropikalnego,

Tabela I  
Ekologia drożdży z rodzaju *Metschnikowia*

Środowisko naturalne	Gatunek	Pierwsze doniesienie
Wodne	<i>Metschnikowia bicuspidata</i>	Metschnikoff, 1884
	<i>M. krissii</i>	van Uden i Castelo-Branco, 1961
	<i>M. zobellii</i>	van Uden i Castelo-Branco, 1961
Łądowe	<i>M. aberdeeniae</i>	Lachance i wsp., 2006
	<i>M. agaves</i>	Lachance, 1993
	<i>M. andauensis</i>	Manso i Nunes, 2011
	<i>M. caudata</i>	de Vega i wsp., 2014
	<i>M. chrysolidarum</i>	Nguyen i wsp., 2006
	<i>M. chrysoperlae</i>	Suh i wsp., 2004
	<i>M. cibodasensis</i>	Sjamsuridzal i wsp., 2013
	<i>M. colchici</i>	Gouliamova i wsp., 2015
	<i>M. corniflorae</i>	Nguyen i wsp., 2006
	<i>M. drakensbergensis</i>	de Vega i wsp., 2014
	<i>M. drosophilae</i>	Lachance i wsp., 2001
	<i>M. fructicola</i>	Kurtzman i Droby, 2001
	<i>M. gruessii</i>	Giménez-Jurado, 1992
	<i>M. henanensis</i>	Hui i wsp., 2013
	<i>M. hibisci</i>	Lachance i wsp., 1998
	<i>M. kunwiensis</i>	Brysch-Herzberg, 2004
	<i>M. lachancei</i>	Giménez-Jurado i wsp., 2003
	<i>M. laotica</i>	Sipiczki, 2014
	<i>M. lunata</i>	Golubev, 1978
	<i>M. noctiluminum</i>	Nguyen i wsp., 2006
	<i>M. orientalis</i>	Lachance i wsp., 2006
	<i>M. pulcherrima</i>	Pitt i Miller, 1968
	<i>M. reukaufii</i>	Pitt i Miller, 1968
	<i>M. shanxiensis</i>	Xue i Zhang, 2006
	<i>M. shivogae</i>	Lachance i wsp., 2008
	<i>M. sinensis</i>	Xue i wsp., 2006
	<i>M. unicuspidata</i>	Keilin, 1920, van Uden, 1962
	<i>M. vanudenii</i>	Giménez-Jurado i wsp., 2003
<i>M. viticola</i>	Péter i wsp., 2005	
<i>M. ziziphicola</i>	Xue i wsp., 2006	
Tropikalne	<i>M. arizonensis</i>	Lachance oraz Bowles, 2002
	<i>M. bowlesiae</i>	Lachance, 2013
	<i>M. cerradonensis</i>	Rosa i wsp., 2007
	<i>M. colocasiae</i>	Lachance i Bowles, 2004
	<i>M. continentalis</i> <i>M. continentalis</i> var. <i>continentalis</i>	Lachance i wsp., 1998
	<i>M. cubensis</i>	Fidalgo-Jimenez i wsp., 2008
	<i>M. dekortorum</i>	Lachance i Bowles, 2002
	<i>M. hamakuensis</i>	Lachance M., 2005
	<i>M. hawaiiensis</i>	Lachance i wsp., 1990
	<i>M. ipomoeae</i>	Lachance i wsp., 1998
	<i>M. kamakouana</i>	Lachance, 2005
	<i>M. lochheadii</i>	Lachance i wsp., 2001
	<i>M. matae</i>	de Oliveira Santos i wsp., 2015
	<i>M. mauinuiana</i>	Lachance, 2005
	<i>M. santaceciliae</i>	Lachance i wsp., 2003
	<i>M. similis</i>	Lachance i Bowles, 2004

Na podstawie [23, 30, 49]

charakteryzujące się tworzeniem zarodników o szczególnie dużych rozmiarach [29, 48]. Według de Oliveira-Santos'a „grupa tropikalna” drożdży *Metschnikowia* sp., których askospory osiągają długość nawet 17 µm, liczy kilkanaście gatunków: *M. arizonensis*, *M. bowlesiae*, *M. cerradonensis*, *M. colocasiae*, *M. continentalis*, *M. continentalis* var. *continentalis*, *M. cubensis*, *M. dekortorum*, *M. hamakuensis*, *M. hawaiiensis*, *M. ipomoeae*, *M. kama-kouana*, *M. lochheadii*, *M. matae*, *M. mauiuiana*, *M. santaceiliae*, *M. similis* [23, 49]. Są one najczęściej izolowane jako mikrobiota owadów odwiedzających efemeryczne kwiaty, a większość z nich jest endemicznie związana z określonymi regionami geograficznymi [33].

Gatunki „ładowe” z rodzaju *Metschnikowia*, obok innych rodzajów drożdży, np. *Candida*, *Hanseniasspora*, *Kloeckera* oraz *Pichia* występują na powierzchni skórki zdrowych owoców, a ich poziom wynosi 10–10<sup>3</sup> jtk/cm<sup>2</sup>. Charakteryzują się one wysoką odpornością na wysuszenie, światło słoneczne, czy też wahania temperatury. Drożdże *M. pulcherrima* rzadko powodują psucie świeżych owoców, za proces ten odpowiedzialne są głównie grzyby strzępkowe. Drożdże *Metschnikowia* sp., występując jako naturalna mikrobiota owoców, są nieodłącznie związane z mikrobiotą moszczy i win. Uczestniczą one w pierwszym etapie spontanicznej fermentacji, kiedy to mogą stanowić nawet 18% populacji drożdży uczestniczących w tym procesie [1, 47].

W ekosystemach lądowych drożdże z rodzaju *Metschnikowia* uczestniczą w złożonych relacjach z innymi organizmami. Główne czynniki, które mogą kształtować złożone konsorcja drożdży opisali Starmar i wsp. na przykładzie systemu roślina-drożdże-*Drosophila* [64]. Pierwszym czynnikiem kształtującym takie relacje jest specyficzność, ponieważ owady żywią się tylko niektórymi gatunkami roślin. Drożdże rozwijają się w fytosferze roślin tylko wtedy, gdy w tkance gospodarza nie będzie obecnych związków toksycznych, takich jak np. saponiny (amensalizm). Ponadto mikrobiota już obecna w tkance roślinnej, może oddziaływać na nowo wprowadzane do nich gatunki (interakcje międzydrobnoustrojowe). W niektórych przypadkach interakcje mają charakter mutualistyczny, lecz w innych może dochodzić do konkurencji o składniki odżywcze [16].

Ciekawym przykładem mutualizmu jest związek pomiędzy drożdżami z rodzaju *Metschnikowia* i małymi (2–6 mm) owadami z rodziny *Nitidulidae*. Charakter tej symbiozy nie jest jeszcze do końca wyjaśniony, lecz wyniki wstępnych eksperymentów sugerują, że dorosłe chrząszcze mogą przetrwać bez tych mikroorganizmów w środowisku bogatym w substancje odżywcze, ale przeżycie larw zależy już od obecności komórek drożdży [32].

Wodne gatunki *Metschnikowia* sp. występują dość powszechnie w morzach i oceanach, choć ich liczebność nie jest tak duża jak bakterii. Gatunki należące

do tego rodzaju stanowią mikrobiotę morskich bezkręgowców, ryb oraz alg. Badania wskazują na możliwe relacje symbiotyczne między omawianymi drożdżami, a organizmami wodnymi. Jednak niektóre gatunki *Metschnikowia* sp. mogą być chorobotwórcze dla ryb i planktonowych skorupiaków, stanowiąc np. pasożyty rozwielitek *Daphnia* sp. [46]. Doniesienia literaturowe na ten temat są jednak nieliczne, gdyż występowanie interakcji między drożdżami i organizmami wodnymi nie było tak intensywnie badane jak w przypadku organizmów lądowych. Jako pierwszy pasożytnictwo drożdży *M. bicuspidata* wykrył Metschnikoff, który zaobserwował, że ich komórki wytwarzają charakterystyczne długie askospory w formie igieł. Wnikają one do rozwielitek jako gospodarza przez co ich spory mogą znajdować się w każdej części organizmu tych małych skorupiaków, nawet w czułkach. Zainfekowane rozwielitki w późnych stadiach zakażenia stają się opalizująco białe i wyglądają tak, jakby były wypełnione słomą. Infekcje drożdżami *M. bicuspidata* u *Daphnia* sp. trwają zwykle 2–3 tygodnie i kończą się najczęściej śmiercią gospodarza. W czasie infekcji zdolność *Daphnia* sp. do rozmnażania ulega znacznej redukcji i postępuje wraz z rozwojem zakażenia [13, 44].

#### 4. Morfologia i fizjologia

Komórki wegetatywne drożdży z rodzaju *Metschnikowia* charakteryzuje bardzo zróżnicowana morfologia. Mogą być one kuliste, elipsoidalne, owalne, w kształcie gruszki lub wydłużone, występujące pojedynczo, w parach lub czasami w krótkich łańcuchach. Ich rozmiary są również bardzo zróżnicowane, wynosząc od 2–8 µm szerokości do 3–35 µm długości [62]. Kształt komórek jest specyficzny dla niektórych gatunków, np. komórki w kształcie półksiężyca tworzy *M. lunata*, a bardzo wydłużone komórki *M. gruessii* występują w grupach po 3 lub 4, tworząc charakterystyczne „trójkąt” lub „samoloty” [18].

Komórki drożdży rozmnażają się wegetatywnie przez pączkowanie wieloboczne, tworzą słabo rozbudowaną pseudogrzybnie, ale nie tworzą mycelium. W starszych hodowlach tworzone są chlamydospory, odznaczające się grubszą ścianą i występowaniem jednej lub kilku kuleczek tłuszczu. Pozostaje kwestią otwartą odporność chlamydospor na warunki stresogenne, natomiast, w odróżnieniu od innych rodzajów, chlamydospory *Metschnikowia* sp. dają początek zarówno aktywnym, pączkującym komórkom wegetatywnym, jak i tworzeniu worków z zarodnikami (1–2). Gatunki *Metschnikowia* sp. tworzą charakterystyczne długie askospory w kształcie igły, a same worki z zarodnikami są o wiele większe niż komórki wegetatywne. U gatunków *M. pulcherrima*, *M. reukauffii* i *M. koreen-*

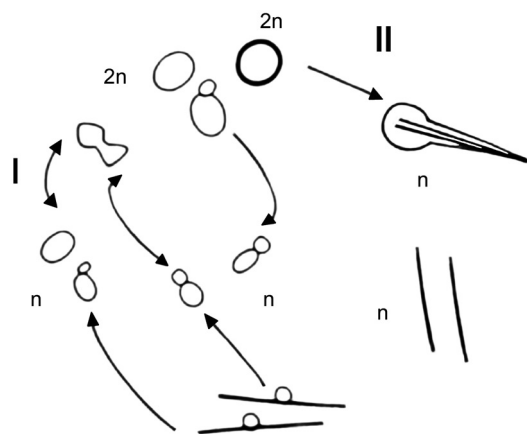
sis tworzenie zarodników jest poprzedzone przejściem komórek diploidalnych w chlamydospory. Ta podwójna rola tzw. „pulcherrima cells”, funkcjonujących zarówno jako chlamydospory, jak i komórki macierzyste dla worków, jest unikalną cechą wśród drożdży [31].

Gatunki należące do tzw. „grupy tropikalnej” wytwarzają zarodniki, których rozmiary są nie tylko do 50 razy większe od pączkujących komórek wegetatywnych, ale także same worki mają charakterystyczne helikalnie ułożone wypustki [33, 49]. Charakterystyczna morfologia askospor sugeruje, iż kształt igły może być wynikiem adaptacji środowiskowej. Niewykluczone, że kształt ten odgrywa istotną rolę w procesie inwazji drożdży w komórkach gospodarza, choć niewiele jest dowodów na to, że gatunki inne niż *M. bicuspidata* wykorzystują unikalny kształt askospor dla adaptacji do różnorodnych warunków środowiskowych [12, 30].

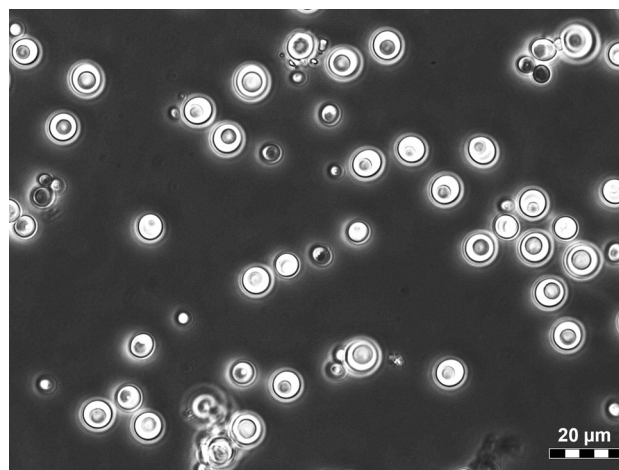
Sporulacja omawianych drożdży jest najlepiej widoczna na naturalnym podłożu agarowym V8, inaczej niż u drożdży *Saccharomyces*, dla których stosuje się zwykle syntetyczny agar octanowy. Unikalna kompozycja pożywki V8, złożonej z soków warzywnych, zapewnia odpowiednie składniki odżywcze ułatwiające wywołanie i utrzymanie pełnego procesu seksualnego. Warto zaznaczyć, że u większości gatunków *Metschnikowia* optymalna temperatura dla zarodnikowania jest niższa od optymalnej temperatury wzrostu i wynosi 12–17°C [30].

## 5. Cykl paraseksualny

Podstawowy materiał genetyczny mieszczący się w haploidalnych komórkach drożdży z rodzaju *Metschnikowia* zawarty jest w dwóch chromosomach o wielkości 1,8 Mb (I) i 2,0 Mb (II) [9]. Udowodniono, że w obrębie niektórych szczepów diploidalnych *Metschnikowia* sp., np.: *M. bicuspidata*, *M. pulcherrima* i *M. reukaufii* możliwe jest istnienie zarówno komórek haplo-, jak i diploidalnych (Rys. 1) [48]. Po kopulacji komórek



Rys. 1. Cykl życiowy drożdży *Metschnikowia* sp. (opis w tekście)



Rys. 2. Chlamydospory drożdży *M. pulcherrima* z widocznymi kropelkami tłuszczu

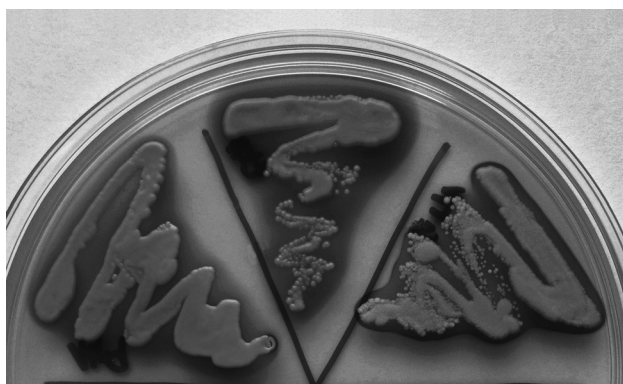
występuje faza heterokarionów, która może mieć różną długość, w zależności od szczepu i warunków hodowli. Heterokarion o haploidalnych jądrach może generować haploidalne komórki przeciwnych typów lub, po kariogamii, mogą tworzyć się komórki diploidalne.

Badając cykl komórkowy gatunków z rodzaju *Metschnikowia* stwierdzono, że *M. drosophilae*, *M. orientalis*, *M. agaves* oraz gatunki izolowane w strefie klimatu tropikalnego są haploidalne, heterotaliczne i ulegają fuzji. Z kolei komórki *M. bicuspidata* mogą istnieć zarówno jako diploidalne, jak i haploidalne [31]. Występujące zmiany w poszczególnych fazach cyklu życiowego *Metschnikowia* sp. mogą być związane z ich zróżnicowaną ekologią, np. występowaniem w środowiskach słodkich substratów roślinnych lub w organizmach owadów [48].

## 6. *Metschnikowia pulcherrima* – aktywność biochemiczna oraz potencjał aplikacyjny

Drożdże z gatunku *Metschnikowia pulcherrima* są gatunkiem „ładowym”, dość często izolowanym jako typowa mikrobiota owoców, kwiatów oraz soków roślinnych. Komórki wegetatywne są kuliste lub elipsoidalne o wymiarach 2,5–6 µm szerokości na 4–10 µm długości. W starszych hodowlach widoczne są kuliste komórki zawierające jedną lub kilka kropel tłuszczu (Rys. 2). Kolonie rosnące na agarze słodowym przybierają barwę kremową, ale w obecności jonów Fe<sup>3+</sup> ich kolor zmienia się na czerwonawo-brązowy, wskutek wytwarzania barwnika pulcherriminowego, który zwykle dyfunduje do podłoża (Rys. 3) [53, 60].

W hodowlach tlenowych *M. pulcherrima* nie tworzy pseudomycelium, natomiast szczątkową pseudogryźnię może wytwarzać w warunkach ograniczonego dostępu tlenu. Starsze komórki wegetatywne przekształcają się w sferyczne chlamydospory, z których z kolei powstają wydłużone, cylindryczne worki o wymiarach



Rys. 3. Tworzenie barwnika – pulcherrimini przez drożdże *Metschnikowia pulcherrima* w obecności soli  $\text{FeCl}_3$

(4–11) × (15–55)  $\mu\text{m}$ . Zwykle zawierają one jeden lub dwa zarodniki w kształcie igły [31, 45].

*M. pulcherrima* asymiluje glukozę, galaktozę, sorbozę, sacharozę, maltozę, celobiozę, trehalozę, melezytozę, czasem rybozę. Drożdże te są także zdolne do wykorzystywania etanolu, glicerolu, mannitolu, salicyny i heksadekanu. Inne źródła węgla, np.: inulina, rafinoza, laktoza, skrobia, ramnoza, arabinoza, metanol, erytrytol, inozytol i kwas glukuronowy nie są przez nie przyswajane. Mimo dość szerokiego spektrum asymilowanych źródeł węgla, fermentują jedynie glukozę, fruktozę, czasami galaktozę. Udział zasad G+C w DNA tego gatunku wynosi 45,6% [30].

Głównymi związkami azotu wykorzystywanymi przez drożdże są wolne aminokwasy i nieorganiczne związki amonowe. Są one asymilowane, umożliwiając wzrost drożdży, produkcję wyższych alkoholi, kwasów organicznych oraz estrów. Drożdże *Metschnikowia* sp. nie asymilują azotanów, ale mogą wykorzystywać etyloaminę oraz lizynę [30, 44]. Warto podkreślić, że omawiane drożdże są zdolne do produkcji pozakomórkowych proteaz i lipaz, a cecha ta odgrywa ważną rolę w adaptacji komórek do warunków środowiskowych, tworzeniu związków aromatu oraz ich aktywności anty-drobnoustrojowej [30].

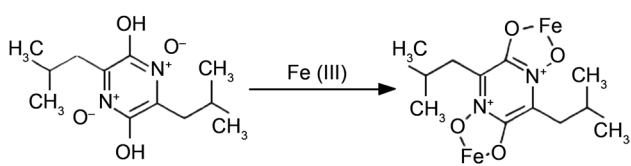
### Amensalizm, pulcherrimina i procesy biokontroli

Drożdże *Metschnikowia* sp. charakteryzuje wyjątkowa zdolność do wygrywania konkurencji z innymi mikroorganizmami o kolonizację określonych nisz ekologicznych. Antagonistyczne własności tych drożdży można wytłumaczyć: (1) konkurencją o składniki odżywcze, (2) zmianą pH środowiska wskutek produkcji kwasów organicznych, (3) tolerancją komórek na etanol oraz (4) wydzielaniem i uwalnianiem pozakomórkowych związków anty-drobnoustrojowych [47, 63]. Drożdże-antagoniści, namnażając się w środowisku, nie tylko ograniczają pulę łatwo dostępnych składników pokarmowych, ale także zmniejszają potencjalną prze-

strzeń życiową dla innych drobnoustrojów, co w efekcie wpływa na ograniczenie ich rozwoju [20].

Stwierdzono, że drożdże *Metschnikowia* sp. charakteryzują się dość silną aktywnością przeciwwgrzybiczą, wykazując zdecydowanie słabszy antagonizm w stosunku do bakterii i pierwotniaków [2, 33, 35]. Kilka wcześniejszych doniesień dotyczących wytwarzania toksyn killerowych przez te drożdże, zostało ostatnio zweryfikowanych. Wskazano, że w wielu przypadkach działanie antybakteryjne *M. pulcherrima* wywołane jest zmianą pH środowiska wskutek produkcji kwasów organicznych, natomiast antagonizm w stosunku do drożdży oraz pleśni związany jest głównie z produkcją kwasu pulcherriminowego wiążącego deficytowe żelazo [50]. Występowanie aktywności killerowej zostało potwierdzone u rodzajów: *Saccharomyces*, *Debaryomyces* (*Schwanniomyces*), *Kluyveromyces*, *Zygosaccharomyces*, *Pichia*, *Williopsis*, *Saccharomycodes*. Warto jednak tutaj wspomnieć, że drożdże *Metschnikowia* sp. wykazują oporność na toksyny killerowe [20].

Na unikatowe zdolności *M. pulcherrima* do wygrywania konkurencji z innymi drobnoustrojami o miejsce w środowisku i związaną z nimi produkcję zabarwionych na czerwono związków wskazał już w 1959 roku MacWilliam [38]. Cook zidentyfikował czerwony barwnik jako sól kwasu pulcherriminowego [8]. Kwas ten jest wydzielany przez komórki do środowiska zewnętrznego, a tam z jonami żelaza (III) tworzy kompleks o czerwonym zabarwieniu (Rys. 4) [41]. Według Naumowa zdolne do tworzenia kwasu pulcherriminowego są tylko komórki haploidalne *Metschnikowia pulcherrima*. Obserwował on bowiem powstawanie czerwonych mikroobszarów w białych koloniach drożdży diploidalnych [48].



Rys. 4. Tworzenie pulcherrimini w reakcji kompleksowania jonów  $\text{Fe}^{3+}$  i kwasu pulcherriminowego

Pulcherrimina może być produkowana również przez niektóre gatunki bakterii z rodzaju *Bacillus* (*B. licheniformis*, *B. subtilis*) oraz szczepy drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Produkcja barwnika ma miejsce w pożywkach zawierających sole żelaza (III), ale ubogich w biotynę i inne potrzebne stymulatory wzrostu [3, 8, 26, 60, 68]. Inne drożdże, np. *Rhodotorula* sp. i *Sporobolomyces* sp. również charakteryzują się wytwarzaniem czerwonych barwników, jednak związki te odbiegają znacznie od pulcherrimini, zarówno pod względem budowy, jak i właściwości. Pulcherrimina jest praktycznie nierozpuszczalna w wodzie, kwasach

i typowych rozpuszczalnikach organicznych. Związek ten rozpuszcza się natomiast dość dobrze w silnych roztworach alkalicznych, a dodatek kwasu powoduje ponowne zmniejszenie jej rozpuszczalności i wytrącanie z roztworu. Procedura otrzymywania pulcherrimy, opisana została już w 1953 roku przez Kluyver'a i wsp. Pozwoliła ona na otrzymanie 250–300 mg barwnika ze 100 g mokrej biomasy drożdży [26].

Uważa się, że reakcja kompleksowania kwasu pulcherriminowego i jonów żelaza Fe (III) wyczerpuje dostępność tych jonów w środowisku. Żelazo jest ważnym pierwiastkiem dla wzrostu wszystkich organizmów żywych, zatem jego niedobór w środowisku stymuluje mechanizmy konkurencji. Zdolność do produkcji związków o niskiej masie cząsteczkowej warunkuje taką przewagę w konkurencyjnym nabyciu jonu żelazowego [6]. Właśnie brakiem jonów  $Fe^{3+}$  tłumaczy się zahamowanie wzrostu drożdży „dzikich”, zanieczyszczających środowiska roślinne, choć nie wyklucza się występowania również innych mechanizmów antagonistycznego działania *M. pulcherrima* [57]. Istnieją bowiem dowody wskazujące, że omawiane drożdże wydzielają także enzymy lityczne, np. chitynazę, co może wiązać się z ich właściwościami antydrabnoustrojowymi [66].

Stwierdzono, że obecność  $CaCl_2$  i  $NaHCO_3$  w środowisku ma pozytywny wpływ na potencjał antagonistyczny szczepów *Metschnikowia* sp. [10]. Macarisin i wsp. wykazali, że szczepy omawianych drożdży generują wysoki poziom nadtlenu na powierzchniach nienaruszonych owoców. Taka odpowiedź oksydacyjna drożdży może być elementem antagonistycznych zachowań *M. pulcherrima* w stosunku do innych drobnoustrojów [37].

Różne szczepy *M. pulcherrima* zostały uznane jako wysoce skuteczny środek kontroli biologicznej przeciwko licznym gatunkom grzybów atakujących owoce i warzywa, np. *Penicillium expansum* i *Botrytis cinerea* [24, 60]. Antagonistyczne działanie omawianych drożdży zostało także odnotowane dla innych rodzajów grzybów: *Candida*, *Aspergillus*, *Trichosporon*, *Trichoderma* oraz bakterii: *Escherichia coli* i *Proteus vulgaris* [50, 59, 66]. Dostępna literatura opisuje szczepy drożdży należące do gatunków: *M. pulcherrima* i *M. fructicola* jako skuteczne w zwalczaniu *B. cinerea*, *P. expansum*, *Alternaria alternata* na jabłkach, *P. digitatum* i *P. italicum* na cytrusach oraz *B. cinerea* na winogronach, truskawkach i pomidorach [20, 57, 66]. Ponadto *M. pulcherrima* okazały się skuteczne w zapobieganiu rozwojowi bakterieryjnych patogenów: *Listeria* sp. i *Salmonella* sp. [39].

Drożdże *Metschnikowia* sp. o szerokiej tolerancji temperaturowej, nie wytwarzają spor o działaniu alergizującym oraz szkodliwych mikotoksyn, a więc mogą wchodzić w skład komercyjnych preparatów zapewniających ochronę owoców i warzyw zarówno przed, jak i po zbiorze [4, 47, 66].

W obszernym artykule przeglądowym, opracowanym przez największe światowe jednostki opiniotwórcze i przemysłowe, laboratoria i stowarzyszenia sektora spożywczego, drożdże *M. pulcherrima* znalazły się na liście mikroorganizmów technologicznie przydatnych [4]. Opracowane wcześniej preparaty Shemer (Holandia) oraz ProYeast-ST i ProYeast-ORG (Izrael) skutecznie zwalczają patogeny kwiatów i owoców już na polu, kiedy stosowane są kilkukrotnie w czasie okresu wegetacyjnego. Wykazano, że są one aktywne w stosunku do pleśni z rodzajów: *Botrytis*, *Penicillium*, *Rhizopus* i *Aspergillus* rozwijających się na truskawkach, jabłkach, owocach cytrusowych i winogronach [24, 71]. Obecnie EFSA (European Food Safety Authority) prowadzi konsultacje w sprawie aktywnej substancji *M. fructicola*, o potencjalnym zastosowaniu jako naturalne biopestycydy [14].

Badania prowadzone przez Csutak'a i wsp. sugerują, że szczepy *M. pulcherrima*, izolowane bezpośrednio jako mikrobiota owoców, wykazują lepszą aktywność antagonistyczną w stosunku do patogenów, w porównaniu ze szczepami kolekcyjnymi. Wynika to prawdopodobnie z możliwości występowania u izolatów zmian genotypowych i fenotypowych, związanych z adaptacją do różnych środowisk naturalnych [10].

Występowanie oddziaływań antagonistycznych *M. pulcherrima* w stosunku do szczepów *Candida* sp. izolowanych z ludzkiego materiału klinicznego może przyczynić się do rozszerzenia aplikacji drożdży *Metschnikowia* sp. w preparatach farmaceutycznych dla ludzi i zwierząt [10]. Jednak takie zastosowanie wymaga wielu badań. Warto zaznaczyć, że w obrębie rodzaju *Metschnikowia* mogą znaleźć się również szczepy atypowe. Kuan i wsp. opisali pierwszy przypadek wyizolowania od pacjenta z zapaleniem skóry szczepu drożdży, wykazującego duże podobieństwo do *Metschnikowia drosophilae*. Fakt ten wskazuje na potrzebę rozwijania kompleksowej analizy molekularnej oraz charakterystyki fenotypowej szczepów należących do rodzaju *Metschnikowia* [27].

### Aktywność fermentacyjna

Drożdże *M. pulcherrima* charakteryzuje słaba aktywność fermentacyjna, choć stanowią one często rodzinę mikrobiotę moszczy winiarskich. Liczne badania wykazały, że rodzaj *Saccharomyces* dominuje w etapie głównej fermentacji alkoholowej, zaś inne rodzaje, m.in. *Metschnikowia* są aktywne podczas pierwszych stadiów procesu.

Położenie geograficzne, warunki klimatyczne, odmiany owoców, a także specyficzne technologie produkcji win, czy cydrów mogą istotnie wpływać na różnorodność rodzajową i gatunkową drożdży obecnych w moszczu [5, 69]. Znajomość gatunków drożdży, które

prowadzą procesy fermentacji alkoholowej, stanowi kluczowy element wiedzy o ich wpływie na jakość wina. Świeży moszcz gronowy zawiera wiele gatunków drożdży, głównie z rodzajów: *Hanseniaspora* (*Kloeckera*), *Pichia*, *Candida*, *Kluyveromyces*, *Saccharomyces* oraz *Metschnikowia*. Drożdże te stanowią zarówno rodzimą mikrobiotę winogron, jak i środowiska winnicy. *Metschnikowia* sp. oraz inne drożdże niekonwencjonalne inicjują spontaniczną fermentację soku, ale bardzo szybko w procesie fermentacji zaczynają dominować *S. cerevisiae* [5, 36].

Liczba komórek drożdży, innych niż *Saccharomyces* sp., już na wczesnych etapach fermentacji osiąga maksimum wynoszące  $10^5$  jtk/ml. Poziom taki jest jednak wystarczający, by wywierać wpływ na skład chemiczny wina. Zatem znaczenie drożdży niekonwencjonalnych w ogólnym charakterze wina jest bardziej istotne niż wcześniej sądzono. Wiele badań w różnych regionach winiarskich na świecie potwierdza istotny wkład, jaki gatunki drożdży nie należące do *Saccharomyces* sp. wnoszą do procesów fermentacji, zarówno spontanicznych, jak i kierowanych. Drożdże niekonwencjonalne wprowadzają do procesu fermentacji element różnorodności ekologicznej, która znacznie wykracza poza rodzaj *Saccharomyces* [17].

Aktywność enzymatyczna drożdży odgrywa kluczową rolę w kształtowaniu charakteru produktu finalnego. Szczególnie ważna jest produkcja pozakomórkowych enzymów hydrolitycznych: pektynaz, proteaz,  $\beta$ -glukanaz,  $\beta$ -glukozydaz, celulaz, celobiaz oraz amylaz. Aktywność proteolityczna ma istotne znaczenie dla redukcji zmętnień w piwie, czy winie. Ponadto obecność aktywnych proteaz zwiększa dostępność przyswajalnych źródeł azotu dla mikrobioty win [54]. W badaniach Strauss'a i wsp. drożdże *M. pulcherrima* wykazały dobrą aktywność tych enzymów, obok innych drożdży niekonwencjonalnych. *Metschnikowia* sp. wykazuje także aktywność  $\beta$ -glukozydazy, która ma istotne znaczenie w tworzeniu związków aromatu [19, 65]. Aktywność tego enzymu w moszczu skutkuje zwiększeniem zawartości  $\alpha$ -terpineolu, nerolu oraz geraniolu. Jednakże, w winach wytworzonych przez mieszane kultury drożdży *M. pulcherrima* oraz *S. cerevisiae*, stężenie dwóch ostatnich związków było zdecydowanie niższe, prawdopodobnie wskutek przekształcenia nerolu i geraniolu do  $\alpha$ -terpinolu przez *S. cerevisiae* [51].

Przemysł fermentacyjny poszukuje nowych technologii, które umożliwiają produkcję win o obniżonej zawartości alkoholu. Jednym ze sposobów byłoby wykorzystanie szczepów drożdży, które są mniej wydajne w przekształcaniu sacharydów do etanolu. Komercyjne drożdże winiarskie charakteryzują się wysoką zdolnością fermentacyjną. Wykazano jednak, że szczepy *M. pulcherrima* mogą być wykorzystane do produkcji win niskoalkoholowych. Odpowiednie

inokulacja moszczy szczepami *M. pulcherrima* oraz fermentacyjnymi *Saccharomyces* sp. umożliwiły wytworzenie produktów o obniżonej zawartości etanolu oraz o bardzo interesującym profilu zapachowym [7, 55, 70]. Otrzymane wina charakteryzowały się podwyższonym stężeniem 2-fenyli i octanu 2-fenylotylu. Obecność tych związków wpływała pozytywnie na cechy sensoryczne produktów fermentacji [70].

Szczepy *M. pulcherrima*, tworząc związki przeciwdrobnoustrojowe: kwas pulcherriminowy oraz 2-fenylotanol, mogą być stosowane jako biofungicydy w środowiskach fermentacyjnych o kwaśnym odczynie środowiska, wynoszącym nawet pH = 3–4 [56]. Oceniono, że obecność drożdży *M. pulcherrima* może wpływać hamująco na wzrost drożdży zanieczyszczających środowiska fermentacyjne: *Pichia*, *Candida*, *Hanseniaspora*, *Kluyveromyces*, *Saccharomycodes*, *Torulaspora* i *Brettanomyces*. Interesującym jest fakt, że aktywność *M. pulcherrima* nie ma negatywnego wpływu na wzrost drożdży konwencjonalnych *S. cerevisiae* [5, 25, 50].

Mimo, że dokładne mechanizmy tej „naturalnej biokontroli” są wciąż słabo poznane, to oferują one potencjał zastosowania wybranych szczepów *M. pulcherrima* jako składnika tzw. „multistarterów” razem z konwencjonalnymi drożdżami przemysłowymi [50].

## Produkcja lipidów

Drożdże *M. pulcherrima* wykazują potencjał do produkcji tłuszczu. Lipidy mogą nawet stanowić do 40% s.m., co jest porównywalne z innymi drobnoustrojami oleogennymi. Ponadto tłuszcze wytwarzane przez *Metschnikowia* sp. wykazują duże podobieństwo do tych obecnych w oleju palmowym [56].

U prawie wszystkich organizmów zdolność do biosyntezy lipidów prowadzi do utworzenia nasyconych kwasów tłuszczowych. Utworzone kwasy C16-C18 mogą być następnie modyfikowane przez aktywność odpowiednich desaturaz i elongaz. Głównym produktem biosyntezy jest kwas oleinowy ( $\Delta^{9,12}$ C18:2), który stanowi nawet 70% ogólnej puli kwasów tłuszczowych. Gromadzenie lipidów zachodzi w środowisku, gdy limitacja źródeł węgla praktycznie nie istnieje, natomiast występuje niedobór źródeł azotu. Oprócz deficytu azotu, również niedobór fosforanów i siarczanów stanowi kluczowy element środowiskowy dla syntezy kwasów tłuszczowych u mikroorganizmów oleogennych. Na pewnym etapie hodowli, po wyczerpaniu źródeł węgla, namnażanie komórek zostaje zatrzymane, a metabolizm jest wówczas ukierunkowany na syntezę lipidów [56].

Tworzenie kwasów tłuszczowych inicjuje konwersja acetylo-CoA do malonylo-CoA i malonylo-ACP. Acetylo-CoA powstaje z kwasu cytrynowego, zgromadzonego wewnątrz mitochondriów lub powstałego w cyklu Krebsa, przy udziale liazy cytrynianowej. Innym waż-



nym enzymem związanym z procesem akumulacji lipidów jest dehydrogenaza izocytrynianowa zależna od obecności adenosynomonofosforanu (AMP). W przypadku deficytu azotu, dochodzi do gwałtownego obniżenia poziomu AMP. Wówczas aktywność tego enzymu zwiększa się, by wykorzystać do syntezy materiału komórkowego wszystkie dostępne jony amonowe. Powoduje to zmiany w cyklu Krebsa, polegające na hamowaniu aktywności dehydrogenazy izocytrynianowej, a więc dochodzi do akumulacji cytrynianu. Cytrynian w cytoplazmie ulega przemianom i w konsekwencji powstaje acetylo-CoA, niezbędny do biosyntezy kwasów tłuszczowych. Biosynteza ta zachodzi w procesie odwróconego procesu  $\beta$ -oksydacji [40].

W produkcji przemysłowej, zwłaszcza przy zastosowaniu odpadowych surowców, środowisko często nie jest sterylne, co może istotnie wpływać na wydajność procesu biosyntezy [40]. Wykorzystując unikalne zdolności *Metschnikowia* sp. do wzrostu w dość szerokim zakresie temperatur, a także ich aktywności enzymatyczne i przeciwdrobnoustrojowe, wyselekcjonowane szczepy drożdży można wykorzystać do produkcji olejów z różnorodnej biomasy roślinnej, bez konieczności zastosowania szczególnych warunków aseptycznych [56].

## 7. Podsumowanie

Wyjątkowe zdolności adaptacyjne szczepów z rodzaju *Metschnikowia* oraz dominacja nad innymi grupami drobnoustrojów w różnych niszach ekologicznych sprawiają, że cechy tych drożdży wydają się być nie tylko interesujące z naukowego punktu widzenia, ale wnoszą one także duży potencjał aplikacyjny. Zważywszy, że aktualny wykaz mikroorganizmów o potencjalnych możliwościach aplikacyjnych jest raczej stabilny, a nawet konserwatywny, zastosowanie technologiczne mogą znaleźć tylko gatunki bardzo dobrze zbadane i opisane [4]. Rozwój wiedzy biotechnologicznej i metod molekularnych z pewnością pozwolą nie tylko na skuteczną identyfikację wyselekcjonowanych drożdży, ale także umożliwią wyjaśnienie mechanizmów ich działania, monitorowania wzrostu oraz efektywności poszczególnych szlaków metabolicznych. Pozwoli to na powszechne wykorzystanie unikalnych zdolności drożdży z rodzaju *Metschnikowia* w różnych procesach biotechnologicznych.

## Piśmiennictwo

- Alessandria V., Giacosa S., Campolongo S., Rolle L., Rantsiou K., Coccolin L.: Yeast population diversity on grapes during on-vine withering and their dynamics in natural and inoculated fermentations in the production of icewines. *Food Res. Int.* **54**, 139–147 (2013)
- Barata A., Malfeito-Ferreira M., Loureiro V.: The microbial ecology of wine grape berries. *Int. J. Food Microbiol.* **153**, 243–259 (2012)
- Bonnefond L., Arai T., Sakaguchi Y., Suzuki T., Ishitani R., Nureki O.: Structural basis for nonribosomal peptide synthesis by an aminoacyl-tRNA synthetase paralog. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 3912–3917 (2011)
- Bourdichon F., Hansen E.B. i wsp.: Food fermentations: microorganisms with technological beneficial use. *Int. J. Food Microbiol.* **154**, 87–97 (2012)
- Comitini F., Gobbi M., Domizio P., Romani C., Lencioni L., Mannazzu I., Ciani M.: Selected non-*Saccharomyces* wine yeasts in controlled multistarter fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiol.* **28**, 873–882 (2011)
- Compant S., Duffy B., Nowak J., Clément C., Barka E.A.: Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 4951–4959 (2005)
- Contreras A., Curtin C., Varela C.: Yeast population dynamics reveal a potential “collaboration” between *Metschnikowia pulcherrima* and *Saccharomyces uvarum* for the production of reduced alcohol wines during Shiraz fermentation. *Appl. Microbiol. Biot.* **99**, 1885–1895 (2015)
- Cook A.H., Slater C.A.: Metabolism of „wild” yeasts I. The chemical nature of pulcherrimin. *J.I. Brewing.* **60**, 213–217 (1954)
- Csutak O., Vassu T., Grebenişan I., Cornea P.: *Metschnikowia pulcherrima*, antifungal biocontrol agent taxonomic classification, morpho-physiological and genetic aspects, antifungal action. *Bacteriol. Virusol. Parazitol. Epidemiol.* **52**, 129–138 (2007)
- Csutak O., Sarbu I., Vassu T.: Influence of sodium bicarbonate, calcium chloride and growth media on antimicrobial activity of *Metschnikowia pulcherrima*. *J. Food Sci. Eng.* **3**, 79–86 (2013)
- Demain A.L., Phaff H.J., Kurtzman C.P.: The instruction and agricultural significance of yeasts (w) *The Yeasts. A taxonomic study*, red. C.P. Kurtzman, J.W. Fell, Elsevier, London, 1998, s. 13–19
- Duffy M.A.: Selective predation, parasitism, and trophic cascades in a bluegill-*Daphnia*-parasite system. *Oecologia*, **153**, 453–460 (2007)
- Ebert D., Zschokke-Rohringer C.D., Carius H.J.: Dose effects and density-dependent regulation of two microparasites of *Daphnia magna*. *Oecologia*, **122**, 200–209 (2000)
- European Food Safety Authority: Public consultations planner, <http://www.efsa.europa.eu/en/consultations/consultationsplanner> (28.01.2017)
- Fernández-Espinar M.T., Martorell P., de Llanos R., Querol A.: Molecular methods to identify and characterize yeasts in foods and beverages (w) *Yeast in food and beverages*, red. A. Querol, G.H. Fleet, Springer, Berlin Heidelberg, 2016, s. 55–82
- Fischer M.J., Pensec F., Demangeat G., Farine S., Chong J., Ramírez-Suero M., Mazet F., Bertsch C.: Impact of *Quillaja saponaria* saponins on grapevine ecosystem organisms. *Anton. Leeuw. Int. J.G.* **100**, 197–206 (2011)
- Fleet G.H.: Wine yeasts for the future. *FEMS Yeast Res.* **8**, 979–995 (2008)
- Giménez-Jurado G., Valderrama M.J., Sá-Nogueira I., Spencer-Martins I.: Assessment of phenotypic and genetic diversity in the yeast genus *Metschnikowia*. *Anton. Leeuw. Int. J.G.* **68**, 101–110 (1995)
- González-Pombo P., Pérez G., Carrau F., Guisán J.M., Batista-Viera F., Brena B.M.: One-step purification and characterization of an intracellular  $\beta$ -glucosidase from *Metschnikowia pulcherrima*. *Biotechnol. Lett.* **30**, 1469–1475 (2008)
- Grzegorzczak M., Szalewicz A., Żarowska B., Połomska X., Wątorok W., Wojtatowicz M.: Drobnoustroje w biologicznej

- ochronie roślin przed chorobami grzybowymi. *Acta Sci. Pol. Biotechnologia*, **14**, 19–42 (2015)
21. Guzmán B., Lachance M.A., Herrera C.M.: Phylogenetic analysis of the angiosperm-floriculous insect-yeast association: have yeast and angiosperm lineages co-diversified? *Mol. Phylogenet. Evol.* **68**, 161–175 (2013)
  22. Hui F.L., Chen L., Li Z.H., Niu Q.H., Ke T.: *Metschnikowia hennensis* sp. nov., a new anamorphic yeast species isolated from rotten wood in China. *Anton. Leeuw. Int. J.G.* **103**, 899–904 (2013)
  23. Index Fungorum, <http://www.indexfungorum.org/names/Names.asp> (25.01.2017)
  24. Janisiewicz W.J., Tworowski T.J., Kurtzman C.P.: Biocontrol potential of *Metschnikowia pulcherrima* strains against blue mold of apple. *Phytopathology*, **91**, 1098–1108 (2001)
  25. Jolly N.P., Augustyn O.P.H., Pretorius I.S.: The use of *Candida pulcherrima* in combination with *Saccharomyces cerevisiae* for the production of Chenin blanc wine. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **24**, 63–69 (2003)
  26. Kluyver A.J., van der Walt J.P., van Triet A.J.: Pulcherrimin, the pigment of *Candida pulcherrima*. *P. Natl. Acad. Sci USA*, **39**, 583–593 (1953)
  27. Kuan C.S., Ng K.P. i wsp.: Isolation and characterization of an atypical *Metschnikowia* sp. strain from the skin scraping of a dermatitis patient. *PLoS ONE*, **11**, e0156119 (2016)
  28. Kurtzman C.P., Fell J.W., Boekhout, T.: Gene sequence analyses and other DNA-based method for yeast species recognition (w) The Yeasts. A taxonomic study, red. C.P. Kurtzman, J.W. Fell, T. Boekhout, Elsevier, London, 2011, s. 137–144
  29. Kurtzman C.P., Robnett C.J.: Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Anton. Leeuw. Int. J.G.* **73**, 331–371 (1998)
  30. Lachance M.A.: *Metschnikowia* Kamienski (1899) (w) The Yeasts. A taxonomic study, red. C.P. Kurtzman, J.W. Fell, T. Boekhout, Elsevier, London, 2011, s. 575–620
  31. Lachance M.A.: *Metschnikowia*: half tetrads, a regicide and the fountain of youth. *Yeast*, **33**, 563–574 (2016)
  32. Lachance M.A., Bowles J.M., Starmer W.T.: *Metschnikowia santaciliae*, *Candida hawaiiiana*, and *Candida kipukae*, three new yeast species associated with insects of tropical morning glory. *FEMS Yeast Res.* **3**, 97–103 (2003)
  33. Lachance M.A., Hurtado E., Hsiang T.: A stable phylogeny of the large-spored *Metschnikowia* clade. *Yeast*, **33**, 261–275 (2016)
  34. Lachance M.A., Lawrie D., Dobson J., Piggott J.: Biogeography and population structure of the Neotropical endemic yeast species *Metschnikowia lochheadii*. *Anton. Leeuw. Int. J.G.* **94**, 403–414 (2008)
  35. Lachance M.A., Starmer W.T., Rosa C.A., Bowles J.M., Barker J.S.F., Janzen D.H.: Biogeography of the yeasts of ephemeral flowers and their insects. *FEMS Yeast Res.* **1**, 1–8 (2001)
  36. Liu P.T., Lu L., Duan C.Q., Yan G.L.: The contribution of indigenous non-*Saccharomyces* wine yeast to improved aromatic quality of Cabernet Sauvignon wines by spontaneous fermentation. *LWT – Food Sci. Technol.* **71**, 356–363 (2016)
  37. Macarisin D., Droby S., Bauchan G., Wisniewski M.: Superoxide anion and hydrogen peroxide in the yeast antagonist-fruit interaction: a new role for reactive oxygen species in postharvest biocontrol? *Postharvest Biol. Tec.* **58**, 194–202 (2010)
  38. MacWilliam I.C.: A survey of the antibiotic powers of yeasts. *J. Gen. Microbiol.* **21**, 410–414 (1959)
  39. Manso T., Nunes C., Lima-Costa M.: Growth kinetics of the biocontrol agent *Metschnikowia andauensis* PBC-2 in submerged batch cultures. *Int. J. Res. Agric. Food Sci.* **2**, 1–14 (2014)
  40. Martínez E.J., Raghavan V., Ganzález-Andrés F., Gómez X.: New biofuel alternatives: integrating waste management and single cell oil production. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 9385–9405 (2015)
  41. Melvydas V., Staneviciene R., Balynaite A., Vaiciuniene J., Garjonyte R.: Formation of self-organized periodic patterns around yeasts secreting a precursor of a red pigment. *Microbiol. Res.* **193**, 87–93 (2016)
  42. Mendonça-Hagler L.C., Hagler A.N., Kurtzman C.P.: Phylogeny of *Metschnikowia* species estimated from partial rRNA sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**, 368–373 (1993)
  43. Metschnikoff V.E.: Über eine Sprosspilzkrankheit der Daphnien Beitrag zur Lehre über den Kampf der Phagocyten gegen Krankheitserreger. *Arch. Pathol. Anat. Ph.* **96**, 177–195 (1884)
  44. Miller, M.W., Phaff H.J.: *Metschnikowia* Kamienski (w) The Yeasts. A taxonomic study, red. C.P. Kurtzman, J.W. Fell, Elsevier, London, 1998, s. 256–267
  45. Molnár O., Prillinger H.: Analysis of yeast isolates related to *Metschnikowia pulcherrima* using the partial sequences of the large subunit rDNA and the actin gene; description of *Metschnikowia andauensis* sp. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* **28**, 717–726 (2005)
  46. Moore M.M., Strom M.S.: Infection and mortality by the yeast *Metschnikowia bicuspidata* var. *bicuspidata* in chinook salmon fed live adult brine shrimp (*Artemia franciscana*). *Aquaculture*, **220**, 43–57 (2003)
  47. Muccilli S., Restuccia C.: Bioprotective role of yeasts. *Microorganisms*, **3**, 588–611 (2015)
  48. Naumov G.I., 2011. Molecular and genetic differentiation of small-spored species of the yeast genus *Metschnikowia* Kamienski. *Microbiology*, **80**, 135–142 (2011)
  49. de Oliveira-Santos A.R., Perri A.M., da Graça Stupiello Andrietta M., Rosa C.A., Lachance M.A.: 2015. The expanding large-spored *Metschnikowia* clade: *Metschnikowia matae* sp. nov., a yeast species with two varieties from the Brazilian Atlantic Forest. *Anton. Leeuw. Int. J.G.* **108**, 753–763 (2015)
  50. Oro L., Ciani M., Comitini F.: Antimicrobial activity of *Metschnikowia pulcherrima* on wine yeasts. *J. Appl. Microbiol.* **116**, 1209–1217 (2014)
  51. Padilla B., Gil J.V., Manzanares P.: Past and future of non-*Saccharomyces* yeasts: from spoilage microorganisms to biotechnological tools for improving wine aroma complexity. *Front. Microbiol.* **7**, 411 (2016)
  52. Péter G., Tornai-Lehoczki J., Suzuki M., Dlačny D.: *Metschnikowia viticola* sp. nov., a new yeast species from grape. *Anton. Leeuw. Int. J.G.* **87**, 155–160 (2005)
  53. Pitt J.I., Miller M.W.: Speciation in the yeast genus *Metschnikowia*. *Anton. Leeuw. Int. J.G.* **36**, 357–381 (1970)
  54. Reid V.J., Theron L.W., du Toit M., Divol B.: Identification and partial characterization of extracellular aspartic protease genes from *Metschnikowia pulcherrima* IWBT Y1123 and *Candida apicola* IWBT Y1384. *Appl. Environ. Microb.* **78**, 6838–6849 (2012)
  55. Sadineni V., Kondapalli N., Obulam V.S.R.: Effect of co-fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspora delbrueckii* or *Metschnikowia pulcherrima* on the aroma and sensory properties of mango wine. *Ann. Microbiol.* **62**, 1353–1360 (2012)
  55. Santamauro F., Whiffin F.M., Scott R.J., Chuck C.J.: Low-cost lipid production by an oleaginous yeast cultured in non-sterile conditions using model waste resources. *Biotechnol. Biofuels*, **7**, 34 (2014)
  57. Saravanakumar D., Ciavarella A., Spadaro D., Garibaldi A., Gullino M.L.: *Metschnikowia pulcherrima* strain MACH1 outcompetes *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata* and *Penicillium expansum* in apples through iron depletion. *Postharvest Biol. Tec.* **49**, 121–128 (2008)

58. Seino M.M., de Vega C., Bazaga P., Pozo M.I., Herrera C.M.: Development and characterization of microsatellite loci for the nectar-living yeast *Metschnikowia reukaufii*. *Mol. Ecol. Resour.* **13**, 760–762 (2013)
59. Sharma R.R., Singh D., Singh R.: Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Biol. Control*, **50**, 205–221 (2009)
60. Sipiczki M.: *Metschnikowia* strains isolated from botrytized grapes antagonize fungal and bacterial growth by iron depletion. *Appl. Environ. Microb.* **72**, 6716–6724 (2006)
61. Sipiczki M., Pfliegler W.P., Holb I.J.: *Metschnikowia* species share a pool of diverse rRNA genes differing in regions that determine hairpin-loop structures and evolve by reticulation. *PLoS ONE*, **8**, e67384 (2013)
62. Spadaro D., Lorè A., Garibaldi A., Gullino M.L.: A new strain of *Metschnikowia fructicola* for postharvest control of *Penicillium expansum* and patulin accumulation on four cultivars of apple. *Postharvest Biol. Tec.* **75**, 1–8 (2013)
63. Spadaro D., Vola R., Piano S., Gullino M.L.: Mechanisms of action and efficacy of four isolates of the yeast *Metschnikowia pulcherrima* active against postharvest pathogens on apples. *Postharvest Biol. Tec.* **24**, 123–134 (2002)
64. Starmer W.T., Fogleman J.C., Lachance M.A.: The yeast community of cacti (w) *Microbial ecology of leaves*. red. J.H. Andrews, S.S. Hirano, Springer, New York, 1991, s. 158–178
65. Strauss M.L., Jolly N.P., Lambrechts M.G., van Rensburg P.: Screening for the production of extracellular hydrolytic enzymes by non-*Saccharomyces* wine yeasts. *J. Appl. Microbiol.* **91**, 182–190 (2001)
66. Türkel S., Korukluoğlu M., Yavuz M.: Biocontrol Activity of the local strain of *Metschnikowia pulcherrima* on different postharvest pathogens. *Biotechnol. Res. Int.* **2014**, 397167 (2014)
67. van Uden N., Castelo-Branco R.: *Metschnikowiella zobellii* sp. nov. and *M. krissii* sp. nov., two yeasts from the Pacific Ocean pathogenic for *Daphnia magna*. *J. Gen. Microbiol.* **26**, 141–148 (1961)
68. Uffen R.L., Canale-Parola E.: Synthesis of pulcherriminic acid by *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **111**, 86–93 (1972)
69. Valles B.S., Bedriñana R.P., Tascón N.F., Simón A.Q., Madrera R.R.: Yeast species associated with the spontaneous fermentation of cider. *Food Microbiol.* **24**, 25–31 (2007)
70. Varela C., Sengler F., Solomon M., Curtin C.: Volatile flavour profile of reduced alcohol wines fermented with the non-conventional yeast species *Metschnikowia pulcherrima* and *Saccharomyces uvarum*. *Food Chem.* **209**, 57–64 (2016)
71. Wisniewski M., Wilson C., Droby S., Chalutz E., El-Ghauth A., Stevens C.: *Postharvest biocontrol: new concepts and applications (w) Biological control: a global perspective*, red. C. Vincent, M.S. Goettel, G. Lazarovitz, CABI, Wallingford, 2007, s. 262–273
72. Yamada Y., Nagahama T., Banno I.: The phylogenetic relationships among species of the genus *Metschnikowia kamienski* and its related genera based on the partial sequences of 18S and 26S ribosomal RNAs (*Metschnikowiaceae*). *Bulletin of the Faculty of Agriculture – Shizuoka University*, **44**, 9–20 (1995)
73. Yaman M., Radek R.: Identification, distribution and occurrence of the ascomycete *Metschnikowia typographi* in the great spruce bark beetle, *Dendroctonus micans*. *Folia Microbiol.* **53**, 427–432 (2008)