

DETERMINATION OF KILLER CHARACTER OF WINE YEAST ISOLATED FROM ISTRA ODREĐIVANJE KILLER KARAKTERA VINSKIH KVASACA IZOLIRANIH SA PODRUČJA ISTRE

Sandi ORLIĆ^{1*}, Martina POGAČIĆ¹, Ana JEROMEL², Marko KAROGLAN², Bernard KOZINA², Lucilla IACUMIN³, Sulejman REDŽEPOVIĆ¹

¹Department of microbiology

²Department of viticulture and enology

Faculty of Agriculture, University of Zagreb, Svetošimunska 25, 10 000 Zagreb, Croatia

³Department of Food Science, Faculty of Agriculture, University of Udine, Via Marangoni 33, 33100 Udine, Italy

Corresponding author: Sandi ORLIĆ; +38512394034; +38512393881; e-mail: sorlic@agr.hr

Manuscript received: November 14, 2007; Reviewed: december 28, 2007; Accepted for publication: January 12, 2008

ABSTRACT

Wild wine yeasts with killer phenotype are widespread in many wine regions of the world. The presence of killer yeasts may become particularly important in wine fermentations conducted by inoculation with selected strains of *Saccharomyces cerevisiae*. Wild killer yeasts may suppress selected sensitive yeasts inoculated into the must during the fermentation. The goal of this investigation was to identify killer yeast in Istra region using physiological and molecular methods. In total 50 *S.cerevisiae* strains were tested. Using the physiological methods 17 strains were identified like killer positive and using molecular methods two strains more. Our results are in agreement with some previous ecological surveys.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*, killer toxin, ds plasmids

SAŽETAK

Killer kvasci su rašireni u monogim vinogradarsko-vinarskim regijama u svijetu. Navedeno je svojstvo vrlo značajno u selekcijskim programima jer killer sojevi mogu značajnije utjecati na tijek alkoholne fermentacije. Cilj ovog istraživanja bio je identifikacija killer sojeva kvasaca izoliranih s područja Istre pomoću fizioloških i molekularnih metoda. Ukupno je analizirano 50 izolata. Pomoću fiziološke metode utvrđeno je 17 killer pozitivnih sojeva, a uporabom molekularne metode dva soja više. Navedeni rezultati su u suglasnosti s nekim prijašnjim istraživanjima.

Ključne riječi: *Saccharomyces cerevisiae*, killer toksin, ds plazmid

DETAILED ABSTRACT IN ENGLISH

Killer toxins were first discovered in *Saccharomyces cerevisiae* by Makower & Bevan [1] and since then they have been found in numerous other yeast species and genera. Through the following years, killer yeasts and their toxins found applications in several fields. For example, killer yeasts have provided an interesting model for studying the mechanisms involved in the processing and secretion of extracellular proteins, and the identification of killer toxin receptors on the envelope of sensitive targets has helped in the elucidation of the structure and function of the yeast cell wall. Wild wine yeasts with killer phenotype are widespread in many wine regions of the world (Spain, Italy, Australia, France, Argentina, Slovenia). The presence of killer yeasts may become particularly important in wine fermentations conducted by inoculation with selected strains of *S. cerevisiae*. Wild killer yeasts may suppress selected sensitive yeasts inoculated into the must during the fermentation. This chance occurrence may decrease wine quality or even cause stuck wine fermentation. On the other hand, inoculated killer wine yeasts may be effective in suppressing undesirable wild yeast strains to improve wine quality. The goal of this investigation was to identify the presence of killer wine yeast isolated from Istra wine growing region using molecular and physiological methods. A total of 50 *S. cerevisiae* strains were isolated from different positions in Istra (Poreč, Rovinj, Koreniki, Savudrija) (Table 1) and tested for the killer toxin production in laboratory conditions. Using physiological method 17 strains were identified like killer positive (0 % from Poreč, 100 % from Savudrija, 60% from Rovinj and 33 % from Koreniki) and using molecular method two more strains (RO 1555 and RO 1558) were identified like killer positive. During this investigation the identification of killer wine strains from Istra was documented for the first time. Further research will elucidate the killer properties of these strains and the possible use in controlled wine fermentations.

UVOD

Selekcija kvasaca je dugotrajan proces u kojem se utvrđuju različite tehnološke i kvalitativne karakteristike kojima se nastoji poboljšati kakvoća vina [12]. Među tehnološkim karakteristikama koje se ispituju tijekom selekcije spada i killer aktivnost. Na samom početku u moštu se nalazi mješavina različitih populacija kvasaca. Od iznimne je važnosti da soj kvasca s najboljim fermentacijskim sposobnostima nadvlada ostale sojeve te privede fermentaciju kraju. U biti, kvaliteta samog vina uvelike ovisi o utjecaju soja koji dominira te njegovim karakteristikama. Bevan i Makower [1] otkrili su killer fenomen unutar sojeva *Saccharomyces cerevisiae*, koji su prvotno bili izolirani kao uzročnici kvarenja u procesu proizvodnje piva. Killer fenotip, kojeg su oni opisali bazirao se na sekreciji proteina male molekularne mase, a njegova aktivnost bila je vidljiva kroz uništavanje osjetljivih stanica (killer sensitive) istog ili srodnog roda kvasaca. Taj protein nazvan je killer toxin. Uskoro su uslijedila daljnja istraživanja, koja su dokazala da taj fenomen nije ograničen samo na rod *Saccharomyces*, već je prisutan i kod nekih drugih rodova kvasaca. Neki od njih su: *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Kluyveromyces*, *Pichia* i *Torulopsis* [10]. Killer protein u biti predstavlja preprotoksin koji se sastoji od signalnog peptida kojeg slijedi peptid (δ komponenta), čija funkcija još nije poznata, te dvije toksinske podjedinice α i β , koje su odvojene glikozidnim γ peptidom [7]. Gunge [5] je predložio da se killer kvasci podijele u četiri grupe, ovisno o njihovoj genetskoj osnovi killer karaktera (dsRNA plazmidi, dsDNA plazmidi, kromosomalna DNA te neidentificirane determinante). Različiti M dsRNA plazmidi kodiraju različite killer proteine. Neki od njih su K1, K2, K3, KT28, K3GR1, no samo su tri tipa (K1, K2 i K28) u potpunosti definirana uz pomoć molekularnih i genetskih analiza. K1 tip je najzastupljeniji kod sojeva *S. cerevisiae*. Stabilan je u vrlo uskom rasponu pH vrijednosti (4.2-4.6), stoga je inaktivan u moštu. K2 toksin je glikoprotein i aktivan je u rasponu pH 2.8-4.8,

Tablica 1: Rezultati fiziološke i molekularne metode/ Results of the physiological and molecular method

| Podrijetlo sojeva/Strain origin | Savudrija | Rovinj | Poreč | Koreniki |
|---|-----------|--------|-------|----------|
| Broj sojeva/Number of strains | 5 | 10 | 5 | 30 |
| Fiziološka metoda (killer pozitivni)/Physiological method (Killer positive) | 4 | 5 | 0 | 10 |
| Molekularna metoda (killer pozitivni)/Molecular method (killer positive) | 5 | 6 | 0 | 10 |

sa maksimalnom aktivnošću između 4.2-4.4, te je aktivan u moštu i vinu.

Tijekom zadnja dva desetljeća, killer toksini, te sojevi koji izlučuju same toksine pronašli su i svoju praktičnu primjenu. Primjerice u prehrambenoj industriji, killer sojevi se koriste u borbi protiv divljih sojeva kvasaca, koji mogu dovesti do kontaminacije vina, kruha, piva i sl. [3,2]. Koriste se i kao bio agensi u konzerviranju hrane [9, 17], zatim kao antimikotici u liječenju ljudskih i životinjskih gljivičnih oboljenja i naravno u rekombinacijskoj DNA tehnologiji. Cilj istraživanja ovog rada bilo je utvrđivanje rasprostranjenosti killer fenomena kod kvasaca izoliranih iz različitih vinogorja Istre, uz pomoć fizioloških i molekularnih metoda.

MATERIJALI I METODE ISTRAŽIVANJA

Kvasci

Kvasci korišteni u ovom pokusu, izolirani su sa područja Istre, sa kultivara Malvazije Istarska (*Vitis vinifera* L.), tijekom berbe 2002. Čuvani su na podlozi malt agara (Biolife italiana, Milano, Italija) na temperaturi od +4°C. Kvasci pripadaju zbirici Zavoda za mikrobiologiju Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Identifikacija na razini vrste izvršena je pomoću diferencijalne WL nutrient agar podloge (Biolife italiana, Milano, Italija) na kojoj vrsta *S.cerevisiae* raste karaktersitičnom morfologijom i bojom [13].

Određivanje killer karaktera na petrijevim zdjelicama

Killer karakter je određen po metodi predloženoj od Orlić et al. [8]. Ukratko: sojevi 1080 (killer negativan) i 1079 (killer pozitivan) dobiveni su od G.A. Farris (Sassari,

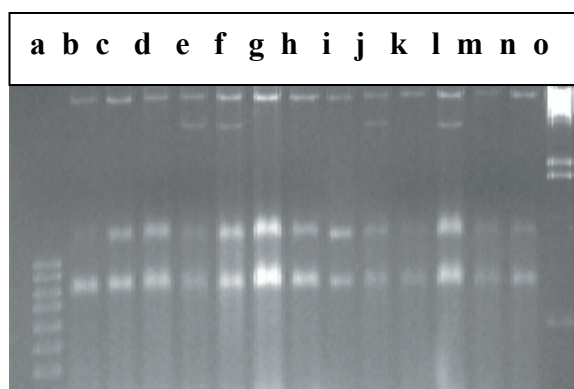
Italija) i bili su upotrebljeni kao kontrolni sojevi. Zone inhibicije bile su određene na YEPG agaru (1% kvasni ekstrakt, 1% pepton, 2 % glukoze i 1,5% agara) pH 4.5. Očitovanje rezultata je izvršeno nakon 48 sati na 25°C.

Molekularno određivanje killer karaktera

Molekularno određivanje killer karaktera određeno je po metodi predloženoj od Reyes et al. [14]. Ukratko, svježe kulture kvasaca uzgajaju se u tekućoj YEPG (1% kvasnog ekstrakta; 1% peptona; 2% glukoze) podlozi i to u 5 ml. Iz epruvete se uzima 1,5ml uzorka i stavlja se u kiveticu, zatim se centrifugira na 5000rpm 5min. Talog se stavi zajedno sa 200µl lysis buffera (1% SDS, 2% Triton X-100, 100mM NaCl, 1mM EDTA, 10mM Tris-HCl, pH=8.0) i 200µl fenol-kloroform-izoamilnog alkohola (25:24:1) (Fluka, Njemačka) u epruvetice sa staklenim kuglicama za razbijanje stanica. Sve zajedno se vortexira oko 4 minuta u razmacima. Nakon toga slijedi centrifugiranje na 13.000rpm 10min. Surnatant se stavlja u novu kiveticu i čuva se na - 20°C. Prisustvo ds plazmida se provjerava elektoroforezom na 1,2 % agaroznom gelu s 0,5µl/ml etidium bromida. Uzima se 5µl gel loading solution-a (Sigma, Njemačka) i 20µl uzorka koji se zajedno stavlja u jažicu na gelu. Marker korišteni u elektroforezi su: Fag λ DNA digestirana sa Hind III i 100bp ladder (Sigma, Njemačka). Elektroforeza u TBE puferu na 80V je u trajanju od 180min. Gelovi su slikani nakon izlaganja UV svijetlu sa digitalnom kamerom (Olympus, Japan).

REZULTATI ISTRAŽIVANJA

Tijekom ovog istraživanja ispitano je 50 različitih sojeva *S. cerevisiae* izoliranih sa različitih vinogradarskih



Slika 1: ds plazmid u odabranim sojevima/ ds plasmid in the selected strains (molecular marker 100bp (a), RO 1596 (b), RO 1597 (c), RO 1600 (d), RO 1555 (e), RO 1558 (f), RO 1560 (g), RO 1601 (h), RO 1604 (i), RO 1605 (j), RO 1631 (k), RO 1635 (l); RO 1645(m), RO 1655 (n), molecular marker λ DNA (o)

položaja u Istarskoj županiji. Utvrđivanje prisutnosti killer faktora izvršeno je fiziološkom i molekularnim metodama. Od ukupno 50 sojeva izoliranih primjenom fizioloških metoda njih 17 je bilo killer pozitivno (34%) (Tablica 1). Fiziološke metode ponekad mogu dovesti do pogrešnih rezultata [13] te smo ispitali isto svojstvo utvrđivanjem plazmida koji je i nosioc killer proteina. Svi izolati iz Poreča bili su killer negativni, dok su u ostalim područjima izolirani i killer pozitivni sojevi i to 100 % u Savudriji, 60% u Rovinju i 33 % u Korenikima. Usporedbom rezultata dobivenih ovim dvjema metodama, može se vidjeti da se rezultati poklapaju u svim slučajevima osim kod sojeva označenih brojem RO 1555 i RO 1558. Naime, metoda izvedena na petrijevim zdjelicama kod sojeva RO 1555 i RO 1558 nije pokazala zonu inhibicije. Međutim molekularna metoda pokazala je prisutnost plazmida, te se na temelju te metode može zaključiti istraživani sojevi killer pozitivni (Slika 1). Ponavljanjem elektroforeze, rezultat je ostao isti.

RASPRAVA

Kvasci su nosioci alkoholne fermentacije. Oni svojim metabolizmom transformiraju mošt u vino. Tijekom programa selekcije nastoji se utvrditi niz čimbenika koji bi nam olakšali alkoholnu fermentaciju, odnosno osigurali kvalitetniji i sigurniji tijek. Među njih ubraja se i killer faktor, odnosno sposobnost određenog soja kvasca da ubije osjetljive kvasce. U prirodnim populacijama kvasca ovo svojstvo je često utvrđivano [16, 6, 4, 11, 15, 18] u najznačajnijim vinorodnim područjima u svijetu. U vinorodnim područjima iz RH nije do sada istraživana prisutnost killer faktora kod vinskih kvasaca uporabom molekularnih i fizioloških metoda. Redžepović et al. [13] i Orlić et al. [8] nisu utvrdili primjenom fizioloških metoda prisutnost killer kvasaca sa položaja Jazbina (Zagrebačko vinogorje) te Kutjevačkog vinogorja. U ovom je istraživanju po prvi put identificirano fiziološkim i molekularnim metodama 34% killer pozitivnih izolata iz Istre, ali su razlike ovisno o lokaciji uzorkovanja značajne (Tablica 1). Razlike mogu biti uvjetovane ekološkim uvjetima u kojima se pojedini sojevi kvasaca razvijaju. Uspoređujući prisutnost killer kvasaca izoliranih iz Istre s ostalim vinorodnim područjima u svijetu došli smo do sličnih rezultata. Tako su Vagnoli et al. [16], utvrdili da 88% izolata iz spontanijih fermentacija iz regije Toskane imaju killer aktivnost, a Hildago i Flores [6], 87% u regiji oko Madrida. Istraživači u Sloveniji [11, 18] su utvrdili puno nižu brojnost killer kvasaca u vrijednost od 3-4%, a Sangorin et al. [15] od 135 izolata je utvrdio da njih 37% su killer osjetljivi, 21% je pokazalo neutralni fenotip i 42% je imalo killer aktivnost. Killer karakter može predstavljati jedan pokazatelj na temelju kojeg će

se odabrati soj kvasca sa željenim karakteristikama kao starter kultura. Na taj način inokulirani soj ima veće šanse da prevlada tijekom fermentacije.

ZAKLJUČCI

Tijekom ovog istraživanja po prvi je put dokumentirana identifikacija i izolacija killer kvasaca iz vinorodnih područja iz Istarske županije primjenom molekularnih i fizioloških metoda. Usporedbom ovih metoda utvrđene su razlike kod sojeva RO 1555 i RO 1558 te je neophodno detaljnije ispitati genetičke osnovice killer svojstva kod ova dva soja. Daljnjom selekcijom izdvojeni izolati će se u budućnosti moći koristiti u kontroliranim alkoholnim fermentacijama jer prisutnost killer karaktera i otpornost na killer toksine, dva su značajna faktora koja treba uzeti u obzir u proizvodnji vina.

POPIS LITERATURE

- [1] Bevan E.A., Makower M., The physiological basis of the killer character in yeast, Proc.Xith Int.Congr. Genet. (1963)1:202
- [2] Ciani M., Faticenti F., Killer toxin of *Kluyveromyces phaffii* DBVPG 6067 as a biopreservative agent to control apiculate wine yeasts, Appl. Environ. Microb. (2001) 67(7): 3058-3063.
- [3] Comitini F., De Ingeniis J., Pepe L., Mannazzu I., Ciani M., *Pichia anomala* and *Kluyveromyces wickerhamii* killer toxins as new tools against *Dekkera/Brettanomyces* spoilage yeasts, FEMS Microb. Lett. (2004) 238: 235-240.
- [4] Da Silva L., The occurrence of killer, sensitive and neutral yeasts in Brazilian Riesling Italic grape must and the effect of neutral strains on killing behaviour, Appl. Microb. Biotech. (1996) 46: 112-121
- [5] Gunge N., Yeast DNA plasmids, Annu.Rev. Microbiol. (1983) 37:253-276.
- [6] Hidalgo P., Flores M., Occurrence of killer character in yeasts associated with Spanish wine production, Food Microbiol. (1994) 11: 161-167.
- [7] Magliani W., Conti S., Gerloni M., Bertolotti D., Polonelli L., Yeast killer systems, Clin.Microbiol.Rev. (1997) 10(3): 173-90.
- [8] Orlić S., Očić N., Jeromel A., Huić K., Redžepović S., Selection of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains from Kutjevo wine growing area at the laboratory scale, Agri. Cons. Scien. (2005) 70(3): 87-91.
- [9] Palpacelli, V., Ciani, M., Rosini, G. (1991): Activity of different "killer" yeasts on strains of yeast species undesirable in the food industry, FEMS Microbiology

Letters 84, 75-78

[10] Philliskirk G., Young T. W., The occurrence of killer character in yeasts of various genera, *Antonie van Leeuwenhoek* (1975) 41: 147-151.

[11] Povhe Jemec K., Čadež N., Zagorc T., Bubič V., Zupec A., Raspor P., Yeast population dynamics in five spontaneous fermentations of Malvasia must, *Food Microb.* (2001) 18(3): 247-259.

[12] Pretorius I.S., Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking, *Yeast* (2000) 16(8): 675-729.

[13] Redžepović S., Orlic S., Sikora S., Majdak A., Pretorius I.S., Identification and characterization of *Saccharomyces paradoxus* and *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from Croatian vineyards, *Lett. Appl. Microbiol.* (2002) 35: 305-310.

[14] Reyes A., Pagraggio M., Pesole G., Romano P., Genetic Characterisation of dsRNA Plasmids in Italian *Saccharomyces cerevisiae* Wine Yeast, *Food Tech. Biotech.* (1999) 37(4): 229-234.

[15] Sangorri M., Zajonskovsky I., Lopes, C., Rodriguez M., Giraudo de van Broock M., Caballero A., Killer behaviour in wild wine yeasts associated with Merlot and Malbec type musts spontaneously fermented from northwestern Patagonia (Argentina), *J. Basic Microbiol.* (2001) 41(2): 105-113

[16] Vagnoli P., Musmanno R.A., Cresti S., Di Maggio T., Coratza G., Occurance of killer yeasts in spontaneous wine fermentations from the Tuscany region of Italy, *Appl. Environ. Microb.* (1993) 59(12): 4037-4043.

[17] Yap N.A., de Barros Lopes M., Langridge P., Henschke P.A., The incidence of killer activity of non-*Saccharomyces* yeasts towards indigenous yeasts species of grape must: potential application in wine fermentation, *J. Appl. Microb.* (2000) 89:381-389.

[18] Zagorc T., Maraz A., Čadež N., Povhe Jemec G., Peter G., Resnik M., Nemanič J., Raspor P., Indigenous wine killer yeasts and their application as a starter culture in wine fermentation, *Food Microb.* (2001) 18(4): 441-445.

