

UNIwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii
Dyscyplina naukowa: Technologia Żywności i Żywienia

Adam Michał Staniszewski

Rozprawa doktorska

**Izolacja, charakterystyka i potencjalne zastosowanie drożdży
probiotycznych występujących w produktach roślinnych spontanicznie
fermentowanych jako element żywności fortyfikowanej**

***Isolation, characterization and potential use of probiotic yeasts found in spontaneously
fermented plant products as a component of fortified food***

Rozprawa doktorska wykonana w Katedrze Biotechnologii,
Mikrobiologii i Żywienia Człowieka

Promotor: dr hab. Monika Kordowska - Wiater, prof. uczelni

Lublin, 2025

*Najszczerze podziękowania Pani Promotor
Dr hab. Monice Kordowskiej - Wiater za nieocenioną pomoc
naukową, merytoryczną oraz wiele cierpliwości.*

*Pragnę podziękować,
Pracownikom i Doktorantom
Katedry Biotechnologii,
Mikrobiologii i Żywienia Człowieka
a w szczególności Panu Kierownikowi
prof. dr hab. Adamowi Waśko,
który stworzył sprzyjające warunki,
umożliwiające realizację założonych zadań
badawczych.*

*Dziękuję również całej mojej Rodzinie za bycie ze
mną podczas tej przygody, to dzięki Wam jestem tu, gdzie
jestem.*

Oświadczenie promotora rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego.

Data Podpis promotora

Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej

Świadom odpowiedzialności prawnej oświadczam, że:

- ☐ niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana przez mnie samodzielnie pod kierunkiem Promotora/~~Promotorów/Promotora pomocniczego*~~ i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami.
- ☐ przedstawiona rozprawa doktorska nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem stopnia naukowego.
- ☐ niniejsza wersja rozprawy doktorskiej jest tożsama z załączoną na nośniku wersją elektroniczną.

Data Podpis autora

*niepotrzebne skreślić

WYKAZ PRAC NAUKOWYCH WCHODZĄCYCH W SKŁAD CYKLU

- I. **Adam Staniszewski**, Monika Kordowska-Wiater; Probiotic and potentially probiotic yeasts - characteristics and food application. Foods 2021 T. 10, Nr 6, 1306, DOI: 10.3390/foods10061306
Liczba punktów MEiN: 100, IF: 5,561

- II. **Adam Staniszewski**, Monika Kordowska-Wiater; Probiotic yeasts and how to find them – Polish wines of spontaneous fermentation as source for potentially probiotic yeasts. Foods 2023 T. 12, Nr 18, 3392, DOI: 10.3390/foods12183392
Liczba punktów MEiN: 140, IF: 4,7

- III. **Adam Staniszewski**, Patrycja Staniszevska, Monika Kordowska-Wiater; Probiotic Yeasts and How to Find Them-From Spoilage to Probiotic. Applied Sciences-Basel. 2024. T. 14, Nr 24, 11698, DOI: 10.3390/app142411698
Liczba punktów MEiN: 100, IF: 2,5

- IV. **Adam Staniszewski**, Patrycja Staniszevska, Elwira Komoń-Janczara, Monika Kordowska-Wiater; Probiotic Yeast and How to Use Them - Combining Traditions and New Waves in Fermented Beverages. Foods 2025 T. 14, Nr 16, 2921, DOI: 10.3390/foods14162921
Liczba punktów MEiN: 100, IF: 5,1

Sumaryczna liczba punktów MEiN zgodnie z rokiem wydania publikacji: 440 pkt MEiN,
sumaryczny Impact Factor: 17,861

SPIS TREŚCI:

Spis treści.....	5
1.Streszczenie	6
2. Summary	7
3. Wprowadzenie teoretyczne	8
4. Hipotezy i cele badawcze	19
5. Materiały i metody badawcze.....	20
5.1. Izolacja drożdży i badanie ich właściwości probiotycznych	20
5.1.1. Izolacja drożdży.....	21
5.1.2. Identyfikacja drożdży	22
5.1.3. Ocena właściwości probiotycznych uzyskanych izolatów.....	22
5.1.4. Właściwości szczepów związane z bezpieczeństwem i wirulencją	25
5.1.5. Aktywność enzymatyczna badanych szczepów	25
5.1.6 Badanie właściwości szczepów związanych z produkcją napojów fermentowanych	26
5.2. Przygotowanie probiotycznego produktu spożywczego	26
5.2.1. Dobór produktu spożywczego do dalszych badań.....	26
5.2.2. Przygotowanie podpiwku	28
5.2.3. Pomiar parametrów związanych z fermentacją.....	28
5.3. Analizy statystyczne	31
6. Omówienie wyników i dyskusja.....	32
6.1. Izolacja drożdży i badanie ich właściwości probiotycznych	32
6.1.1. Izolacja i identyfikacja drożdży.....	32
6.1.2. Ocena właściwości probiotycznych uzyskanych izolatów.....	36
6.1.3. Właściwości szczepów związane z bezpieczeństwem i wirulencją	47
6.1.4. Aktywność enzymatyczna badanych szczepów	48
6.1.5 Badanie właściwości szczepów związanych z produkcją napojów fermentowanych	50
6.2. Przygotowanie probiotycznego produktu spożywczego	56
6.2.1. Pomiar parametrów związanych z fermentacją.....	57
7. Stwierdzenia i wnioski	71
8. Bibliografia	73
9. Publikacje składające się na rozprawę doktorską	92
10. Oświadczenia autorów	161

1. Streszczenie

W ostatnich latach coraz większe zainteresowanie zyskują badania nad nowymi, alternatywnymi probiotykami. W trend ten wpisują się badania nad drożdżami probiotycznymi, które przez wiele lat stały w cieniu lepiej poznanych bakterii probiotycznych. Niniejsza praca dotyczy izolacji, charakterystyki oraz zastosowania drożdży probiotycznych pochodzących z żywności i napojów spontanicznej fermentacji. Badania odpowiadają na rosnące zainteresowanie naukowe i przemysłowe probiotykami niebakteryjnymi oraz na potrzebę wyjścia poza dobrze poznany gatunek drożdży probiotycznych *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*. Poprzez serię komplementarnych badań - od syntezy literatury, poprzez izolację eksperymentalną, charakterystykę funkcjonalną aż po próby aplikacyjne - wykazano, że zarówno gatunki drożdży konwencjonaln, jak i niekonwencjonalnych ,stanowią obiecujące kultury do wykorzystania jako probiotyki, oraz składniki żywności funkcjonalnej. W drodze prac eksperymentalnych pozyskano izolaty drożdży z różnych nisz ekologicznych (wina spontanicznej fermentacji, psująca się żywność) i dokonano ich identyfikacji genetycznej, a w kolejnym etapie przeprowadzono ocenę ich właściwości probiotycznych i technologicznych. W ostatnim etapie wytypowane izolaty należące do rodzajów: *Saccharomyces*, *Hanseniaspora*, *Metschnikowia* i *Pichia* zastosowano jako kultury startowe do produkcji tradycyjnego polskiego napoju fermentowanego - podpiwku. Uzyskane podpiwki poddano szeregowi testów oceniających ich właściwości oraz określono potencjał technologiczny pozyskanych drożdży. W toku analiz udało potwierdzić się pełen zakres hipotez założonych w poniższej pracy. Jako najbardziej obiecujące drożdże probiotyczne w toku badań wytypowano sześć szczepów : *Hanseniaspora uvarum* (15_Hans_uvarum i 16_Hans_uvarum), *Metschnikowia pulcherrima* (110_Metsch_pulcherrima i 113_Metsch_pulcherrima), *Pichia kudriavzevii* (101_Pich_kudriavzevii) oraz *Saccharomyces cerevisiae* (37_Sacch_cerevisiae).

Słowa kluczowe: drożdże, drożdże probiotyczne, podpiwek, probiotyki, żywność funkcjonalna

2. Summary

In recent years, research into new, alternative probiotics has been gaining increasing interest. This trend includes research on probiotic yeasts, which for many years have been overshadowed by better-known probiotic bacteria. This paper concerns the isolation, characterization, and application of probiotic yeasts derived from spontaneously fermented foods and beverages. This research responds to the growing scientific and industrial interest in non-bacterial probiotics and the need to expand beyond the well-known probiotic yeast species *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*. Through a series of complementary studies-from literature synthesis, through experimental isolation, functional characterization, and application trials-it has been demonstrated that both conventional and unconventional yeast species represent promising cultures for use as probiotics and functional food ingredients. Through experimental work, yeast isolates from various ecological niches (spontaneous fermentation wines, spoiled foods) were obtained and genetically identified. Subsequently, their probiotic and technological properties were assessed. Finally, the selected isolates, belonging to the genera *Saccharomyces*, *Hanseniaspora*, *Metschnikowia*, and *Pichia*, were used as starter cultures for the production of a traditional Polish fermented beverage -underbeer. The obtained underbeer strains were subjected to a series of tests to assess their properties, and the technological potential of the yeasts was determined. The analyses confirmed the full range of hypotheses proposed in this study. Six strains were selected as the most promising probiotic yeasts in the course of the study: *Hanseniaspora uvarum* (15_Hans_uvarum and 16_Hans_uvarum), *Metschnikowia pulcherrima* (110_Metsch_pulcherrima and 113_Metsch_pulcherrima), *Pichia kudriavzevii* (101_Pich_kudriavzevii) and *Saccharomyces cerevisiae* (37_Sacch_cerevisiae).

Key words: yeast, probiotic yeasts, underbeer, probiotics, functional food

3. Wprowadzenie teoretyczne

Drożdże towarzyszą ludzkości od zarania dziejów, pierwsze potwierdzone naukowo doniesienia zastosowania drożdży sięgają czasów starożytnego Egiptu, gdzie stosowane były w produkcji piwa i chleba (Samuel 1996). Fermentacja zaliczana jest do najstarszych metod biotechnologicznych znanych ludzkości, w zależności od źródła pierwsze dowody na celowe wykorzystanie żywności fermentowanej sięgają od 13 000 do 6000 lat temu (Craig 2021; Manna et al. 2021; Samuel 1996). Fermentacja pojawiła się w starożytnych kulturach jako sposób na konserwację żywności w trudnych okresach, była także wykorzystywana podczas uczt rytualnych oraz do poprawy smaku i zapachu potraw (Ojha and Tiwari 2016). Dowody historyczne wskazują, że fermentacja produktów, takich jak mleko i zboża była powszechna w wielu regionach świata, a sam proces fermentacji odgrywał kluczową rolę w wielu dawnych cywilizacjach np. warzenie piwa w Babilonii, produkcja sosu sojowego we wschodniej Azji oraz fermentacja owoców w Grecji (Manna et al. 2021; Ojha and Tiwari 2016).

Wraz z procesem fermentacji nieodłącznym towarzyszem ludzkości były probiotyki. Naukowcy zauważali korzystny wpływ spożywania dużych ilości fermentowanych produktów mlecznych na zdrowie już w XIX wieku, lecz przyczyna tych pozytywnych efektów pozostawała nieodkryta. Chociaż Louis Pasteur zidentyfikował bakterie i drożdże odpowiedzialne za proces fermentacji, to nie powiązał tych mikroorganizmów z żadnym wpływem na zdrowie (Barnett 2000). W 1905 roku Ilja Miecznikow, wysnuł teorię, że wpływ na długowieczność Bułgarów mają bakterie kwasu mlekowego używane do fermentacji jogurtu, które są również obecne w okrężnicy (Lynne V. McFarland 2015). Jedno z najwcześniejszych badań dotyczących wpływu probiotyków na ludzi, odbyło się w 1922 roku i obejmowało zastosowanie bakterii *Lactobacillus acidophilus* u 30 pacjentów z przewlekłymi zaparciami, biegunką lub egzemą. Badanie to wykazało poprawę stanu zdrowia we wszystkich trzech schorzeniach (Cheplin, Post, and Wiseman 1923; Lynne V. McFarland 2015). Termin „probiotyk” opisujący substancję wydzielaną przez mikroorganizm, o działaniu stymulującym wzrost innego drobnoustroju, pojawił się w literaturze po raz pierwszy w 1965 roku, w pracy Lilley i Stillwell (Lilly and Stillwell 1965). Liczne badania prowadzone w kolejnych dekadach znacznie poszerzyły wiedzę naukową o

probiotykach. W 2001 roku WHO/FAO zdefiniowała na nowo probiotyki jako „żywe mikroorganizmy, które podane w odpowiednich ilościach przynoszą korzyści zdrowotne gospodarzowi”, a w kolejnych latach International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics przedstawiło konsensus w kwestii zakresu i właściwego stosowania terminu „probiotyki” (Hill et al. 2014).

Wytypowanie odpowiednich kandydatów na probiotyki może być czasochłonne i kosztowne, jednak pewne właściwości ułatwiają przeprowadzenie wstępnego przesiewu *in vitro*. Te właściwości można podzielić na dwie główne grupy: cechy funkcjonalne i technologiczne. Wśród cech funkcjonalnych wyróżnia się przede wszystkim: zdolność mikroorganizmu do przeżycia w przewodzie pokarmowym, interakcje z organizmem gospodarza, właściwości przeciwdrobnoustrojowe oraz bezpieczeństwo stosowania. Ponieważ większość probiotyków jest przyjmowana doustnie, aby dotrzeć do przewodu pokarmowego (jelit), muszą one przetrwać przejście z jamy ustnej do jelit. Oznacza to konieczność sprawdzenia, czy potencjalne szczepy probiotyczne są odporne na warunki panujące w przewodzie pokarmowym (enzymy trawienne, kwas żołądkowy, sole żółciowe, pH i temperatura ciała gospodarza), czy mają zdolność kolonizacji powierzchni śluzówki jelit oraz czy są w stanie wytrzymać konkurencję ze strony mikrobioty jelitowej (zdolność do auto- i koagregacji, hydrofobowość powierzchniowa oraz oporność na antybiotyki). Wybrany szczep musi być również zidentyfikowany gatunkowo i szczepowo, poddany testom bezpieczeństwa (nie może wytwarzać toksyn i innych czynników wirulencji, ani wykazywać szkodliwych aktywności metabolicznych (Lynne V. McFarland 2015; Staniszewski and Kordowska-Wiater 2021; Žuntar et al. 2020). Cechy technologiczne obejmują łatwość wytwarzania dużych ilości biomasy, odporność na procesy konserwacji, takie jak liofilizacja, długi okres przydatności produktu końcowego, stabilność genetyczną oraz brak negatywnego wpływu na właściwości organoleptyczne (smak, zapach, konsystencję) produktu końcowego (Jach et al. 2013; Libudzisz 2002).

Jednym z rozwijających się trendów badawczych nad probiotykami są badania nad probiotycznymi drożdżami (Staniszewski and Kordowska-Wiater 2021). Historia drożdży probiotycznych sięga początku XX wieku, kiedy Henri Boulard wyizolował oryginalny szczep drożdży *Saccharomyces boulardii* z owoców liczi podczas epidemii cholery w Indochinach. W 1947 roku francuska firma farmaceutyczna Biocodex nabyła

prawa własności intelektualnej do tego szczepu *S. boulardii* i zarejestrowała go w Instytucie Pasteura w 1953 roku jako *S. boulardii* CNCM I-745. Obecnie drożdże te są jedynymi drożdżami probiotycznymi stosowanymi w leczeniu biegunki związanej z antybiotykoterapią oraz ostrego nieżytu żołądkowo-jelitowego u dzieci. Skuteczność tego szczepu została potwierdzona klinicznie również w leczeniu ostrych i przewlekłych zaburzeń przewodu pokarmowego, takich jak biegunka wywołana przez *Clostridioides difficile*, biegunka podróźnych, zespół jelita drażliwego (IBS) oraz choroba Crohna (Kelesidis and Pothoulakis 2012; Ting, Lee, and Goh 2025).

Obecnie taksonomiczna pozycja *S. cerevisiae* var. *boulardii* jest wciąż dyskusyjna, jednak aktualne publikacje naukowe oraz baza Index Fungorum uznają *S. cerevisiae* var. *boulardii* jedynie za odmianę *S. cerevisiae*, blisko spokrewnioną ze szczepami winiarskimi tego gatunku. Początkowo *S. cerevisiae* var. *boulardii* był opisywany jako osobny gatunek - *Saccharomyces boulardii*, jednak szybki rozwój filogenetyki molekularnej w ostatnich latach doprowadził do zmiany tej klasyfikacji, podobnie jak w przypadku wielu innych gatunków drożdży (L. V. McFarland 1996; Ting, Lee, and Goh 2025). Zaproponowano kilka mechanizmów działania probiotycznego *S. cerevisiae* var. *boulardii*, w tym modulację mikrobiomu jelitowego, hamowanie rozwoju patogenów, adhezję do nabłonka jelitowego, immunoregulację odporności oraz wpływ troficzny na przewód pokarmowy. *S. cerevisiae* var. *boulardii* pomaga w przywróceniu prawidłowej flory jelitowej u pacjentów po antybiotykoterapii lub operacji, potencjalnie działając jako tymczasowy substytut naturalnego mikrobiomu do czasu jego regeneracji. Jego działanie przeciwdrobnoustrojowe obejmuje produkcję białek neutralizujących toksyny bakteryjne (takie jak toksyna cholery), co wpływa na redukcję poziomu cAMP, przyczyniającego się do powstania biegunki oraz hamowanie powierzchniowych endotoksyn *Escherichia coli* poprzez defosforylację. Dodatkowe mechanizmy obejmują stymulację produkcji immunoglobuliny A przeciwko toksynie A *Clostridium difficile*, degradację toksyn za pomocą wydzielanych proteaz oraz modulację produkcji cytokin. (Buts et al. 2006; Deleu et al. 2024; Hedin et al. 2024; Kelesidis and Pothoulakis 2012; Pais et al. 2020; Tiago et al. 2012). Drożdże te mogą także wzmacniać integralność bariery jelitowej przez stymulację wydzielania białek TJ (ang. tight junction proteins) oraz ograniczać kontakt patogenów z nabłonkiem jelit poprzez bezpośrednie wiązanie z ich komórkami za pomocą reszt mannozowych w ścianie komórkowej drożdży (Pothoulakis et al. 1993). Choć wydzielanie związków

przeciwdrobnoustrojowych (peptydów, nadtlenu wodoru i kwasów organicznych) jest typowym mechanizmem bakteryjnych probiotyków, nie wykazano, by *S. cerevisiae* var. *boulardii* miał bezpośrednie działanie hamujące wzrost bakterii czy wydzieliał takie związki (Offei et al. 2019). Efekty troficzne przypisywane *S. cerevisiae* var. *boulardii* są również bardzo interesujące. Obejmują one stymulację błony rąbkowej, zwiększanie wydzielania enzymów trawiennych (np. sacharazy-izomaltazy, maltazy-glukoamylazy, laktazy-flozyny hydrolazy, aminopeptydazy alaninowej, fosfatazy alkalicznej) oraz transporterów składników odżywczych (np. białka transportujące glukozę z sodem), co może być indukowane przez poliaminy, a także wpływ na produkcję krótkołańcuchowych i rozgałęzionych kwasów tłuszczowych, odgrywających ważne role w różnych tkankach (jelita, wątroba, tkanka tłuszczowa, mięśnie i mózg) (Pais et al. 2020; Ting, Lee, and Goh 2025). W ostatnich latach dodatkowo zyskują na znaczeniu badania molekularne mające na celu zrozumienie różnic pomiędzy *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* (Sb), a *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) i odkrycie molekularnych przyczyn właściwości probiotycznych tych drożdży (Carvalho, Moreno, and Domingues 2025; Ting, Lee, and Goh 2025). Ting i in. wyróżniają następujące różnice: Sb to szczep diploidalny, charakteryzujący się tetrasomią chromosomu XII, podczas gdy Sc występuje zarówno w formie haploidalnej, jak i diploidalnej. Sb nie posiada nienaruszonych elementów transpozycyjnych Ty, zachowując jedynie pojedyncze długie powtórzenia terminalne (LTR). Sb wykazuje zmienność liczby kopii genów, w tym wzrosty liczby kopii THI13, IMD3, COS3, FEX1 i HSP32 oraz spadek liczby kopii CUP1. Dodatkowe zróżnicowania obserwuje się w genach związanych z wykorzystaniem maltozy (MAL11, MAL13, IMA2, IMA3, IMA4), metabolizmem heksoz (HXT9, HXT11, REE1), katabolizmem asparaginy (ASP3-1, ASP3-2, ASP3-3, ASP3-4), transportem żelaza sideroforowego (ARN2, ENB1), sortowaniem wakuolarnym (VTH1, VTH2) i innymi (AYT1, AIF1, COS10, BDS1). Autorzy sugerują, iż grubsza warstwa mannoproteinowa ściany komórkowej Sb - prawdopodobnie związana z rozszerzoną rodziną genów seripauperyny - zwiększa oporność na octany. Mutacja punktowa G1278A w genie PGM2 zmniejsza metabolizm galaktozy, lecz sprzyja lepszemu wzrostowi w temperaturze 37°C. Sb jest organizmem asporogennym, prawdopodobnie ze względu na dwie mutacje (C1578T i T2096A) w genie MATa1, które skutkują niepełną mejozą i brakiem zdolności do prawidłowej sporulacji (Ting, Lee, and Goh 2025).

Wiele badań wykazało skuteczność *S. cerevisiae* var. *boulardii* w leczeniu schorzeń przewodu pokarmowego, takich jak biegunki pokarmowe i podróżnych, choroba Crohna, nieswoiste zapalenia jelit, zespół jelita drażliwego, ostry nieżyt żołądkowo-jelitowy u dorosłych i dzieci, a także przewlekła biegunka u osób zakażonych HIV, wywołana przez *Clostridium difficile*, *Vibrio cholerae* i inne patogeny (Cassanego et al. 2015; Das, Gupta, and Das 2016; Feizizadeh, Salehi-Abargouei, and Akbari 2014). Badania Profir i wsp. wykazały również istotne zmniejszenie nasilenia toksokarozy (Czerucka, Piche, and Rampal 2007; Profir, Buruiana, and Vizireanu 2015; Staniszewski and Kordowska-Wiater 2021). Probiotyczne drożdże są także stosowane w celu ograniczenia działań niepożądanych terapii eradykacyjnej *Helicobacter pylori* (Profir, Buruiana, and Vizireanu 2015; Yang et al. 2017). Skuteczność probiotycznych drożdży została udokumentowana w wielu badaniach klinicznych (Bahuguna, Venugopal, and Rai 2024; Consoli et al. 2016; Das, Gupta, and Das 2016; Efremova et al. 2024; Feizizadeh, Salehi-Abargouei, and Akbari 2014; D. Wang et al. 2025). Das i wsp. wykazali w randomizowanym badaniu klinicznym, że podawanie dawki 250 mg dwa razy dziennie dzieciom poniżej 5. roku życia istotnie skracało czas trwania biegunki i pobytu w szpitalu, bez skutków ubocznych, ale nie wpływało na długość gorączki ani wymiotów w ostrej biegunce rotawirusowej (Das, Gupta, and Das 2016). Feizizadeh i wsp., na podstawie metaanalizy 22 badań randomizowanych, stwierdzili, że *S. cerevisiae* var. *boulardii* może być skuteczny w leczeniu ostrej biegunki u dzieci niezależnie od jej przyczyny, znacząco zmniejszając częstotliwość stolców i ryzyko biegunki. W analizowanych badaniach nie zaobserwowano poważnych działań niepożądanych, choć były one prowadzone na wcześniej zdrowych dzieciach, wykluczając pacjentów z niedożywieniem lub niedoborami odporności (Feizizadeh, Salehi-Abargouei, and Akbari 2014). Dla tych grup pacjentów dane są ograniczone, choć opisano pojedyncze przypadki: Thygesen i wsp. opisali przypadek 79-letniej kobiety z fungemią spowodowaną *S. cerevisiae* var. *boulardii* (SbF) po resekcji jelita (Thygesen, Glerup, and Tarp 2012), Kara i wsp. opisali dwa przypadki SbF po leczeniu probiotykiem na oddziale intensywnej terapii (Kara et al. 2018), Ellouze i wsp. zgłosili przypadki wstrząsu septycznego po podaniu *S. cerevisiae* var. *boulardii* (Ellouze et al. 2016). Przypadki SbF zgłaszano także u pacjentów z biegunką związaną z *Clostridium difficile*, leczonych doustnie *S. cerevisiae* var. *boulardii* wraz z antybiotykami (Santino et al. 2014). Jednak większość tych przypadków dotyczy ciężko chorych lub osób z obniżoną

odpornością.

Kolejną ewolucją wśród trendu badawczego dotyczącego probiotycznych drożdży jest rozszerzenie zakresu zainteresowań badawczych poza przedstawicieli *Saccharomyces spp.* Nowe izolaty drożdży o potencjale probiotycznym zostały pozyskane z różnych produktów i środowisk, takich jak owoce, warzywa, żywność i napoje fermentowane czy odpady przemysłu mleczarskiego. Nowe szczepy muszą spełniać wszystkie wymagane kryteria probiotyczne, cechować się bezpieczeństwem oraz wykazywać dobre właściwości technologiczne. Izolowanie drożdży z wielu środowisk pozwala odkrywać nowe szczepy probiotyczne o unikalnych cechach biochemicznych, na przykład zdolność do wydzielania zewnątrzkomórkowej laktazy, co może umożliwiać trawienie serwatki stosowanej jako dodatek paszowy. Najnowsze badania wskazują, że oprócz *S. cerevisiae var. boulardii*, także inne gatunki, takie jak *Kluyveromyces marxianus* oraz *Pichia kudriavzevii*, mogą wykazywać właściwości probiotyczne. Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA) przyznał status QPS (qualified presumption of safety) jedynie kilku drożdżom dopuszczanym jako dodatki do żywności, m.in. *K. marxianus var. lactis* oraz *K. marxianus var. fragilis* (Arévalo-Villena et al. 2018). Wiele badań dotyczących nie-*Saccharomyces* wykazało, że mogą one mieć właściwości probiotyczne. Przykładowo, Ochangco i współpracownicy przebadali szczepy *Debaryomyces hansenii* wyizolowane z sera oraz przewodów pokarmowych ryb. W trakcie badań za najlepszego kandydata na probiotyk uznali szczep DI 02 ze względu na jego wyjątkową zdolność przetrwania w trudnych warunkach przewodu pokarmowego, silną adhezję do komórek Caco-2 i mucyny oraz wywoływanie silniejszej odpowiedzi przeciwzapalnej niż *S. cerevisiae var. boulardii* (do oceny użyto stosunku cytokin IL-10 do IL-12 jako wskaźnika efektu przeciwzapalnego). Inny szczep, DI 09, wykazał jeszcze silniejsze przyleganie do komórek Caco-2 i mucyny. Dwa kolejne szczepy (DI 10 i DI 15) indukowały wyższy stosunek IL-10/IL-12 niż szczepy *S. cerevisiae var. boulardii*, co wskazuje na silniejsze działanie przeciwzapalne wobec ludzkich komórek dendrytycznych (Ochangco et al. 2016). Wyniki uzyskane przez Oliveirę i współpracowników sugerują, że niektóre drożdże wyizolowane z fermentowanych oliwek stołowych, takie jak *Pichia guilliermondii* 25A oraz *Candida norvegica* 7A, wykazują potencjał probiotyczny dzięki odporności na warunki symulowanego przewodu pokarmowego, na poziomie zbliżonym do szczepu referencyjnego *S. cerevisiae var. boulardii* (Oliveira et al. 2017). Gil-Rodrigues i

współautorzy przeanalizowali 130 szczepów drożdży z kolekcji kultur i zaobserwowali, że dwa szczepy *Schizosaccharomyces pombe* (IFI-936 i IFI-2180) charakteryzują się wysoką zdolnością do przetrwania w jelitach gospodarza (dobry wzrost w temperaturze 37°C, wysoka tolerancja na warunki przewodu pokarmowego oraz duża autoagregacja), a także znaczną aktywnością antyoksydacyjną (Gil-Rodríguez, Carrascosa, and Requena 2015). Z kolei Rodríguez i współpracownicy spośród 108 zidentyfikowanych szczepów drożdży różnego pochodzenia wskazali, że *Hanseniaspora osmophila* i *P. kudriavzevii* są najbardziej obiecującymi szczepami na podstawie analiz statystycznych zastosowanych na każdym etapie selekcji (Fernandez-Pacheco Rodríguez et al. 2018).

Zastosowanie drożdży probiotycznych jako dodatku do żywności pozwala na powstanie produktów spełniających definicję żywności funkcjonalnej. Termin „żywność funkcjonalna” jest zazwyczaj stosowany w celach marketingowych, ma różne definicje i nie jest prawnie uznawany na całym świecie. Wyjątkiem jest Japonia, gdzie żywność funkcjonalna stanowi odrębną kategorię prawną. Według Międzynarodowej Rady Informacji o Żywności (IFIC) żywność funkcjonalna to „żywność lub składniki diety, które mogą przynosić korzyści zdrowotne wykraczające poza podstawowe odżywianie” (Henry 2010; Ifland et al. 2015). W 2022 roku Temple zaproponował nową definicję żywności funkcjonalnej: „Żywność funkcjonalna to nowoczesna żywność, której formuła opiera się na substancjach lub żywych mikroorganizmach o potencjalnej wartości prozdrowotnej lub zapobieganiu chorobom, w stężeniu bezpiecznym i wystarczająco wysokim, aby osiągnąć zamierzone korzyści. Dodane składniki mogą obejmować składniki odżywcze, błonnik pokarmowy, fitochemikalia, inne substancje lub probiotyki.” (Temple 2022).

Produkty probiotyczne, dzięki swoim korzystnym właściwościom wpływającym na różne funkcje fizjologiczne, mogą być zaliczane do żywności funkcjonalnej (Roberfroid 2000). W ostatnich latach opublikowano wiele badań dotyczących wykorzystania drożdży probiotycznych i potencjalnie probiotycznych w żywności. Senkarcinova i współpracownicy wykazali możliwość zastosowania szczepu probiotycznego *S. cerevisiae* var. *boulardii* w produkcji piwa niskoalkoholowego i bezalkoholowego (Senkarcinova et al. 2019). Dane przedstawione przez Ramirez-Cota i in. sugerują, że ten gatunek drożdży może przetrwać stężenia etanolu spotykane w najpopularniejszych stylach piwa rzemieślniczego, co oznacza, że stworzenie piwa

wzbogaconego w probiotyki jest potencjalnie możliwe (Ramírez-Cota et al. 2021). Mulero-Cerezo i współautorzy stwierdzili, że „*Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* jako jedyny starter drożdżowy pozwala uzyskać piwo rzemieślnicze o wyższej aktywności antyoksydacyjnej, niższej zawartości alkoholu, podobnych walorach sensorycznych oraz większej przeżywalności drożdży po 45 dniach w porównaniu z piwem produkowanym przy użyciu komercyjnego szczepu *S. cerevisiae* powszechnie stosowanego w browarnictwie” (Mulero-Cerezo, Briz-Redón, and Serrano-Aroca 2019). Wyniki przedstawione przez de Paula i współpracowników wykazały również, że piwo funkcjonalne zawierające *S. cerevisiae* var. *boulardii* po przechowywaniu oraz po symulowanym przejściu przez przewód pokarmowy miało populację żywych komórek przekraczającą minimalną dawkę zalecaną dla efektu prozdrowotnego (de Paula et al. 2019). Drożdże probiotyczne mogą być stosowane nie tylko w napojach, ale także w wielu innych produktach spożywczych. Świeca i współpracownicy zaproponowali wykorzystanie *S. cerevisiae* var. *boulardii* jako dodatku do wzbogacania kiełków fasoli i zastosowania ich jako nośnika probiotyków. Ten dodatek nie wpływał na właściwości kiełków, a jednocześnie znacząco poprawiał jakość mikrobiologiczną produktu końcowego (Swieca et al. 2019). Sarwar i in. opracowali jogurt synbiotyczny z udziałem *S. cerevisiae* var. *boulardii* i inuliny. Połączenie drożdży i inuliny zwiększało ilość korzystnych związków lotnych oraz poprawiało teksturę produktu w porównaniu do jogurtu kontrolnego (Sarwar et al. 2019). Drożdże i bakterie kwasu mlekowego (LAB) są często izolowane razem z różnych spontanicznie fermentowanych produktów spożywczych (Staniszewski and Kordowska-Wiater 2021). Karaolis i współpracownicy badali możliwość wykorzystania *S. cerevisiae* var. *boulardii* jako probiotyku w jogurcie kozim z kulturami starterowymi LAB, stwierdzając, że drożdże wspierały wzrost LAB, a ich liczebność była stabilna przez cały okres przechowywania (Karaolis et al. 2013). Podobne korzystne interakcje między *S. cerevisiae*, a LAB występują w fermentacji zakwasu (Sieuwert, Bron, and Smid 2018). Xu i współpracownicy opisali zależność pomiędzy *Lactobacillus*, a *S. cerevisiae* jako złożoną i zależną od składu i procesu produkcji fermentowanej żywności (Z. Xu et al. 2020). Zwykle interakcja ta jest mutualistyczna i korzystna dla obu grup mikroorganizmów, choć nie zawsze oznacza pozytywny wpływ na produkt końcowy. Przykładowo, fermentacja malolaktyczna prowadzona przez *Lactobacillus* może być pożądana w niektórych napojach, takich jak kwaśne piwa, ale w większości przypadków zakwaszenie produktu uznaje się za wadę

spowodowaną zanieczyszczeniem podczas produkcji (Bartowsky 2009; Suzuki 2011; Z. Xu et al. 2020). *S. cerevisiae* wydziela czynniki wzrostowe, takie jak dwutlenek węgla i aminokwasy, które wspierają rozwój *Lactobacillus*; dwutlenek węgla tworzy lokalne środowisko mikrobeztlenowe, preferowane przez *Lactobacillus* spp. (Suharja, Henriksson, and Liu 2014). Drożdże wydzielają również aminokwasy takie jak treonina, glutamina, alanina, glutaminian, seryna i glicyna, umożliwiając LAB wzrost nawet w warunkach, które normalnie byłyby dla nich niekorzystne (Ponomarova et al. 2017). W fermentowanych produktach mlecznych *Lactobacillus* rozkłada laktozę (główny cukier mleka, którego *S. cerevisiae* nie metabolizuje) na glukozę i galaktozę, dostarczając drożdżom źródła węgla. Oprócz galaktozy, kwas mlekowy produkowany przez LAB może być również wykorzystywany przez drożdże w warunkach tlenowych, co może dodatkowo stymulować określone gatunki *Lactobacillus* do produkcji większych ilości kefiranu - biopolimeru o potencjalnych zastosowaniach spożywczych i biomedycznych (Staniszewski and Kordowska-Wiater 2021). Drożdże probiotyczne i potencjalnie probiotyczne mogą być również wykorzystywane do fermentacji produktów zbożowych. Choć spożycie produktów pełnoziarnistych i wieloziarnistych przynosi wiele korzyści zdrowotnych, to jednak produkty te zawierają często czynniki antyodżywcze. Banik i współpracownicy wykazali, że zastosowanie kultury starterowej *S. cerevisiae* APK1 w biofortyfikacji substratów wieloziarnistych wykorzystywanych w tradycyjnych daniach indyjskich prowadziło do wzrostu zawartości białka, błonnika i skrobi oraz redukcji poziomu antyodżywczych składników. Podczas fermentacji zaobserwowano również wzrost potencjału antyoksydacyjnego oraz zawartości związków fenolowych i flawonoidów (Banik et al. 2020). Co więcej, probiotyczne drożdże z rodzaju *Saccharomyces* korzystnie wpływają na wartość odżywczą produktów roślinnych poprzez syntezę folianów oraz eliminację fitynianów i innych substancji antyodżywczych. Wytwarzane przez nie fitazy zwiększają biodostępność i przyswajanie kluczowych minerałów, takich jak żelazo, cynk, magnez i fosfor (Rajkowska, Kunicka-Styczyńska, and Rygala 2012). Dodatkową zaletą *S. cerevisiae* var. *boulardii* są jego właściwości przeciwdrobnoustrojowe oraz zdolność do rozkładu mykotoksyn takich jak aflatoksyny, patulina, ochratoksyna A i inne (Abdel-Kareem, Rasmey, and Zohri 2019; Liu et al. 2020). Naimah i współpracownicy wykazali, że peptydy przeciwdrobnoustrojowe wytwarzane przez te drożdże hamują wzrost *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Staphylococcus aureus* (Naimah, Al-

Manhel, and Al-Shawi 2018). Goktas i in. wykazali również aktywność przeciwdrobnoustrojową *S. cerevisiae* var. *boulardii* pochodzących z suplementów diety wobec *Salmonella* Typhimurium, *Yersinia enterocolitica*, *Candida albicans*, *Alternaria alternata* i *Aspergillus flavus* (Goktas, Dertli, and Sagdic 2021). Oprócz zastosowania *S. cerevisiae* var. *boulardii* w produkcji nowych funkcjonalnych produktów spożywczych, szczep probiotyczny *Pichia kudriavzevii* OG23 został użyty przez Ogunremi i współpracowników do fermentacji produktu zbożowego. Uzyskano zwiększoną aktywność antyoksydacyjną oraz bogactwo związków aromatycznych, a autorzy sugerują, że produkty zbożowe mogą być skutecznym nośnikiem probiotyków (Ogunremi, Agrawal, and Sanni 2015). Amorim i in. porównali *S. cerevisiae* var. *boulardii* i *Meyerozyma caribbica* w produkcji napojów ananasowych oraz ich właściwości. Wyniki wykazały, że dwa szczepy *M. caribbica*, wyizolowane ze skórki ananasa, wykazują pożądane właściwości probiotyczne na poziomie zbliżonym do referencyjnego szczepu *S. cerevisiae* var. *boulardii*. Szczep 9D *M. caribbica* wybrano do fermentacji. Uzyskany napój cechował się wysoką aktywnością antyoksydacyjną, która nie uległa zmianie w trakcie fermentacji. Produkt wytworzony przy użyciu szczepu 9D charakteryzował się również dobrymi cechami sensorycznymi i został dobrze przyjęty przez konsumentów w porównaniu z napojem fermentowanym przez *S. cerevisiae* var. *boulardii* (Amorim, Piccoli, and Duarte 2018).

Podsumowując, drożdże probiotyczne stanowią obiecujący kierunek w aspekcie badań nad probiotykami, które w dłuższej perspektywie mogą dokonać przełomu na rynku żywności funkcjonalnej i nutraceutyków. Chociaż *S. cerevisiae* var. *boulardii* od dawna jest flagowym probiotykiem drożdżowym o udowodnionych korzyściach, obecnie badania wykazują, że także inne drożdże izolowane z fermentowanych produktów roślinnych i środowisk naturalnych również mogą pełnić rolę probiotyczną, a w dodatku niektóre z nich posiadają unikalne cechy metaboliczne i biochemiczne, niespotykane u tradycyjnych bakterii probiotycznych, co stwarza możliwości rozwoju nowej żywności funkcjonalnej o dodatkowych korzyściach zdrowotnych. Integracja drożdży probiotycznych z żywnością wzbogaconą może prowadzić do powstania produktów, które nie tylko wspierają zdrowie jelit, ale także poprawiają profil odżywczy i bezpieczeństwo żywności - łącząc w sobie tradycję i innowację. Dlatego też w swej pracy doktorskiej wybrałem fermentowane produkty roślinne jako źródło do izolacji drożdży, aby w końcowym etapie zastosować pozyskane izolaty do opracowania

nowoczesnego produktu probiotycznego.

4. Hipotezy i cele badawcze

W związku z wyżej opisanym problemem badawczym, sformułowane zostały następujące hipotezy badawcze:

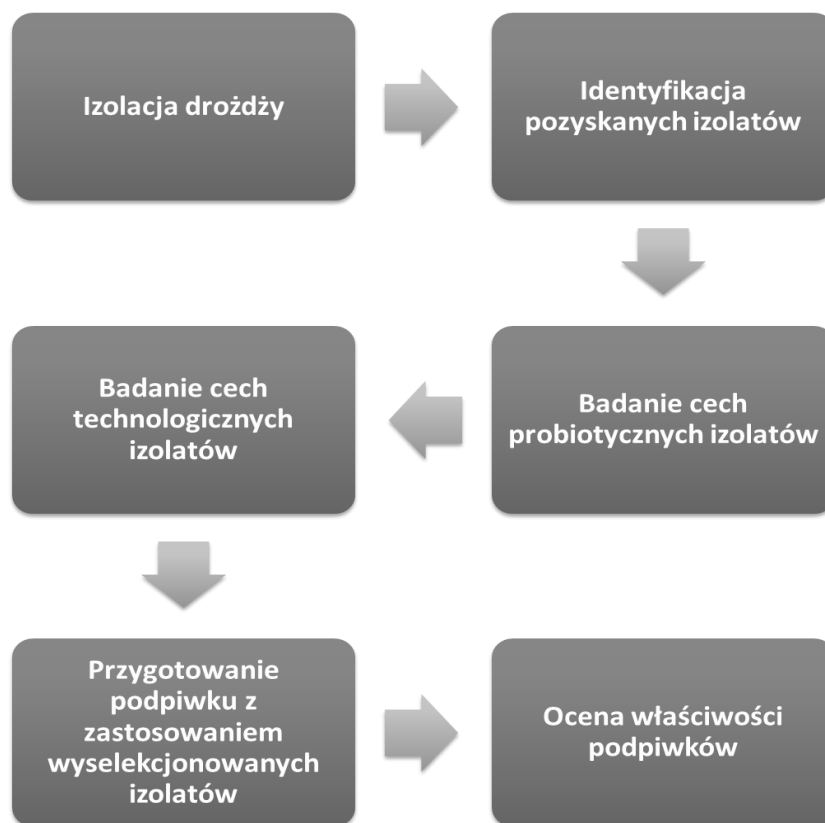
1. Żywność fermentowana pochodzenia roślinnego może być środowiskiem bytowania drożdży o potencjale probiotycznym.
2. Drożdże probiotyczne pochodzące z fermentowanych produktów pochodzenia roślinnego mogą stanowić kultury starterowe do produkcji żywności funkcjonalnej.

Aby zweryfikować hipotezy sformułowano następujące cele:

1. Pozyskanie izolatów drożdży z żywności fermentowanej pochodzenia roślinnego i ich identyfikacja genetyczna.
2. Przetestowanie uzyskanych izolatów pod kątem posiadania właściwości probiotycznych.
3. Przygotowanie produktu spożywczego z zastosowaniem wyselekcjonowanych drożdży probiotycznych.

5. Materiały i metody badawcze

Dysertacja obejmuje doświadczenia laboratoryjne prowadzone w latach 2019-2025. Doświadczenia wykonywano w Katedrze Biotechnologii, Mikrobiologii i Żywienia Człowieka Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie. Szczegółowe metodyki (przygotowane zgodnie z wymogami czasopism) doświadczeń związanych z izolacją drożdży i badaniem ich właściwości probiotycznych przedstawiono w publikacjach (II i III): „Probiotic Yeasts and How to Find Them-Polish Wines of Spontaneous Fermentation as Source for Potentially Probiotic Yeasts” i „Probiotic Yeasts and How to Find Them-From Spoilage to Probiotic”, a metodykę doświadczenia analizującego właściwości produktu spożywczego wyprodukowanego w oparciu o wyizolowane szczepy drożdży - w publikacji (IV): „ Probiotic Yeast and How to Use Them-Combining Traditions and NewWaves in Fermented Beverages”. Uproszczony schemat wykonanych doświadczeń przedstawiony został na Rys. 1.



Rys. 1. Uproszczony schemat przeprowadzonych doświadczeń

5.1 Izolacja drożdży i badanie ich właściwości probiotycznych

Na potrzebę badań wyizolowano drożdże z różnych produktów roślinnych spontanicznej fermentacji: win, piw, dżemów, soków, kompotów, zakwasów. Szczegółowe źródła do izolacji drożdży wymienione są w publikacjach II i III - publikacja II, tabela 1 oraz publikacja III, tabela 1.

5.1.1 Izolacja drożdży

Przygotowano seryjne rozcieńczenia dziesiętne próbek żywności w zakresie od 10^{-1} do 10^{-5} , a objętości 0,2 ml rozprowadzono na płytkach Petriego z podłożem dedykowanym do izolacji drożdży, agarem YGC (ekstrakt drożdżowy, glukoza, chloramfenikol, BTL Łódź, Polska). Płytki inkubowano przez 3-5 dni w temperaturze 25°C. Typowe pojedyncze kolonie drożdży wysiano na agar WL (Biomaxima, Polska) w celu potwierdzenia szczepów innych niż *Saccharomyces*, a następnie na agar YPD, który wykorzystano dwukrotnie w celu uzyskania czystych kultur. Dodatkowo w celu potwierdzenia obecności drożdży przeprowadzono obserwacje mikroskopowe preparatów przyżyciowych. Czyste kultury zamrożono i przechowywano w kolekcji kultur Katedry Biotechnologii, Mikrobiologii i Żywienia Człowieka Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie.

5.1.2 Identyfikacja drożdży

W celu zidentyfikowania uzyskanych szczepów poddano je identyfikacji gatunkowej na podstawie techniki ITS-PCR. Izolację DNA wykonano zgodnie z procedurą Genomic Mini AX Yeast (A&A Biotechnology, Gdańsk, Polska). Amplifikację regionu ITS1- 5,8S - ITS2 przeprowadzono z użyciem starterów ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) i ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC). Do mieszaniny reakcyjnej zawierającej polimerazę Taq - PCR Mix Plus Green (A&A Biotechnology, Gdańsk, Polska) dodano oba startery w stężeniu 0,5 uM i 1 uL matrycy DNA. Warunki amplifikacji: początkowa denaturacja w 95°C przez 5 min, a następnie 34 cykle: denaturacja w 95°C przez 1 min, hybrydyzacja w 56°C przez 1 min, elongacja w 72°C przez 2 min, końcowy etap elongacji w 72°C przez 10 min. Sprawdzone obecność amplikonów za pomocą elektroforezy w 1,5% (w/v) żelu agarozowym w buforze TBE. Sekwencjonowanie uzyskanych amplikonów wykonane zostało przez Genomed S.A. (Warszawa, Polska). Kontigi złożono za pomocą oprogramowania DNA SequenceAssembler v5 (Heracle BioSoft, www.DnaBaser.com). Uzyskane kontigi porównano ze znanymi sekwencjami regionu ITS w bazie danych NCBI GenBank poprzez dopasowanie algorytmem BLAST.

5.1.3 Ocena właściwości probiotycznych uzyskanych izolatów

5.1.3.1 Zdolność do wzrostu w temperaturze 37°C

W celu sprawdzenia zdolności szczepów do rozwoju w temperaturze ciała człowieka, 10 µl świeżej hodowli drożdży wprowadzono do 1 ml bulionu YPD i inkubowano w temperaturze 37°C przez 48 godzin. Przeżywalność w tych specyficznych warunkach określano, obserwując wzrost lub brak wzrostu po okresie inkubacji. Jeśli szczep nie wykazywał zdolności do wzrostu w tych warunkach, wykluczano go z dalszych analiz.

5.1.3.2 Wzrost i przeżywalność w warunkach symulowanego przewodu pokarmowego

Wszystkie szczepy poddano trawieniu in vitro zgodnie z Fernandez-Pacheco i in., 2018, z modyfikacją (Fernandez-Pacheco Rodríguez et al. 2018). Jeden mililitr świeżej hodowli wirowano (5000 obr./min, 10 min), biomasę przemyto bulionem YPD w PBS

(buforowanym roztworze soli fizjologicznej) o pH = 2, uzupełnionym 3 mg/ml pepsyny, odwirowano w tych samych warunkach i po przemyciu zaszczerpiono do 1 ml roztworu żołądkowego zawierającego bulion YPD uzupełniony 3 mg/ml pepsyny w buforowanym roztworze soli fizjologicznej o pH = 2, w celu symulacji warunków panujących w żołądku. Mieszaninę inkubowano w temperaturze 37°C przez 3 godziny. Następnie zawiesinę komórek w roztworze żołądkowym odwirowano (5000 obr./min, 10 min), a biomasę przemyto roztworem imitującym warunki panujące w jelicie cienkim, składającym się z bulionu YPD o pH = 8, zawierającego 1 mg/ml pankreatyny i 0,5% (w/v) soli żółciowych. Biomasa następnie przeniesiono do tego samego roztworu jelitowego i inkubowano w temperaturze 37°C przez 22 godziny. Aby ocenić przeżywalność i wzrost komórek w warunkach żołądkowo-jelitowych, zastosowano technikę posiewu płytkowego na agarze YPD po wykonaniu rozcieńczeń dziesięciokrotnych. Wskaźnik przeżywalności i wzrostu obliczono jako % według wzoru:

$$\text{wskaźnik przeżywalności [\%]} = (\text{liczba żywych komórek/ml po trawieniu in vitro} / \text{liczba żywych komórek/ml przed trawieniem in vitro}) \times 100\%$$

5.1.3.3. Hydrofobowość powierzchni komórek

Hydrofobowość powierzchni komórek badano zgodnie z metodą Amorim i in., 2018 (Amorim, Piccoli, and Duarte 2018). Jeden mililitr świeżej hodowli odwirowano (5000 obr./min, 10 min), biomasę przemyto dwukrotnie i zawieszono w 5 ml PBS (buforowanego roztworu soli fizjologicznej) o pH = 7. Trzy mililitry zawiesiny zmieszano z 1 ml ksylenu. Mieszaninę energicznie wytrząsano przez 2 minuty, a następnie pozwolono na niezakłócone osiadanie w temperaturze 37°C przez 30 minut, co umożliwiło całkowite rozdzielenie faz. Następnie ostrożnie usunięto fazę wodną i spektrofotometrycznie zmierzono gęstość optyczną przy długości fali 600 nm. Spadek wartości OD przyjęto jako miarę hydrofobowości powierzchni komórki obliczoną według poniższego wzoru:

$$\text{Hydrofobowość [\%]} = [1 - ((\text{OD}_{\text{początkowe}} - \text{OD}_{\text{końcowe}}) / \text{OD}_{\text{początkowe}})] \times 100\%$$

gdzie $\text{OD}_{\text{początkowe}}$ i $\text{OD}_{\text{końcowe}}$ to gęstość optyczna (przy 600 nm) przed i po ekstrakcji ksylemem.

5.1.3.4 Zdolność do autoagregacji

Test autoagregacji przeprowadzono zgodnie z metodami Amorim i in., 2018 oraz Gil-Rodriguez i in., 2015 (Amorim, Piccoli, and Duarte 2018; Gil-Rodríguez, Carrascosa, and Requena 2015). Drożdże hodowano w bulionie YPD w temperaturze 37°C przez 24 godziny. Pobrane próbki odwirowano (5000 obr./min, 10 min) i dwukrotnie przemyto PBS o pH = 7. Następnie biomasę zawieszono ponownie w PBS. Aby ocenić autoagregację, 3 ml zawiesiny komórek wirowano przez 10 sekund. Autoagregację określono spektrofotometrycznie po 2, 4 i 24 godzinach inkubacji w temperaturze 37°C na podstawie absorbancji (A) (OD₆₀₀) i wyrażono ją jako:

$$\text{Autoagregacja [\%]} = [1 - (A_t/A_0)] \times 100\%$$

gdzie A_t to absorbancja po 2, 4 lub 24 godzinach, a A₀ to wartość zerowa.

5.1.3.5 Właściwości antyoksydacyjne

Badanie aktywności antyoksydacyjnej przeprowadzono zgodnie z metodą Gil-Rodrigueza i in., 2015 (Gil-Rodríguez, Carrascosa, and Requena 2015). Jeden mililitr hodowli drożdży w bulionie YPD odwirowano (5000 obr./min, 10 min), przemyto dwukrotnie sterylnym roztworem 0,9% NaCl, a osad zawieszono ponownie w 1 ml 0,9% NaCl. Następnie 800 µl zawiesiny komórek przeniesiono do nowej probówki, do której dodano 1 ml roztworu DPPH (2,2-difenylo-1-pikrylohydrazylu) (0,2 mM w metanolu). Mieszaninę zworteksowano i inkubowano w ciemności w temperaturze pokojowej przez 30 min. Po inkubacji probówki reakcyjne wirowano (12 000 obr./min, 5 min), a 300 µl powstałego supernatantu przeniesiono na płytki 96-dołkowe w celu pomiaru absorbancji przy 517 nm (A₅₁₇). Następnie obliczono procent redukcji DPPH za pomocą następującego wzoru :

$$\text{Procent redukcji DPPH [\%]} = [(kontrola A_{517} - próbka A_{517})/kontrola A_{517}] \times 100\%$$

gdzie kontrola A₅₁₇ oznacza absorbancję kontroli (roztwór DPPH bez drożdży), a próbka A₅₁₇ oznacza absorbancję próbki (hodowla drożdży traktowana roztworem DPPH).

5.1.3.6 Właściwości przeciwdrobnoustrojowe

Do oceny aktywności przeciwdrobnoustrojowej szczepów drożdży wobec różnych

gatunków bakterii, w tym *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* i *Enterococcus faecalis*, zastosowano metodę studzienkowo-dyfuzyjną. Hodowle bakteryjne po całonocnej inkubacji w bulionie BHI (bulion sercowo-mózgowy) w temperaturze 37°C, pojedynczo zaszczerpiono po 1 ml na płytki agarowe BHI, rozprowadzono i pozostawiono do wchłonięcia płynu. Następnie, w środku każdej płytki wycięto trzy studzienki (każda o średnicy 5 mm) w równych odstępach od siebie i zaszczerpiono świeżą hodowlą drożdży. Płytki inkubowano przez 24 godziny w temperaturze 37°C, aby ocenić zahamowanie wzrostu bakterii wokół studzienek.

5.1.4 Właściwości szczepów związane z bezpieczeństwem i wirulencją

5.1.4.1 Aktywność hemolityczna

Aby zbadać aktywność hemolityczną, drożdże posiewano na płytki z agarem z krwią (agar Columbia z dodatkiem 5% odfibrynowanej krwi baraniej) (Biomaxima, Lublin, Polska). Płytki inkubowano następnie w temperaturze 37°C przez 72 godziny. Po inkubacji płytki obserwowano pod kątem widocznych oznak hemolizy. Jako kontrolę zastosowano szczep *S. aureus*, który wykazuje zdolności hemolityczne.

5.1.4.2 Produkcja amin biogennych

W celu oceny zdolności szczepów do produkcji amin biogennych, zastosowano metodę zaproponowaną przez Aslankoohi i in., 2016 (Aslankoohi et al. 2016). Drożdże wysiewano na płytki z agarem YPD uzupełnione 0,006% (w/v) dodatkiem purpury bromokrezolowej i mieszaniną aminokwasów (tyrozyna, histydyna, fenyloalanina, leucyna, tryptofan, arginina i lizyna w równych proporcjach) o całkowitym stężeniu masy 1% (w/v). W celu wykrycia amin biogennych (BA), płytki inkubowano w temperaturze 30°C przez 7 dni. Przez cały okres inkubacji codziennie monitorowano wzrost szczepów i wszelkie zmiany w kolorze podłoża. U szczepów drożdży produkujących aminy biogenne, proces dekarboksylacji aminokwasów powodował natychmiastowe pojawienie się fioletowej strefy otaczającej obszar wzrostu. Z drugiej strony, u szczepów, które nie produkowały amin biogennych, obszar wzrostu był otoczony żółtą strefą, którą przypisywano fermentacji glukozy.

5.1.5 Aktywność enzymatyczna badanych szczepów

Aktywność enzymatyczną szczepów oznaczono za pomocą systemu API ZYM (bio-Merieux, Craponne, Francja) zgodnie z zaleceniami producenta. Zawiesinę komórek drożdży przeniesiono do dołków pasków API ZYM i inkubowano w temperaturze 37°C przez 4 godziny. Po okresie inkubacji do każdego dołka dodano po jednej kropli odczynnika ZYM A i ZYM B. Zmiany koloru obserwowane w dołkach, wskazujące na dodatnie reakcje enzymatyczne, odnotowano i wykorzystano do oceny wyników na podstawie karty kolorów API ZYM.

5.1.6 Badanie właściwości szczepów związanych z produkcją napojów fermentowanych

5.1.6.1 Tolerancja na etanol

Szczepy hodowano w temperaturze 28°C przez 48 godzin w bulionie YPD z dodatkiem różnych stężeń etanolu. Stężenie etanolu dla każdego gatunku dobierano na podstawie literatury naukowej (Staniszewski et al. 2025). W przypadku *S. cerevisiae* i *S. cerevisiae* var. *bouardi* (szczepy 37_Sacch_cerevisiae i Sacch_bouardi) zastosowano stężenie etanolu wynoszące 8, 10, 12, 14 i 16% (v/v). Dla pozostałych gatunków stężenia etanolu wynosiły 2, 4, 6, 8 i 10% (v/v). Kultury kontrolne każdego szczepu hodowano w podłożu YPD bez etanolu. Wzrost badanych szczepów oceniano poprzez pomiar gęstości optycznej OD₆₀₀.

Przeżywalność (S) drożdży obliczono według następującego wzoru:

$$S = [\text{OD}_{600} \text{ próbka} / \text{OD}_{600} \text{ kontrola}] \times 100\%$$

5.1.6.2 Zdolność do produkcji siarkowodoru

Testowane szczepy zaszczipiono eżą na podłożu Biggy Agar (Biomaxima, Lublin, Polska) w szalkach Petriego i inkubowano w temperaturze 28°C przez 48 godzin. Wzrost kolonii i zmiana ich barwy na brązową lub czarną wskazywała na zdolność do produkcji H₂S.

5.2 Przygotowanie probiotycznego produktu spożywczego

5.2.1 Dobór produktu spożywczego do dalszych badań

Potencjalnie probiotyczne drożdże izolowane z żywności mogą być wykorzystywane jako składniki funkcjonalnych napojów fermentowanych. W toku rozważań podjąłem decyzję sięgnięcia po tradycyjny staropolski napój – podpiwek jako bazę do produkcji fermentowanego napoju probiotycznego mającego na celu połączyć nowoczesność (probiotyczne drożdże) z tradycją (podpiwkiem). Podpiwek jest uważany za tradycyjny napój spożywany w Polsce i na Litwie pochodzący z czasów Rzeczypospolitej Obojga Narodów. Jego pierwsza komercyjna produkcja rozpoczęła się w połowie XIX wieku. Napój ten był bardzo popularny do końca lat 80. XX wieku jako alternatywa dla dostępnych w sprzedaży napojów słodzonych, które w czasach socjalizmu były w dużej mierze trudno dostępne. Podpiwek to fermentowany napój wytwarzany z prażonych ziaren jęczmienia, znanych jako kawa zbożowa, oraz zmielonego korzenia cykorii z dodatkiem chmielu. Napój nie zawiera słodu. Podczas fermentacji, podobnie jak w przypadku produkcji piwa, drożdże przyswajają cukier i wytwarzają alkohol oraz dwutlenek węgla, co oznacza, że napój nie wymaga sztucznego wzbogacania dwutlenkiem węgla. Gotowy napój ma lekko kwaśny, orzeźwiający smak z nutą goryczki i charakterystycznym aromatem kawy zbożowej i drożdży. Co więcej, ze względu na intensywny smak, kolor i aromat, uzyskiwane tradycyjnymi metodami produkcji, napój ten nie wymaga dodawania chemicznych konserwantów, aromatów ani barwników (Modzelan 2020; Podpiwek, the Traditional Polish Refreshing Soft-Drink – 3 Seas Europe n.d.; Śmiechowska, Jakubowski, and Dmowski 2018).

Do produkcji eksperymentalnych podpiwków zastosowałem szczepy drożdży probiotycznych uzyskanych na drodze wcześniejszej pracy badawczej (publikacja II i III). Dodatkowo elementem utwierdzającym w wyborze podpiwku jako bazy, jest fakt, iż do tej pory nie opublikowano doniesień na temat wykorzystania izolatów *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*, *Pichia kudriavzevii*, *Metschnikowia pulcherrima* ani *Hanseniaspora uvarum* w produkcji podpiwku, co stało się dodatkowym argumentem za wyborem podpiwku.

Szczegółowa lista szczepów drożdży probiotycznych wykorzystanych do przygotowania podpiwków wraz z opisem przygotowania inokulum znajduje się w publikacji IV (publikacja IV, tabela 1.)

5.2.2 Przygotowanie podpiwku

Aby zapewnić jednorodność i ograniczyć wpływ surowców na właściwości badanego napoju, zdecydowano się na zastosowanie komercyjnej bazy do przygotowania podpiwku „Podpiwek” (Bakalland S.A., Warszawa, Polska); w której skład wchodzi: prażone buraki cukrowe, jęczmień i cykorja, chmiel oraz regulatory kwasowości (difosforany i kwas cytrynowy; 0,15% ($\pm 0,05\%$)). Brzeczkę przygotowano zgodnie z zaleceniami producenta, z dodatkiem 500 g sacharozy na każde 10 l brzeczek; brzeczkę rozlano do kolb stożkowych o pojemności 500 ml, wysterylizowano, zaszczepiono w warunkach sterylnych i zamknięto gumowymi korkami z rurkami fermentacyjnymi. Fermentację prowadzono przez 14 dni w temperaturze pokojowej, a następnie kolby przeniesiono do lodówki. Próbkę do analizy pobrano w dniach 0 (kontrola), 7, 14 i 30.

5.2.3 Pomiar parametrów związanych z fermentacją

5.2.3.1 Żywotność drożdży w przygotowanych podpiwkach

Aby ocenić liczbę żywych komórek drożdży w napoju, przygotowano dziesięciokrotne rozcieńczenia próbek w roztworze soli fizjologicznej i po 0,2 ml każdego rozcieńczenia rozprowadzono na płytkach Petriego z agarem YGC w dniach 0, 7, 14 i 30, a następnie inkubowano w temperaturze 28°C przez 72 godziny. Po inkubacji kolonie zliczono, a ich liczbę przeliczono na 1 ml napoju.

5.2.3.2 pH podpiwku

Wartości pH oznaczono za pomocą pehametru HI2210-02 (Hanna Instruments, Olsztyn, Polska). Początkowe pH brzeczek wynosiło 6,71.

5.2.3.3 Kwasowość miareczkowa podpiwku

Całkowitą kwasowość miareczkową (TTA) oznaczono zgodnie metodyką opisaną przez Neffe-Skocińska i in., 2017 oraz Oliveira Alves i in., 2025 (Neffe-Skocińska et al. 2017; Oliveira Alves et al. 2025). Próbkę przygotowano poprzez 10-krotne rozcieńczenie podpiwku (w wodzie destylowanej) i miareczkowanie 100 ml roztworu za pomocą 0,01 M NaOH. Wartość wyrażono w g ekwiwalentu kwasu octowego na litr (g/l) i obliczono z następującego równania:

$$TTA = [(V_{NaOH} \times 0.01 \times 60.05)/V] \times 10$$

gdzie

V_{NaOH} = objętość NaOH użytego do miareczkowania (w ml);

0,01 = stężenie molowe roztworu NaOH użytego do miareczkowania (w mol/l);

60,05 = równoważnik wagowy kwasu octowego (60,05 g/mol);

V = objętość miareczkowanej próbki (w ml);

10 = współczynnik rozcieńczenia.

5.2.3.4 Wigor fermentacyjny

Wigor fermentacyjny (FV) oceniano jako utratę masy nastawu, odpowiadającą ilości CO₂ wydzielanego do atmosfery podczas procesu fermentacji. Naczynia fermentacyjne ważono na początku fermentacji oraz w siódmym i czternastym dniu procesu.

5.2.3.5 Zmętnienie podpiwku

Zmętnienie podpiwku oznaczano zgodnie z zaleceniami Amerykańskiego Towarzystwa Chemików Piwowych (ASBC), próbki oceniano w czasie 0, 7 i 14 dni zgodnie z metodologią zastosowaną przez Pyrovolou i in., 2024 (Pyrovolou et al. 2024).

5.2.3.6 Kolor podpiwku

Pomiar barwy przeprowadzono w dniach 0, 7 i 14 zgodnie z metodologią opracowaną przez Pyrovolou i in., 2024 (Pyrovolou et al. 2024). Do wyrażania jednostek barwy zastosowano skalę EBC (Europejskiej Konwencji Browarniczej). Wartość barwy w jednostkach EBC określono według następującego wzoru:

$$\text{Barwa piwa (EBC)} = 25 \times A_{430}$$

5.2.3.7 Analiza podpiwku metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej

Próbki pobrane po 7, 14 i 30 dniach filtrowano przez filtry strzykawkowe z membraną PTFE o średnicy porów 0,22 µm, a następnie rozcieńczano wodą destylowaną. Oznaczenie jakościowe i ilościowe produktów pofermentacyjnych i pozostałości substratów przeprowadzono na systemie HPLC Dionex UltiMate 3000 (Thermo Scientific, Mundelein, IL, USA) składającym się z pompy (LPG-3400SD), autosamplera (WPS-

3000SL), termostatu kolumnowego (TCC-3000SD) i kolumny Aminex HPX-87H (300 × 7,8 mm, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Jako fazę ruchomą zastosowano 3 mM wodny roztwór H₂SO₄. Próbkę o objętości 20 µl analizowano na kolumnie utrzymywanej w temperaturze 60°C z szybkością przepływu eluentu 0,5 ml/min. Absorbancję kwasów organicznych przy długości fali 210 nm monitorowano za pomocą detektora UV-Vis (Dionex Ultimate, Thermo Scientific), a do identyfikacji węglowodanów, etanolu i glicerolu zastosowano detektor refraktometryczny (RefractoMax 521, Thermo Scientific, Mundelein, IL, USA). Chromatogramy analizowano za pomocą pakietu oprogramowania Chromeleon 7.3 (Thermo Scientific, Mundelein, IL, USA).

5.3 Analizy statystyczne

Wyniki analizowano za pomocą oprogramowania Statistica w wersji 13.3 (2017) dla systemu Windows (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). Do porównania wyników dotyczących przeżywalności, hydrofobowości i aktywności antyoksydacyjnej dla każdego szczepu zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA), a następnie testy post hoc Tukey HSD ($p < 0,05$), a także mieszaną dwuczynnikową analizę wariancji (ANOVA) dla poziomu autoagregacji dla badanych szczepów po 2, 4 i 24 godzinach. Do porównania wyników tolerancji na etanol (2-10% EtOH po 24 i 48 h) dla szczepów należących do rodzajów: *Hanseniaspora*, *Metschnikowia* i *Pichia*, żywotności drożdży (po 0, 7, 14 i 30 dniach), pH podpiwku (7, 14 i 30 dni), całkowitej kwasowości miareczkowej (TTA) (po 7, 14 i 30 dniach), wigoru fermentacyjnego (7 i 14 dni), zmętnienia (0, 7 i 14 dni) i barwy (0, 7 i 14 dni) dla każdego szczepu zastosowano dwuczynnikową analizę wariancji (ANOVA), a następnie testy post hoc Tukeya HSD ($p < 0,05$). Do oceny poziomu tolerancji na etanol (8-16% EtOH po 24 i 48 godzinach) dla szczepów nr 37 i SB oraz stężeń cukrów, etanolu i kwasów organicznych dla każdego szczepu (po 0, 7, 14 i 30 dniach) zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji.

6. Omówienie wyników i dyskusja

Wyniki uzyskane w doświadczeniach związanych z izolacją probiotycznych drożdży oraz przygotowaniem na ich podstawie podpiwku potwierdziły hipotezy badawcze i zostały przedstawione w powiązanych tematycznie w trzech publikacjach z listy *Journal Citation Reports* o łącznej liczbie punktów 340 wg punktacji MEiN. Sumaryczny *Impact Factor* zgodny z rokiem wydania artykułów wynosi 12,3.

6.1 Izolacja drożdży i badanie ich właściwości probiotycznych

6.1.1 Izolacja i identyfikacja drożdży

Na drodze przeprowadzonych prac udało się wyizolować siedemdziesiąt cztery szczepy drożdży - czterdzieści siedem izolatów z win spontanicznej fermentacji (tabela 1.) oraz dwadzieścia siedem szczepów z fermentujących produktów spożywczych (tabela 2.). Wśród wyizolowanych szczepów oznaczono *Candida metapsilosis*, *Candida zeylanoides*, *Hanseniaspora uvarum*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Metschnikowia ziziphicola*, *Meyerozyma caribbica*, *Pichia kluyveri*, *Pichia kudriavzevii*, *Pichia manshurica*, *Saccharomyces cerevisiae* i *Starmerella bacillaris*.

Drożdże wyizolowane z win zostały zidentyfikowane jako *H. uvarum*, *P. kluyveri*, *M. pulcherrima*, *M. ziziphicola*, *S. cerevisiae* i *S. bacillaris*. Pomimo ograniczonych badań nad bioróżnorodnością drożdży w polskich winach, otrzymane wyniki w dużej mierze pokrywają się z listami gatunków opisanymi przez Drozd i in. oraz Cioch-Skoneczny i in. (Cioch-Skoneczny et al. 2021; Drozd et al. 2015), ale obejmują jeden gatunek nie wymieniony przez autorów - *Starmerella bacillaris*. Gatunek *S. bacillaris*, znany również jako *Candida zemplinina*, jest często izolowany z winogron oraz win i może wpływać na skład chemiczny moszczów i win ze względu na swoją zdolność do wytwarzania różnych metabolitów, które wpływają na ich właściwości enologiczne (Englezos et al. 2017; Masneuf-Pomarede et al. 2015; Nadai, Giacomini, and Corich 2021). Wszystkie gatunki wyizolowane z win w moim badaniu, występują powszechnie i są izolowane w środowiskach winogron, moszczu i wina na całym świecie.

Szczepy wyizolowane z psujących się produktów spożywczych należały do sześciu gatunków: *C. metapsilosis*, *C. zeylanoides*, *M. pulcherrima*, *M. caribbica*, *P.*

kudriavzevii i *P. manshurica*. Większość gatunków, do których należą uzyskane w badaniach izolaty pochodzące z psującej się żywności, była już wyizolowana z produktów pochodzenia roślinnego, w wielu częściach świata przez innych badaczy i opisana w literaturze jako posiadająca potencjał probiotyczny na podstawie analiz *in vitro* (Aydin et al. 2024; Lara-Hidalgo et al. 2019; Muche, Geremew, and Jiru 2023; Shruthi et al. 2024; Simões et al. 2021; B. Wang et al. 2024).

Tabela 1. Szczepy drożdży wyizolowane z win spontanicznej fermentacji

Numer szczepu	Gatunek	Numer kodowy szczepu
1	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	01_Metsch_pulcherrima
2	<i>Starmerella bacillaris</i>	02_Starm_bacillaris
3	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	03_Sacch_cerevisiae
4	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	04_Hans_uvarum
5	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	05_Hans_uvarum
6	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	06_Sacch_cerevisiae
7	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	07_Hans_uvarum
8	<i>Starmerella bacillaris</i>	08_Starm_bacillaris
9	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	09_Sacch_cerevisiae
10	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10_Sacch_cerevisiae
11	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	11_Sacch_cerevisiae
12	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	12_Hans_uvarum
13	<i>Metschnikowia ziziphicola</i>	13_Metsch_ziziphicola
14	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	14_Hans_uvarum
15	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	15_Hans_uvarum
16	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	16_Hans_uvarum
17	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	17_Metsch_pulcherrima
18	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	18_Metsch_pulcherrima
19	<i>Starmerella bacillaris</i>	19_Starm_bacillaris
20	<i>Starmerella bacillaris</i>	20_Starm_bacillaris

21	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	21_Metsch_pulcherrima
22	<i>Starmerella bacillaris</i>	22_Starm_bacillaris
23	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	23_Hans_uvarum
24	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	24_Hans_uvarum
25	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	25_Sacch_cerevisiae
26	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	26_Sacch_cerevisiae
27	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	27_Sacch_cerevisiae
31	<i>Starmerella bacillaris</i>	31_Starm_bacillaris
32	<i>Pichia kluyveri</i>	32_Pich_kluyveri
33	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	33_Hans_uvarum
34	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	34_Metsch_pulcherrima
35	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	35_Sacch_cerevisiae
36	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	36_Metsch_pulcherrima
37	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	37_Sacch_cerevisiae
38	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	38_Sacch_cerevisiae
39	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	39_Sacch_cerevisiae
40	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	40_Sacch_cerevisiae
41	<i>Starmerella bacillaris</i>	41_Starm_bacillaris
42	<i>Starmerella bacillaris</i>	42_Starm_bacillaris
43	<i>Starmerella bacillaris</i>	43_Starm_bacillaris
44	<i>Pichia kluyveri</i>	44_Pich_kluyveri
45	<i>Starmerella bacillaris</i>	45_Starm_bacillaris
46	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	46_Metsch_pulcherrima
47	<i>Starmerella bacillaris</i>	47_Starm_bacillaris
-	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i>	Sacch_boulardi

Tabela 2. Szczepy drożdży wyizolowane z psujących się produktów spożywczych

Numer szczepu	Gatunek	Numer kodowy szczepu
---------------	---------	----------------------

52	<i>Pichia kudriavzevii</i>	052_Pich_kudriavzevii
53	<i>Pichia kudriavzevii</i>	053_Pich_kudriavzevii
58	<i>Candida metapsilosis</i>	058_Cand_metapsilosis
63	<i>Candida metapsilosis</i>	063_Cand_metapsilosis
64	<i>Pichia manshurica</i>	064_Pich_manshurica
75	<i>Meyerozyma caribbica</i>	075_Mey_caribbica
76	<i>Meyerozyma caribbica</i>	076_Mey_caribbica
80	<i>Candida metapsilosis</i>	080_Cand_metapsilosis
83	<i>Candida metapsilosis</i>	083_Cand_metapsilosis
85	<i>Pichia manshurica</i>	085_Pich_manshurica

89	<i>Candida metapsilosis</i>	089_Cand_metapsilosis
90	<i>Candida metapsilosis</i>	090_Cand_metapsilosis
91	<i>Candida metapsilosis</i>	091_Cand_metapsilosis
93	<i>Candida metapsilosis</i>	093_Cand_metapsilosis
95	<i>Candida metapsilosis</i>	095_Cand_metapsilosis
96	<i>Candida metapsilosis</i>	096_Cand_metapsilosis
99	<i>Pichia kudriavzevii</i>	099_Pich_kudriavzevii
101	<i>Pichia kudriavzevii</i>	101_Pich_kudriavzevii
105	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	105_Metsch_pulcherrima
106	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	106_Metsch_pulcherrima
107	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	107_Metsch_pulcherrima
108	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	108_Metsch_pulcherrima
109	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	109_Metsch_pulcherrima
110	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	110_Metsch_pulcherrima
111	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	111_Metsch_pulcherrima
112	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	112_Metsch_pulcherrima
113	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	113_Metsch_pulcherrima
-	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i>	Sacch_boulardi

6.1.2 Ocena właściwości probiotycznych pozyskanych izolatów drożdży

6.1.2.1 Zdolność do wzrostu w temperaturze 37°C

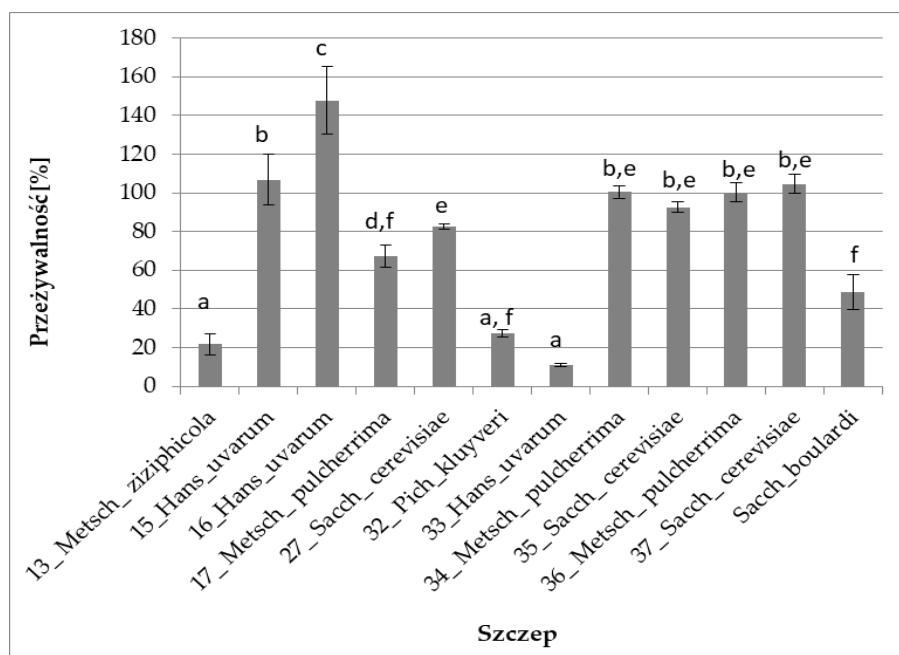
W przypadku szczepów pochodzących z win spontanicznej fermentacji tylko dwadzieścia jeden szczepów wykazało dobry wzrost w temperaturze ciała człowieka, w tym 4 izolaty drożdży z gatunku *H. uvarum*, 5 izolatów *Metschnikowia* sp., 2 izolaty *P. klyveri* i 10 szczepów należących do *S. cerevisiae*. Jedynym gatunkiem drożdży

wyizolowanym z win, u którego żaden ze szczepów nie wykazał tej zdolności była *Starmerella bacillaris*. Z drugiej strony wszystkie szczepy wyizolowane z psującej się żywności wykazały zdolność do wzrostu w 37°C. Różnica ta może wynikać z przystosowań poszczególnych szczepów do ich oryginalnego środowiska bytowania. Pomimo tego, że środowisko fermentacji wina jest środowiskiem pełnym wyzwań dla drożdży (niekorzystne ciśnienie osmotyczne, niskie pH, akumulacja etanolu ect.), nie promuje ono ewolucji szczepów w kierunku termotolerancji, z drugiej strony obecność drożdży pochodzących z psującej się żywności może być skutkiem kontaminacji mikrobiotą człowieka lub ich odpornością na procesy związane z obróbką żywności, co zwykle powiązane jest ze zdolnością do przetrwania w wyższej temperaturze (Alkalbani et al. 2022; Vergara Alvarez et al. 2023).

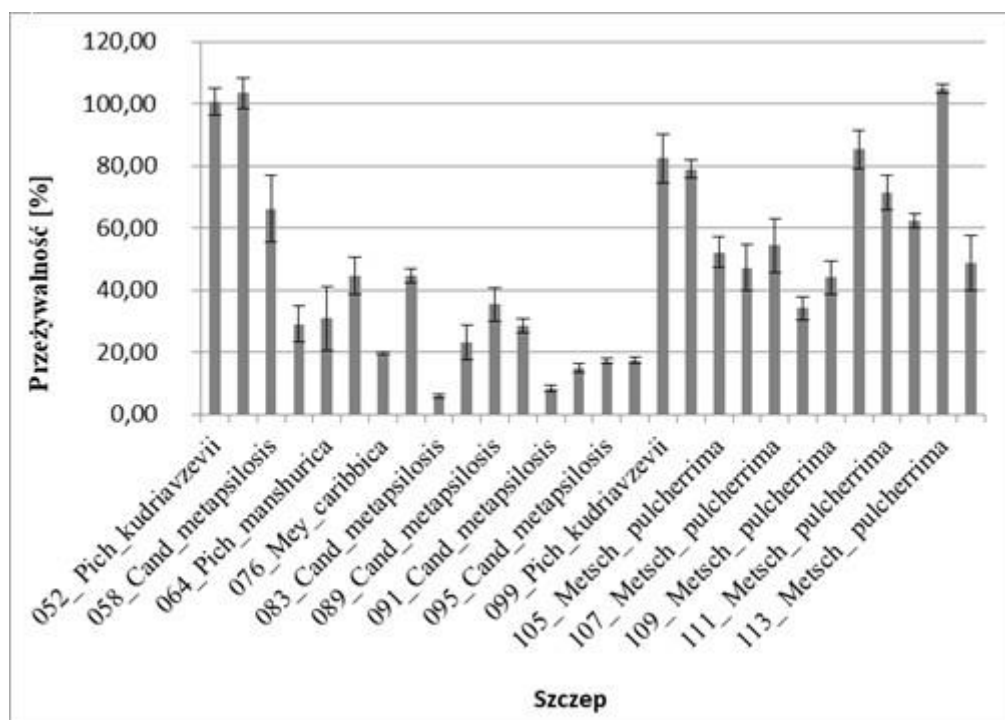
6.1.2.2 Wzrost i przeżywalność w warunkach symulowanego przewodu pokarmowego

Kolejnym etapem badań właściwości probiotycznych pozyskanych izolatów było sprawdzenie czy są zdolne przetrwać w warunkach symulowanego przewodu pokarmowego. Spośród dwudziestu jeden szczepów wyizolowanych z win, które wykazały się wzrostem w tem. 37°C, tylko jedenaście przetrwało warunki symulowanego przewodu pokarmowego, z czego osiem wykazało wyższą przeżywalność niż szczep kontrolny *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* CNCM I-745. Pięć szczepów wykazało przeżywalność przekraczającą sto procent: 16_Hans_uvarum (147,8%), 15_Hans_uvarum (106,6%), 37_Sacch_cerevisiae (104,6%), 34_Metsch_pulcherrima (100,4%) i 36_Metsch_pulcherrima (100,1%). W przypadku szczepów pozyskanych z fermentującej żywności jedenaście szczepów wykazało taką samą lub wyższą przeżywalność niż *S. cerevisiae* var. *boulardii* CNCM I-745, lecz tylko trzy szczepy wykazały przeżywalność przekraczającą sto procent: 052_Pich_kudriavzevii (100,61%), 053_Pich_kudriavzevii (103,47%) oraz 113_Metsch_pulcherrima (104,99%). Może to

sugerować, że warunki panujące w przewodzie pokarmowym mogą być korzystne dla wzrostu wymienionych szczepów w porównaniu ze standardowymi warunkami hodowli drożdży. Podobne wyniki dla szczepów pochodzących z wina opublikowali Vergara Alvarez i in. (Vergara Alvarez et al. 2023). Także inni autorzy stwierdzili wysoką zdolność do przetrwania warunków przewodu pokarmowego u *M. pulcherrima*, a ich potencjał probiotyczny przedstawiono w pracach Al-Nijir i in., 2024 oraz Abolghasemi i in. (Abolghasemi, Larypoor, and Hosseini 2022; Al-Nijir et al. 2024). Liczni autorzy przedstawiają również obiecującą zdolność *P. kudriavzevii* do przetrwania warunków przewodu pokarmowego i sugerują jego probiotyczny potencjał (Agarbaty et al. 2024; Hsu and Chou 2020; Lara-Hidalgo et al. 2019; Muche, Geremew, and Jiru 2023; Paul et al. 2023; Piraine et al. 2023; Tamang and Lama 2022; B. Wang et al. 2024). Aydin i in. wyizolowali sześć szczepów *P. kudriavzevii* z produktów fermentowanych, takich jak tradycyjny ser, zakwas, solanka oliwna i Shalgam, które wykazały wskaźniki przeżywalności od 51% do 84,4% dla szczepów najbardziej odpornych i dały podobne wyniki do tych przedstawionych w poniższej pracy (Aydin et al. 2024). W innym artykule Piraine i in. opisano szczep *P. kluyveri* LAR001 pochodzący z żywności, który wykazał potencjał probiotyczny i właściwości, które mogą pozwolić na jego wykorzystanie w dalszej produkcji napojów (Piraine et al. 2023). Szczegółowe dane dla poszczególnych szczepów wyizolowanych z win przedstawiono na Rys. 2., dla szczepów wyizolowanych z psującej się żywności szczegółowe dane przedstawione są na Rys. 3. Wszystkie szczepy, które nie wykazały zdolności przetrwania w warunkach przewodu pokarmowego, zostały wyłączone z dalszych badań.



Rys. 2. Przeżywalność i wzrost drożdży wyizolowanych z win w warunkach przewodu pokarmowego (jednoczynnikowa ANOVA: szczep: $F(11,24) = 89,533$, $p = 0,00000$; błąd standardowy $\pm 0,043683$).

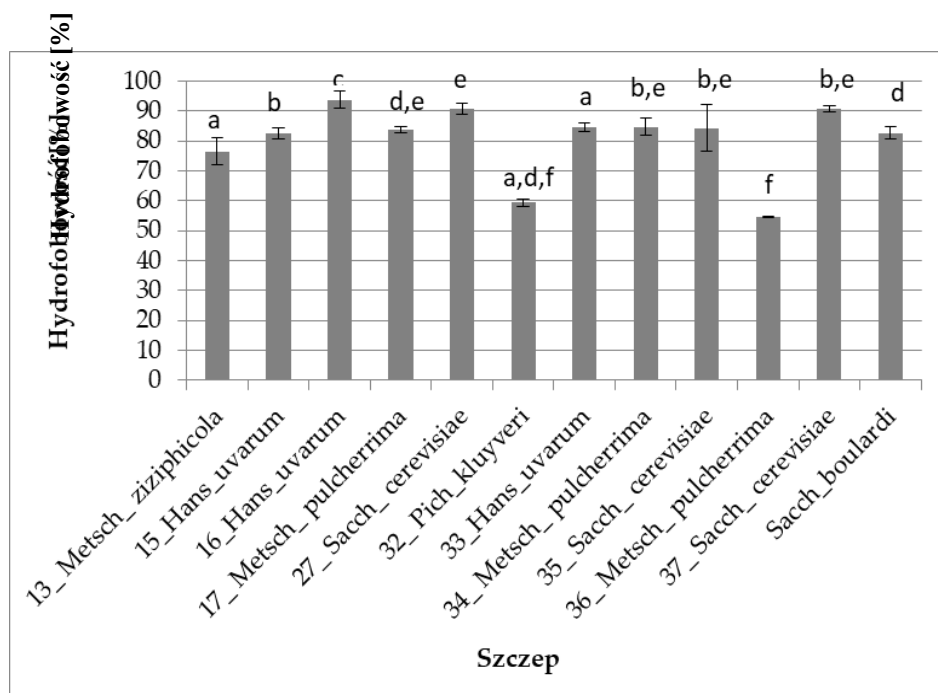


Rys. 3. Przeżywalność i wzrost drożdży wyizolowanych z psującej się żywności w warunkach przewodu pokarmowego (jednoczynnikowa ANOVA: szczep: $F(27,56) = 85,544$, $p =$

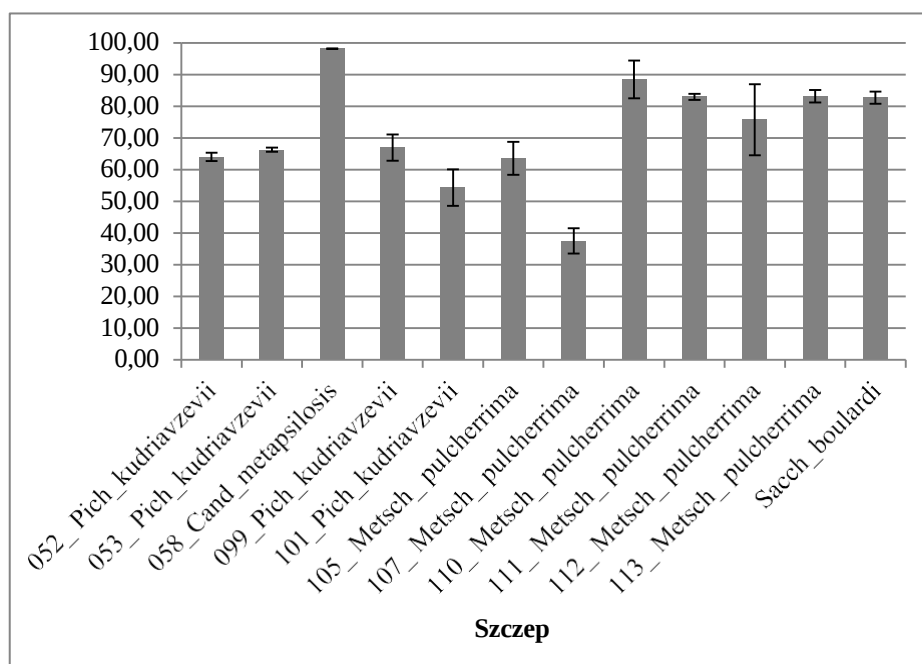
0.0000, se $\pm$ 0.031514).

6.1.2.3 Hydrofobowość powierzchni komórek

Ocena hydrofobowości powierzchni komórek, obok zdolności do autoagregacji pozwala na ocenę zachowania mikroorganizmów w przewodzie pokarmowym, a drożdże o wysokiej hydrofobowości wykazują wysoką zdolność do przylegania do linii komórkowych jelit (Fernandez-Pacheco Rodríguez et al. 2018; Perricone et al. 2014; Syal and Vohra 2013). Zdolność ta jest kluczowym warunkiem kolonizacji potencjalnie probiotycznych szczepów w przewodzie pokarmowym, ponieważ pomaga im uniknąć natychmiastowej eliminacji poprzez ruchy perystaltyczne układu pokarmowego i daje przewagę konkurencyjną w obrębie przewodu pokarmowego. W przypadku szczepów pozyskanych z win wszystkie, z wyjątkiem trzech szczepów: 36_Metsch_pulcherrima (54,63%), 32_Pich_kluyveri (59,42%) i 13_Metsch_ziziphicola (76,53%), wykazały hydrofobowość powyżej 80%, co może sugerować ich zdolność do szybkiego przylegania do błony śluzowej. W przypadku szczepów pozyskanych z psującej się żywności tylko cztery szczepy wykazały hydrofobowość powyżej 80%: 110_Metsch_pulcherrima (88.44%), 111_Metsch_pulcherrima (82.97%), 113_Metsch_pulcherrima (83.16%), and 058_Cand_metapsilosis (98.16%). Rezultaty te pokrywają się lub przewyższają rezultaty hydrofobowości uzyskane przez innych badaczy dla tych samych gatunków drożdży (Al-Nijir et al. 2024; Gómez-Gaviria et al. 2024; Liao et al. 2023; Vergara Alvarez et al. 2023). Szczegółowe dane dla szczepów pozyskanych z win przedstawiono na Rys. 4., dla szczepów wyizolowanych z zepsutej żywności na Rys, 5.



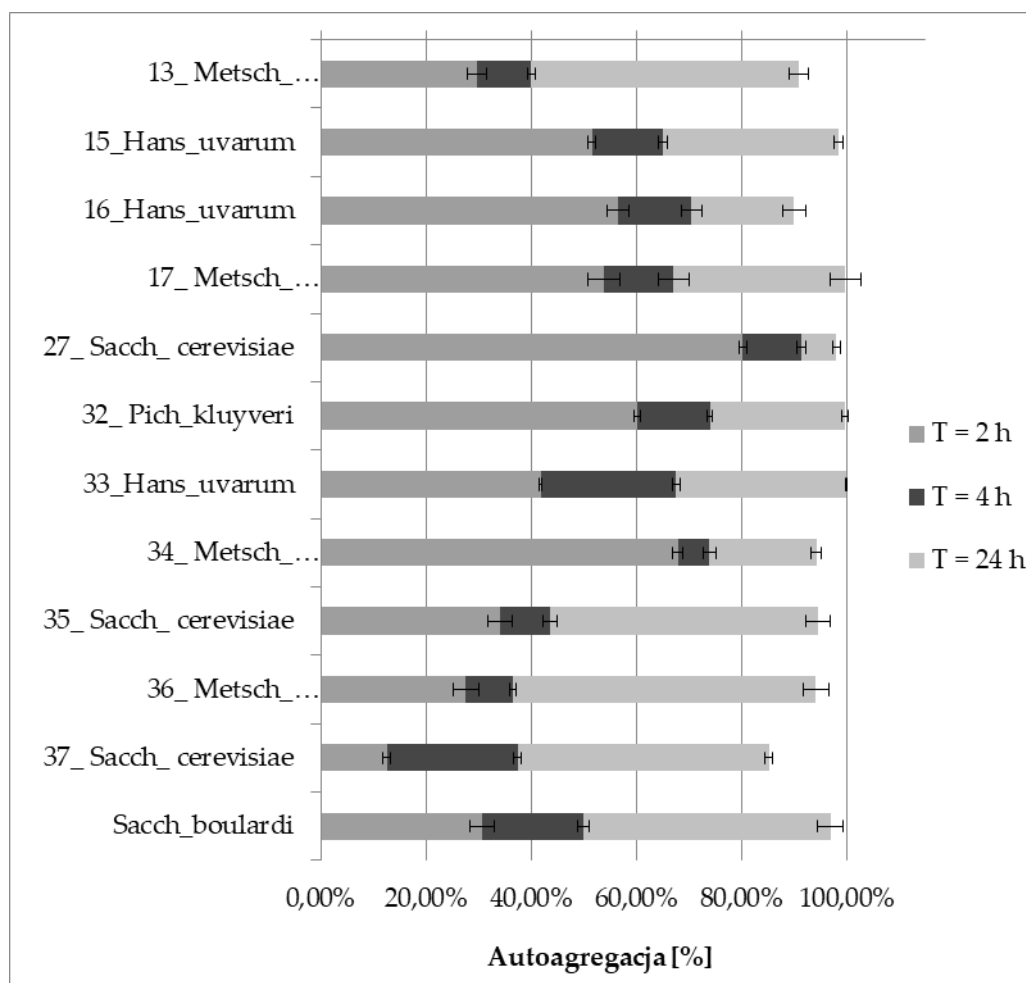
Rys. 4. Hydrofobowość powierzchni komórek drożdży wyizolowanych z win (jednoczynnikowa ANOVA: szczep: $F(11,24) = 45,775$, $p = 0,00000$; błąd standardowy $\pm 0,017750$).



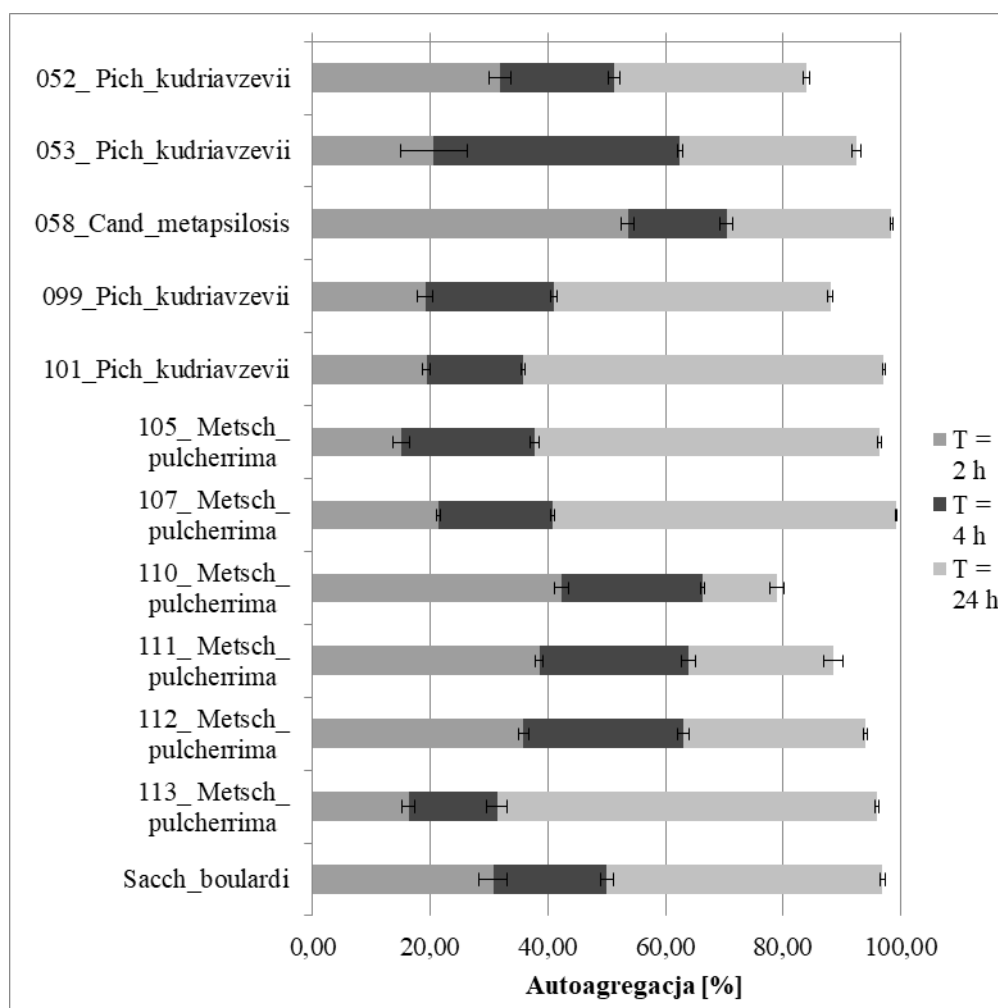
Rys. 5. Hydrofobowość powierzchni komórek drożdży wyizolowanych z psującej się żywności (jednoczynnikowa ANOVA: szczep: $F(27,56) = 38,982$, $p = 0,0000$, se $\pm 0,027319$).

6.1.2.4 Zdolność do autoagregacji

Zdolności do autoagregacji pozwala na ocenę zachowania mikroorganizmów (m.in. zdolność do tworzenia biofilmu) w przewodzie pokarmowym. Pizzolitto i in. sugerują, że wskaźnik autoagregacji wynoszący 80% lub więcej należy uznać za wysoki (Pizzolitto et al. 2013). U wszystkich szczepów, niezależnie od źródła izolacji, wskaźniki autoagregacji wzrastały wraz z upływem czasu, przekraczając 80% po 24 godzinach, z wyjątkiem szczepu 110_Metsch_pulcherrima, który wykazał autoagregację na poziomie 78,96% po tym czasie. Wyniki te są wyższe w porównaniu do szczepów wyizolowanych z różnych typów żywności przebadanych przez Fernandez-Pacheco i in., lecz zbliżone do rezultatów autoagregacji uzyskanych przez Vergara Alvarez i in., podczas badania izolatów drożdży uzyskanych z win (Fernandez-Pacheco Rodríguez et al. 2018; Vergara Alvarez et al. 2023). Szczegółowe dane dla szczepów pozyskanych z win przedstawiono na Rys. 6., dla szczepów wyizolowanych z fermentującej żywności na Rys. 7.



Rys. 6. Wyniki testu autoagregacji dla szczepów wyizolowanych z wina po 2, 4 i 24 godzinach (dwuczynnikowa ANOVA: szczep: $F(11,72) = 925,80$, $p = 0,00000$; błąd standardowy $\pm 0,431909$; czas: $F(2,72) = 13,991$, $p = 0,00000$; błąd standardowy $\pm 0,215954$; szczep $\times$ czas: $F(22,72) = 174,89$, $p = 0,00000$; błąd standardowy $\pm 0,748088$).

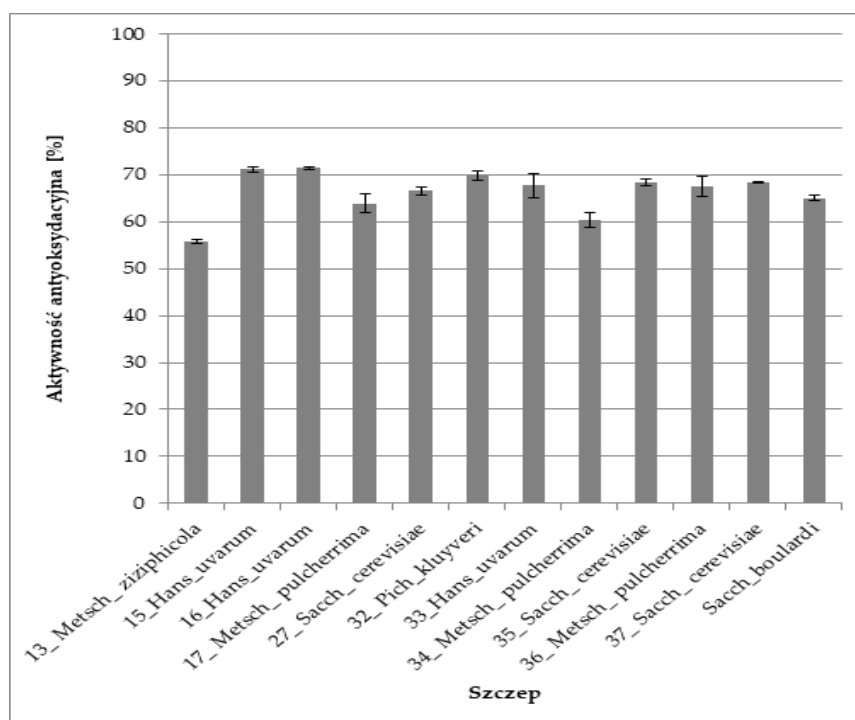


Rys. 7. Wyniki testu autoagregacji szczepów wyizolowanych z psującej się żywności w ciągu 2, 4 i 24 godzin (dwuczynnikowa analiza wariancji: szczep: $F(27,168) = 580,26$, $p = 0,0000$, błąd standardowy $\pm 0,376682$; czas: $F(2,168) = 71106$, $p = 0,0000$, błąd standardowy $\pm 0,123298$; szczep $\times$ czas: $F(54,168) = 294,56$, $p = 0,0000$, błąd standardowy $\pm 0,652432$)

6.1.2.5 Właściwości antyoksydacyjne

Wszystkie badane szczepy wykazały wysokie właściwości antyoksydacyjne. Szczepy, które wykazały wyższe właściwości antyoksydacyjne od szczepu kontrolnego *S. cerevisiae* var. *boulardii* CNCM I-745: 15_Hans_uvarum (71.20%), 16_Hans_uvarum (71.44%), 32_Pich_kluyveri (69.83%), 099_Pich_kudriavzevii (67.05%), 101_Pich_kudriavzevii (81.36%), 105_Metsch_pulcherrima (74.01%), 107_Metsch_pulcherrima (76.47%), 110_Metsch_pulcherrima (81.90%), 111_Metsch_pulcherrima (82.05%), 112_Metsch_pulcherrima (80.92%), 113_Metsch_pulcherrima (81.23%). Hsu i Chou uzyskali wysokie wyniki właściwości

antyoksydacyjnych (powyżej 50%) tylko dla 31,6% wyizolowanych szczepów drożdży, ale nie dla *P. kudriavzevii*, które wykazały aktywność antyoksydacyjną na poziomie około 35% (Hsu and Chou 2020). Agarbati i in. opisali aktywność antyoksydacyjną szczepów *M. pulcherrima* w zakresie 11,65 - 60,12%, a dla *S. cerevisiae* między 46,12, a 66,49%, przy czym szczep referencyjny CODEX wykazał 65,58% (Agarbati et al. 2020). Było to poniżej wyników uzyskanych przez badane w pracy szczepy. Wang i in. uzyskali bardzo dobre wyniki w reakcji z DPPH dla izolatów drożdży przekraczające 80%, a dla *P. kudriavzevii* i *S. cerevisiae* - 90% (B. Wang et al. 2024). W badaniu Fernandez-Pacheco i in., najwyższy odsetek redukcji DPPH odnotowano dla dwóch szczepów *Saccharomyces* (3 i 6) oraz jednego *P. kudriavzevii* (1200), z wartościami odpowiednio 33,71%, 32,66% i 33,42% (Fernández-Pacheco, Pintado, et al. 2021), co stanowi wartość 2-2,5 razy mniejszą niż uzyskane w tej pracy wyniki. Takie różnice w aktywności antyoksydacyjnej szczepów mogą wynikać z kilku czynników - zmienności genetycznej, różnic w aktywności metabolicznej szczepów, a także innych warunków środowiskowych, wpływających na aktywność metaboliczną poszczególnych szczepów (Fakruddin, Hossain, and Ahmed 2017; Feng and Wang 2020; Sarwar et al. 2022). Szczegółowe dane dla szczepów pozyskanych z win przedstawiono na Rys. 8., dla szczepów wyizolowanych z fermentującej żywności na Rysunku 9.



Rys. 8. Aktywność antyoksydacyjna szczepów wyizolowanych z win (jednoczynnikowa ANOVA: szczep: $F(11,24) = 36,078$, $p = 0,00000$; błąd standardowy $\pm 0,007562$).

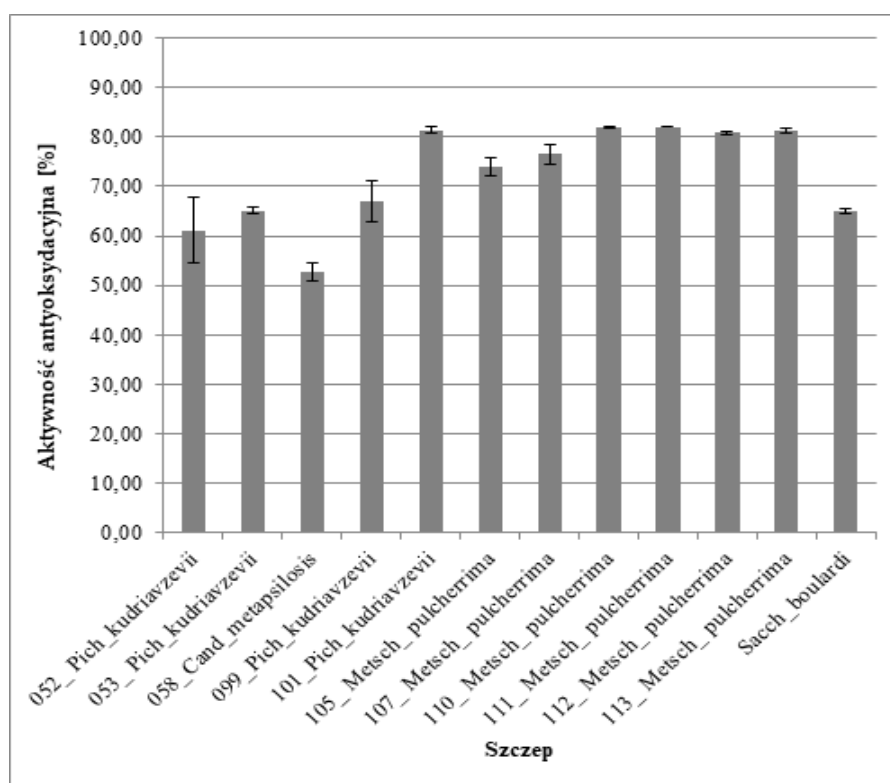


Figura 9. Aktywność antyoksydacyjna szczepów wyizolowanych z psującej się żywności (jednoczynnikowa ANOVA: szczep: $F(27,56) = 72,221$, $p = 0,0000$, błąd standardowy $\pm 0,011803$)

6.1.2.6 Właściwości przeciwdrobnoustrojowe

Żaden z badanych szczepów (poza 15_Hans_uvarum, który wykazał słabą aktywność przeciw *S. aureus*) nie wykazał aktywności przeciwdrobnoustrojowej wobec testowanych szczepów bakterii Gram-dodatnich i Gram-ujemnych, co jest zgodne z raportami Wang i in. oraz Binetti i in. , których drożdże wyizolowane z kombuchy i sera, nie hamowały wzrostu patogenów (Binetti et al. 2013; B. Wang et al. 2024). Z drugiej strony, Muche i in. stwierdzili, że szczepy *S. cerevisiae*, *C. humilis* i *P. kudriavzevii* hamowały w różnym stopniu wzrost klinicznych szczepów bakterii chorobotwórczych, w tym *Salmonella* Typhi, *E. coli* i *S. aureus* (Muche, Geremew, and Jiru 2023). Podobnie, Agarbati i in. uzyskali różną aktywność przeciwdrobnoustrojową wyizolowanych szczepów, np. *M. pulcherrima* i *P. fermentans* wykazały aktywność przeciwdrobnoustrojową wobec *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli* i *S. enterica* (Agarbati et al. 2020). Zdolność szczepów probiotycznych do zwalczania szkodliwych bakterii jest uważana za istotną cechę ich działania przeciwko patogenom w przewodzie pokarmowym człowieka. Jak jednak wynika z powyższych doniesień, nie wszystkie drożdże wykazują tę cenną właściwość.

6.1.3 Właściwości szczepów związane z bezpieczeństwem i wirulencją

6.1.3.1 Aktywność hemolityczna

Żaden z badanych szczepów nie wykazał zdolności do hemolizy (brak rozkładu krwinek czerwonych), co świadczy o braku patogenności testowanych szczepów (Suvarna et al. 2018). Podobne wyniki dla badanych drożdży probiotycznych otrzymali inni badacze m.in. Fernandez-Pacheco i in. (Fernández-Pacheco, Pintado, et al. 2021).

6.1.3.2 Produkcja amin biogennych

Kolejną ważną cechą pod względem bezpieczeństwa mikroorganizmów probiotycznych jest ich niezdolność do produkcji amin biogennych, które mogą mieć niekorzystny wpływ na organizm ludzki po spożyciu (Aslankoohi et al. 2016). Ze wszystkich szczepów testowanych w tym badaniu, tylko pięć szczepów

27_Sacch_cerevisiae, 32_Pich_kluyveri, 34_Metsch_pulcherrima, 107_Metsch_pulcherrima i 111_Metsch_pulcherrima, wykazało zdolność do produkcji amin biogennych i z tego powodu nie mogą być uważane za kandydatów na probiotyki. W swoim badaniu Caruso i in. stwierdzili, że szczepy *M. pulcherrima*, *S. cerevisiae* i *Brettanomyces bruxellensis* mogą wytwarzać specyficzne aminy biogenne (Caruso et al. 2002). Ponadto Delgado-Ospina i in. wykazali te zdolności u 58% szczepów *S. cerevisiae* i 37% szczepów *P. kudriavzevii* wyizolowanych z fermentowanych ziaren kakaowca (Delgado-Ospina et al. 2020). Aslankoohi i in. , badając niekonwencjonalne drożdże, stwierdzili, że *Lachancea thermotolerans*, *Wickerhamomyces subpelliculosa* i *P. kudriavzevii* wytwarzają te związki w niewielkich ilościach (Aslankoohi et al. 2016). Z kolei Landete i in. nie stwierdzili zdolności do wytwarzania amin biogennych u badanych przez siebie szczepów drożdży winiarskich (Landete, Ferrer, and Pardo 2007). Wyniki przedstawione w tej pracy potwierdzają obserwację, iż zdolność drożdży do wytwarzania amin biogennych jest zależna od szczepu.

6.1.3.3 Inne aspekty związane z bezpieczeństwem

Dodatkowo, *Candida metapsilosis* opisana w tym badaniu należy do kompleksu *Candida parapsilosis*, który według wielu autorów obejmuje gatunki uznawane za potencjalne patogeny. W związku z tym możliwość wykorzystania jej jako potencjalnego probiotyku wymaga przeprowadzenia szeregu dodatkowych badań i testów, przez co szczepy *C. metapsilosis* pojawiające się w tej pracy zostały wyłączone z dalszych eksperymentów (Gómez-Gaviria et al. 2024; Orsi, Colombari, and Blasi 2010; Rodríguez et al. 2018; Trofa, Gácsér, and Nosanchuk 2008).

6.1.4 Aktywność enzymatyczna badanych szczepów

Szczegółowe wyniki aktywności enzymatycznej w oparciu o testy API ZYM dla szczepów pozyskanych z win przedstawiono w tabeli 2, publikacja II., dla szczepów wyizolowanych z psującej się żywności w tabeli 2, publikacja III. W przypadku izolatów pozyskanych z win wszystkie testowane szczepy wykazywały szeroki zakres aktywności enzymatycznej, w tym enzymy rozkładające lipidy i cukry, takie jak esterazy, lipazy, i α -glukozydaza, co może potencjalnie poprawić trawienie pokarmu. Ponadto żaden ze szczepów nie wykazywał aktywności trypsyny (enzymu, który może być powiązany z

patogennością niektórych mikroorganizmów u ludzi) ani β -glukuronidazy związanej z transformacją prekarcynogenów w karcynogeny i stymulacją raka jelita grubego (Monteagudo-Mera et al. 2011; Tanner et al. 1985). Aktywność aminopeptydaz enzymatycznych, takich jak aryamidazy (wykazana u niektórych izolatów) i esterazy, może wpływać na właściwości produktu ze względu na ich zdolność do biotransformacji składników żywności (Lee et al. 2019; Monteagudo-Mera et al. 2011; Pytka et al. 2022; Valderrama et al. 2021).

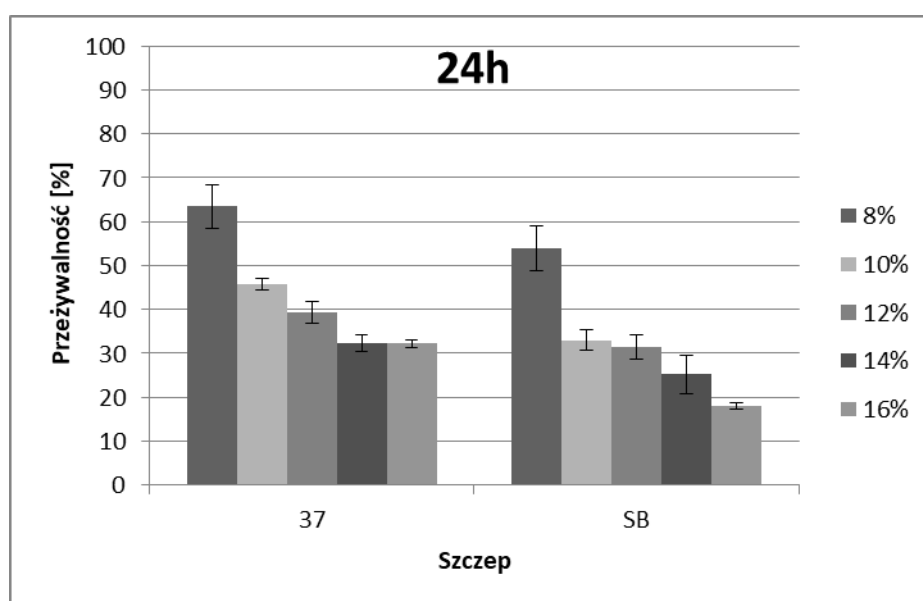
W przypadku szczepów pozyskanych z żywności ulegającej niepożądaną fermentacji wszystkie szczepy wykazywały aktywność aryamidazy leucynowej, fosfatazy alkalicznej i fosfatazy kwaśnej, a żaden ze szczepów nie wykazywał aktywności α -fukozydazy. Wszystkie izolaty oprócz jednego (085_Pich_manshurica) wykazywały aktywność esterazy C4 i lipazy esterazowej C8. Ponadto tylko dwa szczepy (110_Metsch_pulcherrima i 111_Metsch_pulcherrima) wykazywały aktywność trypsyny i β -glukuronidazy, a tylko 063_C_metapsilosis wykazywał aktywność lipazy (C14). W przeciwieństwie do wyników podobnych testów opublikowanych przez Fernandez-Pacheco i in., w których prawie nie wykazano aktywności fosfatazy alkalicznej, aryamidazy waliny i aryamidazy cysteiny, aktywności te są szeroko obecne w szczepach testowanych w poniższej pracy (Fernández-Pacheco, Pintado, et al. 2021). Z drugiej strony, wyniki aktywności esterazy (C4), lipazy esterazowej (C14) i aryamidazy leucynowej, uzyskane przez drożdże w badaniu Fernandez-Pacheco i in. świadczą o podobnej obfitości występowania jak u szczepów przedstawionych w niniejszej rozprawie (Fernández-Pacheco, Rosa, et al. 2021). Podobne aktywności enzymatyczne szczepów probiotycznych zaobserwowali Bilski i in. oraz Psomas i in. (Bilski et al. 2017; Psomas et al. 2001). Aktywność fosfatazy alkalicznej u szczepów probiotycznych może pozytywnie wpływać na pacjentów z zaburzeniami zapalnymi przewodu pokarmowego, a ponadto aktywność aryamidaz leucynowych i cysteinowych, fosfatazy kwaśnej i naftolo-AS-BI-fosfohydrolazy mieści się w zakresie odpowiedniego profilu aktywności enzymatycznej dla szczepów probiotycznych (Bilski et al. 2017; Kunyeit, Rao, and Anu-Appaiah 2023; Psomas et al. 2001).

6.1.5 Badanie właściwości szczepów związanych z produkcją napojów fermentowanych

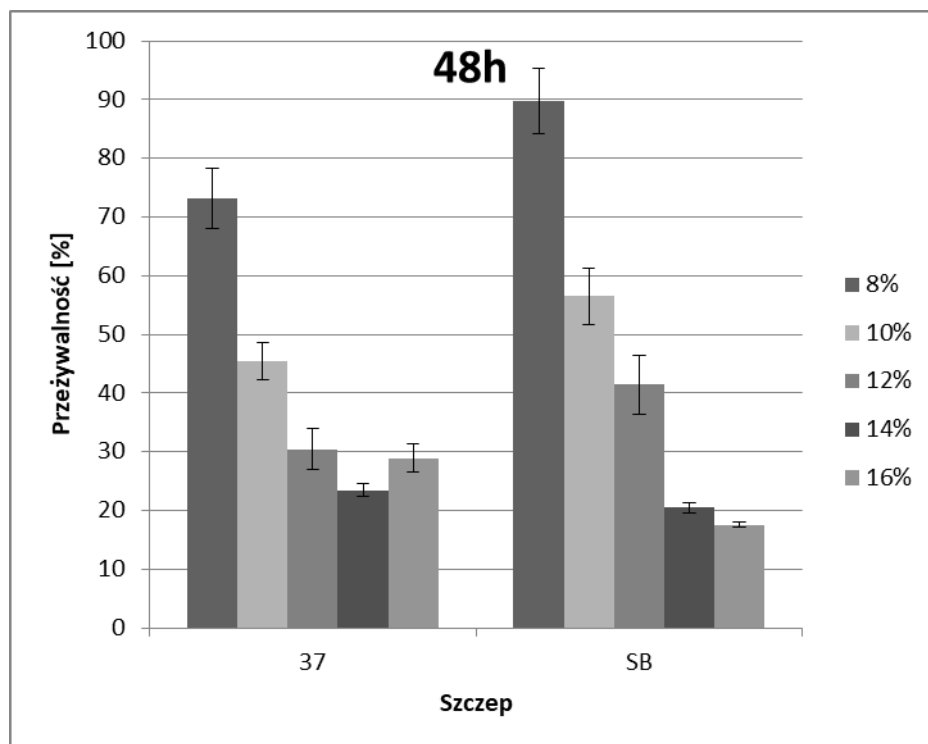
6.1.5.1 Tolerancja na etanol

Określenie wrażliwości na etanol jest jednym z podstawowych wymagań dla szczepów drożdży przeznaczonych do stosowania w przemyśle fermentacyjnym. W klasycznym teście probówkowym poziom tolerancji na etanol wyrażony jest jako procentowy spadek gęstości optycznej (OD_{600}) hodowli w obecności odpowiednich stężeń etanolu w stosunku do kontroli. Wyniki przeżywalności w obecności etanolu drożdży *Saccharomyces* zostały przedstawione na Rys. 10 i 11. Szczep 37_*Sacch_cerevisiae* wykazał najwyższą odporność na etanol, zachowując przeżywalność na poziomie około 32% i 23-29% odpowiednio przy 14% i 16% (v/v) etanolu po 24 i 48 godzinach. Również wysoką odpornością charakteryzował się szczep referencyjny *Sacch_boulardi*, który po 24 godzinach wykazywał odpowiednio 25% i 18% przeżywalności przy 14% i 16% etanolu, ze stopniowym spadkiem po 48 godzinach. Wśród drożdży nie należących do rodzaju *Saccharomyces*, szczep 101_*Pich_kudriavzevii* wykazywał najwyższą przeżywalność po 24 godzinach w obecności 2%, 6% i 8% (v/v) etanolu, natomiast po 48 godzinach szczep 16_*Hans_uvarum* cechował się lepszym przeżyciem w obecności wszystkich testowanych stężeń etanolu. Ogólnie rzecz biorąc, nawet w obecności 10% (v/v) etanolu drożdże przeżywały w zakresie 25,5-35% po 24 godzinach i 14,8-22,8% po 48 godzinach, jak przedstawiono na Rys. 12 i 13.. Analiza wykazała oczekiwane różnice w tolerancji etanolu pomiędzy szczepami drożdży zarówno *Saccharomyces*, jak i nie-*Saccharomyces*. Szczepy *S. cerevisiae* wykazały tolerancję na etanol porównywalną do klasycznych szczepów winiarskich *Saccharomyces*, które zwykle fermentują do stężenia etanolu wynoszącego 12-15% (v/v) (Ji et al. 2025; Stewart 2016; Wimalasena et al. 2014). Wyniki uzyskane dla szczepu *Sacch_boulardi* (*S. cerevisiae* var. *boulardii* CNCM I-745) są zgodne z badaniami dotyczącymi tolerancji etanolu przeprowadzonymi przez Ramirez-Cota i in., 2020 (Ramírez-Cota et al. 2021). Jeśli chodzi o drożdże nie-*Saccharomyces*, szczepy 15 i 16 należące do *H. uvarum* wykazywały niewielki wzrost nawet przy 10% (v/v) etanolu, co potwierdza obserwacje Matraxia i in., 2021(Matraxia et al. 2021). Ogólnie jednak szczepy te charakteryzowały się niską odpornością na etanol, co jest typowe dla gatunków odgrywających głównie rolę w początkowych etapach fermentacji wina i cydru (Martin et al. 2022; Sola et al. 2024), a właściwość ta może zależeć od temperatury inkubacji

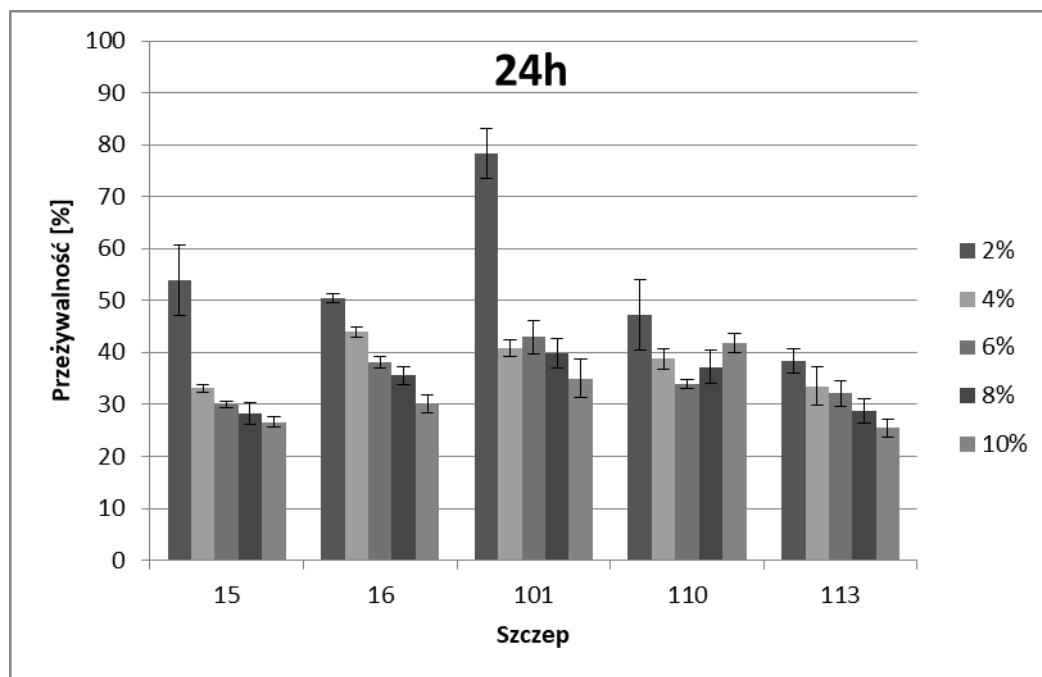
(Hutzler et al. 2012). Oba szczepy *H. uvarum* nie były w stanie intensywnie się namnażać, gdy stężenie etanolu przekraczało 6-8%, co jest zgodne z licznymi doniesieniami literaturowymi dotyczącymi tego rodzaju (Al Daccache et al. 2020; Del Fresno et al. 2021; Martin et al. 2022; Du Plessis et al. 2019; Sola et al. 2024; A. Xu et al. 2022). Szczep 101_Pich_kudriavzevii wykazywał umiarkowaną tolerancję na etanol, lepszą niż szczepy Metschnikowia, ale wciąż niższą niż *Saccharomyces*; praktycznie rzecz biorąc, szczep ten może aktywnie rosnąć do poziomu około 6-8% (v/v) etanolu. Jest to zgodne z literaturą, ponieważ *Pichia kudriavzevii* zazwyczaj toleruje około 7% (v/v) etanolu w standardowych warunkach fermentacji (*Candida krusei* | Viticulture and Enology n.d.). Górna granica tolerancji etanolowej tego szczepu (niewielki wzrost przy 8% (v/v)) jest nieco wyższa od przeciętnej, ale nadal znacznie niższa niż w przypadku *S. cerevisiae* (Chu et al. 2023; Stewart 2016). Oba szczepy *M. pulcherrima* (110 i 113) okazały się bardzo wrażliwe na etanol, co potwierdzają dane literaturowe, według których szczepy Metschnikowia zwykle przeżywają w stężeniu etanolu 3-5% (v/v) i są stosowane głównie do fermentacji mieszanych z *Saccharomyces cerevisiae* (Canonico, Comitini, and Ciani 2019; Morata et al. 2019; Torres-Díaz et al. 2024).



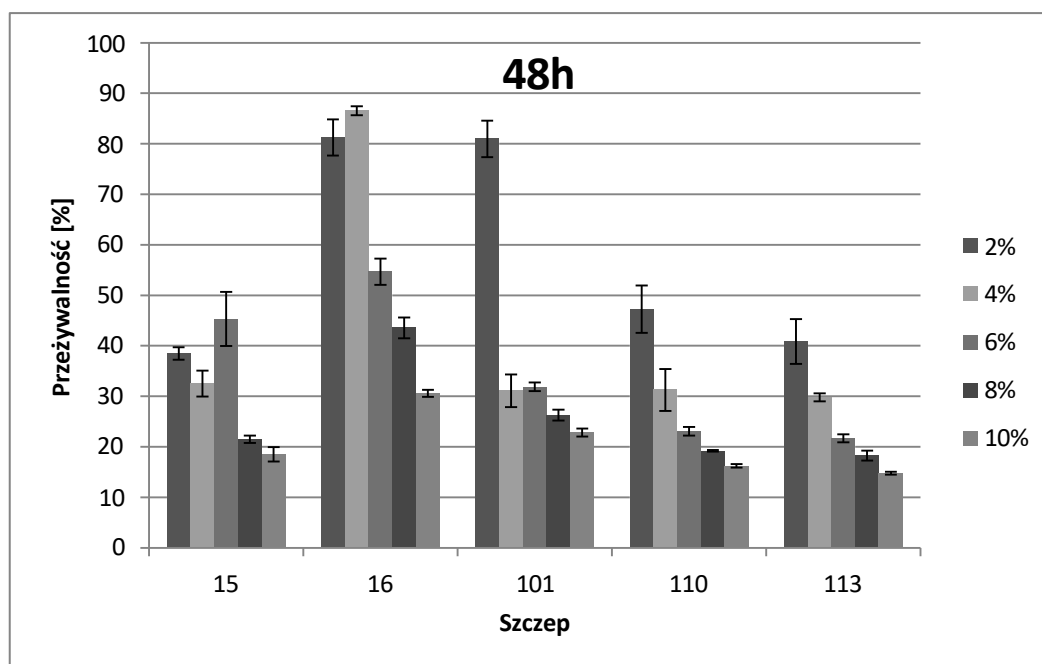
Rys. 10. Tolerancja na etanol u szczepów *Saccharomyces* spp. (37 i SB) przy różnym stężeniu etanolu po 24 h. Przeżywalność badanych szczepów nr 37 i SB w ciągu 24 godzin w 8, 10, 12, 14 i 16% etanolu (dwuczynnikowa ANOVA: szczep: $F(1,20)=72,703$, $p=0,00000$, błąd standardowy $\pm 0,004721$; EtOH %: $F(4,20)=20,349$, $p=0,00000$; błąd standardowy $\pm 0,007465$; szczep $\times$ EtOH %: $F(4,20)=25,313$; $p=0,00000$, błąd standardowy $\pm 0,010557$).



Rys. 11. Tolerancja na etanol u szczepów *Saccharomyces* spp. (37 i SB) przy różnym stężeniu etanolu po 48 godzinach. Przeżywalność badanych szczepów nr 37 i SB w ciągu 48 godzin w 8, 10, 12, 14 i 16% etanolu (dwuczynnikowa ANOVA: szczep: $F(1,20)=83,267$, $p=0,00000$, błąd standardowy $\pm 0,005503$; EtOH %: $F(4,20)=24,112$, $p=0,00000$; błąd standardowy $\pm 0,008701$; szczep $\times$ EtOH %: $F(4,20)=41,1991$; $p=0,00000$, błąd standardowy $\pm 0,012305$).



Rys. 12. Tolerancja na etanol u szczepów innych niż *Saccharomyces* przy różnych stężeniach EtOH po 24 h. Przeżywalność badanych szczepów nr (15, 16, 101, 110 i 113) w ciągu 24 godzin w 0, 2, 4, 6, 8, 10 i 12% EtOH (dwuczynnikowa ANOVA: EtOH %: $F(5,62) = 27\,461$, $p = 0,00000$; błąd standardowy $\pm 0,006318$ - $0,014128$; szczep $\times$ EtOH %: $F(20,62) = 25\,563$; $p = 0,00000$, błąd standardowy $\pm 0,014128$; jednoczynnikowa ANOVA: szczep: $F(4,88) = 5,2884$, $p = 0,00073$, błąd standardowy $\pm 0,063141$ - $0,068200$).



Rys. 13. Tolerancja na etanol u szczepów innych niż *Saccharomyces* przy różnych stężeniach EtOH po 48 h. Przeżywalność badanych szczepów nr (15, 16, 101, 110 i 113) w ciągu 48 godzin w 0, 2, 4, 6, 8, 10 i 12% EtOH (dwuczynnikowa ANOVA:; EtOH %: $F(5,62) = 117,35$, $p = 0,00000$, błąd standardowy $\pm 0,006299$ - $0,014084$; szczep $\times$ EtOH %: $F(20,62) = 40,080$, $p = 0,00000$, błąd standardowy $\pm 0,014084$; jednoczynnikowa ANOVA: szczep: $F(4,88) = 4,5875$, $p = 0,00206$, błąd standardowy $\pm 0,079084$ - $0,085420$).

6.1.5.2 Zdolność do produkcji siarkowodoru

Kolejną istotną cechą drożdży wykorzystywanych w procesach fermentacyjnych jest zdolność do produkcji siarkowodoru (H_2S). Związek ten ma duże znaczenie w przemyśle napojów alkoholowych, takich jak wino, piwo czy cydr. Drożdże zazwyczaj wytwarzają H_2S poprzez redukcję nieorganicznych związków siarki, najczęściej siarczków powstających podczas rozkładu związków organicznych. Na przykład ilość H_2S podczas fermentacji piwa zależy od czasu gotowania brzojki. Uważa się, że H_2S pełni w komórkach drożdży zarówno funkcje metaboliczne, jak i ochronne, zwłaszcza we wczesnej fazie fermentacji, gdy komórki przechodzą krytyczne zmiany żywieniowe i muszą radzić sobie ze stresem oksydacyjnym (Hou et al. 2023). Mechanizmy powstawania tego związku są dobrze poznane u drożdży *Saccharomyces* sp. (Wainwright 1971). W prezentowanych badaniach zarówno izolaty *Saccharomyces*, jak i *Metschnikowia* oraz

Pichia wykazały zdolność do produkcji H₂S na podłożu BIGGY agar. Natomiast szczepy należące do *H. uvarum* nie wykazały tej aktywności, co jest zgodne z typowymi cechami tych gatunków (Hou et al. 2023; Matraxia et al. 2021; Wainwright 1971).

6.2 Przygotowanie probiotycznego produktu spożywczego

Na drodze przeprowadzonych eksperymentów udało się wytypować sześć szczepów o właściwościach probiotycznych, które przeznaczono do finalnego etapu eksperymentu - przygotowania monokulturowego podpiwku o właściwościach probiotycznych (Rys. 14). Lista szczepów wykorzystanych do przygotowania eksperymentalnych podpiwków znajduje się w tabeli 3.



Rys. 14. Podpiwki przygotowane z użyciem probiotycznych drożdży w trakcie fermentacji

Tabela 3. Szczepy drożdży potencjalnie probiotycznych zastosowanych do przygotowania podpiwków

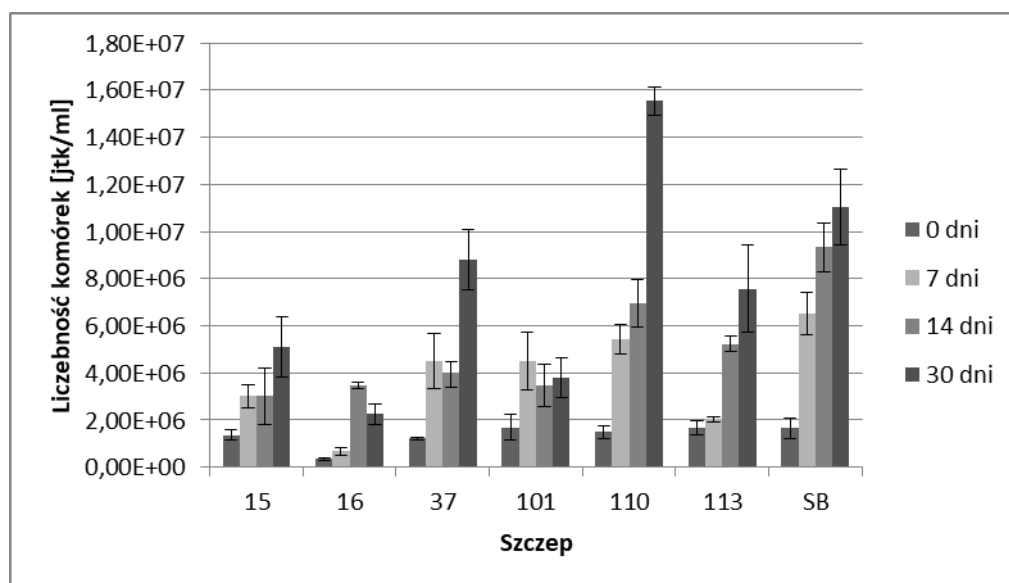
Numer szczepu	Gatunek	Numer kodowy szczepu
15	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	15_Hans_uvarum
16	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	16_Hans_uvarum
37	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	37_Sacch_cerevisiae
101	<i>Pichia kudriavzevii</i>	101_Pich_kudriavzevii
110	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	110_Metsch_pulcherrima
113	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	113_Metsch_pulcherrima
SB	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i>	Sacch_boulardi

6.2.1 Pomiar parametrów związanych z fermentacją

6.2.1.1 Żywotność drożdży w przygotowanych podpiwkach

Liczbę drożdży w brzeczce oceniano tuż po inokulacji oraz w dniach 7, 14 i 30. Wszystkie szczepy wykazywały wzrost w badanym czasie fermentacji i przechowywania, chociaż niektóre szczepy (16_Hans_uvarum, 37_Sacch_cerevisiae, 101_Pich_kudriavzevii) wykazały przejściowy, niewielki spadek liczby komórek. Wyniki przedstawione na Rys. 15. wskazują, że wszystkie szczepy zachowały żywotność na poziomie powyżej 10^6 jtk/ml przez cały okres analizy. Przeżywalność drożdży podczas fermentacji wpływa zarówno na wydajność fermentacji, jak i stabilność produktu końcowego, a w kontekście probiotycznych produktów spożywczych przeżywalność szczepów probiotycznych jest kluczowa (Azhar and M.S. 2023; Pereira de Paula et al. 2021; Ramírez-Cota et al. 2021; Youn et al. 2022). Niewielkie wahania liczby drożdży obserwowane w trakcie fermentacji mogą być związane z reakcją na stres wywołaną przez

trudne warunki, takie jak wzrost stężenia etanolu, niedobór składników odżywczych czy zmiany ciśnienia osmotycznego. Tego typu stresory aktywują mechanizmy przetrwania, w tym zmiany w metabolizmie i ekspresji genów, co może prowadzić do tymczasowego spadku żywotności drożdży. Badania pokazują, że te reakcje stresowe są kluczowe dla adaptacji drożdży i często skutkują krótkotrwałym spadkiem liczby komórek podczas fermentacji (Bauer and Pretorius 2000; Costa et al. 2023; de Paula et al. 2019; Postaru et al. 2023; Walker and Basso 2020; Youn et al. 2022). Wszystkie badane szczepy przekroczyły minimalną zalecaną przez WHO liczbę żywych komórek, wynoszącą 10^6 jtk/ml, co sugeruje ich potencjał do wykorzystania przy produkcji podpiwku probiotycznego, biorąc pod uwagę tendencję zwykłą ich liczby (nawet do 10^7 jtk/ml) podczas fermentacji (Morelli and Capurso 2012; Staniszewski et al. 2025). Ponadto, biorąc pod uwagę wielkość typowej porcji serwowanego podpiwku (250-500 ml), liczba żywych komórek wynosząca 10^9 sugerowana przez innych autorów powinna zostać osiągnięta (Hill et al. 2014). Drożdże zachowały przeżywalność przez cały okres przechowywania (1 miesiąc). Otrzymane wyniki są zgodne z obserwacjami Hinojosa-Avila (2025) (Hinojosa-Avila et al.), który podczas produkcji piwa na bazie mieszanej brzezki uzyskał 6,2 Log jtk/ml dla komercyjnego *S. cerevisiae* var. *boulardii* na końcu fermentacji, oraz z wynikami Mulero-Cerezo, gdzie zastosowane do produkcji piwa rzemieślniczego *S. cerevisiae* var. *boulardii* osiągnęły liczbę komórek $8,3 \times 10^6$ jtk/ml.



Rys. 15. Przeżywalność drożdży w podpiwku w dniach 0, 7, 14 i 30. Przeżywalność badanych szczepów nr (15,16,37,101,110,113,SB) w ciągu 0, 7, 14, 30 dni (dwuczynnikowa ANOVA: szczep: $F(5,60)=15,718$, $p=0,0000$, błąd standardowy $\pm 494907,0$; czas: $F(3,60)=49,091$, $p=0,0000$; błąd standardowy $\pm 386886,6$; szczep $\times$ czas: $F(15,60)=4,1785$; $p=0,00003$, błąd standardowy $\pm 0,699904, 1-989813,9$).

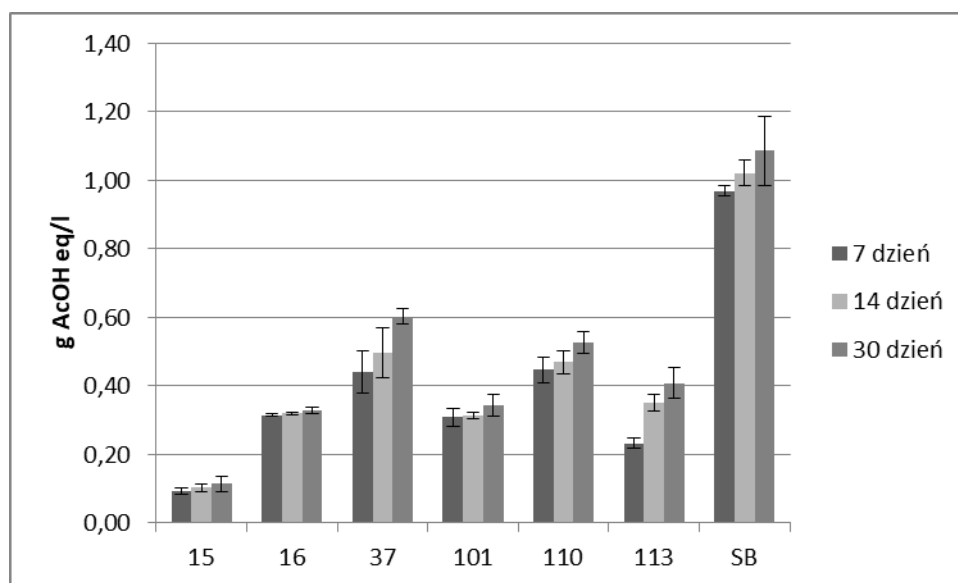
6.2.1.2 pH podpiwku

pH podpiwków podczas całego okresu fermentacji i przechowywania mieściło się w zakresie 3,5-5,5 (wykres 6, publikacja IV). W trakcie procesu fermentacji pH zmniejszyło się dla wszystkich testowanych szczepów, przy czym najwyższe wartości pH odnotowano w napojach zawierających szczep 15_Hans_uvarum, a najniższe w produktach ze szczepem Sacch_boulardi.

6.2.1.3 Kwasowość miareczkowa podpiwku

We wszystkich podpiwkach wykazano wzrost całkowitej kwasowości miareczkowej (TTA) w trakcie trwania eksperymentu. Najniższą wartość TTA określono dla napoju wytworzonego ze szczepu 15_Hans_uvarum, a najwyższą wartość TTA dla napoju wytworzonego przez Sacch_boulardi podczas eksperymentu. TTA wahało się od 0,094 g równoważnika kwasu octowego na litr napoju ze szczepem 15_Hans_uvarum do

0,97 g/l dla kontrolnej próby zawierającej *Sacch_boulardi* w dniu 7. W dniu 14. TTA wahała się od 0,102 g/l do 1,02085 g/l równoważnika kwasu octowego na litr dla tych samych podpiwków, a w dniu 30. wartości te wynosiły odpowiednio 0,114 g/l i 1,085 g/l (wykres 7, publikacja IV). Wszystkie badane szczepy drożdży powodowały wzrost kwasowości miareczkowej (TTA) napoju podczas fermentacji, co jest typowym efektem wynikającym z produkcji kwasów organicznych przez komórki drożdży (Rozès et al. 2024; Sánchez-Suárez and Peinado 2024). Najwyższe wartości TTA uzyskano dla podpiwków zawierających oba szczepy *Saccharomyces* (37_*Sacch_cerevisiae* i *Sacch_boulardii*), co odzwierciedla ich intensywną aktywność metaboliczną i dobrze znaną zdolność do zakwaszania środowiska. Wysoka produkcja kwasów jest charakterystyczna dla ich roli w fermentacji wina i piwa, gdzie wytwarzają takie kwasy jak octowy, bursztynowy czy mlekowy jako produkty uboczne metabolizmu (Ambroset et al. 2011; Pinu, Villas-Boas, and Martin 2019; Sánchez-Suárez and Peinado 2024). Z kolei aktywność szczepów 15_*Hans_uvarum* i 16_*Hans_uvarum* wpłynęła jedynie na niewielki wzrost kwasowości w trakcie całej fermentacji, co jest zgodne z obserwacjami innych autorów, według których *H. uvarum* przyczynia się do zakwaszenia głównie poprzez ograniczoną produkcję kwasu octowego, który może wzmacniać odczucie świeżości w napojach fermentowanych. Napoje zawierające oba szczepy *M. pulcherrima* (110_*Metsch_pulcherrima* i 113_*Metsch_pulcherrima*) osiągnęły pośrednie wartości TTA. To również jest zgodne z wcześniejszymi badaniami, które wykazały, że *M. pulcherrima* wytwarza relatywnie niewiele kwasów organicznych, co wynika z jej wolniejszego tempa fermentacji i mniejszej aktywności metabolicznej (Jolly, Varela, and Pretorius 2014; Pawlikowska and Kręgiel 2017; Torres-Díaz et al. 2024; Vicente et al. 2020; Vilela 2019). Rezultaty te są zgodne z analizą pH i metabolitów, ponieważ najwyższa kwasowość i najniższe pH skorelowane były z najwyższymi stężeniami kwasów wytwarzanych przez badane drożdże. Szczegółowe wyniki znajdują się na Rysunku 16.



Rys.16 Całkowita kwasowość miareczkowa (TTA) napojów wyprodukowanych przez testowane szczepy. TTA testowanych szczepów nr (15, 16, 37, 101, 110, 113 i SB) w ciągu 7, 14 i 30 dni (dwuczynnikowa ANOVA: szczep: $F(5,24) = 5,0736$, $p = 0,00259$, błąd standardowy $\pm 0,070830$ – $0,100168$; czas: $F(2,24) = 0,20727$, $p = 0,81424$; błąd standardowy $\pm 0,067814$; szczep $\times$ czas: $F(10,24) = 0,06997$; $p = 0,99994$, błąd standardowy $\pm 0,173497$).

6.2.1.4 Wigor fermentacyjny

Wigor fermentacyjny (FV) oceniano jako utratę masy wyrażoną w g CO₂ (w/v) na 100 ml brzeczki. Naczynia fermentacyjne ważono na początku fermentacji oraz w 7. i 14. dniu. Różnica w wigrze fermentacyjnym była zależna od szczepu i wzrastała w trakcie fermentacji. Szczep 15_Hans_uvarum charakteryzował się najniższą FV zarówno w 7., jak i 14. dniu (odpowiednio 0,357 g i 0,557 g). Natomiast szczep kontrolny, Sacch_boulardi, charakteryzował się najwyższą FV w 7. i 14. dniu (odpowiednio 6,587 g i 10,83 g). Wyniki testu przedstawiono na wykresie 8, publikacja IV.

6.2.1.5 Zmętnienie podpiwku

Zmętnienie jest to zmniejszenie przezroczystości cieczy spowodowane obecnością nierozpuszczonych substancji i często jest wykorzystywane jako wskaźnik tworzenia biomasy, zawieszenia drożdży oraz stabilności koloidalnej napoju. Prawie wszystkie

testowane podpiwki wykazały wzrost mętności w całym okresie fermentacji, z wyjątkiem napojów zawierających szczepy 15_Hans_uvarum, 37_Sacch_cerevisiae i Sacch_boulardi. Mętność napojów zawierających szczepy 15_Hans_uvarum i 37_Sacch_cerevisiae pozostała na dość podobnym poziomie przez cały okres fermentacji. Nastawy zawierające szczepy 101_Pich_kudriavzevii i Sacch_boulardi wykazały niewielki spadek zmętnienia w dniu 14, a te z dodatkiem drożdży 113_Metsch_pulcherrima i 16_Hans_uvarum znacznie zwiększyły poziom zmętnienia (wykres 9, publikacja IV). Zmiany zmętnienia uzależnione są od tendencji do flokulacji szczepów w miarę postępu fermentacji, drożdże flokulujące zaczynają osadzać się na dnie, co prowadzi do spadku mętności (101_Pich_kudriavzevii i Sacch_boulardii po 14 dniach), podczas gdy szczepy nieflokulujące mogą utrzymywać wysoką zawartość komórek w zawieszynie. Spadek zmętnienia będący efektem wzrostu aktywności flokulacyjnej lub częściowego opadania komórek w końcowej fazie fermentacji, może być związany z obniżoną aktywnością metaboliczną drożdży i mniejszą ilością wydzielanych metabolitów zewnątrzkomórkowych (Sica et al. 2024). Warto jednak pamiętać, że wzrost mętności w czasie nie zawsze wynika wyłącznie z przyrostu biomasy; może być również związany z gromadzeniem się zewnątrzkomórkowych polisacharydów, mannanoprotein oraz β -glukanów uwalnianych podczas autolizy lub przebudowy ściany komórkowej (Alexandre and Guilloux-Benatier 2006; Steiner, Becker, and Gastl 2010). Te makrocząsteczki mogą zwiększać niestabilność koloidalną i powodować zmętnienie w fazie ciekłej. Dodatkowo uwolnienie pęcherzyków i różnych egzometabolitów do medium, szczególnie w późnych etapach fermentacji, może wpływać na poziom mętności (Mencher et al. 2020; Speers et al. 2003; Steiner, Becker, and Gastl 2010). Procesy autolizy również mogą sprzyjać częściowemu klarowaniu się cieczy, gdy większe cząsteczki koloidalne opadają lub ulegają degradacji (Meledina, Davydenko, and Dedegkaev 2015).

6.2.1.6. Kolor podpiwku

Barwę podpiwków można oznaczyć według metody stosowanej do piwa. Im wyższa wartość jednostek EBC, tym ciemniejsza jest barwa piwa. Piwa jasne zazwyczaj mieszczą się w zakresie 1,5-3,0 jednostek EBC, piwa jasne i bursztynowe w zakresie 3,0-15,0, a piwa ciemne w zakresie 15,0-200 i więcej (Is the color of beer related to the color

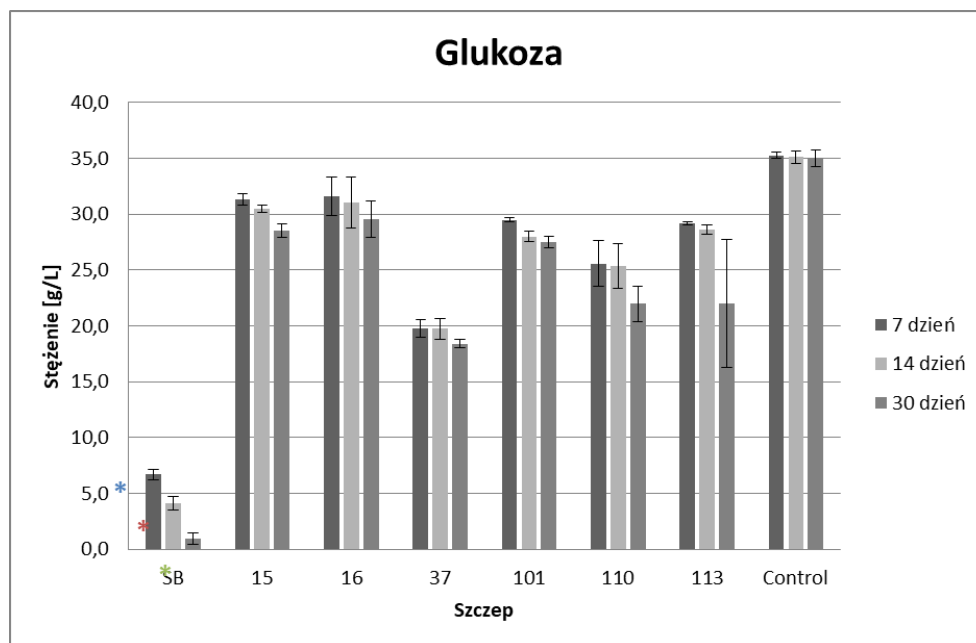
of the distillers grain? - Hunterlab n.d.). Wyniki badania barwy podpiwków przedstawiono na wykresie 10, publikacja IV. Kolor wszystkich badanych próbek zmieniał się w trakcie eksperymentu i nie wykazywał żadnego trendu ani tendencji związanej z gatunkiem lub okresem fermentacji, co pozwala założyć, że jest to cecha uzależniona od szczepu drożdży. Wszystkie podpiwki według skali EBC zostały sklasyfikowane jako piwa jasne i bursztynowe. Jednakże, analizując uzyskane wyniki, można zaobserwować następujące trendy: (1) Stopniowa redukcja koloru (szczep 15_Hans_uvarum): charakteryzuje się stałym spadkiem wartości EBC w punktach czasowych. Może to odzwierciedlać stałe procesy adsorpcji polifenoli lub transformacji enzymatycznej, często związane z aktywnością metaboliczną drożdży (Karabegović et al. 2021; Sánchez-Suárez and Peinado 2024). (2) Stopniowy wzrost koloru (szczep 16_Hans_uvarum): charakteryzuje się stałym wzrostem wartości EBC w punktach czasowych, co może wynikać z postępującego uwalniania pigmentu ze składników z powodu łagodnej aktywności enzymatycznej lub strukturalnego zakłócenia matrycy materiałowych. Ponadto ograniczona adsorpcja pigmentu na ścianach komórkowych drożdży i ciągła ekstrakcja w środowisku o niskiej zawartości etanolu może wyjaśnić ten wzrost (Karabegović et al. 2021; C. Wang, Mas, and

Esteve-Zarzoso 2015; J. Wang et al. 2024). (3) Początkowy wzrost, a następnie redukcja koloru (szczonepy 101_Pich_kudriavzevii i 110_Metsch_pulcherrima), co tłumaczy się opóźnioną autolizą, rozerwaniem ścian komórkowych lub uwolnieniem pigmentu, a następnie wytrąceniem lub adsorpcją substancji związanych z kolorem (Benito et al. 2011; Pons-Mercadé et al. 2021). (4) Początkowy spadek, a następnie wzrost (szczonepy 37_Sacch_cerevisiae, 113_Metsch_pulcherrima i Sacch_boulardi): taki wzór może odzwierciedlać wczesną adsorpcję polifenoli na ścianach komórkowych drożdży lub transformację enzymatyczną, początkowo redukując kolor. Na późniejszych etapach autoliza lub chemiczne zmiany powierzchni komórki mogą spowodować uwolnienie wcześniej związanych pigmentów do medium (Benito et al. 2011; Pons-Mercadé et al. 2021).

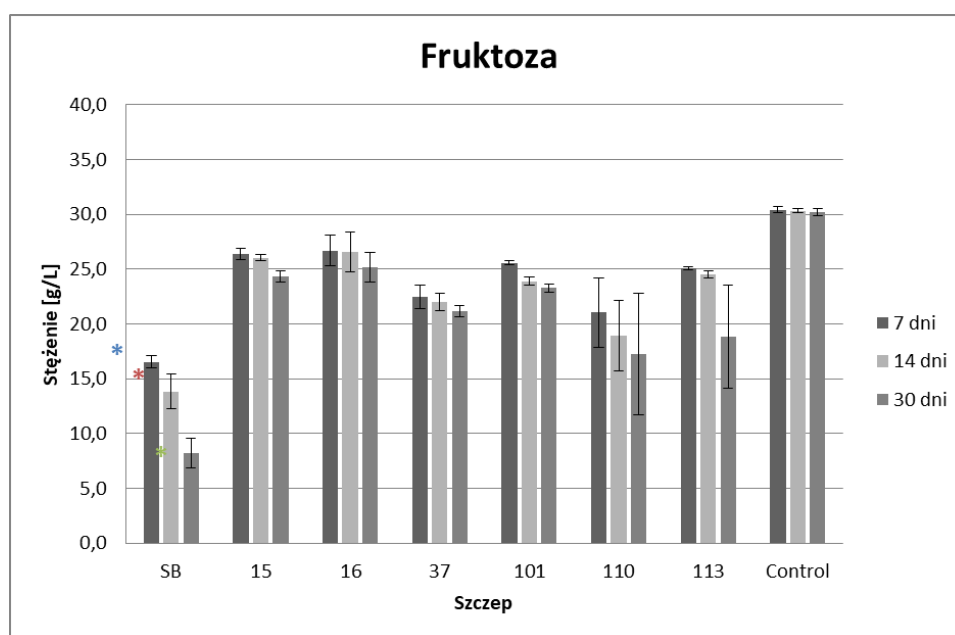
6.2.1.7 Analiza podpiwku metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej

Brzeczka przygotowana po sterylizacji, a przed zaszczepieniem zawierała węglowodany: glukozę (35,26 g/l) i fruktozę (30,42 g/l), pochodzące z hydrolizy sacharozy oraz węglowodany złożone (104,30 g/l) zawierające produkty częściowej hydrolizy skrobi, uwolnione podczas prażenia ziarna (np. maltodekstrynę) i inulinę obecną w cykorii (czasy retencji były takie same w warunkach separacji). Wykryto również niewielką ilość kwasu cytrynowego (0,13 g/l), który był składnikiem mieszaniny jako regulator kwasowości. Podczas inkubacji nastąpiły zmiany w zawartości cukrów w brzeczce ze względu na ich asymilację przez komórki drożdży i metabolizm (w tym fermentację etanolową). Szczegółowe dane dotyczące zużycia substratów przez sześć szczepów drożdży potencjalnie probiotycznych i Sacch_boulardi przedstawiono na Rysunkach 17-19. W pierwszych dniach fermentacji zaobserwowano istotne zmiany w składzie brzeczki, które zależały od użytych drożdży. Wyraźnie widać, że monosacharydy glukoza i fruktoza zostały wykorzystane najszybciej przez Sacch_boulardi, odpowiednio 28,68 g/l i 13,87 g/l. Szczep 37_Sacch_cerevisiae przyswoił 15,47 g/l glukozy i 7,97 g/l fruktozy i był najlepszy w przyswajaniu cukrów złożonych. Drożdże *M. pulcherrima* i *P. kudriavzevii* przyswoiły w tym czasie 16,36-27,45% glukozy i 15,94-30,86% fruktozy, a szczep *H. uvarum* zasymilowały tylko około 10-11% glukozy i 12-13% fruktozy. Spożycie węglowodanów złożonych było również niskie. Szybkie zużycie cukru było zgodne z produkcją etanolu (Rysunek 20.), a największą ilość wyprodukował

Sacch_boulardi, osiągając poziom 22,51 g/l po 7 dniach, podczas gdy 37_Sacch_cerevisiae wyprodukował 8,4 g/l etanolu w tym czasie, a 110_Metsch_pulcherrima, 101_Pich_kudriavzevii i 113_Metsch_pulcherrima wyprodukowały odpowiednio 4,91 g/l, 1,29 g/l i 1,07 g/l. Oba szczepy *H. uvarum* nie były zdolne do produkcji etanolu w zastosowanych warunkach. W podpiwkach zawierających drożdże *Saccharomyces* zaobserwowano wzrost stężenia kwasu cytrynowego w stosunku do stężenia w brzeczce o 0,1 g/l i 0,42 g/l odpowiednio dla szczepów 37_Sacch_cerevisiae i Sacch_boulardi (Rysunek 21.). Kwas winowy wykryto w niewielkich ilościach podczas fermentacji prowadzonej przez *Saccharomyces spp.*, odpowiednio 1,63 g/l i 0,71 g/l dla szczepów Sacch_boulardi i 37_Sacch_cerevisiae, a szczep 110_Metsch_pulcherrima wytworzył 0,15 g/l tego kwasu (Rysunek 22.). Kwas jabłkowy występował w kulturach wszystkich szczepów w stężeniach 0,16-0,39 g/l, z wyjątkiem szczepu 110_Metsch_pulcherrima, gdzie po 7 dniach fermentacji wykryto 1,27 g/l (Rysunek 23.). W kolejnych tygodniach, gdy partie przechowywano w temperaturze chłodniczej, drożdże *Saccharomyces* powoli asymilowały glukozę i fruktozę, a także produkowały etanol do stężeń końcowych 9,69 g/l dla szczepu 37_Sacch_cerevisiae i 24,27 g/l dla szczepu Sacch_boulardi. Etanol był również obecny przez cały czas trwania eksperymentu w kulturze szczepu 110_Metsch_pulcherrima (do 6,20 g/l). Pozostałe drożdże również powoli przyswajały cukry, ale nie wykazywały aktywności metabolicznej. Podczas przechowywania próbek w warunkach chłodniczych widoczna była stabilizacja składu napojów (Rysunki 20-23).

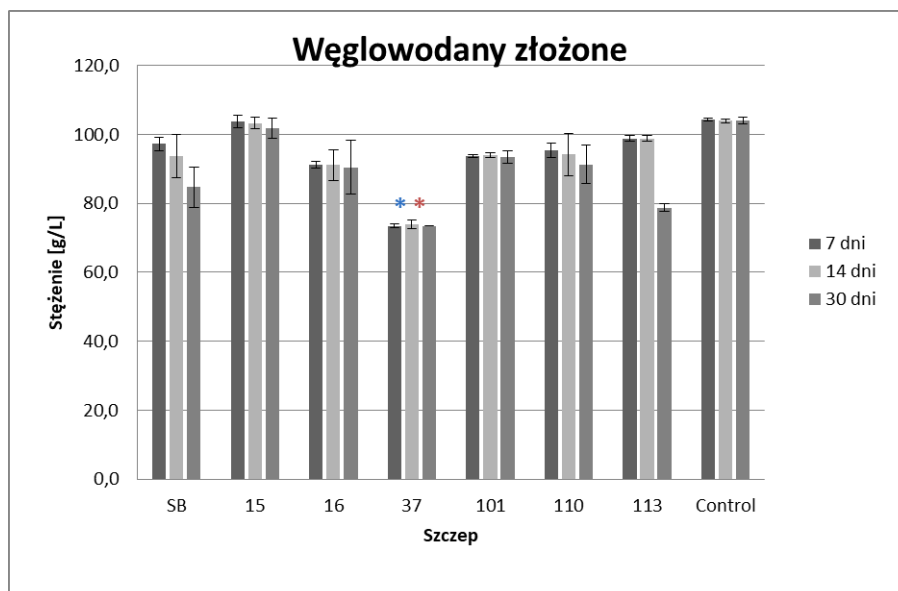


Rys. 17. Zmiany stężenia glukozy (g/l) w piwie fermentowanym pod wpływem różnych szczepów drożdży (SB, 15, 16, 37, 101, 110 i 113) oraz w próbce kontrolnej po 7, 14 i 30 dniach fermentacji. Słupki oznaczają wartości średnie $\pm$ odchylenie standardowe ($n = 3$). Kolorowe gwiazdki (*) oznaczają statystycznie istotne różnice ($p < 0,05$) między wszystkimi szczepami a próbką kontrolną w tym samym punkcie czasowym (7, 14 lub 30 dni).

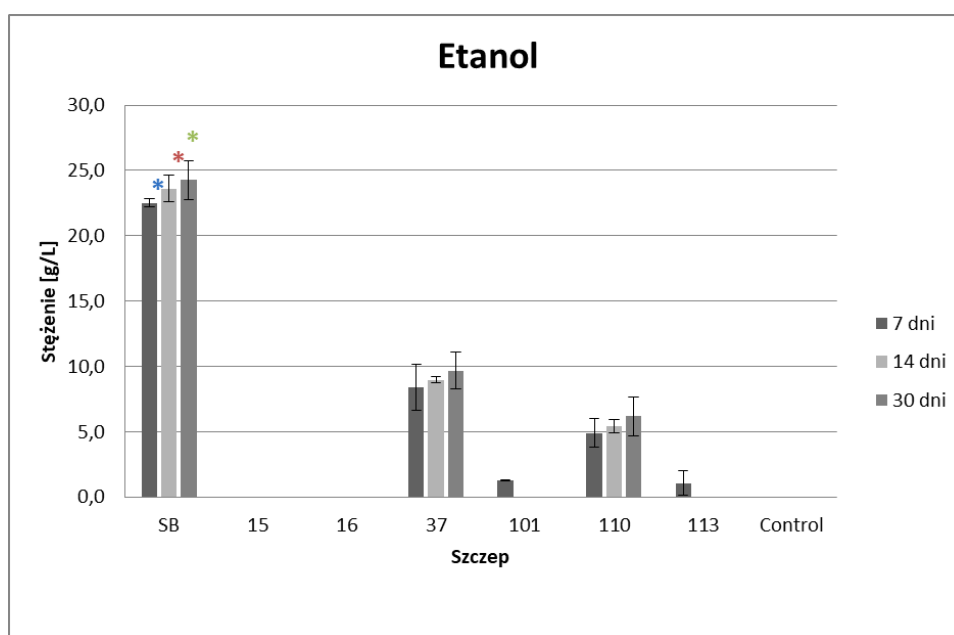


Rys. 18. Zmiany stężenia fruktozy (g/l) w piwie fermentowanym pod wpływem różnych szczepów drożdży (SB, 15, 16, 37, 101, 110 i 113) oraz w próbce kontrolnej po 7, 14 i 30 dniach fermentacji. Słupki oznaczają wartości średnie $\pm$ odchylenie standardowe ($n = 3$). Kolorowe

gwiazdki (*) oznaczają statystycznie istotne różnice ($p < 0,05$) między wszystkimi szczepami a próbką kontrolną w tym samym punkcie czasowym (7, 14 lub 30 dni).

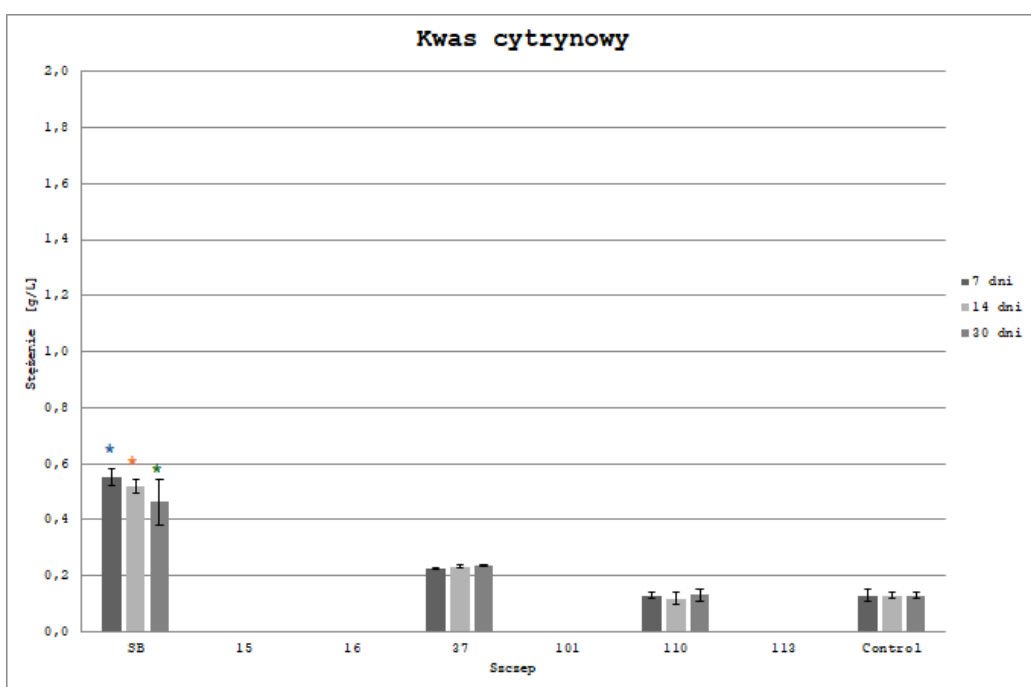


Rys. 19. Zmiany stężenia węglowodanów złożonych (g/l) w piwie fermentowanym pod wpływem różnych szczepów drożdży (SB, 15, 16, 37, 101, 110 i 113) oraz w próbce kontrolnej po 7, 14 i 30 dniach fermentacji. Słupki oznaczają wartości średnie $\pm$ odchylenie standardowe ($n = 3$). Kolorowe gwiazdki (*) oznaczają statystycznie istotne różnice ($p < 0,05$) między wszystkimi szczepami a próbką kontrolną w tym samym punkcie czasowym (7, 14 lub 30 dni).

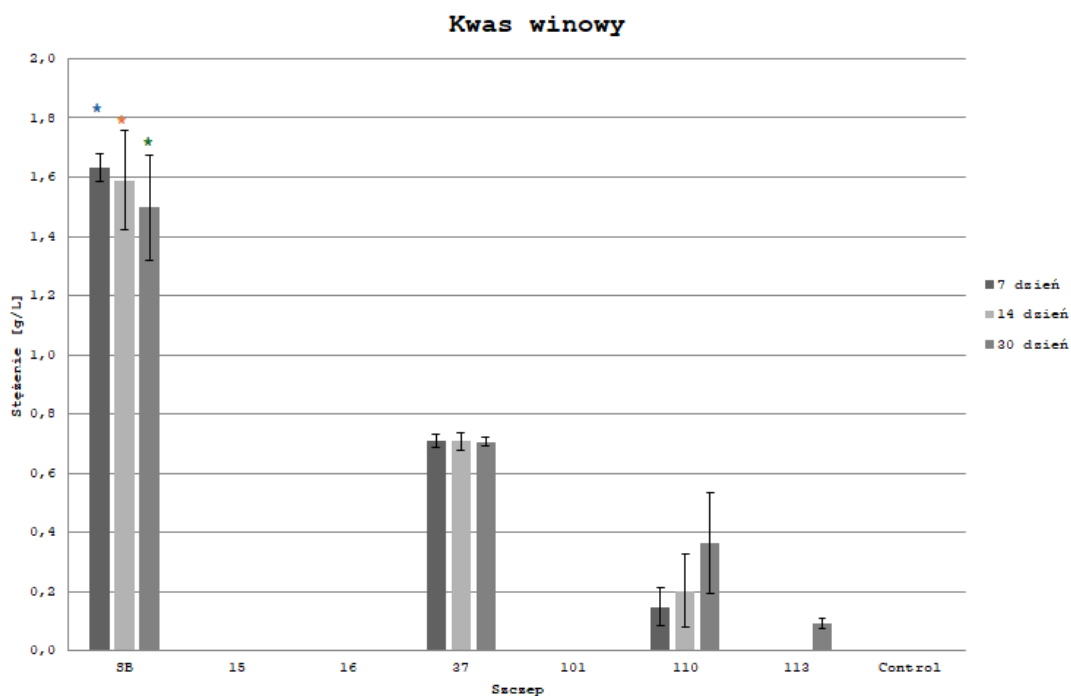


Rys. 20. Zmiany stężenia etanolu (g/l) w piwie fermentowanym pod wpływem różnych

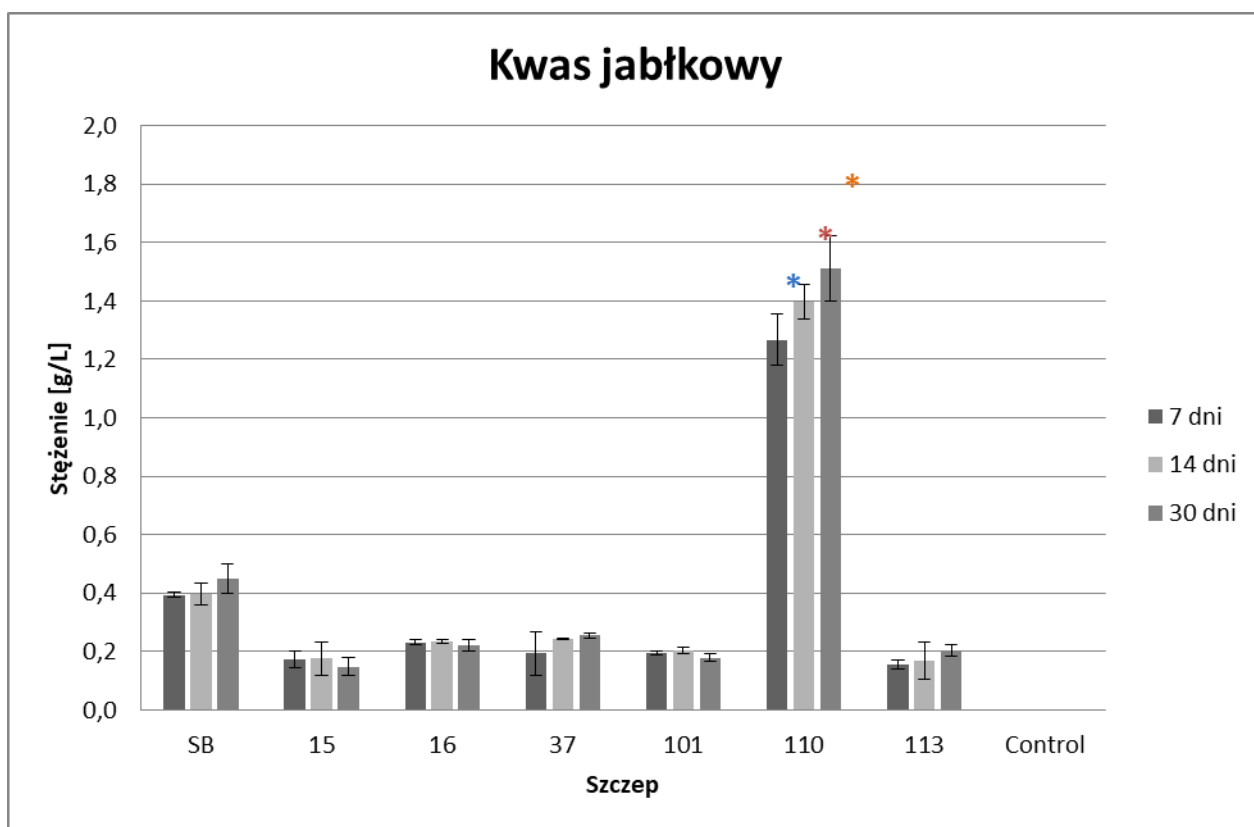
szczepów drożdży (SB, 15, 16, 37, 101, 110 i 113) oraz w próbce kontrolnej po 7, 14 i 30 dniach fermentacji. Słupki oznaczają wartości średnie $\pm$ odchylenie standardowe ($n = 3$). Kolorowe gwiazdki (*) oznaczają statystycznie istotne różnice ($p < 0,05$) między wszystkimi szczepami a próbką kontrolną w tym samym punkcie czasowym (7, 14 lub 30 dni).



Rys. 21. Zmiany stężenia kwasu cytrynowego (g/l) w piwie fermentowanym pod wpływem różnych szczepów drożdży (SB, 15, 16, 37, 101, 110 i 113) oraz w próbce kontrolnej po 7, 14 i 30 dniach fermentacji. Słupki oznaczają wartości średnie $\pm$ odchylenie standardowe ($n = 3$). Kolorowe gwiazdki (*) oznaczają statystycznie istotne różnice ($p < 0,05$) między wszystkimi szczepami a próbką kontrolną w tym samym punkcie czasowym (7, 14 lub 30 dni).



Rys. 22. Zmiany stężenia kwasu winowego (g/l) w piwie fermentowanym pod wpływem różnych szczepów drożdży (SB, 15, 16, 37, 101, 110 i 113) oraz w próbce kontrolnej po 7, 14 i 30 dniach fermentacji. Słupki oznaczają wartości średnie $\pm$ odchylenie standardowe ($n = 3$). Kolorowe gwiazdki (*) oznaczają statystycznie istotne różnice ($p < 0,05$) między wszystkimi szczepami a próbką kontrolną w tym samym punkcie czasowym (7, 14 lub 30 dni).



Rys. 23. Zmiany stężenia kwasu jabłkowego (g/l) w piwie fermentowanym pod wpływem różnych szczepów drożdży (SB, 15, 16, 37, 101, 110 i 113) oraz w próbce kontrolnej po 7, 14 i 30 dniach fermentacji. Słupki oznaczają wartości średnie $\pm$ odchylenie standardowe ($n = 3$). Kolorowe gwiazdki (*) oznaczają statystycznie istotne różnice ($p < 0,05$) między wszystkimi szczepami a próbką kontrolną w tym samym punkcie czasowym (7, 14 lub 30 dni).

7. Stwierdzenia i wnioski

Badania przedstawione w niniejszej pracy pozytywnie weryfikują postawione hipotezy badawcze. Wykazują, iż spontaniczne fermentacje roślinne - niezależnie od tego, czy jako pożądane (fermentacja moszczu winnego), czy jako niepożądane przypadki psucia się żywności - kryją w sobie zróżnicowaną mikrobiotę drożdży, którą można wykorzystać do poszukiwania szczepów probiotycznych, a warunki fermentacji mogą stanowić preselekcję ekologiczną względem niektórych pożądanych cech probiotycznych. Szczepy wyizolowane przeze mnie w toku pracy wykazywały liczne pożądane cechy probiotyczne - wysoką zdolność do przeżycia w warunkach symulowanego przewodu pokarmowego, wysoką hydrofobowość oraz autoagregację oraz szeroki zakres produkowanych enzymów, co przy kompatybilności pozyskanych szczepów z wymaganiami technologicznymi pozwala uznać, iż szczepy te są drożdżami probiotycznymi o wysokim potencjale aplikacyjnym w produkcji napojów fermentowanych. W toku badań udało się istotnie poszerzyć zakres wiedzy w aspekcie potencjału probiotycznego drożdży biorących udział w fermentacji win, a także sięgnąć po alternatywne, do tej pory nie wykorzystane źródła izolatów drożdży probiotycznych jakim jest zepsuta i psująca się żywność, która tradycyjnie kojarzy się raczej z niepożądaną mikrobiotą, aniżeli obiecującym obiektem do izolacji potencjalnych probiotyków.

W drugiej części badań wykazano, iż podpiwek, tradycyjny polski napój fermentowany, który do tej pory nie stanowił obiektu zainteresowania badaczy, może być użyty jako nośnik dla drożdży probiotycznych. Tym sposobem może on stanowić łącznik pomiędzy tradycją, a nowoczesnością będąc jednocześnie staropolskim napojem fermentowanym i innowacyjnym produktem funkcjonalnym. Powyższe badania mogą stanowić istotny przyczynek do dalszych badań w aspekcie zarówno drożdży probiotycznych i ich właściwości, a także sięgania po zapomniane do tej pory tradycyjne typy żywności.

Na podstawie uzyskanych wyników sformułowane zostały następujące wnioski:

1. Żywność fermentowana spontanicznie, zarówno pożądana, jak i niepożądana jest źródłem drożdży o potencjale probiotycznym.
2. W zastosowanej procedurze selekcyjnej najwięcej kryteriów probiotyczności wykazały następujące gatunki i szczepy drożdży: *Hanseniaspora uvarum* (15_Hans_uvarum i 16_Hans_uvarum), *Metschnikowia pulcherrima* (110_Metsch_pulcherrima i 113_Metsch_pulcherrima), *Pichia kudriavzevii* (101_Pich_kudriavzevii) oraz *Saccharomyces cerevisiae* (37_Sacch_cerevisiae)
3. Drożdże probiotyczne wyizolowane z żywności spontanicznej fermentacji mogą stanowić bezpieczne kultury starterowe do przygotowania fermentowanych napojów o właściwościach probiotycznych
4. Podpiwek fermentowany z użyciem drożdży probiotycznych może stanowić nośnik dla szczepów probiotycznych z uwagi na dobrą przeżywalność szczepów w ciągu okresu fermentacji i przechowywania w warunkach chłodniczych.
5. Drożdże należące do różnych gatunków wytwarzają podpiwki o nieco odmiennych właściwościach, lecz wszystkie otrzymane napoje można zaklasyfikować do produktów niskoalkoholowych lub bezalkoholowych, co zgodne jest z definicją podpiwku.

8. Bibliografia

- Abdel-Kareem, M. Marwa, A. M. Rasmey, and A. A. Zohri. 2019. "The Action Mechanism and Biocontrol Potentiality of Novel Isolates of *Saccharomyces Cerevisiae* against the Aflatoxigenic *Aspergillus Flavus*." *Letters in Applied Microbiology* 68(2): 104-11.
- Abolghasemi, Hedieh, Mohaddeseh Larypoor, and Farzaneh Hosseini. 2022. "Probiotic Effects of *Metschnikowia* Isolated from Dairy Products Aquatic Environments." *International Journal of Molecular and Clinical Microbiology* 12(2): 1692-1703. https://ijmcm.tonekabon.iau.ir/article_693452.html (April 28, 2024).
- Agarbati, Alice et al. 2020. "Potential Probiotic Yeasts Sourced from Natural Environmental and Spontaneous Processed Foods." *Foods* 9(3): 287. <https://www.mdpi.com/2304-8158/9/3/287/htm> (April 15, 2021).
- Agarbati, Alice et al.. 2024. "Agro-Ecosystem of Honeybees as Source for Native Probiotic Yeasts." *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 40(5): 147. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11274-024-03941-z> (April 28, 2024).
- Al-Nijir, Montazar, Daniel A Henk, Michael R Bedford, and Christopher J Chuck. 2024. "Assessing *Metschnikowia Pulcherrima* as a Potential Probiotic Yeast for Animal Feed." *Sustainable Microbiology*. <https://academic.oup.com/sumbio/advance-article/doi/10.1093/sumbio/qvae008/7658443> (April 28, 2024).
- Alexandre, Hervé, and Michèle Guilloux-Benatier. 2006. "Yeast Autolysis in Sparkling Wine - a Review." *Australian Journal of Grape and Wine Research* 12(2): 119-27. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1755-0238.2006.tb00051.x> (June 3, 2025).
- Alkalbani, Nadia S. et al. 2022. "In Vitro Characterization and Identification of Potential Probiotic Yeasts Isolated from Fermented Dairy and Non-Dairy Food Products." *Journal of Fungi* 8(5): 544. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9147075/> (September 24, 2025).
- Ambroset, Chloé et al. 2011. "Deciphering the Molecular Basis of Wine Yeast Fermentation Traits Using a Combined Genetic and Genomic Approach." *G3: Genes, Genomes, Genetics* 1(4): 263-81.

- Amorim, Juliana Cunha, Roberta Hilsdorf Piccoli, and Whasley Ferreira Duarte. 2018. "Probiotic Potential of Yeasts Isolated from Pineapple and Their Use in the Elaboration of Potentially Functional Fermented Beverages." *Food Research International* 107: 518-27. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29580515/> (April 15, 2021).
- Arévalo-Villena, María et al. 2018. "Probiotic Capability in Yeasts: Set-up of a Screening Method." *LWT* 89: 657-65.
- Aslankoochi, Elham et al. 2016. "Non-Conventional Yeast Strains Increase the Aroma Complexity of Bread." *PLOS ONE* 11(10): e0165126. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0165126> (December 20, 2022).
- Aydın, Furkan, Yeşim Aktepe, Halil İbrahim Kahve, and İbrahim Çakır. 2024. "In Vitro Probiotic Characterization of Yeasts with Their Postbiotics' Antioxidant Activity and Biofilm Inhibition Capacity." *Current Microbiology* 81(11): 1-12. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00284-024-03881-9> (October 29, 2024).
- Azhar, M. A., and Munaim M.S. 2023. "Survival of Isolated Probiotic Yeast Strains from Kefir Towards Bile and Acidic Environments." <https://www.iscientific.org/wp-content/uploads/2023/08/10-IJCBS-23-23-3-3-done.pdf> (May 29, 2025).
- Bahuguna, Nikita, Divya Venugopal, and Nishant Rai. 2024. "Biotherapeutic Potential of Probiotic Yeast *Saccharomyces Boulardii* Against *Candida Albicans* Biofilm." *Indian Journal of Microbiology*: 1-12. <https://link.springer.com/article/10.1007/s12088-024-01350-2> (September 14, 2025).
- Banik, Abhijit et al. 2020. "Biofortification of Multi-Grain Substrates by Probiotic Yeast." *Food Biotechnology* 34(4): 283-305. <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/08905436.2020.1833913> (July 25, 2022).
- Barnett, James A. 2000. "A History of Research on Yeasts 2: Louis Pasteur and His Contemporaries, 1850-1880." *Yeast* 16(8): 755-71. <https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions>.
- Bartowsky, E. J. 2009. "Bacterial Spoilage of Wine and Approaches to Minimize It." *Letters in Applied Microbiology* 48(2): 149-56. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1472-765X.2008.02505.x> (July 25, 2022).
- Bauer, F.F., and I.S. Pretorius. 2000. "Yeast Stress Response and Fermentation Efficiency:

- How to Survive the Making of Wine - A Review.” *South African Journal of Enology and Viticulture* 21(1): 27-51. <https://www.journals.ac.za/sajev/article/view/3557> (May 29, 2025).
- Benito, S. et al. 2011. “Formation of Vinylphenolic Pyranoanthocyanins by *Saccharomyces Cerevisiae* and *Pichia Guillermondii* in Red Wines Produced Following Different Fermentation Strategies.” *Food Chemistry* 124(1): 15-23.
- Bilski, Jan et al. 2017. “The Role of Intestinal Alkaline Phosphatase in Inflammatory Disorders of Gastrointestinal Tract.” *Mediators of Inflammation* 2017(1): 9074601. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1155/2017/9074601> (October 3, 2024).
- Binetti, A., M. Carrasco, J. Reinheimer, and V. Suárez. 2013. “Yeasts from Autochthonal Cheese Starters: Technological and Functional Properties.” *Journal of applied microbiology* 115(2): 434-44. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23600736/> (October 29, 2024).
- Buts, Jean Paul et al. 2006. “*Saccharomyces Boulardii* Produces in Rat Small Intestine a Novel Protein Phosphatase That Inhibits *Escherichia Coli* Endotoxin by Dephosphorylation.” *Pediatric Research* 60(1): 24-29. <https://www.nature.com/articles/pr2006189> (September 14, 2025).
- “*Candida Krusei* | Viticulture and Enology.” <https://wineserver.ucdavis.edu/industry-info/enology/wine-microbiology/yeast-mold/candida-krusei> (June 25, 2025).
- Canonico, Laura, Francesca Comitini, and Maurizio Ciani. 2019. “*Metschnikowia Pulcherrima* Selected Strain for Ethanol Reduction in Wine: Influence of Cell Immobilization and Aeration Condition.” *Foods* 2019, Vol. 8, Page 378 8(9): 378. <https://www.mdpi.com/2304-8158/8/9/378/htm> (June 26, 2025).
- Caruso, M. et al. 2002. 18 *World Journal of Microbiology and Biotechnology Formation of Biogenic Amines as Criteria for the Selection of Wine Yeasts*. Springer. <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1014451728868> (October 29, 2024).
- Carvalho, João Paulo, David Sáez Moreno, and Lucília Domingues. 2025. “Genetic Engineering of *Saccharomyces Boulardii*: Tools, Strategies and Advances for Enhanced Probiotic and Therapeutic Applications.” *Biotechnology Advances* 84: 108663. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2025.108663> (August 5, 2025).
- Cassanego, Daniela Buzatti, Neila Silvia Pereira dos Santos Richards, Marcio Antonio Mazutti, and Maurício Ramírez-Castrillón. 2015. “Leveduras: Diversidade Em Kefir, Potencial Probiótico e Possível Aplicação Em Sorvete.” *Ciência e Natura* 37(0): 175.

- <http://dx.doi.org/105902/2179460X> (April 15, 2021).
- Cheplin, Harry A., Charles D. Post, and Joseph R. Wiseman. 1923. "Bacillus Acidophilus Milk and Its Therapeutic Effects." *The Boston Medical and Surgical Journal* 189(12): 405-11. <https://www.nejm.org/doi/pdf/10.1056/NEJM192309201891204> (September 13, 2025).
- Chu, Yunfei et al. 2023. "Advances in the Application of the Non-Conventional Yeast *Pichia kudriavzevii* in Food and Biotechnology Industries." *Journal of Fungi* 2023, Vol. 9, Page 170 9(2): 170. <https://www.mdpi.com/2309-608X/9/2/170/htm> (April 29, 2024).
- Cioch-Skoneczny, Monika, Paweł Satora, Szymon Skoneczny, and Magdalena Skotniczny. 2021. "Biodiversity of Yeasts Isolated during Spontaneous Fermentation of Cool Climate Grape Musts." *Archives of microbiology* 203(1): 153-62. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32780151/> (June 3, 2023).
- Consoli, Marcella Lobato D. et al. 2016. "Randomized Clinical Trial: Impact of Oral Administration of *Saccharomyces Boulardii* on Gene Expression of Intestinal Cytokines in Patients Undergoing Colon Resection." *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition* 40(8): 1114-21. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25917895/> (April 15, 2021).
- Costa, Ane Catarine Tosi et al. 2023. "Transcriptional Response of Multi-Stress-Tolerant *Saccharomyces Cerevisiae* to Sequential Stresses." *Fermentation* 9(2).
- Craig, Oliver E. 2021. "Prehistoric Fermentation, Delayed-Return Economies, and the Adoption of Pottery Technology." *Current Anthropology* 62(S24): S233-41. <https://www.journals.uchicago.edu/doi/10.1086/716610> (September 13, 2025).
- Czerucka, D., T. Piche, and P. Rampal. 2007. "Review Article: Yeast as Probiotics - *Saccharomyces Boulardii*." *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 26(6): 767-78. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17767461/> (April 16, 2021).
- Al Daccache, Marina et al. 2020. "Control of the Sugar/Ethanol Conversion Rate during Moderate Pulsed Electric Field-Assisted Fermentation of a *Hanseniaspora* Sp. Strain to Produce Low-Alcohol Cider." *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 59: 102258.
- Das, Susrut, Pradeep Kumar Gupta, and Rashmi Ranjan Das. 2016. "Efficacy and Safety of *Saccharomyces Boulardii* in Acute Rotavirus Diarrhea: Double Blind Randomized Controlled Trial from a Developing Country." *Journal of Tropical Pediatrics* 62(6):

- 464-70. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27283364/> (April 15, 2021).
- Deleu, Sara et al. 2024. "Effect of Mutant and Engineered High-Acetate-Producing *Saccharomyces Cerevisiae* Var. *Boulardii* Strains in Dextran Sodium Sulphate-Induced Colitis." *Nutrients* 16(16): 2668. <https://www.mdpi.com/2072-6643/16/16/2668/htm> (September 14, 2025).
- Delgado-Ospina, Johannes et al. 2020. "Exploring the Capability of Yeasts Isolated from Colombian Fermented Cocoa Beans to Form and Degrade Biogenic Amines in a Lab-Scale Model System for Cocoa Fermentation." *Microorganisms* 2021, Vol. 9, Page 28 9(1): 28. <https://www.mdpi.com/2076-2607/9/1/28/htm> (August 9, 2023).
- Drozdz, Iwona et al. 2015. "Comparison of the Yeast Microbiota of Different Varieties of Cool-Climate Grapes by PCR-RAPD." *Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences* 9(1): 293-98. <https://potravinarstvo.com/journal1/index.php/potravinarstvo/article/view/484> (July 11, 2023).
- Efremova, Irina et al. 2024. "Efficacy and Safety of a Probiotic Containing *Saccharomyces Boulardii* CNCM I-745 in the Treatment of Small Intestinal Bacterial Overgrowth in Decompensated Cirrhosis: Randomized, Placebo-Controlled Study." *Journal of Clinical Medicine* 2024, Vol. 13, Page 919 13(3): 919. <https://www.mdpi.com/2077-0383/13/3/919/htm> (September 14, 2025).
- Ellouze, O. et al. 2016. "Septic Shock Due to *Saccharomyces Boulardii*." *Medecine et Maladies Infectieuses* 46(2): 104-5. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26774277/> (April 15, 2021).
- Englezos, Vasileios et al. 2017. "Starmerella Bacillaris in Winemaking: Opportunities and Risks." *Current Opinion in Food Science* 17: 30-35.
- Fakruddin, Md, Md Nur Hossain, and Monzur Morshed Ahmed. 2017. "Antimicrobial and Antioxidant Activities of *Saccharomyces Cerevisiae* IFST062013, a Potential Probiotic." *BMC Complementary and Alternative Medicine* 17(1): 1-11. <https://bmccomplementmedtherapies.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12906-017-1591-9> (October 3, 2024).
- Feizizadeh, Sahar, Amin Salehi-Abargouei, and Vajihe Akbari. 2014. "Efficacy and Safety of *Saccharomyces Boulardii* for Acute Diarrhea." *Pediatrics* 134(1): e176-91. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24958586/> (April 15, 2021).
- Feng, Tao, and Jing Wang. 2020. "Oxidative Stress Tolerance and Antioxidant Capacity of Lactic Acid Bacteria as Probiotic: A Systematic Review." *Gut Microbes* 12(1).

- /pmc/articles/PMC7524341/ (October 3, 2024).
- Fernández-Pacheco, Pilar, Cristina Pintado, et al. 2021. "Potential Probiotic Strains of *Saccharomyces* and Non-*Saccharomyces*: Functional and Biotechnological Characteristics." *Journal of Fungi* 7(3): 177. /pmc/articles/PMC7999857/ (April 19, 2021).
- Fernández-Pacheco, Pilar, Isabel Zaparoli Rosa, et al. 2021. "Study of Potential Probiotic and Biotechnological Properties of Non-*Saccharomyces* Yeasts from Fruit Brazilian Ecosystems." *Brazilian Journal of Microbiology* 52(4): 2129-44.
<https://link.springer.com/article/10.1007/s42770-021-00541-z> (July 3, 2023).
- Fernandez-Pacheco Rodríguez, Pilar, María Arévalo-Villena, Isabel Zaparoli Rosa, and Ana Briones Pérez. 2018. "Selection of Potential Non-Sacharomyces Probiotic Yeasts from Food Origin by a Step-by-Step Approach." *Food Research International* 112: 143-51. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.06.008> (May 6, 2021).
- Del Fresno, Juan Manuel et al. 2021. "Application of *Hanseniaspora Vineae* Yeast in the Production of Rosé Wines from a Blend of Tempranillo and Albillo Grapes." *Fermentation* 2021, Vol. 7, Page 141 7(3): 141. <https://www.mdpi.com/2311-5637/7/3/141/htm> (June 25, 2025).
- Gil-Rodríguez, Ana María, Alfonso V. Carrascosa, and Teresa Requena. 2015. "Yeasts in Foods and Beverages: In Vitro Characterisation of Probiotic Traits." *LWT - Food Science and Technology* 64(2): 1156-62.
- Goktas, Hamza, Enes Dertli, and Osman Sagdic. 2021. "Comparison of Functional Characteristics of Distinct *Saccharomyces Boulardii* Strains Isolated from Commercial Food Supplements." *LWT* 136: 110340.
- Gómez-Gaviria, Manuela, Laura C. García-Carnero, Dario A. Baruch-Martínez, and Héctor M. Mora-Montes. 2024. "The Emerging Pathogen *Candida Metapsilosis*: Biological Aspects, Virulence Factors, Diagnosis, and Treatment." *Infection and Drug Resistance* 17: 171-85.
<https://www.dovepress.com/the-emerging-pathogen-candida-metapsilosis-biological-aspects-virulenc-peer-reviewed-fulltext-article-IDR> (May 18, 2024).
- Hedin, Karl Alex et al. 2024. "Saccharomyces Boulardii Enhances Anti-Inflammatory Effectors and AhR Activation via Metabolic Interactions in Probiotic Communities." *ISME Journal* 18(1): 212. <https://dx.doi.org/10.1093/ismejo/wrae212> (September 14, 2025).
- Henry, C. J. 2010. "Functional Foods." *European Journal of Clinical Nutrition* 64(7): 657-666.

59. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20606685/> (April 16, 2021).
- Hill, Colin et al. 2014. "The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics Consensus Statement on the Scope and Appropriate Use of the Term Probiotic." *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 11(8): 506-14. <https://www.nature.com/articles/nrgastro.2014.66> (April 16, 2021).
- Hinojosa-Avila, Carlo R. et al. "Chemical Profiling and Probiotic Viability Assessment in Gueuze-Style Beer: Fermentation Dynamics, Metabolite and Sensory Characterization, and in Vitro Digestion Resistance." *Food Chemistry* 462: 140916. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2024.140916> (April 20, 2025).
- Hou, Ruoyu et al. 2023. "Hydrogen Sulfide Production during Early Yeast Fermentation Correlates with Volatile Sulfur Compound Biogenesis but Not Thiol Release." *FEMS Yeast Research* 23: 1-10. <https://dx.doi.org/10.1093/femsyr/foad031> (July 7, 2025).
- Hsu, Shih-An, and Jui-Yu Chou. 2020. "YEASTS IN FERMENTED FOOD AND KEFIR: IN VITRO CHARACTERIZATION OF PROBIOTIC TRAITS." <https://doi.org/10.36899/JAPS.2021.2.0245> (October 29, 2024).
- Hutzler, M., R. Riedl, J. Koob, and F. Jacob. 2012. 65 *BrewingScience Fermentation and Spoilage Yeasts and Their Relevance for the Beverage Industry - A Review*. https://www.researchgate.net/publication/287235582_Fermentation_and_spoilage_yeasts_and_their_relevance_for_the_beverage_industry_-_A_review (July 5, 2025).
- Ifland, J. R. et al. 2015. "Functional Foods in the Treatment of Processed Food Addiction and the Metabolic Syndrome." In *Nutraceuticals and Functional Foods in Human Health and Disease Prevention*, CRC Press, 43-60. <https://www.taylorfrancis.com/https://www.taylorfrancis.com/books/mono/10.1201/b19308/nutraceuticals-functional-foods-human-health-disease-prevention-debasis-bagchi-harry-preuss-anand-swaroop> (April 15, 2021).
- "Is the Color of Beer Related to the Color of the Distillers Grain? - Hunterlab." <https://support.hunterlab.com/hc/en-us/articles/202022605-Is-the-color-of-beer-related-to-the-color-of-the-distillers-grain> (July 3, 2025).
- Jach, Monika, Renata Łoś, Maciej Maj, and Anna Malm. 2013. "Probiotyki - Aspekty Funkcjonalne i Technologiczne." *Postepy Mikrobiologii* 52(2): 161-70.
- Ji, Xue Xue et al. 2025. "Response Mechanism of Ethanol-Tolerant *Saccharomyces Cerevisiae* Strain ES-42 to Increased Ethanol during Continuous Ethanol Fermentation." *Microbial cell factories* 24(1): 33.

- <https://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12934-025-02663-7> (May 29, 2025).
- Jolly, Neil P., Cristian Varela, and Isak S. Pretorius. 2014. "Not Your Ordinary Yeast: Non-Saccharomyces Yeasts in Wine Production Uncovered." *FEMS Yeast Research* 14(2): 215-37. <https://dx.doi.org/10.1111/1567-1364.12111> (May 30, 2025).
- Kara et al. 2018. "Saccharomyces Cerevisiae Fungemia after Probiotic Treatment in an Intensive Care Unit Patient." *Journal de Mycologie Medicale* 28(1): 218-21. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29132794/> (April 16, 2021).
- Karabegović, Ivana et al. 2021. "Potential of Non-Saccharomyces Yeast for Improving the Aroma and Sensory Profile of Prokupac Red Wine." *OENO One* 55(2): 181-95. <https://oenone.eu/article/view/3859/15263> (June 3, 2025).
- Karaolis, Constantinos, George Botsaris, Iakovos Pantelides, and Dimitris Tsaltas. 2013. "Potential Application of *Saccharomyces Boulardii* as a Probiotic in Goat's Yoghurt: Survival and Organoleptic Effects." *International Journal of Food Science & Technology* 48(7): 1445-52. <http://doi.wiley.com/10.1111/ijfs.12111> (April 16, 2021).
- Kelesidis, Theodoros, and Charalabos Pothoulakis. 2012. "Efficacy and Safety of the Probiotic *Saccharomyces Boulardii* for the Prevention and Therapy of Gastrointestinal Disorders." *Therapeutic Advances in Gastroenterology* 5(2): 111-25. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22111111/> (May 16, 2021).
- Kunyeit, Lohith, Reeta P. Rao, and K. A. Anu-Appaiah. 2023. "Yeasts Originating from Fermented Foods, Their Potential as Probiotics and Therapeutic Implication for Human Health and Disease." *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 64(19): 1-12. <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408398.2023.2172546> (June 3, 2023).
- Landete, J. M., S. Ferrer, and I. Pardo. 2007. "Biogenic Amine Production by Lactic Acid Bacteria, Acetic Bacteria and Yeast Isolated from Wine." *Food Control* 18(12): 1569-74.
- Lara-Hidalgo, C. E. et al. 2019. "Isolation of Yeasts from Guajillo Pepper (*Capsicum Annuum* L.) Fermentation and Study of Some Probiotic Characteristics." *Probiotics and antimicrobial proteins* 11(3): 748-64. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29696516/> (October 29, 2024).
- Lee, Na-Kyoung et al. 2019. "Bioactive Compounds of Probiotic *Saccharomyces Cerevisiae* Strains Isolated from Cucumber Jangajji." *Journal of Functional Foods* 58: 324-29. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1756464619302427> (July 13, 2023).

- 2023).
- Liao, Qingzhao et al. 2023. "Improvements in the Growth Performance, Morphology, Gut Microbiota, Hepatic Health, and Immune Response of Juvenile Tilapia (*Oreochromis Niloticus*) Fed *Metschnikowia* Sp. GXUS03." *Aquaculture* 577: 739954.
- Libudzisz, Z. 2002. "Probiotics and Prebiotics in Fermented Milks." *Pediatrics Wspolczesna* 4: 19-25.
- Lilly, Daniel M., and Rosalie H. Stillwell. 1965. "Probiotics: Growth-Promoting Factors Produced by Microorganisms." *Science* 147(3659): 747-48.
- Liu, Yue, Joseph Hubert Galani Yamdeu, Yun Yun Gong, and Caroline Orfila. 2020. "A Review of Postharvest Approaches to Reduce Fungal and Mycotoxin Contamination of Foods." *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 19(4): 1521-60. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/1541-4337.12562> (July 25, 2022).
- Mannaa, Mohamed, Gil Han, Young Su Seo, and Inmyoung Park. 2021. "Evolution of Food Fermentation Processes and the Use of Multi-Omics in Deciphering the Roles of the Microbiota." *Foods* 10(11): 2861. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8618017/> (September 13, 2025).
- Martin, Valentina et al. 2022. "Application of *Hanseniaspora Vineae* to Improve White Wine Quality." *White Wine Technology*: 99-115.
- Masneuf-Pomarede, Isabelle et al. 2015. "The Yeast *Starmerella Bacillaris* (Synonym *Candida Zemlinina*) Shows High Genetic Diversity in Winemaking Environments." *FEMS Yeast Research* 15(5): 11 p. <https://hal.inrae.fr/hal-02638126> (July 12, 2023).
- Matraxia, Michele et al. 2021. "Non-Conventional Yeasts from Fermented Honey by-Products: Focus on *Hanseniaspora Uvarum* Strains for Craft Beer Production." *Food Microbiology* 99: 103806.
- McFarland, L. V. 1996. "Saccharomyces Boulardii Is Not Saccharomyces Cerevisiae [4]." *Clinical Infectious Diseases* 22(1): 200-201.
- McFarland, Lynne V. 2015. "From Yaks to Yogurt: The History, Development, and Current Use of Probiotics." *Clinical Infectious Diseases* 60(suppl_2): S85-90. <https://dx.doi.org/10.1093/cid/civ054> (April 16, 2021).
- Meledina, T. V., S. G. Davydenko, and A. T. Dedegkaev. 2015. "Yeast Physiological State Influence on Beer Turbidity." *Agronomy Research* 13(4): 992-1001. https://www.researchgate.net/publication/282273776_Yeast_Physiological_State_Influence_on_Beer_Turbidity (June 3, 2025).
- Mencher, Ana et al. 2020. "Proteomic Characterization of Extracellular Vesicles Produced

- by Several Wine Yeast Species.” *Microbial Biotechnology* 13(5): 1581-96.
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/1751-7915.13614> (June 3, 2025).
- Modzelan, Marta. 2020. “Podpiwek Kujawski.” *Wiedza i jakość* 2(59): 11-12.
- Monteagudo-Mera, A. et al. 2011. “Characterization of Certain Bacterial Strains for Potential Use as Starter or Probiotic Cultures in Dairy Products.” 74(8): 1379-86.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21819671/> (July 13, 2023).
- Morata, Antonio et al. 2019. “Applications of *Metschnikowia Pulcherrima* in Wine Biotechnology.” *Fermentation* 2019, Vol. 5, Page 63 5(3): 63.
<https://www.mdpi.com/2311-5637/5/3/63/htm> (June 26, 2025).
- Morelli, Lorenzo, and Lucio Capurso. 2012. “FAO/WHO Guidelines on Probiotics: 10 Years Later.” *Journal of Clinical Gastroenterology* 46(SUPPL. 1).
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22955349/> (April 16, 2021).
- Muche, Nigus, Tsehayneh Geremew, and Tamene Milkessa Jiru. 2023. “Isolation and Characterization of Potential Probiotic Yeasts from Ethiopian Injera Sourdough.” 3 *Biotech* 13(9). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37581092/> (October 29, 2024).
- Mulero-Cerezo, Joaquín, Álvaro Briz-Redón, and Ángel Serrano-Aroca. 2019. “*Saccharomyces Cerevisiae* Var. *Boulardii*: Valuable Probiotic Starter for Craft Beer Production.” 9(16): 3250. <https://www.mdpi.com/2076-3417/9/16/3250> (April 16, 2021).
- Nadai, Chiara, Alessio Giacomini, and Viviana Corich. 2021. “The Addition of Wine Yeast *Starmerella Bacillaris* to Grape Skin Surface Influences Must Fermentation and Glycerol Production.” *OENO One* 55(2): 47-55. <https://oeno-one.eu/article/view/4556/15059> (July 12, 2023).
- Naimah, Alaa Kareem, Alaa Jabbar Abd Al-Manhel, and Manar Jabbar Al-Shawi. 2018. “Isolation, Purification and Characterization of Antimicrobial Peptides Produced from *Saccharomyces Boulardii*.” *International Journal of Peptide Research and Therapeutics* 24(3): 455-61.
- Neffe-Skocińska, Katarzyna, Barbara Sionek, Iwona Ścibisz, and Danuta Kołożyn-Krajewska. 2017. “Acid Contents and the Effect of Fermentation Condition of Kombucha Tea Beverages on Physicochemical, Microbiological and Sensory Properties.” *CYTA - Journal of Food* 15(4): 601-7.
<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/19476337.2017.1321588> (May 19, 2025).

- Ochangco, Honeylet Sabas et al. 2016. "In Vitro Investigation of *Debaryomyces Hansenii* Strains for Potential Probiotic Properties." *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 32(9).
- Offei, Benjamin et al. 2019. "Unique Genetic Basis of the Distinct Antibiotic Potency of High Acetic Acid Production in the Probiotic Yeast *Saccharomyces Cerevisiae* Var. *Boulardii*." *Genome Research* 29(9): 1478-94.
- Ogunremi, Omotade R., Renu Agrawal, and Abiodun I. Sanni. 2015. "Development of Cereal-Based Functional Food Using Cereal-Mix Substrate Fermented with Probiotic Strain - *Pichia Kudriavzevii* OG32." *Food Science and Nutrition* 3(6): 486-94.
- Ojha, K. Shikha, and Brijesh K. Tiwari. 2016. "Novel Food Fermentation Technologies." In *Food Engineering Series*, Springer, 1-5.
- Oliveira Alves, Raniele et al. 2025. "Investigation of the Influence of Different *Camellia Sinensis* Teas on Kombucha Fermentation and Development of Flavored Kombucha with Brazilian Fruits." <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.
- Oliveira, Tatiane et al. 2017. "Probiotic Potential of Indigenous Yeasts Isolated during the Fermentation of Table Olives from Northeast of Portugal." *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 44: 167-72.
- Orsi, Carlotta Francesca, Bruna Colombari, and Elisabetta Blasi. 2010. "Candida Metapsilosis as the Least Virulent Member of the 'C. Parapsilosis' Complex." *Medical Mycology* 48(8): 1024-33. <https://dx.doi.org/10.3109/13693786.2010.489233> (October 29, 2024).
- Pais, Pedro, Vanda Almeida, Melike Yılmaz, and Miguel C. Teixeira. 2020. "Saccharomyces Boulardii: What Makes It Tick as Successful Probiotic?" *Journal of Fungi* 6(2): 1-15. www.mdpi.com/journal/jof (May 16, 2021).
- Paul, Charushila et al. 2023. "Isolation, Identification and Probiotic Potential of Lactic Acid Bacteria and Yeasts from Commercial Yogurt and Homemade Non-Dairy Fermented Food 'KANJI.'" *International Journal of Gastronomy and Food Science* 34: 100787.
- de Paula, Breno Pereira et al. 2019. "Growth Parameters and Survivability of *Saccharomyces Boulardii* for Probiotic Alcoholic Beverages Development." *Frontiers in Microbiology* 10: 474445. www.frontiersin.org (May 29, 2025).
- Pawlikowska, Ewelina, and Dorota Kręgiel. 2017. "Enzymatic Profiles And Antimicrobial

- Activity Of The Yeast *Metschnikowia Pulcherrima*.” (23): 17-24.
- Pereira de Paula, Breno et al. 2021. “Technological Features of *Saccharomyces Cerevisiae* Var. *Boulardii* for Potential Probiotic Wheat Beer Development.” *LWT* 135: 110233.
- Perricone, Marianne, Antonio Bevilacqua, Maria Rosaria Corbo, and Milena Sinigaglia. 2014. “Technological Characterization and Probiotic Traits of Yeasts Isolated from Altamura Sourdough to Select Promising Microorganisms as Functional Starter Cultures for Cereal-Based Products.” *Food Microbiology* 38: 26-35.
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0740002013001603> (June 5, 2023).
- Pinu, Farhana R, Silas G Villas-Boas, and Damian Martin. 2019. “Pre-Fermentative Supplementation of Fatty Acids Alters the Metabolic Activity of Wine Yeasts.”
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.01.005> (May 30, 2025).
- Piraine, Renan Eugenio Araujo et al. 2023. “Brewing and Probiotic Potential Activity of Wild Yeasts *Hanseniaspora Uvarum* PIT001, *Pichia Kluyveri* LAR001 and *Candida Intermedia* ORQ001.” *European Food Research and Technology* 249(1): 133-48.
<https://link.springer.com/article/10.1007/s00217-022-04139-z> (April 28, 2024).
- Pizzolitto, R. P. et al. 2013. “Evaluation of *Saccharomyces Cerevisiae* as an Antiaflatoxicogenic Agent in Broiler Feedstuffs.” *Poultry Science* 92(6): 1655-63.
- Du Plessis, Heinrich et al. 2019. “Modulation of Wine Flavor Using *Hanseniaspora Uvarum* in Combination with Different *Saccharomyces Cerevisiae*, Lactic Acid Bacteria Strains and Malolactic Fermentation Strategies.” *Fermentation* 2019, Vol. 5, Page 64 5(3): 64.
<https://www.mdpi.com/2311-5637/5/3/64/htm> (May 30, 2025).
- “Podpiwek, the Traditional Polish Refreshing Soft-Drink - 3 Seas Europe.”
<https://3seaseurope.com/podpiwek-refreshing-soft-drink-underbeer-poland/> (April 20, 2025).
- Ponomarova, Olga et al. 2017. “Yeast Creates a Niche for Symbiotic Lactic Acid Bacteria through Nitrogen Overflow.” *Cell Systems* 5(4). /pmc/articles/PMC5660601/ (April 16, 2021).
- Pons-Mercadé, Pere et al. 2021. “New Insights about the Influence of Yeasts Autolysis on Sparkling Wines Composition and Quality.” *Grapes and Wine*.
<https://www.intechopen.com/chapters/79500> (June 4, 2025).
- Postaru, Madalina, Alexandra Tucaliuc, Dan Cascaval, and Anca Irina Galaction. 2023. “Cellular Stress Impact on Yeast Activity in Biotechnological Processes-A Short Overview.” *Microorganisms* 11(10): 2522.

<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC10609598/> (May 29, 2025).

- Pothoulakis, Charalabos et al. 1993. "Saccharomyces Boulardii Inhibits Clostridium Difficile Toxin A Binding and Enterotoxicity in Rat Ileum." *Gastroenterology* 104(4): 1108-15. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8462799/> (April 16, 2021).
- Profir, Alina-Georgiana, Cristian-Teodor Buruiana, and Camelia Vizireanu. 2015. 21 *Effects of s. Cerevisiae Var. Boulardii in Gastrointestinal Disorders*. <http://> (April 16, 2021).
- Psomas, E. et al. 2001. "Some Probiotic Properties of Yeast Isolates from Infant Faeces and Feta Cheese." *International Journal of Food Microbiology* 69(1-2): 125-33.
- Pyrovolou, Katerina et al. 2024. "Fermentation of a Strong Dark Ale Hybrid Beer Enriched with Carob (Ceratonia Siliqua L.) Syrup with Enhanced Polyphenol Profile." *Applied Sciences (Switzerland)* 14(3): 1199. <https://www.mdpi.com/2076-3417/14/3/1199/htm> (May 27, 2025).
- Pytko, Monika et al. 2022. "Usefulness of Potentially Probiotic L. Lactis Isolates from Polish Fermented Cow Milk for the Production of Cottage Cheese." *Applied Sciences* 12(23): 12088. <https://www.mdpi.com/2076-3417/12/23/12088/htm> (April 24, 2023).
- Rajkowska, Katarzyna, Alina Kunicka-Styczyńska, and A Rygala. 2012. "Probiotic Activity of Saccharomyces Cerevisiae Var. Boulardii Against Human Pathogens." *Food Technology and Biotechnology* 50: 230-36.
- Ramírez-Cota, G. Yedid, E. Oliver López-Villegas, Antonio R. Jiménez-Aparicio, and Humberto Hernández-Sánchez. 2021. "Modeling the Ethanol Tolerance of the Probiotic Yeast Saccharomyces Cerevisiae Var. Boulardii CNCM I-745 for Its Possible Use in a Functional Beer." *Probiotics and antimicrobial proteins* 13(1): 187-94. <https://link.springer.com/article/10.1007/s12602-020-09680-5> (May 28, 2025).
- Roberfroid, Marcel B. 2000. "Prebiotics and Probiotics: Are They Functional Foods?" In *American Journal of Clinical Nutrition*, American Society for Nutrition.
- Rodríguez, María L et al. 2018. "The Oral Cavity: A Reservoir That Favors Colonization and Selection of Candida Parapsilosis Sensu Stricto Strains with High Pathogen Potential Under Conditions of Gingival-Periodontal Disease." *J. Dent. Sci. Ther* 2(1). www.verizonaonlinepublishing.com (October 30, 2024).
- Rozès, Nicolas et al. 2024. "Influence of Yeasts on Wine Acidity: New Insights into Saccharomyces Cerevisiae." *OENO One* 58(4). <https://oenone.eu/article/view/7877/40289> (May 29, 2025).

- Samuel, Delwen. 1996. "Investigation of Ancient Egyptian Baking and Brewing Methods by Correlative Microscopy." *Science* 273(5274): 488-90.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8662535/> (September 13, 2025).
- Sánchez-Suárez, Fernando, and Rafael A. Peinado. 2024. "Use of Non-Saccharomyces Yeast to Enhance the Acidity of Wines Produced in a Warm Climate Region: Effect on Wine Composition." *Fermentation* 10(1): 17. <https://www.mdpi.com/2311-5637/10/1/17/htm> (May 29, 2025).
- Santino, I. et al. 2014. "Saccharomyces Cerevisiae Fungemia, a Possible Consequence of the Treatment of Clostridium Difficile Colitis with a Probioticum." *International Journal of Immunopathology and Pharmacology* 27(1): 143-46.
- Sarwar, Abid et al. 2019. "Physicochemical and Microbiological Properties of Synbiotic Yogurt Made with Probiotic Yeast Saccharomyces Boulardii in Combination with Inulin." *Foods* 8(10): 468. <https://www.mdpi.com/2304-8158/8/10/468/htm> (April 16, 2021).
- Sarwar, Abid et al. 2022. "Effect of Chilled Storage on Antioxidant Capacities and Volatile Flavors of Synbiotic Yogurt Made with Probiotic Yeast Saccharomyces Boulardii CNCM I-745 in Combination with Inulin." *Journal of Fungi* 8(7): 713. [/pmc/articles/PMC9317841/](https://pmc/articles/PMC9317841/) (October 3, 2024).
- Senkarcinova, Bara, Ines Alexandra Graça Dias, Jakub Nespor, and Tomas Branyik. 2019. "Probiotic Alcohol-Free Beer Made with Saccharomyces Cerevisiae Var. Boulardii." *LWT* 100: 362-67.
- Shruthi, B. et al. 2024. "Probiotic and Functional Attributes of Yeasts Isolated from Different Traditional Fermented Foods and Products." *Probiotics and Antimicrobial Proteins*.
- Sica, P. et al. 2024. "Pre-Adaptation of Yeast (Saccharomyces Cerevisiae) Strains to Very High Gravity Can Improve Fermentation Parameters and Reduce Osmotic Stress." *Biomass Conversion and Biorefinery* 15(6): 9123-37.
<https://link.springer.com/article/10.1007/s13399-024-05746-4> (May 29, 2025).
- Sieuwert, Sander, Peter A. Bron, and Eddy J. Smid. 2018. "Mutually Stimulating Interactions between Lactic Acid Bacteria and Saccharomyces Cerevisiae in Sourdough Fermentation." *LWT - Food Science and Technology* 90: 201-6.
<https://research.wur.nl/en/publications/mutually-stimulating-interactions-between-lactic-acid-bacteria-an> (April 16, 2021).

- Simões, L. A. et al. 2021. "Probiotic Properties of Yeasts Isolated from Brazilian Fermented Table Olives." 131(4): 1983-97.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33704882/> (April 16, 2021).
- Śmiechowska, Maria, Mariusz Jakubowski, and Przemysław Dmowski. 2018. "Nowe Trendy Na Rynku Niskoalkoholowych Napojów Fermentowanych." *Kosmos* 67(3): 575-82. <https://kosmos.ptpk.org/index.php/Kosmos/article/view/2443> (April 20, 2025).
- Sola, Isabela Maria Macedo Simon et al. 2024. "Impact of Pure, Co-, and Sequential Fermentations with *Hanseniaspora* Sp. and *Saccharomyces Cerevisiae* on the Volatile Compounds of Ciders." *Fermentation* 2024, Vol. 10, Page 177 10(4): 177.
<https://www.mdpi.com/2311-5637/10/4/177/htm> (June 25, 2025).
- Speers, R. Alex, Yu Lai Jin, Allan T. Paulson, and Robert J. Stewart. 2003. "Effects of β -Glucan, Shearing and Environmental Factors on the Turbidity of Wort and Beer." *Journal of the Institute of Brewing* 109(3): 236-44.
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/j.2050-0416.2003.tb00164.x> (June 3, 2025).
- Staniszewski, Adam, and Monika Kordowska-Wiater. 2021. "Probiotic and Potentially Probiotic Yeasts-Characteristics and Food Application." *Foods* 2021, Vol. 10, Page 1306 10(6): 1306. <https://www.mdpi.com/2304-8158/10/6/1306/htm> (September 25, 2024).
- Staniszewski, Adam, Patrycja Staniszewska, Elwira Komó N-Janczara, and Monika Kordowska-Wiater. 2025. "Probiotic Yeast and How to Use Them-Combining Traditions and New Waves in Fermented Beverages." *Foods* 2025, Vol. 14, Page 2921 14(16): 2921. <https://www.mdpi.com/2304-8158/14/16/2921/htm> (August 24, 2025).
- Steiner, Elisabeth, Thomas Becker, and Martina Gastl. 2010. "Turbidity and Haze Formation in Beer - Insights and Overview." *Journal of the Institute of Brewing* 116(4): 360-68. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/j.2050-0416.2010.tb00787.x> (June 3, 2025).
- Stewart, Graham G. 2016. "Saccharomyces Species in the Production of Beer." *Beverages* 2(4): 34. <https://www.mdpi.com/2306-5710/2/4/34/htm> (June 25, 2025).
- Suharja, Anggita A.S., Anders Henriksson, and Shao Quan Liu. 2014. "Impact of *Saccharomyces Cerevisiae* on Viability of Probiotic *Lactobacillus Rhamnosus* in

- Fermented Milk under Ambient Conditions.” *Journal of Food Processing and Preservation* 38(1): 326-37.
- Suvarna, Surajvanshikumar et al. 2018. “Potential Probiotic Characterization and Effect of Encapsulation of Probiotic Yeast Strains on Survival in Simulated Gastrointestinal Tract Condition.” *Food Science and Biotechnology* 27(3): 745.
<https://doi.org/10.1007/s10068-018-0310-8> (September 24, 2025).
- Suzuki, Koji. 2011. “125th Anniversary Review: Microbiological Instability of Beer Caused by Spoilage Bacteria.” *Journal of the Institute of Brewing* 117(2): 131-55.
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/j.2050-0416.2011.tb00454.x> (July 25, 2022).
- Swieca, Michal et al. 2019. “Nutritional and Pro-Health Quality of Lentil and Adzuki Bean Sprouts Enriched with Probiotic Yeast *Saccharomyces Cerevisiae* Var. *Boulardii*.” *LWT* 100: 220-26.
- Syal, P., and A. Vohra. 2013. “Probiotic Potential of Yeasts Isolated From Traditional Indian Fermented Foods.” *International Journal of Microbiology Research* 5(2): 390-98.
https://www.researchgate.net/publication/272738789_Probiotic_potential_of_yeasts_isolated_from_traditional_indian_fermented_foods (June 5, 2023).
- Tamang, Jyoti Prakash, and Sonam Lama. 2022. “Probiotic Properties of Yeasts in Traditional Fermented Foods and Beverages.” *Journal of Applied Microbiology* 132(5): 3533-42. <https://academic.oup.com/jambio/article/132/5/3533/6988654> (March 22, 2023).
- Tanner, A. C.R., M. N. Strzempko, C. A. Belsky, and G. A. McKinley. 1985. “API ZYM and API An-Ident Reactions of Fastidious Oral Gram-Negative Species.” *Journal of clinical microbiology* 22(3): 333-35. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3930558/> (July 13, 2023).
- Temple, Norman J. 2022. “A Rational Definition for Functional Foods: A Perspective.” *Frontiers in Nutrition* 9: 957516. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9559824/> (July 5, 2025).
- Thygesen, Julie Bjerre, Henning Glerup, and Britta Tarp. 2012. “*Saccharomyces Boulardii* Fungemia Caused by Treatment with a Probioticum.” *BMJ Case Reports* 2012.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22605806/> (April 16, 2021).
- Tiago, F. C.P. et al. 2012. “Adhesion to the Yeast Cell Surface as a Mechanism for

- Trapping Pathogenic Bacteria by *Saccharomyces* Probiotics.” *Journal of Medical Microbiology* 61(PART 9): 1194-1207.
<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.042283-0>
 (September 14, 2025).
- Ting, Tiew Yik, Wei Jing Lee, and Hoe Han Goh. 2025. “Molecular Genetics and Probiotic Mechanisms of *Saccharomyces Cerevisiae* Var. *Boulardii*.” *Probiotics and Antimicrobial Proteins*: 1-15. <https://link.springer.com/article/10.1007/s12602-025-10634-y> (September 14, 2025).
- Torres-Díaz, Lesly L. et al. 2024. “Exploring *Metschnikowia Pulcherrima* as a Co-Fermenter with *Saccharomyces Cerevisiae*: Influence on Wine Aroma during Fermentation and Ageing.” *Beverages* 2024, Vol. 10, Page 26 10(2): 26.
<https://www.mdpi.com/2306-5710/10/2/26/htm> (May 30, 2025).
- Trofa, David, Attila Gácsér, and Joshua D. Nosanchuk. 2008. “*Candida Parapsilosis*, an Emerging Fungal Pathogen.” *Clinical Microbiology Reviews* 21(4): 606-25.
<https://journals.asm.org/doi/10.1128/cmr.00013-08> (October 30, 2024).
- Valderrama, Benjamín et al. 2021. “Cultivable Yeast Microbiota from the Marine Fish Species *Genypterus Chilensis* and *Seriotelella Violacea*.” *Journal of Fungi* 2021, Vol. 7, Page 515 7(7): 515. <https://www.mdpi.com/2309-608X/7/7/515/htm> (July 13, 2023).
- Vergara Alvarez, Silvia Cristina et al. 2023. “Bioprospecting of the Probiotic Potential of Yeasts Isolated from a Wine Environment.” *Fungal Genetics and Biology* 164: 103767. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1087184522001128> (June 3, 2023).
- Vicente, Javier et al. 2020. “The Genus *Metschnikowia* in Enology.” *Microorganisms* 8(7): 1-19. <https://www.mdpi.com/2076-2607/8/7/1038/htm> (May 30, 2025).
- Vilela, Alice. 2019. “Use of Nonconventional Yeasts for Modulating Wine Acidity.” *Fermentation* 2019, Vol. 5, Page 27 5(1): 27. <https://www.mdpi.com/2311-5637/5/1/27/htm> (May 30, 2025).
- Wainwright, T. 1971. “Production of H₂S by Yeasts: Role of Nutrients.” *Journal of Applied Bacteriology* 34(1): 161-71.
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1365-2672.1971.tb02275.x> (July 7, 2025).
- Walker, Graeme M., and Thiago O. Basso. 2020. “Mitigating Stress in Industrial Yeasts.” *Fungal Biology* 124(5): 387-97.

- Wang, Boying et al. 2024. "Evaluation of the Probiotic Potential of Yeast Isolated from Kombucha in New Zealand." *Current research in food science* 8.
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/38524400/> (October 29, 2024).
- Wang, Chunxiao, Albert Mas, and Braulio Esteve-Zarzoso. 2015. "Interaction between *Hanseniaspora Uvarum* and *Saccharomyces Cerevisiae* during Alcoholic Fermentation." *International Journal of Food Microbiology* 206: 67-74.
- Wang, Dingkang et al. 2025. "Therapeutic Potential of *Saccharomyces Boulardii* in Alleviating Gastrointestinal Stress through Preservation of Intestinal Cell Membrane Integrity." *BMC Microbiology* 25(1): 1-10.
<https://link.springer.com/articles/10.1186/s12866-025-03984-8> (September 14, 2025).
- Wang, Jun et al. 2024. "Metabolomics and Flavor Diversity in Cabernet Sauvignon Wines Fermented by Various Origins of *Hanseniaspora Uvarum* in the Presence and Absence of *Saccharomyces Cerevisiae*." *LWT* 203: 116396.
- Wimalasena, Tithira T. et al. 2014. "Phenotypic Characterisation of *Saccharomyces* Spp. Yeast for Tolerance to Stresses Encountered during Fermentation of Lignocellulosic Residues to Produce Bioethanol." *Microbial Cell Factories* 13(1): 1-13.
<https://microbialcellfactories.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2859-13-47>
 (June 25, 2025).
- Xu, Ahui et al. 2022. "Use of Non-*Saccharomyces* Yeast Co-Fermentation with *Saccharomyces Cerevisiae* to Improve the Polyphenol and Volatile Aroma Compound Contents in Nanfeng Tangerine Wines." *Journal of Fungi* 8(2): 128.
<https://www.mdpi.com/2309-608X/8/2/128/htm> (May 29, 2025).
- Xu, Zhenbo et al. 2020. "Spoilage Lactic Acid Bacteria in the Brewing Industry." *Journal of Microbiology and Biotechnology* 30(7): 955-61.
<https://www.jmb.or.kr/journal/view.html?doi=10.4014/jmb.1908.08069> (July 25, 2022).
- Yang, Lin et al. 2017. "*Saccharomyces Boulardii* Administration Can Inhibit the Formation of Gastric Lymphoid Follicles Induced by *Helicobacter Suis* Infection." *Pathogens and Disease* 75(1). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28115360/> (April 16, 2021).
- Youn, Hye Young et al. 2022. "Survivability of *Kluyveromyces Marxianus* Isolated From Korean Kefir in a Simulated Gastrointestinal Environment." *Frontiers in Microbiology* 13: 842097. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (May 29, 2025).

Žuntar, Irena, Zvonimir Petric, Danijela Bursac Kovacević, and Predrag Putnik. 2020.
“Safety of Probiotics: Functional Fruit Beverages and Nutraceuticals.” *Foods* 9(7).

9. Publikacje składające się na rozprawę doktorską

Review

Probiotic and Potentially Probiotic Yeasts—Characteristics and Food Application

Adam Staniszewski and Monika Kordowska-Wiater * 

Department of Biotechnology, Microbiology and Human Nutrition, University of Life Sciences in Lublin, Skromna 8, 20-704 Lublin, Poland; adam.staniszewski@up.lublin.pl

* Correspondence: monika.kordowska-wiater@up.lublin.pl; Tel.: +48-814623357

Abstract: Probiotics are live microorganisms which when administered in adequate amounts confer a health benefit on the host. Besides the well-known and tested lactic acid bacteria, yeasts may also be probiotics. The subject of probiotic and potentially probiotic yeasts has been developing and arising potential for new probiotic products with novel properties, which are not offered by bacteria-based probiotics available on the current market. The paper reviews the first probiotic yeast *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*, its characteristics, pro-healthy activities and application in functional food production. This species offers such abilities as improving digestion of certain food ingredients, antimicrobial activities and even therapeutic properties. Besides *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*, on this background, novel yeasts with potentially probiotic features are presented. They have been intensively investigated for the last decade and some species have been observed to possess probiotic characteristics and abilities. There are yeasts from the genera *Debaryomyces*, *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Meyerozyma*, *Torulaspora*, etc. isolated from food and environmental habitats. These potentially probiotic yeasts can be used for production of various fermented foods, enhancing its nutritional and sensory properties. Because of the intensively developing research on probiotic yeasts in the coming years, we can expect many discoveries and possibly even evolution in the segment of probiotics available on the market.

Keywords: probiotics; probiotic yeasts; *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*; potentially probiotic yeasts



Citation: Staniszewski, A.; Kordowska-Wiater, M. Probiotic and Potentially Probiotic Yeasts—Characteristics and Food Application. *Foods* **2021**, *10*, 1306. <https://doi.org/10.3390/foods10061306>

Academic Editor: Andreas Gomez-Zavaglia

Received: 27 April 2021
Accepted: 3 June 2021
Published: 7 June 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

According to the World Health Organization (WHO) and the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), probiotics are “live microorganisms which when administered in adequate amounts confer a health benefit on the host” [1]. Health benefits have been predominantly demonstrated for specific probiotic strains of the bacteria genera *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Bacillus* and *Escherichia* [2], while the only yeast genus that has been proven effective in double-blind studies is *Saccharomyces* [3].

Probiotics are able to grow at 37 °C, survive unfavourable conditions of human digestive track (e.g., digestive enzymes, pancreatic juice and low pH) and contribute to the health of the host environment by regulating microbiota as well as exerting biological functions; some also adhere to gut epithelial cells' mucus [2]. Within the last years, the interest in this subject has increased; PubMed indexes over 31,000 articles that use the term probiotic and over 15,000 have been published within the last five years (Figure 1), but probiotic yeast research is a minor part of this with fewer than 850 articles indexed by PubMed within the last 5 years (Figure 1). The aim of the publication is to review the latest information about probiotic and potentially probiotic yeasts and their application in various kinds of functional food.

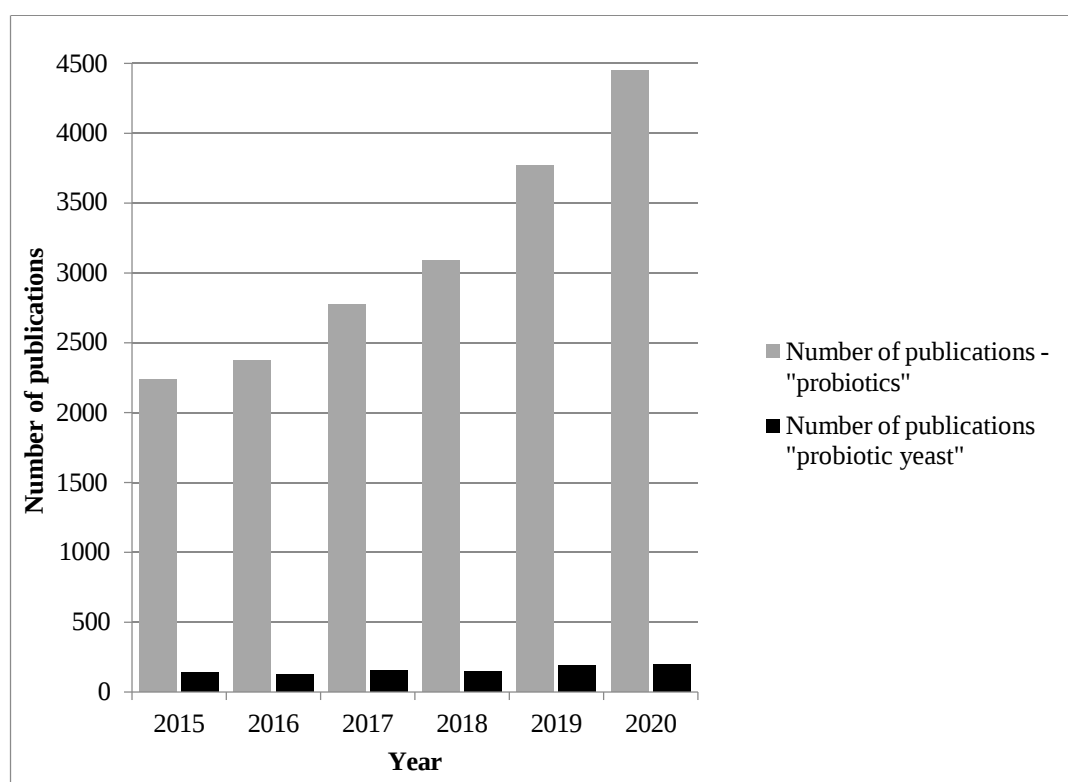


Figure 1. Number of PubMed publications under the terms “probiotics” and “probiotic yeast” in the last 5 years.

2. Properties of Perfect Probiotic Strain

Screening for promising probiotic candidates could be time-consuming and expensive, but certain properties have proven helpful and allow carrying out initial in vitro screening. These properties fall under two groups—functional and technological features. In functional features, we can distinguish four main properties: ability to survive delivery to the target organ, interaction with host systems, antipathogenic properties and safety. Most probiotics are taken orally to reach the intestinal tract (GI tract) as its target organ. Thus, they must survive transit from the mouth to the GI tract. This implies screening potential probiotic strains for resistance to environmental conditions inside the GI track (digestive enzymes, gastric and bile salts, pH and body temperature of host), ability to colonise mucosal surfaces and ability to withstand the gut’s microbiota (auto- and coaggregation capability, surface hydrophobicity and antibiotic resistance) [4]. The selected strain must also be species identified, strain typed and tested by means of safety (strain cannot produce toxins, be pathogenic or have hazardous metabolic activities) and must be able to survive the manufacturing process [5]. Technological features include an ability to easily produce large amounts of biomass, resistance to preservation procedures such as lyophilisation with high shelf life in the finished product, genetic stability and no deterioration of the organoleptic characteristics of final products [6,7].

3. *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*

The history of probiotic yeast dates back to the early 20th century, when Henri Boulard isolated the original strain from fruits in Indochina [8]. Since the 1950s, it has been widely used as a commercially available treatment for diarrhoea worldwide. The taxonomic position of *S. cerevisiae* var. *boulardii* is debatable [9,10], but current literature and Index Fungorum claim *S. cerevisiae* var. *boulardii* to be no more than a variety of *S. cerevisiae*, closely related to the *S. cerevisiae* wine strains [11,12]. *S. cerevisiae* var. *boulardii* was originally described as a separate species—*Saccharomyces boulardii*—but rapid development of molecular phylogenetics in recent years has led to a change in its classification, as has

happened with many yeast species, and it is currently classified as *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*. Despite having some unique properties, it cannot be regarded as a distinct species [13,14]. According to McFarland [10], there are some important differences between *S. cerevisiae* var. *boulardii* and *S. cerevisiae* at the physiological (i.e., lack of ability to use galactose as carbon source and lack of ability to produce ascospores) and molecular levels (i.e., individual chromosome and gene copy numbers). This was confirmed by Edwards-Ingram et al. [13]. The main differences between these microorganisms are presented in Table 1.

Table 1. Differences between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*.

	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i>
Ability to grow at 37 °C	-	+
Usage of galactose as carbon source	+	-
Ability to produce ascospores	+	-
Ability to survive pH 2.5	-	+
Additional copies IX chromosome	-	+
Enhanced ability for pseudohyphal switching	-	+
Ploidy	diploid or haploid	diploid

The results published by Mitterdorfer et al. [14] show that either *Saccharomyces cerevisiae* or *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* amplification product (1170 bp) specific for *S. cerevisiae* could be obtained during species-specific polymerase chain reaction with primers SC1/SC2 [15]. Nevertheless, they showed that distinctive fingerprint patterns for *S. cerevisiae* var. *boulardii* could be produced via RAPD; in addition, restriction profiles of the ITS region with four endonucleases applied (MseI, MspI, ScrFI and TaqI) were identical for all *S. cerevisiae* var. *boulardii* strains and always differed from all of the others.

Edwards-Ingram et al. [16] reported that *S. cerevisiae* var. *boulardii* is a strain of *S. cerevisiae* that has lost most of its Ty1/2 elements, while data obtained by Khatri et al., show the presence of Ty2 elements but absence of Ty1, Ty3 and Ty4 elements [11]. However, how important these distinct properties of *S. cerevisiae* var. *boulardii* are for its probiotic potency is not fully known yet. Comparative transcriptome analysis conducted by Pais et al., presents significant differences in expression levels of various genes between *S. cerevisiae* var. *boulardii* and *S. cerevisiae* under GI-track-like conditions. They also suggested 30 genes which are predicted to be associated with the main probiotic properties of *S. cerevisiae* var. *boulardii* including genes associated with polyamine metabolism, carbon source assimilation and acetate production [17]. The list of genes mentioned by Pais et al., is presented in Table 2. Moreover, there are genes with higher copy number in *S. cerevisiae* var. *boulardii* than in *S. cerevisiae* responsible for protein synthesis (*RPL31A*, *RPL41A*, *RPS24B*, *RPL2B* and *RSA3*) and stress response (*HSP26*, *SSA3*, *SED1*, *HSP42*, *HSP78* and *PBS2*). It is possible that these genes support increased growth rate, pseudo-hyphal switching and higher resistance to high pH. Duplicated and triplicated genes mostly encode stress response proteins, elongation factors, ribosomal proteins, kinases, transporters and fluoride export, which may be helpful in adaptation to stress conditions. *S. cerevisiae* var. *boulardii* is also reported to have several genes with different number of copies related to pseudo-hyphal growth (*CDC42*, *DFG16*, *RGS2*, *CYR1*, *CDC25*, *STE11*, *SKM1* and *RAS1*). The higher maximum number of repetitive sequences within flocculation genes (e.g., *FLO1*), which may affect adhesion and flocculation ability, was also identified in *S. cerevisiae* var. *boulardii* [17].

Table 2. Genes predicted to be associated with the main probiotic properties of *S. cerevisiae* var. *boulardii* (data acc. to Pais et al. [17]).

Poliamine Metabolism	Carbon Source Assimilation	Acetate Production
AGP2	CYC8	ACS2
ARG7	GAL1	ADH1
CAR2	GAL7	ALD4
PTK1	IMA1	ALD5
TPO1	MIG1	CIT3
TPO2	PGM1	IDP3
TPO4	SUC2	LSC2
	TUP1	MAE1
		MDH3
		MLS1
		PDC6
		SDH2
		SDH5
		SHH3
		SHH4

Multiple mechanisms (modulation of normal microbiome of the gut, antagonism against pathogens, adhesion to the mucus, immune modulation and trophic effects on GI tract) have been proposed for the probiotic action of *S. cerevisiae* var. *boulardii* [18,19]. *S. cerevisiae* var. *boulardii* helps to restore the normal microbiota of the gut in patients after antibiotic therapy or surgery and may temporarily work as a replacement of the natural microbiome until it is re-established. Among various modes of antimicrobial activity, there are secretion of special proteins that cleave microbial toxins (i.e., cholera toxin) or reduce cAMP levels responsible for diarrhoea and the ability to inhibit *Escherichia coli* surface endotoxins by dephosphorylation. Other mechanisms include stimulation of immunoglobulin A production against *Clostridium difficile* toxin A, degradation of the toxin by a secreted protease [20–22] and modulation of cytokine production [23]. *S. cerevisiae* var. *boulardii* could preserve enterocyte barrier integrity by stimulating tight junction protein secretion and could reduce or exclude pathogens from interaction with intestinal epithelial cells by binding directly to the pathogen cells via mannose residues in the yeast cell wall [20]. Secretion of antimicrobial compounds in the form of peptides, hydrogen peroxide and organic acids features prominently among the generally accepted action mechanisms of bacterial probiotics, but none of the direct inhibitory actions on bacterial growth or antimicrobial compound secretion by this species has been reported [24]. Trophic effects postulated for *S. cerevisiae* var. *boulardii* are also a very interesting subject. Among the effects, it is especially worth highlighting such effects as stimulation of brush border membrane; secretion of digestive enzymes, e.g., sucrase-iso-maltase, maltase-glucoamylase, lactase-phlorizin hydrolase, alanine aminopeptidase, alkaline phosphatase and nutrient transporters (sodium-glucose transport proteins), which may be induced by polyamines; and modulation of short- and branched-chain fatty acids synthesis, which play various roles in the physiological and biochemical functions in different tissues (intestine, liver, adipose, muscle and brain) [19].

Several studies have been conducted using *S. cerevisiae* var. *boulardii* in the treatment of gastrointestinal diseases such as foodborne and traveller's diarrhoeas; Crohn's and inflammatory bowel disease; irritable bowel syndrome; adults and children's acute gastroenteritis; and HIV-infected chronic diarrhoea caused by *Clostridium difficile*, *Vibrio cholerae* and other pathogenic enterobacteria. In addition, research conducted by Profir et al., shows significant reduction in the intensity of toxocariasis [3,25–28]. Additionally, probiotic yeasts have been used to reduce side effects of treatments against *Helicobacter pylori* [28,29]. The efficiency of probiotic yeasts has been documented in several clinical studies [3,30–34]. Das et al., showed in a randomised clinical trial that the dose of 250 mg twice a day for children under 5 years old significantly shortened the diarrheal duration and duration of hospitalisation

without any adverse events, but it had no effect on the duration of fever or vomiting in acute rotavirus diarrhoea in children [33]. Feizizadeh et al., based on a meta-analysis of 22 randomised control trials, concluded that *S. cerevisiae* var. *boulardii* might be effective in treating acute childhood diarrhoea regardless of its causes and can significantly decrease stool frequency and the risk ratio of diarrhoea in children. The studies included in the meta-analysis did not show any major side effects related to *S. cerevisiae* var. *boulardii*, but these trials were carried out on previously healthy children, excluding malnutrition and immunodeficient patients [31]. For those groups, data are limited, but some case studies occur. Thygesen et al., described a case report of 79-year-old woman who developed *S. cerevisiae* var. *boulardii* fungemia (SCF) after bowel resection [35]. Kara et al., described two cases of SCF after probiotic treatment of intensive care unit patients [36]. Ellouze et al., reported cases of septic shock after *S. cerevisiae* var. *boulardii* treatment [37]. SCF has also been reported in patients with *Clostridium difficile*-associated diarrhoea who have been treated orally with *S. cerevisiae* var. *boulardii* in association with antibiotic treatment [38]. However, most cases concern severely ill or immunocompromised patients.

4. Novel Strains of Yeast with Probiotic Potential

Within the last years, interest in the subject of novel yeast with potentially probiotic properties has been increasing. Novel isolates have been isolated from diverse products and environments such as fruit and vegetables, fermented food and beverages, industrial dairy wastes, etc. Novel isolates must have all properties required for probiotics strain, fulfil safety requirements and have good manufacturing properties. Isolation of various species from numerous environments allows discovering new probiotic strains with innovative biochemical properties, for example the ability to extracellularly secrete lactase which may confer the additional ability to digest whey used as food additive in animal feed. Recent studies report evidence that in addition to *S. cerevisiae* var. *boulardii* other species have probiotic properties, e.g., *Kluyveromyces marxianus* and *Pichia kudriavzevii*. The European Food Safety Authority (EFSA) has granted the QPS status (qualified presumption of safety) to only a few yeasts which might be used as “food additive”, i.e., *K. marxianus* var. *lactis* and *K. marxianus* var. *fragilis* [39]. Several studies conducted on non-*Saccharomyces* yeasts demonstrated the presence of probiotic potential. Ochangco et al., investigated *Debaryomyces hansenii* strains obtained from cheese and fish guts. During the research, they selected strain DI 02 as the best probiotic candidate because of its outstanding ability to survive the GI stresses, adhere to Caco-2 cells and mucin and induce higher anti-inflammatory response than *S. cerevisiae* var. *boulardii* (the authors used the anti-inflammatory cytokine IL-10 to pro-inflammatory cytokine IL-12 ratio as an indicator of anti-inflammatory properties). The other strain, DI 09, adhered more strongly to Caco-2 cells and mucin. Two strains (DI 10 and DI 15) induced a higher IL-10/IL-12 ratio than the *S. cerevisiae* var. *boulardii* strains, indicating higher anti-inflammatory effects on human dendritic cells [40]. The results obtained by Oliveira et al., suggest that some yeasts isolated from fermented table olives such as *Pichia guilliermondii* 25A and *Candida norvegica* 7A have probiotic potential because of their resistance to the simulated digestive track's conditions on a similar level as *S. cerevisiae* var. *boulardii*, the reference strain used in the research [41]. Gil-Rodrigues et al., analysed 130 yeast strains from a culture collection and observed that two strains of *Schizosaccharomyces pombe* (IFI-936 and IFI-2180) display a high capacity to thrive in the host intestine (good growth at 37 °C, good tolerance to GI tract conditions and high autoaggregation percentage) and a high antioxidant activity [42]. From the 108 identified yeasts strains of various origin, Rodríguez et al., showed that two yeasts, *Hanseniaspora osmophila* and *P. kudriavzevii*, were the most promising strains on the basis of statistical analyses applied in each step of selection [43]. All scientists highlight that future studies are needed for the final selection including the GRASS character of the selected strains. Table 3 presents a summary of the data on the novel strains described and their sources of origin.

Table 3. Novel potentially probiotic strains of yeast.

Species	Strain	Origin	References
<i>Candida orthopsilosis</i>	CCMA 1748	Naturally fermented table olives, Brazil	[44]
<i>Candida tropicalis</i>	CCMA 1751	Naturally fermented table olives, Brazil	[44]
<i>Debaryomyces hansenii</i>	CCMA 1761 DI02	Naturally fermented table olives, Brazil Dairy isolate, Denmark	[44] [40]
<i>Hanseniaspora osmophila</i>	1056, 1094	Food environment, YBL of the UCLM, Spain	[45]
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	B0399	Whey, BCCM (accession number MUCL 41579)	[46]
<i>Lachancea thermotolerans</i>	B13	Moss on oak, Italy	[47]
<i>Meyerozyma caribbica</i>	9D CCMA 1758	Pineapple, Brazil Naturally fermented table olives, Brazil	[48] [44]
<i>Metschnikowia ziziphicola</i>	B27	Beech tree bark, Italy	[47]
<i>Pichia fermentans</i>	BY5	Raw milk, China	[49]
<i>Pichia guilliermondii</i>	CCMA 1753	Naturally fermented table olives, Brazil	[44]
<i>Pichia kudriavzevii</i>	BY10, BY 15	Raw milk, China	[49]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3, 146 U, I, O, TUC, LCV	Food environment, YBL of the UCLM, Spain	[45]
		Verdicchio wine, Italy	[47]
	AKP1	Haria (traditional Indian food), India	[50]
	CCMA 1746	Naturally fermented table olives, Brazil	[44]
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	35, 1.1t2, 7.3t2, c7.4, j401, tdvcsff	Sugar cane juice, Cameroon	[47]
<i>Yarrowia lipolytica</i>	HY4	Raw milk, China	[49]

Abbreviations: YBL of the UCLM, Culture Collection of the Yeast Biotechnology Laboratory of the University of Castilla-La Mancha; BCCM, Belgian Coordinated Collection of Microorganisms.

5. Probiotic and Potentially Probiotic Yeasts in the Aspect of Functional Food

The term “functional food” is usually used as a marketing term with various definition and it is not recognised by law globally. The exception is Japan, where the law treats functional foods as a separate food category. According to the International Food Information Council (IFIC), functional foods are “foods or dietary components that may provide health benefit beyond basic nutrition” [51,52].

Probiotics due their properties beneficially affect various physiologic functions, which allow them to be classified as functional foods [53]. In the last years, various studies including the use of probiotic and potentially probiotic yeasts in food have been published. Senkarcinova et al., showed the possibility of using a probiotic strain of *S. cerevisiae* var. *boulardii* in production of low-alcohol and alcohol-free beer [54]. The data published by Ramirez-Cota et al., also suggest the ability of the species to survive ethanol concentration occurring in the most popular craft beer styles; thus, it is potentially possible to create probiotic-fortified beer [55]. Mulero-Cerezo et al., reported that “*Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* as a single yeast starter produces craft beer with higher antioxidant activity, lower alcohol content, similar sensory attributes and higher yeast viability after 45 days than that produced by a commercial *Saccharomyces cerevisiae* strain commonly used in the brewery industry” [56]. The results published by de Paula et al., also show that functional beer containing *S. cerevisiae* var. *boulardii* after storage and in vitro GI transit had a population of living cells above the minimal dose prescribed for health benefit [57].

Probiotic yeast could be used not only for beverages, but various other products as well. Swieca et al., suggested the use of *S. cerevisiae* var. *boulardii* as a food additive to enrich bean sprouts and use them as a carrier for probiotics. This additive did not affect any properties of the sprouts, and the yeast significantly improved microbiological quality of the final products [58]. Sarwar et al., developed symbiotic yogurt with *S. cerevisiae* var. *boulardii* and inulin. The combination of yeast and inulin increased amount of favourable volatile

compounds and improved product texture in comparison to plain, control yogurt [59]. Yeasts and lactic acid bacteria (LAB) are often isolated together from various spontaneously fermented foods [60–68]. Karaolis et al., investigated the potential application of *S. cerevisiae* var. *boulardii* as a probiotic in goat's yoghurt with lactic acid bacteria starter cultures. The authors indicated that *S. cerevisiae* var. *boulardii* promoted the growth of LAB, and its concentration was steady during the whole storage period [69]. Similar mutually stimulating interactions between *S. cerevisiae* and LAB occur in sourdough fermentation [70]. Xu et al., described interaction between *Lactobacillus* and *Saccharomyces cerevisiae*. The interaction is complex and dependent on the composition and production process of fermented foods. Usually, the relationship between LAB and yeast is mutualistic for both groups of microorganisms; however, this does not always mean a positive effect on the final product. For example, malolactic fermentation carried out by *Lactobacillus* in wine and beer might be desirable and beneficial in some types of beverages such as sour beers, but, in most cases, acidification is seen as a product defect, often caused by contamination during production process [71–73]. *S. cerevisiae* secretes several growth factor such as carbon dioxide and amino acids which encourage *Lactobacillus* growth; the release of carbon dioxide provides a local micro-anaerobic environment preferred by *Lactobacillus* spp. [74]. The yeasts also secrete amino acids such as threonine, glutamine, alanine, glutamate, serine and glycine, promoting the growth of LAB and allowing LAB to grow in environments which otherwise would not be possible [75]. In fermented milk products, *Lactobacillus* decomposes lactose (the main sugar in milk foods, which *S. cerevisiae* cannot metabolise) into galactose, providing carbon sources for yeasts. Next to galactose, lactic acid produced by LAB might also be used as a carbon source under aerobic condition, while the assimilation of the lactic acid under this condition might stimulate specific species of *Lactobacillus* to produce higher amounts of kefiran—a food-derived biopolymer with potential for use within food and biomedical applications [68,70,76–79]. Moreover, probiotic and potentially probiotic yeast can be used in fermentation of grain products. The consumption of whole, multigrain grain products has many advantages, but whole grain products present many antinutrients. Banik et al., reported the ability to use probiotic *S. cerevisiae* APK1 starter cultures as biofortification of multigrain substrates used as a base in traditional Indian dishes. The fermented product showed significant improvement in the increment of protein, fibre and starch content and decreasing the level of antinutrients. Furthermore, during fermentation, antioxidant potential and the level of total phenolic and total flavonoid contents increased [80]. Besides, probiotic *Saccharomyces* has an interesting beneficial effect on the nutritional value of foods of plant origin since it synthesises folates and eliminates phytates and other antinutrients. Enzymes—phytases produced by this yeast—enhance the bioavailability and absorption of essential minerals such as iron, zinc, magnesium and phosphorus [81]. Another advantage of *S. cerevisiae* var. *boulardii* may be its antimicrobial properties and ability to decompose mycotoxins such as aflatoxins, patulin, ochratoxin A and others [82,83]. Naimah et al., reported that antimicrobial peptides isolated from *S. cerevisiae* var. *boulardii* inhibit growth of *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* [84]. Goktas et al., also reported antimicrobial activity against *Salmonella* Typhimurium, *Yersinia enterocolitica*, *Candida albicans*, *Alternaria alternata* and *Aspergillus flavus* in strains of *S. cerevisiae* var. *boulardii* isolated from commercial food supplements [85].

Besides *S. cerevisiae* var. *boulardii* usage in production of novel functional products, the probiotic strain *Pichia kudriavzevii* OG23 was used by Ogunremi et al., to produce fermented, cereal-based food. They reported increased antioxidant activity and a variety of flavour compounds. They also suggested the ability to use cereal-based products as delivery vehicle for probiotics [86]. Amorim et al., compared *S. cerevisiae* var. *boulardii* and *Meyerozyma caribbica* for pineapple beverage production and the beverage properties. The results reveal that two strains of *M. caribbica*, isolated from pineapple's skin, showed desirable in vitro probiotic properties similar to the reference probiotic strain *S. cerevisiae* var. *boulardii*. Strain 9D of *M. caribbica* was selected to be used in a fermentation study. The obtained beverage

had high antioxidant activity, and the data show that the antioxidant activity was not affected by the fermentation process. The beverage produced with 9D strain also had good sensorial characteristics and was well accepted by consumers, compared to the beverage obtained by fermentation with *S. cerevisiae* var. *boulardii* [48]. Table 4 shows examples of novel probiotic and potentially probiotic strains for potential application in food.

Table 4. Novel probiotic and potentially probiotic strains of yeast for potential application in food.

Strains	Product	Added Value ¹	References
<i>Pichia fermentans</i> BY5	-	Cholesterol reduction	[49]
<i>Pichia kudriavzevii</i> BY10	-	Cholesterol reduction	[49]
<i>Pichia kudriavzevii</i> BY15	-	Cholesterol reduction	
<i>Meyerozyma caribbica</i> 9D	Fermented pineapple beverage	Better sensory properties with lower ethanol content	[48]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i> CNCM I-745	Craft beer	Possibility to produce functional beer with high ethanol concentration	[55]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i> (strain from Biopron Forte)	Low-alcohol and alcohol-free beer	Production of alcohol-free and low-alcohol products	[54]
<i>Yarrowia lipolytica</i> HY4	-	Cholesterol reduction	[49]

¹ An aspect in which the use of the strain shown can bring innovative properties to the product or improve its properties.

6. Maintaining the Viability of Probiotic Yeasts in Food

A minimum dose of 10^6 colony forming units per millilitre or gram (CFU/mL or CFU/g) must be reached for the food product to be labelled as probiotic [87]. As viability of microorganism is the key to achieve the health benefits, some researches even suggest increasing the dose up to 10^7 CFU/mL or CFU/g [88–90]. There are several ways to accomplish the goal which depends on environmental conditions in final product and its interaction with the probiotic strain. The food matrix's chemical composition and its physical state affect and can interrupt growth, stability and survival of probiotic microorganisms during product storage and GI transition [91]. From the technological point of view, it is favourable if microbial cultures are capable of growing in substrate media, survive during processing and maintain their viability throughout the storage. If the product's matrix provides this condition, the dosage of probiotic microorganism during production can be reduced due to self-propagation of the microorganism [92]. Otherwise, if the environmental condition within the matrix does not allow proliferation of the probiotic strain, experimental dose determination is required, or usage of other methods which will increase strain survivability might be necessary [92]. The most commonly used methods of protective strategies are encapsulation (cells are closed in protective shells made of food grade polymers such as chitosan, gelatine or alginate [90,93]), addition of protective agents (i.e., cryoprotectants and osmoprotectants) and usage of miscellaneous carriers [94–97]. Microencapsulation of *S. cerevisiae* var. *boulardii* has been reported many times. These yeast's cells were entrapped in sodium alginate beads to protect them from adverse conditions [98–100]. Scientists confirmed that microencapsulation assured yeast survival and its controlled release. The encapsulation of *S. cerevisiae* var. *boulardii* with a mixture of alginate, inulin and mucilage was also used to design new functional products such as cheeses and yogurts, and it increased the viability of yeast and extended the full benefits of the product compared with the product supplemented with free or non-encapsulated cells [101]. Arslan et al., (2015) found that the use of gelatin and arabic gum for *S. cerevisiae* var. *boulardii* microencapsulation at higher temperatures resulted in yeast with higher resistance to simulated gastric processes.

Bevilaqua et al., (2020) investigated the effect of microencapsulation into alginate gels on the functional properties of probiotic yeasts and confirmed that yeasts in beads did not

affect such properties as hydrophobicity, autoaggregation and biofilm formation. On the other hand, encapsulation affected protection of the cells against simulated GI conditions. Finally, the kinetic study showed that alginate beads may be useful as reusable carriers of starter cultures or probiotics into the gut [100].

7. Conclusions

Research on probiotics has been dynamically developing in recent years, including the use of probiotic yeasts, which has been minimised thus far, and is gaining more and more interest. The latest research shows the wide potential of the use of probiotic yeast in the food industry and the use of their unique properties thus far not found in probiotic bacteria. The most known probiotic yeast, *S. cerevisiae* var. *boulardii*, has been investigated in detail, and many of its characteristics concerning beneficial effects on human health and the positive or negative influence on food matrices have been reported. Besides *S. cerevisiae* var. *boulardii*, there are other yeasts with potential probiotic activity, but they need to be investigated because the information about them is very scarce. These yeasts (from genera *Pichia*, *Hanseniaspora*, *Torulaspora*, *Metchnikowia*, etc.), which are isolated from food and non-food habitats, are the objects of intensive studies nowadays, and there is a real chance to introduce them into various kinds of food not only for fermentation processes but also for supplementation as valuable nutrients with health benefits. The coming years will bring more information and possibly also a wider use of probiotic yeast in food.

Author Contributions: Conceptualisation, A.S. and M.K.-W.; writing—original draft preparation, A.S.; writing—review and editing, A.S. and M.K.-W.; visualisation, A.S.; and supervision, M.K.-W. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Acknowledgments: We would like to thank Katarzyna Grunt for the help in the manuscript preparation.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Hill, C.; Guarner, F.; Reid, G.; Gibson, G.R.; Merenstein, D.J.; Pot, B.; Morelli, L.; Canani, R.B.; Flint, H.J.; Salminen, S.; et al. Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2014**, *11*, 506–514. [CrossRef] [PubMed]
- Fijan, S. Microorganisms with claimed probiotic properties: An overview of recent literature. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2014**, *11*, 4745–4767. [CrossRef]
- Czerucka, D.; Piche, T.; Rampal, P. Review article: Yeast as probiotics—*Saccharomyces boulardii*. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2007**, *26*, 767–778. [CrossRef] [PubMed]
- McFarland, L.V. From yaks to yogurt: The history, development, and current use of probiotics. *Clin. Infect. Dis.* **2015**, *60*, S85–S90. [CrossRef]
- Žuntar, I.; Petric, Z.; Kovacević, D.B.; Putnik, P. Safety of probiotics: Functional fruit beverages and nutraceuticals. *Foods* **2020**, *9*, 947. [CrossRef] [PubMed]
- Libudzisz, Z. Probiotics and prebiotics in fermented milks. *Pediatr. Współczesna* **2002**, *4*, 19–25.
- Jach, M.; Los, R.; Maj, M.; Malm, A. Probiotyki—Aspekty funkcjonalne i technologiczne. *Postępy Mikrobiol.* **2013**, *52*, 161–170.
- McFarland, L.V. Systematic review and meta-analysis of *saccharomyces boulardii* in adult patients. *World J. Gastroenterol.* **2010**, *16*, 2202–2222. [CrossRef]
- Altmann, M. The Benefits of *Saccharomyces boulardii*. In *The Yeast Role in Medical Applications*; InTech: London, UK, 2017.
- McFarland, L.V. *Saccharomyces boulardii* is not *Saccharomyces cerevisiae*. *Clin. Infect. Dis.* **1996**, *22*, 200–201. [CrossRef]
- Khatri, I.; Tomar, R.; Ganesan, K.; Prasad, G.S.; Subramanian, S. Complete genome sequence and comparative genomics of the probiotic yeast *Saccharomyces boulardii*. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1–12. [CrossRef]
- Index Fungorum-Names Record. Available online: <http://www.indexfungorum.org/Names/NamesRecord.asp?RecordID=456480> (accessed on 17 May 2021).
- Edwards-Ingram, L.; Gitsham, P.; Burton, N.; Warhurst, G.; Clarke, I.; Hoyle, D.; Oliver, S.G.; Stateva, L. Genotypic and physiological characterization of *Saccharomyces boulardii*, the probiotic strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73*, 2458–2467. [CrossRef] [PubMed]

14. Mitterdorfer, G.; Mayer, H.K.; Kneifel, W.; Viernstein, H. Clustering of *Saccharomyces boulardii* strains within the species *S. cerevisiae* using molecular typing techniques. *J. Appl. Microbiol.* **2002**, *93*, 521–530. [\[CrossRef\]](#)
15. Josepa, S.; Guillamon, J.M.; Cano, J. PCR differentiation of *Saccharomyces cerevisiae* from *Saccharomyces bayanus*/*Saccharomyces pastorianus* using specific primers. *FEMS Microbiol. Lett.* **2000**, *193*, 255–259. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
16. Edwards-Ingram, L.C.; Gent, M.E.; Hoyle, D.C.; Hayes, A.; Stateva, L.I.; Oliver, S.G. Comparative genomic hybridization provides new insights into the molecular taxonomy of the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Genome Res.* **2004**, *14*, 1043–1051. [\[CrossRef\]](#)
17. Pais, P.; Oliveira, J.; Almeida, V.; Yilmaz, M.; Monteiro, P.T.; Teixeira, M.C. Transcriptome-wide differences between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*: Clues on host survival and probiotic activity based on promoter sequence variability. *Genomics* **2021**, *113*, 530–539. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
18. Kelesidis, T.; Pothoulakis, C. Efficacy and safety of the probiotic *Saccharomyces boulardii* for the prevention and therapy of gastrointestinal disorders. *Ther. Adv. Gastroenterol.* **2012**, *5*, 111–125. [\[CrossRef\]](#)
19. Pais, P.; Almeida, V.; Yilmaz, M.; Teixeira, M.C. *Saccharomyces boulardii*: What makes it tick as successful probiotic? *J. Fungi* **2020**, *6*, 78. [\[CrossRef\]](#)
20. Pothoulakis, C.; Kelly, C.P.; Joshi, M.A.; Gao, N.; O’Keane, C.J.; Castagliuolo, I.; Lamont, J.T. *Saccharomyces boulardii* inhibits *Clostridium difficile* toxin A binding and enterotoxigenicity in rat ileum. *Gastroenterology* **1993**, *104*, 1108–1115. [\[CrossRef\]](#)
21. Castagliuolo, I.; Thomas Lamont, J.; Nikulasson, S.T.; Pothoulakis, C. *Saccharomyces boulardii* protease inhibits *Clostridium difficile* toxin A effects in the rat ileum. *Infect. Immun.* **1996**, *64*, 5225–5232. [\[CrossRef\]](#)
22. Qamar, A.; Aboudola, S.; Warny, M.; Michetti, P.; Pothoulakis, C.; LaMont, J.T.; Kelly, C.P. *Saccharomyces boulardii* stimulates intestinal immunoglobulin a immune response to *Clostridium difficile* toxin A in mice. *Infect. Immun.* **2001**, *69*, 2762–2765. [\[CrossRef\]](#)
23. Dalmasso, G.; Cottrez, F.; Imbert, V.; Lagadec, P.; Peyron, J.F.; Rampal, P.; Czerucka, D.; Groux, H. *Saccharomyces boulardii* Inhibits Inflammatory Bowel Disease by Trapping T Cells in Mesenteric Lymph Nodes. *Gastroenterology* **2006**, *131*, 1812–1825. [\[CrossRef\]](#)
24. Offei, B.; Vandecruys, P.; De Graeve, S.; Foulquié-Moreno, M.R.; Thevelein, J.M. Unique genetic basis of the distinct antibiotic potency of high acetic acid production in the probiotic yeast *Saccharomyces cerevisiae* var. *Boulardii*. *Genome Res.* **2019**, *29*, 1478–1494. [\[CrossRef\]](#)
25. Ryan, E.P.; Heuberger, A.L.; Weir, T.L.; Barnett, B.; Broeckling, C.D.; Prenni, J.E. Rice bran fermented with *Saccharomyces boulardii* generates novel metabolite profiles with bioactivity. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 1862–1870. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Łukaszewicz, M. *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*—Probiotic Yeast. In *Probiotics*; InTech: London, UK, 2012.
27. Cassanego, D.B.; Richards, N.; Mazutti, M.; Ramírez-Castrillón, M. Yeasts: Diversity in Kefir, Probiotic Potential and Possible Use in Ice Cream. *Ciencia e Natura* **2015**, *37*, 175–186. [\[CrossRef\]](#)
28. Profir, A.-G.; Buruiana, C.-T.; Vizireanu, C. Effects of *S. cerevisiae* var. *Boulardii* in Gastrointestinal Disorders. *J. Agroaliment. Process. Technol.* **2015**, *21*, 148–155.
29. Yang, L.; Tian, Z.B.; Yu, Y.N.; Zhang, C.P.; Li, X.Y.; Mao, T.; Jing, X.; Zhao, W.J.; Ding, X.L.; Yang, R.M.; et al. *Saccharomyces boulardii* administration can inhibit the formation of gastric lymphoid follicles induced by *Helicobacter suis* infection. *Pathog. Dis.* **2017**, *75*. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
30. Hatoum, R.; Labrie, S.; Fliss, I. Antimicrobial and probiotic properties of yeasts: From fundamental to novel applications. *Front. Microbiol.* **2012**, *3*, 421. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
31. Feizizadeh, S.; Salehi-Abargouei, A.; Akbari, V. Efficacy and safety of *Saccharomyces boulardii* for acute diarrhea. *Pediatrics* **2014**, *134*, e176–e191. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
32. Consoli, M.L.D.; Da Silva, R.S.; Nicoli, J.R.; Brūña-Romero, O.; Da Silva, R.G.; De Vasconcelos Generoso, S.; Correia, M.I.T.D. Randomized Clinical Trial: Impact of Oral Administration of *Saccharomyces boulardii* on Gene Expression of Intestinal Cytokines in Patients Undergoing Colon Resection. *J. Parenter. Enter. Nutr.* **2016**, *40*, 1114–1121. [\[CrossRef\]](#)
33. Das, S.; Gupta, P.K.; Das, R.R. Efficacy and safety of *saccharomyces boulardii* in acute rotavirus diarrhea: Double blind randomized controlled trial from a developing country. *J. Trop. Pediatr.* **2016**, *62*, 464–470. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Lazo-Vélez, M.A.; Serna-Saldívar, S.O.; Rosales-Medina, M.F.; Tinoco-Alvear, M.; Briones-García, M. Application of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* in food processing: A review. *J. Appl. Microbiol.* **2018**, *125*, 943–951. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Thygesen, J.B.; Glerup, H.; Tarp, B. *Saccharomyces boulardii* fungemia caused by treatment with a probioticum. *BMJ Case Rep.* **2012**, *2012*. [\[CrossRef\]](#)
36. Kara, I.; Yildirim, F.; Özgen, Ö.; Erganis, S.; Aydog̃ du, M.; Dizbay, M.; Gürsel, G.; Kalkanci, A. *Saccharomyces cerevisiae* fungemia after probiotic treatment in an intensive care unit patient. *J. Mycol. Med.* **2018**, *28*, 218–221. [\[CrossRef\]](#)
37. Ellouze, O.; Berthoud, V.; Mervant, M.; Parthiot, J.P.; Girard, C. Septic shock due to *Saccharomyces boulardii*. *Med. Mal. Infect.* **2016**, *46*, 104–105. [\[CrossRef\]](#)
38. Santino, I.; Alari, A.; Bono, S.; Teti, E.; Marangi, M.; Bernardini, A.; Magrini, L.; Di Somma, S.; Teggi, A. *Saccharomyces cerevisiae* fungemia, a possible consequence of the treatment of *Clostridium difficile* colitis with a probioticum. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* **2014**, *27*, 143–146. [\[CrossRef\]](#)
39. Arévalo-Villena, M.; Fernandez-Pacheco, P.; Castillo, N.; Bevilacqua, A.; Briones Pérez, A. Probiotic capability in yeasts: Set-up of a screening method. *LWT* **2018**, *89*, 657–665. [\[CrossRef\]](#)

40. Ochangco, H.S.; Gamero, A.; Smith, I.M.; Christensen, J.E.; Jespersen, L.; Arneborg, N. In vitro investigation of *Debaryomyces hansenii* strains for potential probiotic properties. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2016**, *32*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Oliveira, T.; Ramalhosa, E.; Nunes, L.; Pereira, J.A.; Colla, E.; Pereira, E.L. Probiotic potential of indigenous yeasts isolated during the fermentation of table olives from Northeast of Portugal. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2017**, *44*, 167–172. [[CrossRef](#)]
42. Gil-Rodríguez, A.M.; Carrascosa, A.V.; Requena, T. Yeasts in foods and beverages: In vitro characterisation of probiotic traits. *LWT Food Sci. Technol.* **2015**, *64*, 1156–1162. [[CrossRef](#)]
43. Fernandez-Pacheco Rodríguez, P.; Arévalo-Villena, M.; Rosa, I.Z.; Briones Pérez, A. Selection of potential non-Sacharomyces probiotic yeasts from food origin by a step-by-step approach. *Food Res. Int.* **2018**, *112*, 143–151. [[CrossRef](#)]
44. Aparecida Simões, L.; Cristina de Souza, A.; Ferreira, I.; Sousa Melo, D.; Angélica Andrade Lopes, L.; Magnani, M.; Freitas Schwan, R.; Ribeiro Dias, D. Probiotic properties of yeasts isolated from Brazilian fermented table olives. *J. Appl. Microbiol.* **2021**. [[CrossRef](#)]
45. Fernández-Pacheco, P.; Cueva, C.; Arévalo-Villena, M.; Moreno-Arribas, M.V.; Briones Pérez, A. *Saccharomyces cerevisiae* and *Hanseniaspora osmophila* strains as yeast active cultures for potential probiotic applications. *Food Funct.* **2019**, *10*, 4924–4931. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Maccaferri, S.; Klinder, A.; Brigidi, P.; Cavina, P.; Costabile, A. Potential probiotic *Kluyveromyces marxianus* B0399 modulates the immune response in Caco-2 cells and peripheral blood mononuclear cells and impacts the human gut microbiota in an in vitro colonic model system. *Appl. Environ. Microbiol.* **2012**, *78*, 956–964. [[CrossRef](#)]
47. Agarbati, A.; Canonico, L.; Marini, E.; Zannini, E.; Ciani, M.; Comitini, F. Potential probiotic yeasts sourced from natural environmental and spontaneous processed foods. *Foods* **2020**, *9*, 287. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Amorim, J.C.; Piccoli, R.H.; Duarte, W.F. Probiotic potential of yeasts isolated from pineapple and their use in the elaboration of potentially functional fermented beverages. *Food Res. Int.* **2018**, *107*, 518–527. [[CrossRef](#)]
49. Chen, L.S.; Ma, Y.; Maubois, J.L.; He, S.H.; Chen, L.J.; Li, H.M. Screening for the potential probiotic yeast strains from raw milk to assimilate cholesterol. *Dairy Sci. Technol.* **2010**, *90*, 537–548. [[CrossRef](#)]
50. Banik, A.; Mondal, J.; Rakshit, S.; Ghosh, K.; Sha, S.P.; Halder, S.K.; Ghosh, C.; Mondal, K.C. Amelioration of cold-induced gastric injury by a yeast probiotic isolated from traditional fermented foods. *J. Funct. Foods* **2019**, *59*, 164–173. [[CrossRef](#)]
51. Henry, C.J. Functional foods. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2010**, *64*, 657–659. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Ifland, J.R.; Preuss, H.G.; Marcus, M.T.; Rourke, K.M.; Taylor, W.C.; Wright, H.T.; Sheppard, K.K. Functional foods in the treatment of processed food addiction and the metabolic syndrome. In *Nutraceuticals and Functional Foods in Human Health and Disease Prevention*; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2015; pp. 43–60, ISBN 9781482237221.
53. Roberfroid, M.B. Prebiotics and probiotics: Are they functional foods? *Am. J. Clin. Nutr.* **2000**, *71*, 1682S–1687S. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Senkarcinova, B.; Graça Dias, I.A.; Nespor, J.; Branyik, T. Probiotic alcohol-free beer made with *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*. *LWT* **2019**, *100*, 362–367. [[CrossRef](#)]
55. Ramírez-Cota, G.Y.; López-Villegas, E.O.; Jiménez-Aparicio, A.R.; Hernández-Sánchez, H. Modeling the Ethanol Tolerance of the Probiotic Yeast *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* CNCM I-745 for its Possible Use in a Functional Beer. *Probiotics Antimicrob. Proteins* **2021**, *13*, 187–194. [[CrossRef](#)]
56. Mulero-Cerezo, J.; Briz-Redón, Á.; Serrano-Aroca, Á. *Saccharomyces Cerevisiae* Var. *Boulardii*: Valuable Probiotic Starter for Craft Beer Production. *Appl. Sci.* **2019**, *9*, 3250. [[CrossRef](#)]
57. Pereira de Paula, B.; de Souza Lago, H.; Firmino, L.; Fernandes Lemos Júnior, W.J.; Ferreira Dutra Corrêa, M.; Fioravante Guerra, A.; Signori Pereira, K.; Zarur Coelho, M.A. Technological features of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* for potential probiotic wheat beer development. *LWT* **2021**, *135*, 110233. [[CrossRef](#)]
58. Swieca, M.; Kordowska-Wiater, M.; Pytko, M.; Gawlik-Dziki, U.; Seczyk, L.; Złotek, U.; Kapusta, I. Nutritional and pro-health quality of lentil and adzuki bean sprouts enriched with probiotic yeast *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*. *LWT* **2019**, *100*, 220–226. [[CrossRef](#)]
59. Sarwar, A.; Aziz, T.; Al-Dalali, S.; Zhao, X.; Zhang, J.; Ud Din, J.; Chen, C.; Cao, Y.; Yang, Z. Physicochemical and microbiological properties of synbiotic yogurt made with probiotic yeast *saccharomyces boulardii* in combination with inulin. *Foods* **2019**, *8*, 468. [[CrossRef](#)]
60. Gulitz, A.; Stadie, J.; Wenning, M.; Ehrmann, M.A.; Vogel, R.F. The microbial diversity of water kefir. *Int. J. Food Microbiol.* **2011**, *151*, 284–288. [[CrossRef](#)]
61. Laureys, D.; De Vuyst, L. Microbial species diversity, community dynamics, and metabolite kinetics of water Kefir fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* **2014**, *80*, 2564–2572. [[CrossRef](#)]
62. Garofalo, C.; Osimani, A.; Milanovic, V.; Taccari, M.; Aquilanti, L.; Clementi, F. The occurrence of beer spoilage lactic acid bacteria in craft beer production. *J. Food Sci.* **2015**, *80*, M2845–M2852. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Garofalo, C.; Osimani, A.; Milanovic, V.; Aquilanti, L.; De Filippis, F.; Stellato, G.; Di Mauro, S.; Turchetti, B.; Buzzini, P.; Ercolini, D.; et al. Bacteria and yeast microbiota in milk kefir grains from different Italian regions. *Food Microbiol.* **2015**, *49*, 123–133. [[CrossRef](#)]
64. Pinto, C.; Pinho, D.; Cardoso, R.; Custódio, V.; Fernandes, J.; Sousa, S.; Pinheiro, M.; Egas, C.; Gomes, A.C. Wine fermentation microbiome: A landscape from different Portuguese wine appellations. *Front. Microbiol.* **2015**, *6*. [[CrossRef](#)]

65. Lhomme, E.; Lattanzi, A.; Dousset, X.; Minervini, F.; De Angelis, M.; Lacaze, G.; Onno, B.; Gobbetti, M. Lactic acid bacterium and yeast microbiotas of sixteen French traditional sourdoughs. *Int. J. Food Microbiol.* **2015**, *215*, 161–170. [\[CrossRef\]](#)
66. Minervini, F.; Lattanzi, A.; De Angelis, M.; Celano, G.; Gobbetti, M. House microbiotas as sources of lactic acid bacteria and yeasts in traditional Italian sourdoughs. *Food Microbiol.* **2015**, *52*, 66–76. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
67. Geissler, A.J.; Behr, J.; von Kamp, K.; Vogel, R.F. Metabolic strategies of beer spoilage lactic acid bacteria in beer. *Int. J. Food Microbiol.* **2016**, *216*, 60–68. [\[CrossRef\]](#)
68. Xu, Z.; Lu, Z.; Soteyome, T.; Ye, Y.; Huang, T.; Liu, J.; Harro, J.M.; Kjellerup, B.V.; Peters, B.M. Polymicrobial interaction between *Lactobacillus* and *Saccharomyces cerevisiae*: Coexistence-relevant mechanisms. *Crit. Rev. Microbiol.* **2021**, *47*, 1–11. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
69. Karaolis, C.; Botsaris, G.; Pantelides, I.; Tsaltas, D. Potential application of *Saccharomyces boulardii* as a probiotic in goat's yoghurt: Survival and organoleptic effects. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2013**, *48*, 1445–1452. [\[CrossRef\]](#)
70. Sieuwerts, S.; Bron, P.A.; Smid, E.J. Mutually stimulating interactions between lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae* in sourdough fermentation. *LWT Food Sci. Technol.* **2018**, *90*, 201–206. [\[CrossRef\]](#)
71. Bartowsky, E.J. Bacterial spoilage of wine and approaches to minimize it. *Lett. Appl. Microbiol.* **2009**, *48*, 149–156. [\[CrossRef\]](#)
72. Suzuki, K. 125th anniversary review: Microbiological instability of beer caused by spoilage bacteria. *J. Inst. Brew.* **2011**, *117*, 131–155. [\[CrossRef\]](#)
73. Xu, Z.; Luo, Y.; Mao, Y.; Peng, R.; Chen, J.; Soteyome, T.; Bai, C.; Chen, L.; Liang, Y.; Su, J.; et al. Spoilage lactic acid bacteria in the brewing industry. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2020**, *30*, 955–961. [\[CrossRef\]](#)
74. Suharja, A.A.S.; Henriksson, A.; Liu, S.Q. Impact of *saccharomyces cerevisiae* on viability of probiotic *lactobacillus rhamnosus* in fermented milk under ambient conditions. *J. Food Process. Preserv.* **2014**, *38*, 326–337. [\[CrossRef\]](#)
75. Ponomarova, O.; Gabrielli, N.; Sévin, D.C.; Müllender, M.; Zirngibl, K.; Bulyha, K.; Andrejev, S.; Kafkia, E.; Typas, A.; Sauer, U.; et al. Yeast Creates a Niche for Symbiotic Lactic Acid Bacteria through Nitrogen Overflow. *Cell Syst.* **2017**, *5*, 345–e6. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
76. Cheirsilp, B.; Shimizu, H.; Shioya, S. Enhanced kefir production by mixed culture of *Lactobacillus kefirifaciens* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biotechnol.* **2003**, *100*, 43–53. [\[CrossRef\]](#)
77. Mendes, F.; Sieuwerts, S.; de Hulster, E.; Almering, M.J.H.; Luttik, M.A.H.; Pronk, J.T.; Smid, E.J.; Bron, P.A.; Daran-Lapujadea, P. Transcriptome-based characterization of interactions between *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* in lactose-grown chemostat cocultures. *Appl. Environ. Microbiol.* **2013**, *79*, 5949–5961. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
78. Marangoni Júnior, L.; Vieira, R.P.; Anjos, C.A.R. Kefiran-based films: Fundamental concepts, formulation strategies and properties. *Carbohydr. Polym.* **2020**, *246*, 116609. [\[CrossRef\]](#)
79. Tan, K.X.; Chamundeswari, V.N.; Loo, S.C.J. Prospects of kefir as a food-derived biopolymer for agri-food and biomedical applications. *RSC Adv.* **2020**, *10*, 25339–25351. [\[CrossRef\]](#)
80. Banik, A.; Ghosh, K.; Pal, S.; Halder, S.K.; Ghosh, C.; Mondal, K.C. Biofortification of multi-grain substrates by probiotic yeast. *Food Biotechnol.* **2020**, *34*, 283–305. [\[CrossRef\]](#)
81. Rajkowska, K.; Kunicka-Styczyńska, A.; Rygala, A. Probiotic Activity of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* Against Human Pathogens. *Food Technol. Biotechnol.* **2012**, *50*, 230–236.
82. Abdel-Kareem, M.M.; Rasmey, A.M.; Zohri, A.A. The action mechanism and biocontrol potentiality of novel isolates of *Saccharomyces cerevisiae* against the aflatoxigenic *Aspergillus flavus*. *Lett. Appl. Microbiol.* **2018**, *68*. [\[CrossRef\]](#)
83. Liu, Y.; Galani Yamdeu, J.H.; Gong, Y.Y.; Orfila, C. A review of postharvest approaches to reduce fungal and mycotoxin contamination of foods. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2020**, *19*, 1521–1560. [\[CrossRef\]](#)
84. Naimah, A.K.; Al-Manhel, A.J.A.; Al-Shawi, M.J. Isolation, Purification and Characterization of Antimicrobial Peptides Produced from *Saccharomyces boulardii*. *Int. J. Pept. Res. Ther.* **2018**, *24*, 455–461. [\[CrossRef\]](#)
85. Goktas, H.; Dertli, E.; Sagdic, O. Comparison of functional characteristics of distinct *Saccharomyces boulardii* strains isolated from commercial food supplements. *LWT* **2021**, *136*. [\[CrossRef\]](#)
86. Ogunremi, O.R.; Agrawal, R.; Sanni, A.I. Development of cereal-based functional food using cereal-mix substrate fermented with probiotic strain—*Pichia kudriavzevii* OG32. *Food Sci. Nutr.* **2015**, *3*, 486–494. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
87. White, J.; Hekmat, S. Development of Probiotic Fruit Juices Using *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 Fortified with Short Chain and Long Chain Inulin Fiber. *Fermentation* **2018**, *4*, 27. [\[CrossRef\]](#)
88. Corcoran, B.M.; Ross, R.P.; Fitzgerald, G.F.; Dockery, P.; Stanton, C. Enhanced survival of GroESL-overproducing *Lactobacillus paracasei* NFBC 338 under stressful conditions induced by drying. *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, *72*, 5104–5107. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
89. Morelli, L.; Capurso, L. FAO/WHO guidelines on probiotics: 10 years later. *J. Clin. Gastroenterol.* **2012**, *46*, S1–S2. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
90. Fiocco, D.; Longo, A.; Arena, M.P.; Russo, P.; Spano, G.; Capozzi, V. How probiotics face food stress: They get by with a little help. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2020**, *60*, 1552–1580. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
91. Sharifi-Rad, J.; Rodrigues, C.F.; Stojanovic-Radic, Z.; Dimitrijevic, M.; Aleksic, A.; Neffe-Skocińska, K.; Zielińska, D.; Kołoz'yn-Krajewska, D.; Salehi, B.; Prabhu, S.M.; et al. Probiotics: Versatile bioactive components in promoting human health. *Medicina* **2020**, *56*, 433. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
92. Mishra, S.; Mishra, H.N. Technological aspects of probiotic functional food development. *Nutrafoods* **2012**, *11*, 117–130. [\[CrossRef\]](#)

-
93. Kowalczyk, D.; Kordowska-Wiater, M.; Nowak, J.; Baraniak, B. Characterization of films based on chitosan lactate and its blends with oxidized starch and gelatin. *Int. J. Biol. Macromol.* **2015**, *77*, 350–359. [[CrossRef](#)]
 94. Capela, P.; Hay, T.K.C.; Shah, N.P. Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yoghurt. *Food Res. Int.* **2006**, *39*, 203–211. [[CrossRef](#)]
 95. Yeo, S.-K.; Ewe, J.A.; Tham, C.; Liong, M.-T. Carriers of Probiotic Microorganisms. In *Probiotics Microbiol Monographs*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2011; Volume 21, pp. 191–220, ISBN 978-3-642-20837-9.
 96. Flach, J.; van der Waal, M.B.; van den Nieuwboer, M.; Claassen, E.; Larsen, O.F.A. The underexposed role of food matrices in probiotic products: Reviewing the relationship between carrier matrices and product parameters. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2018**, *58*, 2570–2584. [[CrossRef](#)]
 97. Asgari, S.; Pourjavadi, A.; Licht, T.R.; Boisen, A.; Ajalloueian, F. Polymeric carriers for enhanced delivery of probiotics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2020**, *161–162*, 1–21. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 98. Qi, W.; Liang, X.; Yun, T.; Guo, W. Growth and survival of microencapsulated probiotics prepared by emulsion and internal gelation. *J. Food Sci. Technol.* **2019**, *56*, 1398–1404. [[CrossRef](#)]
 99. Gallo, M.; Bevilacqua, A.; Speranza, B.; Sinigaglia, M.; Corbo, M.R. Alginate beads and apple pieces as carriers for *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*, as representative of yeast functional starter cultures. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2014**, *49*, 2092–2100. [[CrossRef](#)]
 100. Bevilacqua, A.; Campaniello, D.; Speranza, B.; Racioppo, A.; Altieri, C.; Sinigaglia, M.; Corbo, M.R. Microencapsulation of *saccharomyces cerevisiae* into alginate beads: A focus on functional properties of released cells. *Foods* **2020**, *9*, 1051. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
 101. Zamora-Vega, R.; Montañez-Soto, J.L.; Martínez-Flores, H.E.; Flores-Magallón, R.; Muñoz-Ruiz, C.V.; Venegas-González, J.; Ariza Ortega, T.D.J. Effect of incorporating prebiotics in coating materials for the microencapsulation of *Sacharomyces boulardii*. *Int. J. Food Sci. Nutr.* **2012**, *63*, 930–935. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Article

Probiotic Yeasts and How to Find Them—Polish Wines of Spontaneous Fermentation as Source for Potentially Probiotic Yeasts

Adam Staniszewski  and Monika Kordowska-Wiater * 

Department of Biotechnology, Microbiology and Human Nutrition, University of Life Sciences in Lublin, Skromna 8, 20-704 Lublin, Poland; adam.staniszewski@up.lublin.pl

* Correspondence: monika.kordowska-wiater@up.lublin.pl

Abstract: One approach towards maintaining healthy microbiota in the human gastrointestinal tract is through the consumption of probiotics. Until now, the majority of probiotic research has focused on probiotic bacteria, but over the last few years more and more studies have demonstrated the probiotic properties of yeast, and also of species besides the well-studied *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*. Probiotic strains have to present the ability to survive in harsh conditions of the host body, like the digestive tract. Must fermentation might be an example of a similar harsh environment. In the presented study, we examined the probiotic potential of 44 yeast strains isolated from Polish wines. The tested isolates belonged to six species: *Hanseniaspora uvarum*, *Pichia kluyveri*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Metschnikowia ziziphicola*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Starmerella bacillaris*. The tested strains were subjected to an assessment of probiotic properties, their safety and their other properties, such as enzymatic activity or antioxidant properties, in order to assess their potential usefulness as probiotic yeast candidates. Within the most promising strains were representatives of three species: *H. uvarum*, *M. pulcherrima* and *S. cerevisiae*. *H. uvarum* strains 15 and 16, as well as *S. cerevisiae* strain 37, showed, among other features, survivability in gastrointestinal tract conditions exceeding 100%, high hydrophobicity and autoaggregation, had no hemolytic activity and did not produce biogenic amines. The obtained results show that Polish wines might be a source of potential probiotic yeast candidates with perspectives for further research.

Keywords: enology; Polish wines; probiotics; *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*; probiotic yeasts; non-*Saccharomyces* yeast; viniculture



Citation: Staniszewski, A.; Kordowska-Wiater, M. Probiotic Yeasts and How to Find Them—Polish Wines of Spontaneous Fermentation as Source for Potentially Probiotic Yeasts. *Foods* **2023**, *12*, 3392. <https://doi.org/10.3390/foods12183392>

Academic Editor: Jiajia Song

Received: 2 August 2023

Revised: 28 August 2023

Accepted: 6 September 2023

Published: 11 September 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The human microbiota significantly influence the well-being of the human host, and may participate in the development of a wide variety of diseases. One of the approaches towards maintaining healthy microbiota is through probiotic consumption [1,2]. The World Health Organization defines probiotics as live microorganisms that, when administered in sufficient amounts, confer a health benefit. While the majority of probiotic research has focused on bacterial strains (mainly *Lactobacillus* (according to previous nomenclature) and *Bifidobacterium*), the exploration of probiotic yeast is just gaining momentum due to its potential in terms of unique features and potential therapeutic applications [3–5]. Most probiotic yeast research focuses on *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*, the only species of yeast that has been tested well and is widely used as a probiotic [6–9]. However, more and more research is focused on the search for new strains with probiotic properties, not only *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* [4,10–12]. Examples of non-*Saccharomyces* species with probiotic properties may be *Debaryomyces hansenii* and *Kluyveromyces marxianus* [13–15].

Fermented foods and beverages have been a source of probiotic microorganisms in the human diet since the dawn of time. The coexistence of yeasts and lactic acid bacteria often occurs in a synergistic manner, where they mutually enhance their growth and

survival [16–18]. Examples of fermented products that can be sources for the isolation of probiotic strains are cheese, dough, dairy products, fermented fruits and vegetables, and traditional food and beverages [19–21]. Among such products, wines deserve attention as a source of probiotic microorganisms due to the richness of their microbiota [22–28]. Examples of such potentially probiotic isolates include bacteria like *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Pediococcus pentosaceus* [23,29] and both *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts like *Candida* spp., *Hanseniaspora* spp., *Pichia* spp. and *Torulaspora delbrueckii* [27,28,30]. Over recent years, with the warming of Poland's climate, there has been an increased interest in viticulture, resulting in the growth of vineyards by over 550 in the last decade [25,31]. At the time of publication preparation, only two publications characterizing native yeast strains of Polish wines and one metagenomic study were available, but none of them were dedicated to exploring the probiotic potential of the tested strains [22,25,32]. To the best of our knowledge, this is the first study focusing on the aspect of probiotic potential of yeast isolates derived from Polish wines and may provide some new perspectives on wine-derived yeasts besides the typical look inside their influence on wine's enological properties, such as aroma, acidity, texture, etc.

The main aim of the study was the isolation of probiotic yeast candidate strains from spontaneously fermented Polish wines and the *in vitro* testing of their potentially probiotic and safety properties.

2. Materials and Methods

2.1. Yeast Strains

Forty-four yeast strains were obtained from the culture collection of the Department of Biotechnology, Microbiology and Human Nutrition, Faculty of Food Science and Biotechnology, University of Life Sciences in Lublin. The strains originated from spontaneously fermented wines produced from grapes of the Regent variety sourced from three Polish vineyards, “Dom Bliskowice” (DB), “Małe Dobre” (MD) and “Winnica Janowiec” (WJ), located in the Małopolska Vistula Gorge region in 2019. Fresh cultures for the following experiments were grown for 48 h at 28 °C in YPD (yeast extract peptone dextrose) broth (BTL, Łódź, Poland). A commercial probiotic yeast, *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* CNCM I-745 (Enterol, Biocodex, France), was used as a positive control. To ensure consistency in the measurements, the initial optical density at 600 nm (OD₆₀₀) of each culture was determined. Subsequently, the results were standardized to an OD₆₀₀ value of 1.0 for each experiment, unless stated otherwise. This normalization allowed for accurate and comparable data analysis across different cultures. The strains were preserved in freezing conditions (−20 °C) with glycerol (20%). The code names for individual strains with vineyard origin are listed in Table 1.

Yeast Identification

To verify the identification of the strains obtained from the collection, they were subjected to species identification based on ITS1-5.8S rDNA-ITS2 regions. Strains' identification was obtained via 5.8S-ITS gene sequencing. DNA isolation was performed according to the procedure of Genomic Mini AX Yeast (A&A Biotechnology, Gdańsk, Poland). Amplification of the region was performed with the primers ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') and ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') using PCR Mix Plus Green (A&A Biotechnology, Gdańsk, Poland) with both primers concentration 0.5 µM and 1 µL of fungal DNA template [33]. Amplification conditions: cycle of initial denaturation at 95 °C for 5 min, followed by 34 cycles: denaturation at 95 °C for 1 min, annealing at 56 °C for 1 min, extension at 72 °C for 2 min with final extension step at 72 °C for 10 min. Sequencing of the amplicons was performed using Genomed (Warsaw, Poland). Contigs were assembled with DNA Sequence Assembler v5 (Heracle BioSoft, www.DnaBaser.com) (accessed on 10 January 2023). Obtained contigs were compared to the known sequences of the ITS region in the NCBI GenBank database via alignment with the BLAST algorithm and evolutionary analyses were conducted in MEGA11. The phylogenetic tree was created based on the ITS region

sequences using the maximum likelihood method with the best-fit Kimura 2-parameter model with a discrete gamma distribution (+G), with 1000 bootstrap replication [34].

Table 1. Code names for tested strains.

Strain Number	Species	Code Name	Vineyard ¹
01	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	01_Metsch_pulcherrima	DB
02	<i>Starmerella bacillaris</i>	02_Starm_bacillaris	DB
03	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	03_Sacch_cerevisiae	DB
04	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	04_Hans_uvarum	DB
05	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	05_Hans_uvarum	DB
06	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	06_Sacch_cerevisiae	DB
07	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	07_Hans_uvarum	DB
08	<i>Starmerella bacillaris</i>	08_Starm_bacillaris	DB
09	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	09_Sacch_cerevisiae	DB
10	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	10_Sacch_cerevisiae	DB
11	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	11_Sacch_cerevisiae	DB
12	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	12_Hans_uvarum	DB
13	<i>Metschnikowia ziziphicola</i>	13_Metsch_ziziphicola	MD
14	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	14_Hans_uvarum	MD
15	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	15_Hans_uvarum	MD
16	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	16_Hans_uvarum	MD
17	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	17_Metsch_pulcherrima	MD
18	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	18_Metsch_pulcherrima	MD
19	<i>Starmerella bacillaris</i>	19_Starm_bacillaris	MD
20	<i>Starmerella bacillaris</i>	20_Starm_bacillaris	MD
21	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	21_Metsch_pulcherrima	MD
22	<i>Starmerella bacillaris</i>	22_Starm_bacillaris	WJ
23	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	23_Hans_uvarum	WJ
24	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	24_Hans_uvarum	WJ
25	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	25_Sacch_cerevisiae	DB
26	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	26_Sacch_cerevisiae	DB
27	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	27_Sacch_cerevisiae	DB
31	<i>Starmerella bacillaris</i>	31_Starm_bacillaris	DB
32	<i>Pichia kluyveri</i>	32_Pich_kluyveri	DB
33	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	33_Hans_uvarum	DB
34	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	34_Metsch_pulcherrima	DB
35	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	35_Sacch_cerevisiae	DB
36	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	36_Metsch_pulcherrima	DB
37	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	37_Sacch_cerevisiae	DB
38	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	38_Sacch_cerevisiae	DB
39	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	39_Sacch_cerevisiae	DB
40	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	40_Sacch_cerevisiae	DB
41	<i>Starmerella bacillaris</i>	41_Starm_bacillaris	MD
42	<i>Starmerella bacillaris</i>	42_Starm_bacillaris	MD
43	<i>Starmerella bacillaris</i>	43_Starm_bacillaris	MD
44	<i>Pichia kluyveri</i>	44_Pich_kluyveri	MD
45	<i>Starmerella bacillaris</i>	45_Starm_bacillaris	MD
46	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	46_Metsch_pulcherrima	MD
47	<i>Starmerella bacillaris</i>	47_Starm_bacillaris	MD
-	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>bouardi</i>	Sacch_boulardi	-

¹ Vineyards: “Dom Bliskowice” (DB); “Mate Dobre” (MD); and “Winnica Janowiec” (WJ).

2.2. Evaluation of Potentially Probiotic Traits

2.2.1. Survival and Growth at 37 °C

For checking the ability to grow at human body temperature, 10 µL of fresh yeast culture was inoculated into 1 mL of YPD (Yeast Peptone Dextrose) broth and was incubated at 37 °C for 48 h. Survival under these conditions was assessed via growth or no growth after 48 h. If the strain did not show the ability to grow in the above-mentioned conditions, it was removed from further analysis.

2.2.2. Survival and Growth under Gastrointestinal Tract Conditions

All strains undergo in vitro digestion according to Fernandez-Pacheco et al., 2018, with modification [12]. One milliliter of fresh culture was centrifuged (5000 rpm, 10 min), biomass was washed with YPD broth in PBS (phosphate-buffered saline) at pH = 2 supple-

mented with 3 mg/mL pepsin, centrifuged under the same conditions and after washing, inoculated into 1 mL of gastric solution containing YPD supplemented with 3 mg/mL pepsin in phosphate-buffered saline at pH = 2 to simulate gastric conditions. The mixture was then incubated at 37 °C for 3 h. Following this, the gastric solution was centrifuged (5000 rpm, 10 min) and the biomass was washed with an intestinal solution composed of YPD broth containing 1 mg/mL pancreatin and 0.5% bile salts, adjusted to pH = 8 and was transferred to the same intestinal solution and incubated at 37 °C for 22 h. To assess survival and growth of cells under gastrointestinal conditions, the spread plate technique on YPD agar was used after serial dilution preparations [35,36].

Survival rate and growth was calculated as % by the formula:

$$\text{survival rate [\%]} = \frac{\text{concentration of living cells after in vitro digestion}}{\text{concentration of living cells before in vitro digestion}} \times 100\%$$

2.2.3. Hydrophobicity of Cell Surface

Cell surface hydrophobicity was tested according to Amorim et al., 2018 [37]. One milliliter of fresh culture was centrifuged (5000 rpm, 10 min), biomass was washed twice and was resuspended in 5 mL of PBS (phosphate-buffered saline) at pH = 7. Three milliliters were blended with 1 mL of xylene. The mixture was vigorously shaken for 2 min and then allowed to settle undisturbed at 37 °C for 30 min, facilitating the complete separation of the phases. Subsequently, the aqueous phase was carefully removed, and the absorbance at 600 nm was measured spectrophotometrically. The decrease in the absorbance was taken as the measure of cell surface hydrophobicity calculated using the formula below:

$$\text{Hydrophobicity [\%]} = [1 - ((\text{OD}_{\text{initial}} - \text{OD}_{\text{final}})/\text{OD}_{\text{initial}})] \times 100\%$$

where $\text{OD}_{\text{initial}}$ and OD_{final} are the absorbance (at 600 nm) before and after extraction with xylene [37–39].

2.2.4. Autoaggregation Assay

Autoaggregation assay was carried out according to Amorim et al., 2018, and Gil-Rodriguez et al., 2015 [37,40].

The yeasts were grown in YPD broth at 37 °C for 24 h. After that, they were centrifuged (5000 rpm, 10 min) and washed twice with PBS at pH = 7. The biomass was then resuspended in PBS. To assess autoaggregation, 3 mL of the cell suspension was vortexed for 10 s. Autoaggregation was determined spectrophotometrically after 2, 4 and 24 h of incubation at 37 °C via absorbance (A) (OD_{600}) and it was expressed as:

$$\text{Autoaggregation [\%]} = [1 - (A_t/A_0)] \times 100\%$$

where A_t is the absorbance at 2, 4 or 24 h and A_0 is at zero time [37].

2.2.5. Antioxidant Activity

Antioxidant activity assay was carried out according to Gil-Rodriguez et al., 2015 [40]. One milliliter of yeast culture in YPD broth was centrifuged (5000 rpm, 10 min), washed twice with a sterile solution 0.9% NaCl and the pellet was resuspended in 1 mL of 0.9% NaCl. Next, 800 μL of the cell suspension was transferred to a new tube, to which 1 mL of a DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) solution (0.2 mM in methanol) was added. The mixture was vortexed and incubated in darkness at room temperature for 30 min. Following incubation, the reaction tubes were centrifuged (12,000 rpm, 5 min) and 300 μL of the resulting supernatant was transferred to 96-well plates for measurement of the absorbance at 517 nm (A_{517}). The percentage of reduction in DPPH was then calculated using the following formula [40]:

$$\text{Percentage of reduction of DPPH [\%]} = [(A_{517 \text{ control}} - A_{517 \text{ sample}})/A_{517 \text{ control}}] \times 100\%$$

where $A_{517 \text{ control}}$ represents the absorbance of the control (DPPH solution without yeast) and $A_{517 \text{ sample}}$ represents the absorbance of the sample (yeast culture treated with DPPH solution).

2.2.6. Antimicrobial Activity

The well-diffusion method was employed to evaluate the antimicrobial activity of the yeast strains against various bacterial species [41,42], including *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* and *Enterococcus faecalis*. The bacterial strains were cultivated in BHI (brain heart infusion) broth at 37 °C overnight. Then, the bacterial cultures were individually inoculated with 1 mL of bacterial suspension onto BHI agar plates, spread and left to allow for the liquid absorption. Afterward, three wells (5 mm diameter each) were cut in the center of every plate at equal intervals between each other and inoculated with fresh yeast culture. The plates were incubated for 24 h at 37 °C, to evaluate bacterial growth inhibition.

2.3. Traits Related to Safety and Virulence

2.3.1. Hemolytic Activity

To test hemolytic activity, yeasts were streaked onto blood agar plates (Columbia agar supplemented with 5% defibrinized sheep's blood) (Biomaxima, Lublin, Poland). The plates were then incubated at 37 °C for 72 h. Following incubation, the plates were observed for any visible signs of hemolysis. As a positive control, *Staphylococcus aureus*, known to exhibit hemolysis, was included in the experiment.

2.3.2. Biogenic Amine Production

To evaluate strains' ability to produce biogenic amines, the method suggested by Aslankoohi et al., 2016 was used [43]. Yeasts were streaked onto YPD agar plates supplemented with 0.006% bromocresol purple and an amino acid mix (tyrosine, histidine, phenylalanine, leucine, tryptophan, arginine and lysine in equal ratios) with a total mass concentration of 1%. For the detection of biogenic amines (BAs), the plates were incubated at 30 °C for 7 days. Throughout the incubation period, the growth of strains and any changes in the color of the medium were monitored on a daily basis. This monitoring aimed to identify the presence of biogenic amines, which could be indicated by specific changes in the appearance of the medium. In yeast strains that produce biogenic amines, the process of amino acid decarboxylation resulted in the immediate appearance of a purple halo surrounding the growth area. On the other hand, in the strains that did not produce biogenic amines, the growth area exhibited a yellow halo surrounding it, which was attributed to glucose fermentation. During the growth of the strain, pH reduction occurred, leading to the medium gradually turning purple [43].

2.4. Enzymatic Activity

We determined the enzymatic activities of the strains using the API ZYM system (bio-Merieux, Craaponne, France) according to the manufacturer's recommendations. Yeast cell suspensions were transferred into the wells of the API ZYM strips and incubated at 37 °C for 4 h. After the incubation period, one drop each of the reagents ZYM A and ZYM B was added to each well. Color changes observed in the wells indicating positive enzymatic reactions were noted and used for evaluation of the results on the basis of the API ZYM color chart [44].

2.5. Statistical Analysis

The results were analyzed with Statistica version 13.3 (2017) for Windows (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). The one-way ANOVA followed by Tukey HSD post hoc tests ($p < 0.05$) was used to compare the results for: survivability, hydrophobicity and antioxidant activity for each strain, and mixed two-way ANOVA for level of autoaggregation for testing strains after 2, 4 and 24 h.

3. Results

3.1. Yeast Identification

All strains were identified to the species level (Table 1). All forty-four identified strains belong to five yeast genera: *Saccharomyces* (29.54% of strains), *Starmerella* (25% of strains), *Hanseniaspora* (22.72% of strains), *Metschnikowia* (18.2% of strains) and *Pichia* (4.5% of strains). The results of the phylogenetic analysis are presented in Figure 1.

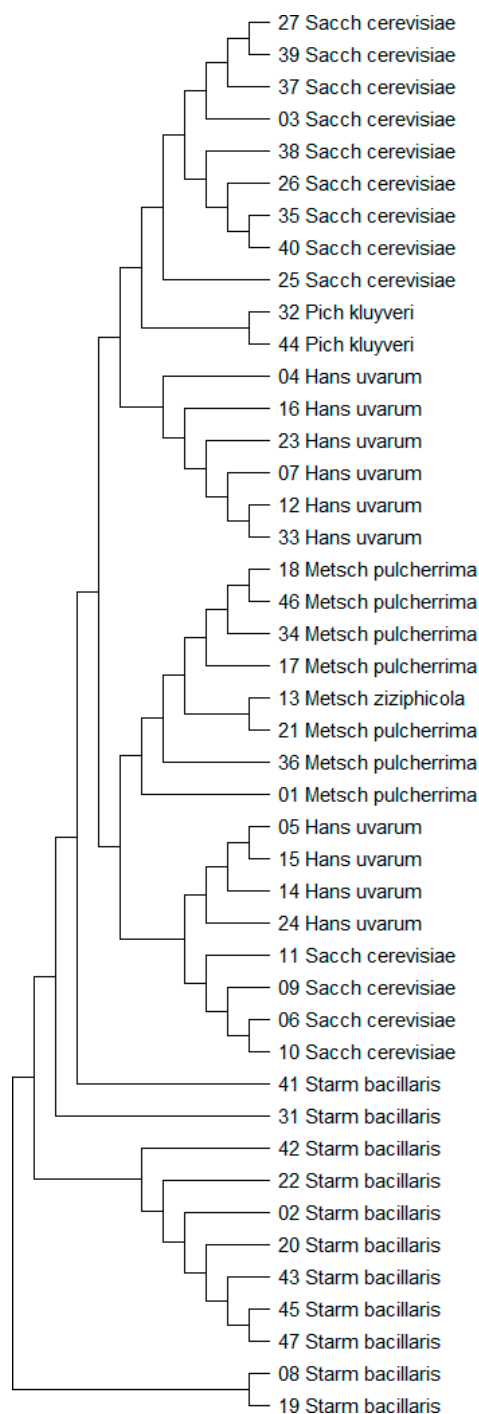


Figure 1. Maximum likelihood tree based on ITS sequences of the studied isolates.

3.2. Evaluation of Potentially Probiotic Traits

3.2.1. Survival and Growth at 37 °C

Out of forty-four tested strains only twenty-one isolates showed an ability to survive and grow at 37 °C. Within tested strains, the highest percentage of survived strains was shown by *Pichia kluyveri* (100% of strains survived), followed by *Saccharomyces cerevisiae* (76.9% of strains survived), *Metschnikowia* spp. (62.5% of strains survived) and *Hanseniaspora uvarum* (40% of strains survived). None of the tested *Starmerella bacillaris* isolates survived. Detailed data are presented in Figure 2. All strains that did not demonstrate the ability to grow at 37 °C were excluded from further studies.

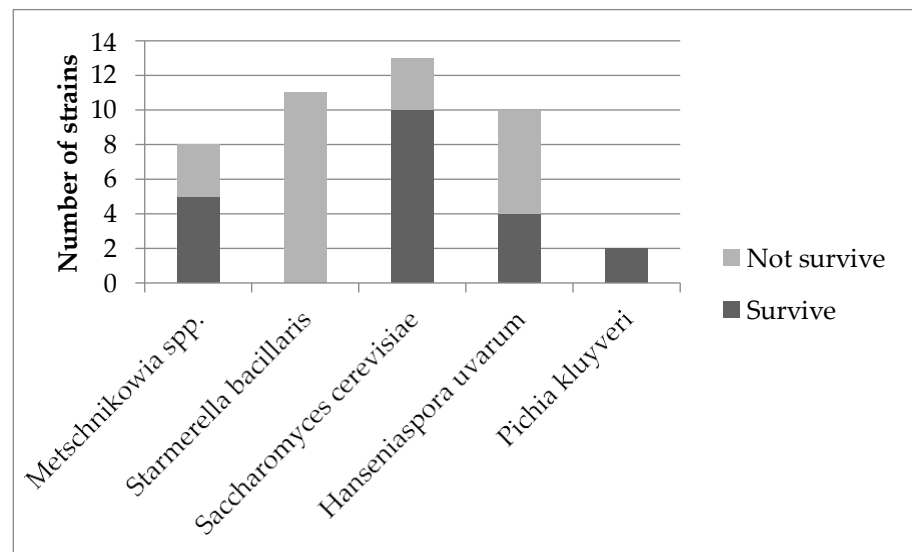


Figure 2. Ability to survive at 37 °C.

3.2.2. Survival and Growth under Gastrointestinal Tract Conditions

As the next step, the remaining strains were subjected to in vitro digestion. Out of twenty-one strains subjected to the procedure, eleven strains showed the ability to survive simulated gastrointestinal conditions. Eight of the eleven strains showed better survivability than the positive control (*Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* CNCM I-745 with survivability at 48.7%). Five strains demonstrated survivability above 100%: 16_Hans_uvarum (147.8%), 15_Hans_uvarum (106.6%), 37_Sacch_cerevisiae (104.6%), 34_Metsch_pulcherrima (100.4%) and 36_Metsch_pulcherrima (100.1%). This may suggest that the conditions in the gastrointestinal tract for the five mentioned strains could be prevailing for their growth compared to standard culture conditions. Detailed data are presented in Figure 3. All strains that did not demonstrate the ability to survive gastrointestinal tract conditions were excluded from further studies and are not included in Figure 3.

3.2.3. Hydrophobicity of Cell Surface

The ability to adhere to intestinal epithelial cells is a crucial requirement for the colonization of potentially probiotic strains in the gastrointestinal tract, as it helps them avoid immediate elimination through peristalsis and gives a competitive advantage within the gastrointestinal tract. Many authors suggest that strains with high hydrophobicity exhibit high adherence to intestinal cell lines [45,46]. All, except three strains: 36_Metsch_pulcherrima (54.63%), 32_Pich_kluyveri (59.42%) and 13_Metsch_ziziphicola (76.53%), showed hydrophobicity above 80% which may suggest their ability to quickly adhere to the mucosa. Detailed data are presented in Figure 4.

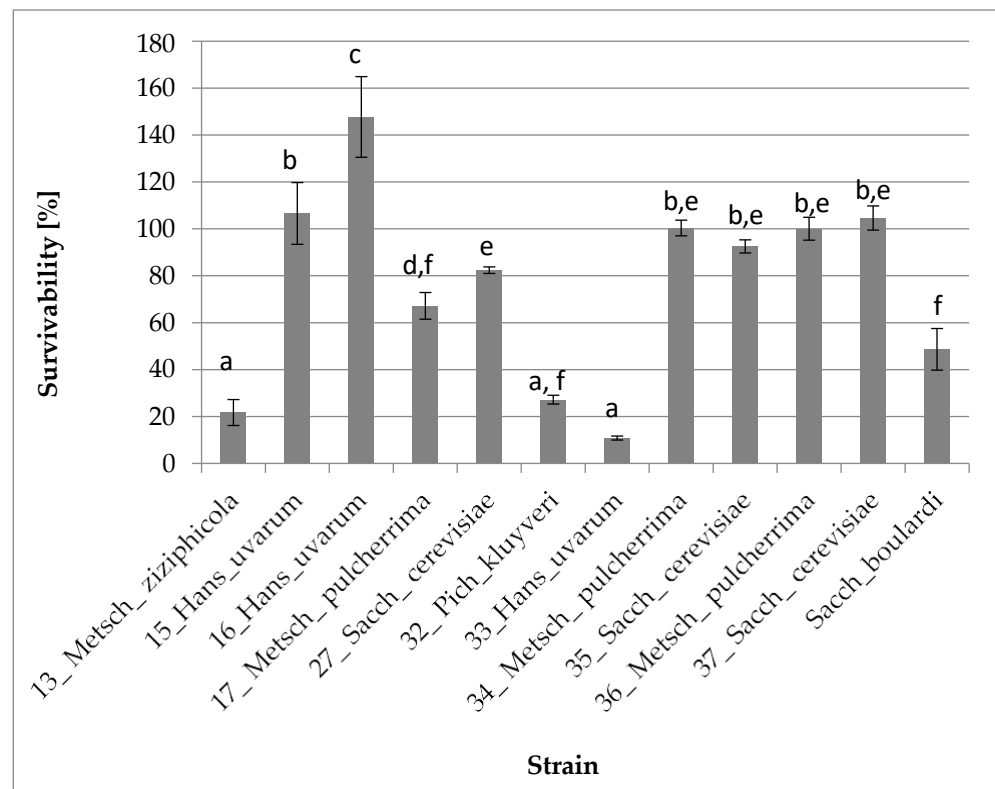


Figure 3. Survival and growth of yeasts under gastrointestinal tract conditions (one-way ANOVA: strain: $F_{(11,24)} = 89,533$, $p = 0.00000$; $se \pm 0.043683$). The values designated by the different letters are statistically significantly different.

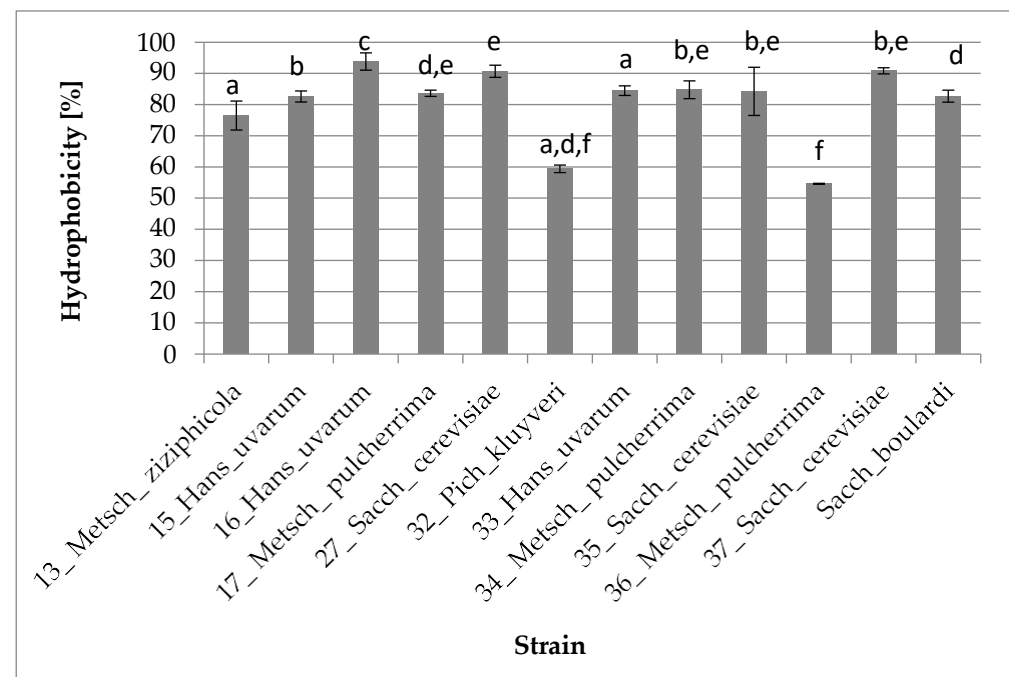


Figure 4. Hydrophobicity of cell surface of yeasts (one-way ANOVA: strain: $F_{(11,24)} = 45,775$, $p = 0.00000$; $se \pm 0.017750$). The values designated by the different letters are statistically significantly different.

3.2.4. Autoaggregation Assay

Pizzolitto et al., 2013, and Amorim et al., 2018, suggest that autoaggregation above 80% should be considered as high [37,47]. Besides 37_Sacch_cerevisiae, all strains presented autoaggregation above 25% after 2 h with the highest autoaggregation rate after 2 h for strains: 27_Sacch_cerevisiae (80.31%), 34_Metsch_pulcherrima (67.90%) and 32_Pich_kluyveri (60.28%). For all strains, autoaggregation rates increased with time reaching above 90% after 24 h, excluding 37_Sacch_cerevisiae, which obtained autoaggregation rates at 12.62%, 37.42% and 85.30% after 2, 4 and 24 h. Detailed data are presented in Figure 5. Result of Tukey HSD post hoc test for Figure 5 is included in the Supplementary Materials (Spreadsheet S1: Figure_5_Tukey_results).

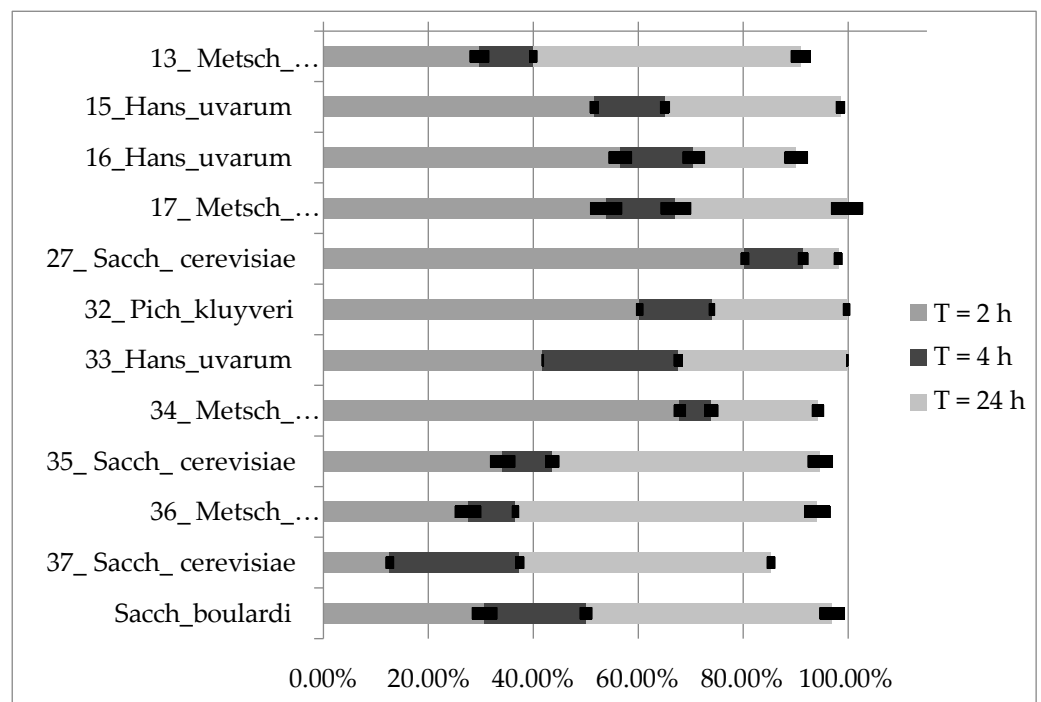


Figure 5. The results of autoaggregation assay for each strain after 2, 4 and 24 h (two-way ANOVA: strain: $F_{(11,72)} = 925.80, p = 0.00000$; se ± 0.431909 ; time: $F_{(2,72)} = 13,991, p = 0.00000$; se ± 0.215954 ; strain $\times$ time: $F_{(22,72)} = 174.89, p = 0.00000$; se ± 0.748088).

3.2.5. Antioxidant Activity

The DPPH assay showed that all tested strains presented high antioxidant activity, but only five strains: 13_Metsch_ziziphicola (55.79%), 15_Hans_uvarum (71.20%), 16_Hans_uvarum (71.44%), 32_Pich_kluyveri (69.83%) and 34_Metsch_pulcherrima (60.42%) showed a significant difference in antioxidant activity toward the control sample of Sacch_boulardi (65.10%). Detailed data are presented in Figure 6. Result of Tukey HSD post hoc test for Figure 6 is included in the Supplementary Materials (Spreadsheet S1: Figure_6_Tukey_results).

3.2.6. Antimicrobial Activity

Only strain 15_Hans_uvarum showed weak antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus*; other strains did not inhibit the growth of pathogenic bacteria.

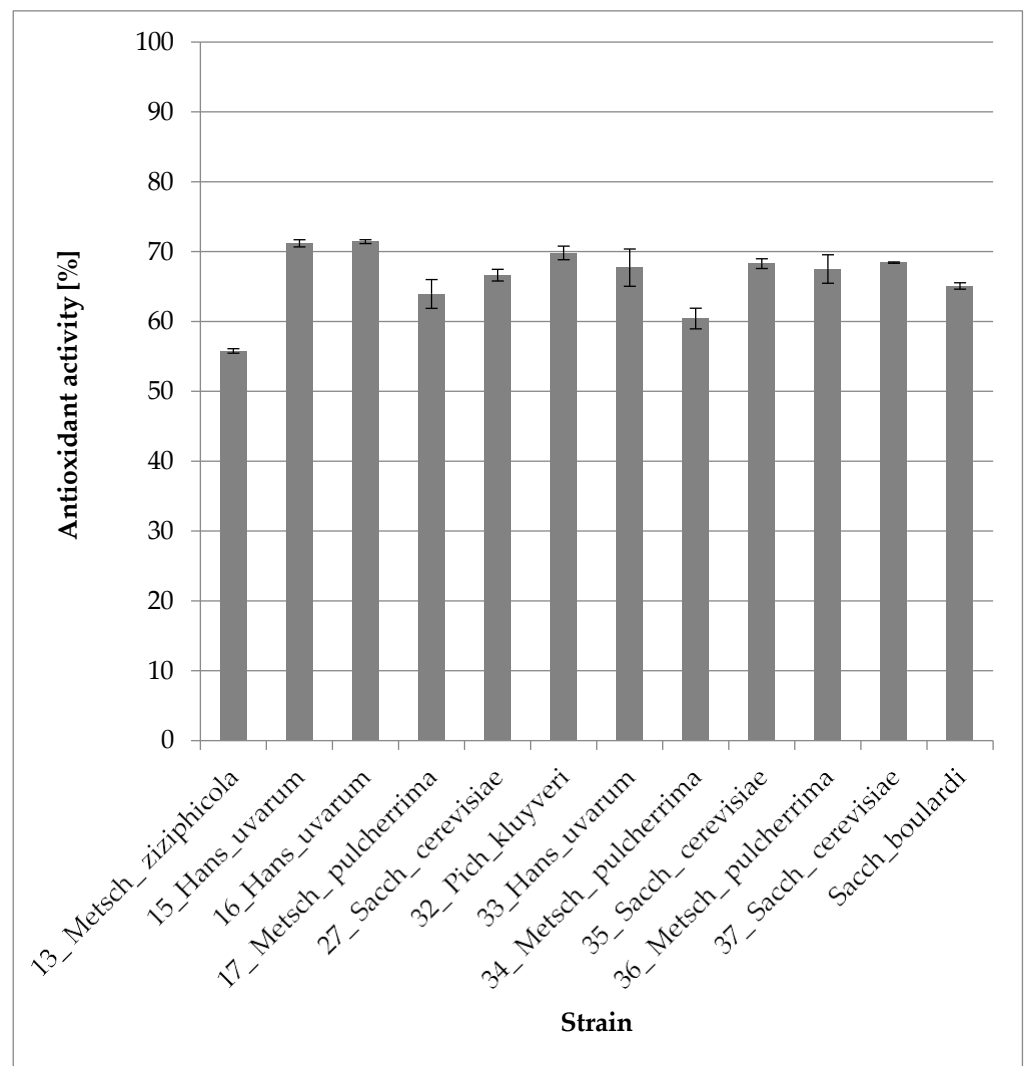


Figure 6. Antioxidant activity for tested strains (one-way ANOVA: strain: $F_{(11,24)} = 36,078$, $p = 0.00000$; $se \pm 0.007562$).

3.3. Traits Related to Safety and Virulence

3.3.1. Hemolytic Activity

None of strains tested in the experiment presented hemolytic activity.

3.3.2. Biogenic Amine Production

From all tested strains, three strains: 27_Sacch_cerevisiae, 32_Pich_kluyveri and 34_Metsch_pulcherrima produced a purple halo around the growth area, which indicate the presence of biogenic amines [43].

3.4. Enzymatic Activity

The API ZYM assay showed various activity profiles within the tested strains. All strains presented activity of alkaline phosphatase, esterase (C4), esterase lipase (C8) and acid phosphatase, but none of the strains presented activity of trypsin, α -galactosidase, β -glucuronidase nor α -fucosidase. The differences in enzymatic activity between tested strains are presented in Table 2.

Table 2. Results of API-ZYM assay for selected yeast strains.

Enzyme	13 ¹	15 ¹	16 ¹	17 ¹	27 ¹	32 ¹	33 ¹	34 ¹	35 ¹	36 ¹	37 ¹
Lipase (C14)	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Leucine arylamidase	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+
Valine arylamidase	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+
Cystine arylamidase	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Chymotrypsin	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-
Acid phosphatase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
β -Galactosidase	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-
α -Glucosidase	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
β -Glucosidase	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+
N-acetyl- β -glucosaminidase	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-
α -Mannosidase	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+

¹ Strain number (see Table 1).

4. Discussion

At the time of preparation for publication, to the best of our knowledge, nobody has published studies focused on the aspect of probiotic potential of yeasts isolated from Polish wines.

The forty-four strains examined belonged to six species: *Hanseniaspora uvarum*, *Pichia kluyveri*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Metschnikowia ziziphicola*, *Saccharomyces cerevisiae*, and *Starmerella bacillaris*. Despite limited research on yeast biodiversity in Polish wines, our findings mostly align with the lists of species described by Drozd et al. and Cioch-Skoneczny et al. [22,32], but include one species not mentioned by the authors—*Starmerella bacillaris*. The species, *S. bacillaris*, known also as *Candida zemplinina*, is frequently isolated from grapes and wines, and may affect the chemical composition of the musts and wines by its ability to produce various metabolites which influence their enological properties [48–50]. All species identified in the study commonly occur and are isolated from grape, must and wine environments worldwide [51–53].

Despite challenging environmental conditions for microorganisms during the wine fermentation process, only 11 out of the 44 strains subjected to the initial experiments demonstrated potential for further research. Two of the most discriminative tests for the experiments were the ability to survive at 37 °C and the ability to survive and grow under gastrointestinal tract (GIT) conditions, eliminating 52.3% and 47.6% of the strains at each of those steps. Among the isolates able to survive the two initial steps of the experiment were the strains belonging to *H. uvarum*, *P. kluyveri*, *M. pulcherrima*, *M. ziziphicola* and *S. cerevisiae*. Besides their enological potential, none of *S. bacillaris* strains tested in the study were able to survive and grow at 37 °C, which stands in opposition to the results obtained by Shen et al., who described *S. bacillaris* CC-PT4 as showing properties as a probiotic candidate [54]. Current data about potentially probiotic strains belonging to *S. bacillaris* are limited to the data of Shen et al. and do not include exact information about the source of isolation of each strain and the information is mainly limited to the list of fruits bought from greengrocers in China. Possibly the reason for differences in the tolerance for the host temperature and the ability to survive under GIT conditions between *S. bacillaris* strains from this study and Shen et al.'s study might be differences in climate conditions at the place of isolate's origin, but such a hypothesis cannot be verified without more detailed data.

Gastrointestinal tract conditions play an important role in human health protection, serving as a barrier between the external environment and the body and helping to prevent the entry of harmful substances and pathogens. Such conditions also play an important role in survival of potential probiotics [40]. In our study, eight of the eleven strains presented better survival rate than *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* CNCM I-745 (positive control), with survivability at 48.7%. Two strains for both *Hanseniaspora uvarum* and *Metschnikowia pulcherrima*, and one strain of *Saccharomyces cerevisiae* exceeded 100% survival rate, which may suggest that GIT conditions are more favorable for them than typical culture conditions. Similar results for wine-derived strains were published by Vergara Alvarez et al. [27]. Such properties may result from the adaptation of the strains to the conditions of wine fermentation, where low pH is common [55,56].

Hydrophobicity and autoaggregation assays allow for the estimation of microorganisms' behavior in GIT [12]. Yeasts with high hydrophobicity exhibit high adherence to intestinal cell lines [38,39]. All strains, with exception of 13_Metsch_ziziphicola, 32_Pich_kluyveri and 36_Metsch_pulcherrima, showed similar or higher hydrophobicity to the control strain, with the highest hydrophobicity in 16_Hans_uvarum (93.83%), 27_Sacch_cerevisiae (90.70%) and 37_Sacch_cerevisiae (90.87%).

Pizzolitto et al. suggest that an autoaggregation rate at 80% or higher should be considered as high [47]. For all examined strains, autoaggregation rates increased with time exceeding above 80% after 24 h and were higher than values obtained for strains derived from various food environments tested by Fernandez-Pacheco [12]. Similar results for wine-derived strains were presented by Vergara Alvarez et al. [27].

According to Gil-Rodriguez et al., 2015, the antioxidant activity of yeasts can be a result of their cell walls and other cellular compounds and sometimes even higher than in lactic acid bacteria [40]. In the study, antioxidant activity levels of tested isolates were close to those of the control, *S. cerevisiae* var. *boulardii*.

Despite some yeast strains exhibiting antimicrobial properties (i.e., *M. pulcherrima* known for its ability to produce antimicrobial pulcherrimin), none of the tested strains showed such properties against tested pathogenic bacteria, which was consistent with the results of other researchers [30,57,58].

As a safety aspect, no hemolytic activity was present in our wine-derived strains. That is a result comparable to those obtained by Corbu et al., 2023, and Fernández-Pacheco et al., 2021 [59,60]. However, the strains 27_Sacch_cerevisiae, 32_Pich_kluyveri and 34_Metsch_pulcherrima showed the ability to produce biogenic amines (BAs) that excludes them as candidates for potentially probiotic strains [43], despite their promising properties in previous assays, due to potential risks for consumers [61,62]. Both Caruso et al., 2001, and Delgado-Ospina et al., 2021, showed that strains belonging to *M. pulcherrima*, *S. cerevisiae* and *P. kluyveri* might produce BAs [63,64]. Comparing the number of the strains producing BAs to the total number of strains in their and our study (where only three of all strains produced BAs) the result can be surprising, especially in the context of places of isolation—wine, in which the presence of biogenic amines formed during the fermentation process is not unusual and influences the sensory properties of wine. Our findings are closer to results obtained by Landete et al., 2007, where none of the examined wine-derived yeast strains produced BAs [65].

All tested strains presented a wide range of enzymatic activity including enzymes that break down proteins and sugars like esterases, lipase, arylamidases and α -glucosidase, which may confer a potential improvement on food digestion. Moreover, none of the strains presented any activity of trypsin (the enzyme that can be related with pathogenicity of some microorganisms in human) or β -Glucuronidase related to transformation of pre-carcinogens into carcinogens and stimulation of colon cancer [66,67]. Activity of enzyme aminopeptidases like arylamidases and esterases may influence product properties because of their biotransformation ability [21,67–69]. Four strains also presented activity of N-acetyl- β -glucosaminidase, an enzyme with the primary functions of targeting and

hydrolyzing oligosaccharides containing chitin [70] that may possibly arise in the biocontrol and biotransformation of some fungal- and invertebrate-based foods.

5. Conclusions

Our data show that Polish wines may be a source of yeast isolates with probiotic potential. Environmental conditions that occur during the must fermentation can help to preselect yeast for some desirable probiotic traits like low pH tolerance. Although isolates obtained during the study were sensitive for high temperature, 52.3% of strains were not able to grow and survive at 37 °C. One of the potential hypotheses of such a result may be due to the climate in Poland, which, despite global warming, does not force the local yeast populations to evolve towards higher temperature tolerance, but further studies will be needed.

The strains with the highest resistance to the conditions in the gastrointestinal tract belong to the species: *Hanseniaspora uvarum* (15_Hans_uvarum and 16_Hans_uvarum), *Metschnikowia pulcherrima* (34_Metsch_pulcherrima and 36_Metsch_pulcherrima) and *Saccharomyces cerevisiae* (37_Sacch_cerevisiae). These strains exceeded the 100% survival rate at GIT conditions and at least doubled the survival rate showed by commercial probiotic yeast *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* CNCM I-745, which suggests their high adaptation to such harsh conditions and may allow a reduction in dosage in the case of probiotic administration.

Besides their ability to survive in GIT conditions, four of the five mentioned isolates showed high hydrophobicity and autoaggregation, which are highly desirable traits in probiotic strains, with the exception of 36_Metsch_pulcherrima with the lowest hydrophobicity rate among all tested strains. Antioxidant activities of tested isolates were close to the control *S. cerevisiae* var. *boulardii*. Unfortunately, the strains did not show the ability to inhibit the growth of common foodborne pathogens.

The selected strains showed valuable enzymatic activities necessary in food digestion and did not have activities of undesirable enzymes such as trypsin and β -glucuronidase.

As a safety aspect, none of the strains presented hemolytic activity, but 34_Metsch_pulcherrima produced biogenic amines; thus, regardless of its other promising characteristics, it cannot be considered as a probiotic yeast candidate.

Here, we can suggest some improvements in the experimental design in future—in case of screening high number of isolates, we suggest screening the tolerance for both temperature and GIT condition at first and moving forward to testing the traits related to the virulence and safety aspects, which will allow a reduction in costs and workload, in the case of experiments where high number of isolates may present such undesirable traits.

In our opinion, Polish wines may be a source of potentially probiotic yeasts and based on our results we suggest 15_Hans_uvarum, 16_Hans_uvarum and 37_Sacch_cerevisiae as encouraging probiotic yeast candidates with perspectives for further research in aspects including food science, development of probiotic formulations, etc.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/foods12183392/s1>, Spreadsheet S1: Figure_5_Tukey_results, Figure_6_Tukey_results.

Author Contributions: Conceptualization, A.S. and M.K.-W.; methodology, A.S. and M.K.-W.; software, A.S.; validation, M.K.-W.; formal analysis, A.S.; investigation, A.S.; resources, A.S.; data curation, A.S.; writing—original draft preparation, A.S.; writing—review and editing, M.K.-W. and A.S.; visualization, A.S.; supervision, M.K.-W.; project administration, A.S.; funding acquisition, A.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: Doctoral School of the University of Life Sciences in Lublin, Grant Number: SzD/18/TZ /2021.

Data Availability Statement: Data will be made available on request.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Sanders, M.E.; Merenstein, D.J.; Reid, G.; Gibson, G.R.; Rastall, R.A. Probiotics and Prebiotics in Intestinal Health and Disease: From Biology to the Clinic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2019**, *16*, 605–616. [\[CrossRef\]](#)
- Wang, B.; Yao, M.; Lv, L.; Ling, Z.; Li, L. The Human Microbiota in Health and Disease. *Engineering* **2017**, *3*, 71–82. [\[CrossRef\]](#)
- Morelli, L.; Capurso, L. FAO/WHO Guidelines on Probiotics: 10 Years Later. *J. Clin. Gastroenterol.* **2012**, *46*, S1–S2. [\[CrossRef\]](#)
- Staniszewski, A.; Kordowska-Wiater, M. Probiotic and Potentially Probiotic Yeasts—Characteristics and Food Application. *Foods* **2021**, *10*, 1306. [\[CrossRef\]](#)
- Jarocki, P.; Komoń-Janczara, E.; Młodzieńska, A.; Sadurski, J.; Kołodzieńska, K.; Łaczmański, Ł.; Panek, J.; Frać, M. Occurrence and Genetic Diversity of Prophage Sequences Identified in the Genomes of *L. Casei* Group Bacteria. *Sci. Rep.* **2023**, *13*, 8603. [\[CrossRef\]](#)
- McFarland, L.V. From Yaks to Yogurt: The History, Development, and Current Use of Probiotics. *Clin. Infect. Dis.* **2015**, *60*, S85–S90. [\[CrossRef\]](#)
- Czerucka, D.; Piche, T.; Rampal, P. Review Article: Yeast as Probiotics—*Saccharomyces Boulardii*. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2007**, *26*, 767–778. [\[CrossRef\]](#)
- Zhang, F.; Aschenbrenner, D.; Yoo, J.Y.; Zuo, T. The Gut Mycobiome in Health, Disease, and Clinical Applications in Association with the Gut Bacterial Microbiome Assembly. *Lancet Microbe* **2022**, *3*, e969–e983. [\[CrossRef\]](#)
- Abid, R.; Waseem, H.; Ali, J.; Ghazanfar, S.; Ali, G.M.; Elashbali, A.M.; Alharethi, S.H. Probiotic Yeast *Saccharomyces*: Back to Nature to Improve Human Health. *J. Fungi* **2022**, *8*, 444. [\[CrossRef\]](#)
- Chen, L.S.; Ma, Y.; Maubois, J.L.; He, S.H.; Chen, L.J.; Li, H.M. Screening for the Potential Probiotic Yeast Strains from Raw Milk to Assimilate Cholesterol. *Dairy Sci. Technol.* **2010**, *90*, 537–548. [\[CrossRef\]](#)
- Arévalo-Villena, M.; Fernandez-Pacheco, P.; Castillo, N.; Bevilacqua, A.; Briones Pérez, A. Probiotic Capability in Yeasts: Set-up of a Screening Method. *LWT* **2018**, *89*, 657–665. [\[CrossRef\]](#)
- Fernandez-Pacheco Rodríguez, P.; Arévalo-Villena, M.; Zaparoli Rosa, I.; Briones Pérez, A. Selection of Potential Non-*Saccharomyces* Probiotic Yeasts from Food Origin by a Step-by-Step Approach. *Food Res. Int.* **2018**, *112*, 143–151. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Angulo, M.; Ramos, A.; Reyes-Becerril, M.; Guerra, K.; Monreal-Escalante, E.; Angulo, C. Probiotic *Debaryomyces hansenii* CBS 8339 Yeast Enhanced Immune Responses in Mice. *3 Biotech* **2023**, *13*, 28. [\[CrossRef\]](#)
- Homayouni-Rad, A.; Azizi, A.; Oroojzadeh, P.; Pourjafar, H. *Kluyveromyces Marxianus* as a Probiotic Yeast: A Mini-Review. *Curr. Nutr. Food Sci.* **2020**, *16*, 1163–1169. [\[CrossRef\]](#)
- Koshchayev, I.; Lavrinenko, K.; Medvedeva, P. Probiotic Drug Based on *Kluyveromyces Marxianus* for Poultry. *E3S Web Conf.* **2022**, *363*, 03070. [\[CrossRef\]](#)
- Ponomarova, O.; Gabrielli, N.; Sévin, D.C.; Mülleder, M.; Zirngibl, K.; Bullyha, K.; Andrejev, S.; Kafkia, E.; Typas, A.; Sauer, U.; et al. Yeast Creates a Niche for Symbiotic Lactic Acid Bacteria through Nitrogen Overflow. *Cell Syst.* **2017**, *5*, 345–357. [\[CrossRef\]](#)
- Sybesma, W.; Kort, R.; Lee, Y.K. Locally Sourced Probiotics, the next Opportunity for Developing Countries? *Trends Biotechnol.* **2015**, *33*, 197–200. [\[CrossRef\]](#)
- Tamang, J.P.; Lama, S. Probiotic Properties of Yeasts in Traditional Fermented Foods and Beverages. *J. Appl. Microbiol.* **2022**, *132*, 3533–3542. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Kunyeit, L.; Rao, R.P.; Anu-Appaiah, K.A. Yeasts Originating from Fermented Foods, Their Potential as Probiotics and Therapeutic Implication for Human Health and Disease. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2023**, *1*–12. [\[CrossRef\]](#)
- de Miranda, N.M.Z.; de Souza, A.C.; de Souza Costa Sobrinho, P.; Dias, D.R.; Schwan, R.F.; Ramos, C.L. Novel Yeasts with Potential Probiotic Characteristics Isolated from the Endogenous Ferment of Artisanal Minas Cheese. *Brazilian J. Microbiol.* **2023**, *54*, 1021–1033. [\[CrossRef\]](#)
- Pytko, M.; Kordowska-Wiater, M.; Wajs, J.; Glibowski, P.; Sajnaga, E. Usefulness of Potentially Probiotic *L. lactis* Isolates from Polish Fermented Cow Milk for the Production of Cottage Cheese. *Appl. Sci.* **2022**, *12*, 12088. [\[CrossRef\]](#)
- Cioch-Skoneczny, M.; Satora, P.; Skoneczny, S.; Skotniczny, M. Biodiversity of Yeasts Isolated during Spontaneous Fermentation of Cool Climate Grape Musts. *Arch. Microbiol.* **2021**, *203*, 153–162. [\[CrossRef\]](#)
- García-Ruiz, A.; González de Llano, D.; Esteban-Fernández, A.; Requena, T.; Bartolomé, B.; Moreno-Arribas, M.V. Assessment of Probiotic Properties in Lactic Acid Bacteria Isolated from Wine. *Food Microbiol.* **2014**, *44*, 220–225. [\[CrossRef\]](#)
- Marzano, M.; Fosso, B.; Manzari, C.; Grieco, F.; Intrano, M.; Cozzi, G.; Mulè, G.; Scioscia, G.; Valiente, G.; Tullo, A.; et al. Complexity and Dynamics of the Winemaking Bacterial Communities in Berries, Musts, and Wines from Apulian Grape Cultivars through Time and Space. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0157383. [\[CrossRef\]](#)
- Kordowska-Wiater, M.; Pytko, M.; Stój, A.; Kubik-Komar, A.; Wroblek, J.; Was'ko, A. A Metagenetic Insight into Microbial Diversity of Spontaneously Fermented Polish Red Wines and an Analysis of Selected Physicochemical Properties. *Appl. Sci.* **2022**, *12*, 4373. [\[CrossRef\]](#)
- Sirén, K.; Mak, S.S.T.; Melkonian, C.; Carøe, C.; Swiegers, J.H.; Molenaar, D.; Fischer, U.; Thomas, P.; Gilbert, M. Taxonomic and Functional Characterization of the Microbial Community During Spontaneous in Vitro Fermentation of Riesling Must. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 697. [\[CrossRef\]](#)

27. Vergara Alvarez, S.C.; Leiva Alaniz, M.J.; Mestre Furlani, M.V.; Vazquez, F.; Mancha Agresti, P.; Cristina Nally, M.; Paola Maturano, Y. Bioprospecting of the Probiotic Potential of Yeasts Isolated from a Wine Environment. *Fungal Genet. Biol.* **2023**, *164*, 103767. [CrossRef]
28. Vilela, A.; Cosme, F.; Inês, A. Wine and Non-Dairy Fermented Beverages: A Novel Source of Pro-and Prebiotics. *Fermentation* **2020**, *6*, 113. [CrossRef]
29. Rayavarapu, B.; Tallapragada, P. Evaluation of Potential Probiotic Characters of *Lactobacillus fermentum*. *Sci. Study Res. Chem. Chem. Eng. Biotechnol. Food Ind.* **2019**, *20*, 183–197.
30. Agarbati, A.; Canonico, L.; Marini, E.; Zannini, E.; Ciani, M.; Comitini, F. Potential Probiotic Yeasts Sourced from Natural Environmental and Spontaneous Processed Foods. *Foods* **2020**, *9*, 287. [CrossRef]
31. Przybek, P. Winnice w Polsce Mapa 581 Polskich Winnic Winogrodnicy.PL. Available online: <http://winogrodnicy.pl/> (accessed on 11 July 2023).
32. Drozd, I.; Makarewicz, M.; Sroka, P.; Satora, P.; Jankowski, P. Comparison of the Yeast Microbiota of Different Varieties of Cool-Climate Grapes by PCR-RAPD. *Potravin. Slovak J. Food Sci.* **2015**, *9*, 293–298. [CrossRef]
33. White, T.J.; Bruns, T.D.; Lee, S.B.; Taylor, J.W. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. In *PCR-Protocols and Applications—A Laboratory Manual*; Academic Press Inc.: Cambridge, MA, USA, 1990; pp. 315–322. ISBN 0-12-372180-6.
34. Altschul, S.F.; Boguski, M.S.; Gish, W.; Wootton, J.C. Issues in Searching Molecular Sequence Databases. *Nat. Genet.* **1994**, *6*, 119–129. [CrossRef]
35. Sanders, E.R. Aseptic Laboratory Techniques: Plating Methods. *J. Vis. Exp.* **2012**, *63*, e3064. [CrossRef]
36. Buck, J.D.; Cleverdon, R.C. The Spread Plate As A Method For The Enumeration Of Marine Bacteria. *Limnol. Oceanogr.* **1960**, *5*, 78–80. [CrossRef]
37. Amorim, J.C.; Piccoli, R.H.; Duarte, W.F. Probiotic Potential of Yeasts Isolated from Pineapple and Their Use in the Elaboration of Potentially Functional Fermented Beverages. *Food Res. Int.* **2018**, *107*, 518–527. [CrossRef]
38. Perricone, M.; Bevilacqua, A.; Corbo, M.R.; Sinigaglia, M. Technological Characterization and Probiotic Traits of Yeasts Isolated from Altamura Sourdough to Select Promising Microorganisms as Functional Starter Cultures for Cereal-Based Products. *Food Microbiol.* **2014**, *38*, 26–35. [CrossRef]
39. Syal, P.; Vohra, A. Probiotic Potential of Yeasts Isolated From Traditional Indian Fermented Foods. *Int. J. Microbiol. Res.* **2013**, *5*, 390–398. [CrossRef]
40. Gil-Rodríguez, A.M.; Carrascosa, A.V.; Requena, T. Yeasts in Foods and Beverages: In Vitro Characterisation of Probiotic Traits. *LWT-Food Sci. Technol.* **2015**, *64*, 1156–1162. [CrossRef]
41. Magaldi, S.; Mata-Essayag, S.; Hartung de Capriles, C.; Perez, C.; Colella, M.; Olaizola, C.; Ontiveros, Y.; Ellis, M.; Ain, A. Well Diffusion for Antifungal Susceptibility Testing. *Int. J. Infect. Dis.* **2004**, *8*, 39–45. [CrossRef]
42. Balouiri, M.; Sadiki, M.; Ibnsouda, S.K. Methods for in Vitro Evaluating Antimicrobial Activity: A Review. *J. Pharm. Anal.* **2016**, *6*, 71. [CrossRef]
43. Aslankooi, E.; Herrera-Malaver, B.; Rezaei, M.N.; Steensels, J.; Courtin, C.M.; Verstrepen, K.J. Non-Conventional Yeast Strains Increase the Aroma Complexity of Bread. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0165126. [CrossRef]
44. Jung, M.Y.; Lee, C.; Seo, M.J.; Roh, S.W.; Lee, S.H. Characterization of a Potential Probiotic Bacterium *Lactococcus raffinolactis* WiKim0068 Isolated from Fermented Vegetable Using Genomic and in Vitro Analyses. *BMC Microbiol.* **2020**, *20*, 136. [CrossRef]
45. Bautista-Gallego, J.; Arroyo-López, F.N.; Rantsiou, K.; Jiménez-Díaz, R.; Garrido-Fernández, A.; Cocolin, L. Screening of Lactic Acid Bacteria Isolated from Fermented Table Olives with Probiotic Potential. *Food Res. Int.* **2013**, *50*, 135–142. [CrossRef]
46. Pan, W.H.; Li, P.L.; Liu, Z. The Correlation between Surface Hydrophobicity and Adherence of Bifidobacterium Strains from Centenarians' Faeces. *Anaerobe* **2006**, *12*, 148–152. [CrossRef]
47. Pizzolitto, R.P.; Armando, M.R.; Salvano, M.A.; Dalcero, A.M.; Rosa, C.A. Evaluation of *Saccharomyces cerevisiae* as an Antiaflatogenic Agent in Broiler Feedstuffs. *Poult. Sci.* **2013**, *92*, 1655–1663. [CrossRef]
48. Nadai, C.; Giacomini, A.; Corich, V. The Addition of Wine Yeast *Starmerella bacillaris* to Grape Skin Surface Influences Must Fermentation and Glycerol Production. *OENO One* **2021**, *55*, 47–55. [CrossRef]
49. Englezos, V.; Giacosa, S.; Rantsiou, K.; Rolle, L.; Cocolin, L. *Starmerella bacillaris* in Winemaking: Opportunities and Risks. *Curr. Opin. Food Sci.* **2017**, *17*, 30–35. [CrossRef]
50. Masneuf-Pomarede, I.; Juquin, E.; Miot-Sertier, C.; Renault, P.; Laizet, Y.; Salin, F.; Alexandre, H.; Capozzi, V.; Cocolin, L.; Colonna-Ceccaldi, B.; et al. The Yeast *Starmerella bacillaris* (Synonym *Candida zemplinina*) Shows High Genetic Diversity in Winemaking Environments. *FEMS Yeast Res.* **2015**, *15*, 11. [CrossRef]
51. Drumonde-Neves, J.; Franco-Duarte, R.; Lima, T.; Schuller, D.; Pais, C. Yeast Biodiversity in Vineyard Environments Is Increased by Human Intervention. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0160579. [CrossRef] [PubMed]
52. Pretorius, I.S.; Van der Westhuizen, T.J.; Augustyn, O.P.H. Yeast Biodiversity in Vineyards and Wineries and Its Importance to the South African Wine Industry: A Review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **1999**, *20*, 61–70. [CrossRef]
53. Capozzi, V.; Garofalo, C.; Chiriatti, M.A.; Grieco, F.; Spano, G. Microbial Terroir and Food Innovation: The Case of Yeast Biodiversity in Wine. *Microbiol. Res.* **2015**, *181*, 75–83. [CrossRef]
54. Shen, Y.; Bai, X.; Zhang, Y.; Gao, Q.; Bu, X.; Xu, Y.; Guo, N. Evaluation of the Potential Probiotic Yeast Characteristics with Anti-MRSA Abilities. *Probiotics Antimicrob. Proteins* **2022**, *14*, 727–740. [CrossRef]

55. Turk, M.; Abramovic', Z.; Plemenitaš, A.; Gunde-Cimerman, N. Salt Stress and Plasma-Membrane Fluidity in Selected Extremophilic Yeasts and Yeast-like Fungi. *FEMS Yeast Res.* **2007**, *7*, 550–557. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Menezes, A.G.T.; Ramos, C.L.; Cenzi, G.; Melo, D.S.; Dias, D.R.; Schwan, R.F. Probiotic Potential, Antioxidant Activity, and Phytase Production of Indigenous Yeasts Isolated from Indigenous Fermented Foods. *Probiotics Antimicrob. Proteins* **2020**, *12*, 280–288. [[CrossRef](#)]
57. Sipiczki, M. *Metschnikowia pulcherrima* and Related Pulcherrimin-Producing Yeasts: Fuzzy Species Boundaries and Complex Antimicrobial Antagonism. *Microorganisms* **2020**, *8*, 1029. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Tenea, G.N.; Anrango Cajas, B.; Carlosama Sanchez, B. Inhibitory-like Substances Produced by Yeasts Isolated from Andean Blueberries: Prospective Food Antimicrobials. *Foods* **2023**, *12*, 2435. [[CrossRef](#)]
59. Corbu, V.M.; Csutak, O. Molecular and Physiological Diversity of Indigenous Yeasts Isolated from Spontaneously Fermented Wine Wort from Ilfov County, Romania. *Microorganisms* **2023**, *11*, 37. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Fernández-Pacheco, P.; Ramos Monge, I.M.; Fernández-González, M.; Poveda Colado, J.M.; Arévalo-Villena, M. Safety Evaluation of Yeasts With Probiotic Potential. *Front. Nutr.* **2021**, *8*, 239. [[CrossRef](#)]
61. Matukas, M.; Starkute, V.; Zokaityte, E.; Zokaityte, G.; Klupsaite, D.; Mockus, E.; Rocha, J.M.; Ruibys, R.; Bartkiene, E. Effect of Different Yeast Strains on Biogenic Amines, Volatile Compounds and Sensory Profile of Beer. *Foods* **2022**, *11*, 2317. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Stój, A.; Płotka-Wasyłka, J.; Simeonov, V.; Kaplan, M. The Content of Biogenic Amines in Rondo and Zweigelt Wines and Correlations between Selected Wine Parameters. *Food Chem.* **2022**, *371*, 131172. [[CrossRef](#)]
63. Delgado-Ospina, J.; Acquaticci, L.; Molina-Hernandez, J.B.; Rantsiou, K.; Martuscelli, M.; Kamgang-Nzekoue, A.F.; Vittori, S.; Paparella, A.; Chaves-López, C. Exploring the Capability of Yeasts Isolated from Colombian Fermented Cocoa Beans to Form and Degrade Biogenic Amines in a Lab-Scale Model System for Cocoa Fermentation. *Microorganisms* **2020**, *9*, 28. [[CrossRef](#)]
64. Caruso, M.; Fiore, C.; Contursi, M.; Salzano, G.; Paparella, A.; Romano, P. Formation of Biogenic Amines as Criteria for the Selection of Wine Yeasts. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2002**, *18*, 159–163. [[CrossRef](#)]
65. Landete, J.M.; Ferrer, S.; Pardo, I. Biogenic Amine Production by Lactic Acid Bacteria, Acetic Bacteria and Yeast Isolated from Wine. *Food Control* **2007**, *18*, 1569–1574. [[CrossRef](#)]
66. Tanner, A.C.R.; Strzempko, M.N.; Belsky, C.A.; McKinley, G.A. API ZYM and API An-Ident Reactions of Fastidious Oral Gram-Negative Species. *J. Clin. Microbiol.* **1985**, *22*, 333–335. [[CrossRef](#)]
67. Monteagudo-Mera, A.; Caro, I.; Rodriguez-Aparicio, L.B.; Rua, J.; Ferrero, M.A.; Garcia-Armesto, M.R. Characterization of Certain Bacterial Strains for Potential Use as Starter or Probiotic Cultures in Dairy Products. *J. Food Prot.* **2011**, *74*, 1379–1386. [[CrossRef](#)]
68. Valderrama, B.; Ruiz, J.J.; Gutiérrez, M.S.; Alveal, K.; Caruffo, M.; Oliva, M.; Flores, H.; Silva, A.; Toro, M.; Reyes-Jara, A.; et al. Cultivable Yeast Microbiota from the Marine Fish Species *Genypterus chilensis* and *Serirolella violacea*. *J. Fungi* **2021**, *7*, 515. [[CrossRef](#)]
69. Lee, N.-K.; Hong, J.-Y.; Yi, S.-H.; Hong, S.-P.; Lee, J.-E.; Paik, H.-D. Bioactive Compounds of Probiotic *Saccharomyces cerevisiae* Strains Isolated from Cucumber *Jangajji*. *J. Funct. Foods* **2019**, *58*, 324–329. [[CrossRef](#)]
70. Patil, R.S.; Ghormade, V.; Deshpande, M.V. Chitinolytic Enzymes: An Exploration. *Enzyme Microb. Technol.* **2000**, *26*, 473–483. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Article

Probiotic Yeasts and How to Find Them—From Spoilage to Probiotic

Adam Staniszewski ¹, Patrycja Staniszewska ² and Monika Kordowska-Wiater ^{1,*}

¹ Department of Biotechnology, Microbiology and Human Nutrition, University of Life Sciences in Lublin, Skromna 8, 20-704 Lublin, Poland; adam.staniszewski@up.lublin.pl

² Department of Invertebrate Ecophysiology and Experimental Biology, University of Life Sciences in Lublin, Dos'wiadczalna 50a, 20-280 Lublin, Poland; patrycja.staniszewska@up.lublin.pl

* Correspondence: monika.kordowska-wiater@up.lublin.pl

Abstract: In the last decade, probiotic yeasts have gained more attention from the scientific community. However, over the decades, researchers have mostly viewed spoilage yeasts as unnecessary and unwanted contamination without considering any of their potentially positive properties. This often led to oversights and the loss of many potentially interesting yeast strains. In this study, we have screened multiple spoilage yeast strains from various spoiled food products and assessed their potential as probiotic candidates. Within this research, we identified two promising probiotic candidates, 113_Metsch_pulcherrima and 101_Pich_kudriavzevii.

Keywords: probiotic yeasts; spoilage yeasts; food microbiology; *Metschnikowia pulcherrima*; *Pichia kudriavzevii*; antioxidant activity; gastrointestinal survival; autoaggregation

1. Introduction

Yeasts are found in a variety of environments where they can ferment available substrates. The fermentation process involves the conversion of complex compounds (primarily carbohydrates) into simpler ones with the simultaneous production of various beneficial metabolites. Generally, fermentation is the preferred process undertaken by yeasts to produce a specific product enriched with nutrients and to protect it against pathogens [1]. The fermentation of carbohydrates such as glucose, fructose, sucrose, or maltose is the basis for the growth and development of yeast in facultative anaerobic conditions. Because sugars are common in foods, especially those of plant origin, their fermentation is crucial in microbial infections caused by yeast. Due to their ability to present with various metabolic activities, these microorganisms can be either starter cultures, desirable in the production of fermented foods and beverages, or spoilage organisms found in many food products and capable of life and proliferation in a wide range of environmental conditions like temperature, pH, water activity, etc. Because of such properties, yeasts can cause undesirable changes in products' texture, flavour, and appearance. The above-mentioned properties might result in yeasts that are as important as they are risky. Food and beverage processing industries are forced to pay attention to microbial contamination throughout the entire production chain to avoid unwanted contamination and production losses [2–4]. On the other hand, some cases of unplanned spoilage by yeasts can result in yeasts playing a positive role in some types of fermented food, such as dairy products and beverages. In such cases, the spoilage yeast contributes to the fermentation, maturation, and development of flavour in the final products derived from cheese and alcoholic beverages, i.e., wine and craft beer are good examples [5,6]. Some of these yeasts have been considered to be novel probiotic organisms after appropriate selection procedures [3].

Fermented foods and beverages are the main sources of yeasts with probiotic potential. Their screening and identification have been gaining attention from researchers in recent years. There are an increasing number of publications in which authors describe



Citation: Staniszewski, A.; Staniszewska, P.; Kordowska-Wiater, M. Probiotic Yeasts and How to Find Them—From Spoilage to Probiotic. *Appl. Sci.* **2024**, *14*, 11698. <https://doi.org/10.3390/app142411698>

Academic Editor: Małgorzata Ziarno

Received: 6 November 2024

Revised: 5 December 2024

Accepted: 11 December 2024

Published: 15 December 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

yeast strains they have isolated from various fermented foods of plant origin. This group includes *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from spontaneously fermented wines [6,7], fermented olives [8], Indian traditional fermented foods [9], kombucha [10], Ethiopian fermented foods [11], the fermented rice beverage Chhang [12], and traditional Turkish sourdough [13]. On the other hand, non-*Saccharomyces* yeasts are becoming the object of increasing interest. The literature contains reports on the isolation and study of the potential probiotic properties of yeasts, including the following: *Candida orthopsilosis*, *C. tropicalis*, *Debaryomyces hansenii*, *Meyerozyma caribbica*, *Pichia guilliermondii* from fermented olives [8], *M. caribbica* from pineapple [14], *Hanseniaspora opuntiae*, *P. kudriavzevii*, and *Wickerhamomyces anomalus* from spontaneously fermented guajillo peppers [15], *P. kudriavzevii* from kombucha [10], *Candida humilis* and *P. kudriavzevii* from Ethiopian fermented foods [11], *Meyerozyma guilliermondii* and *M. caribbica* from Indian traditional fermented products [16], *Diutina (Candida) mesorugosa* from tempeh [17], *P. kudriavzevii* from shalgam, and *W. anomalus* from olive brine [13]. There are also reports of obtaining potentially probiotic yeasts from foods of animal origin, e.g., *P. kudriavzevii*, *P. fermentans*, and *Yarrowia lipolytica* isolated from raw milk [18], *Kluyveromyces lactis* from cheese, *Torulaspora delbrueckii* from kefir [13], and *S. cerevisiae* and *K. marxianus* from kefir [19,20]. Many of the above-mentioned species of potentially probiotic yeasts can cause negative changes in food products during uncontrolled fermentation, which means they can be treated as spoilage factors [2,3]. All the above-mentioned authors used similar screening procedures for testing probioticity in vitro, consisting of the following analyses: growth at human body temperature, survival in the gastrointestinal tract, ability to colonise mucosal surfaces, antimicrobial and antioxidant properties, antibiotic resistance, as well as cell surface properties (hydrophobicity, autoaggregation, and co-aggregation ability). Determining the safety of the tested yeast candidates (no pathogenicity or ability to produce hazardous metabolites) is also an important aspect [21]. This approach has made it possible to obtain several satisfactory isolates from among the dozen or more strains isolated.

In this research, we decided to go against the mainstream trend of fighting to reduce spoilage yeasts and instead focus on screening their probiotic properties and potential. The aim of this study was to obtain yeast isolates from various food products of plant origin, where fermentation was undesirable, and perform in vitro testing for potential probiotic and safety characteristics.

2. Materials and Methods

2.1. Yeast Strains

Twenty-seven yeast isolates originating from various types of spoiled food and beverages were obtained during the isolation procedure, which was followed according to Section 2.1.1.

As a positive control, we used the commercial strain of the probiotic yeast—*Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* CNCM I-745 (Enterol, Biocodex, Gentilly, France). The more detailed data about each strain (code names for individual strains, origin, and species) are included in Table 1.

The yeast cultures were stored frozen in 30% glycerol at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, and before use, they were cultured for 48 h at $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ in YPD broth (Yeast Extract Peptone Dextrose, BTL, Łódź, Poland). The initial optical density at 600 nm (OD₆₀₀) of each culture was assessed to maintain uniformity in the measurements. Following this, the outcomes were adjusted to an OD₆₀₀ value of 1.0 for every experiment unless specified otherwise. The purpose of such standardisation was to enable the accurate data analysis needed for the comparison of various strains.

Table 1. Yeast strains used in this study.

Strain Number	Species	Code Name	Origin/Type of Spoiled Product
052	<i>Pichia kudriavzevii</i>	052_Pich_kudriavzevii	strawberry jam
053	<i>Pichia kudriavzevii</i>	053_Pich_kudriavzevii	pumpkin jam
058	<i>Candida metapsilosis</i>	058_Cand_metapsilosis	fermented red kale
063	<i>Candida metapsilosis</i>	063_Cand_metapsilosis	fermented green kale
064	<i>Pichia manshurica</i>	064_Pich_manshurica	craft beer
075	<i>Meyerozyma caribbica</i>	075_Mey_caribbica	persemon jam
076	<i>Meyerozyma caribbica</i>	076_Mey_caribbica	persemon jam
080	<i>Candida metapsilosis</i>	080_Cand_metapsilosis	compote
083	<i>Candida metapsilosis</i>	083_Cand_metapsilosis	craft beer
085	<i>Pichia manshurica</i>	085_Pich_manshurica	craft beer
089	<i>Candida metapsilosis</i>	089_Cand_metapsilosis	compote
090	<i>Candida metapsilosis</i>	090_Cand_metapsilosis	compote
091	<i>Candida metapsilosis</i>	091_Cand_metapsilosis	compote
093	<i>Candida metapsilosis</i>	093_Cand_metapsilosis	compote
095	<i>Candida metapsilosis</i>	095_Cand_metapsilosis	compote
096	<i>Candida metapsilosis</i>	096_Cand_metapsilosis	compote
099	<i>Pichia kudriavzevii</i>	099_Pich_kudriavzevii	sourdough
101	<i>Pichia kudriavzevii</i>	101_Pich_kudriavzevii	sourdough
105	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	105_Metsch_pulcherrima	fruit juice
106	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	106_Metsch_pulcherrima	fruit juice
107	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	107_Metsch_pulcherrima	fruit juice
108	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	108_Metsch_pulcherrima	fruit juice
109	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	109_Metsch_pulcherrima	fruit juice
110	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	110_Metsch_pulcherrima	fruit juice
111	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	111_Metsch_pulcherrima	fruit juice
112	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	112_Metsch_pulcherrima	fruit wine
113	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	113_Metsch_pulcherrima	fruit wine
-	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>bouardi</i>	Sacch_boulardi	-

2.1.1. Isolation of Yeasts

Serial decimal dilutions of spoiled food samples in the range of 10^{-1} to 10^{-5} were prepared, and 0.2 mL volumes were spread on Petri dishes with a medium dedicated for yeast isolation, YGC agar (yeast extract, glucose, chloramphenicol, BTL Łódź, Poland). The plates were incubated for 3–5 days at 25 °C. The typical singular colonies of yeasts were seeded onto WL agar (Wallerstein Laboratories, Oxoid, Hampshire, UK) to confirm non-Saccharomyces strains, followed by seeding onto YPD agar, which was used twice to obtain pure cultures. Microscopic observations of vital preparations were performed to confirm the yeast presence. Pure cultures were frozen, as described above.

2.1.2. Strain Identification

To confirm the identification of the strains obtained, the 5.8S-ITS gene sequencing method was used. The procedure was carried out in accordance with Staniszewski and Kordowska-Wiater (2023) [6]. Sequencing of the amplicons was performed by Genomed (Warsaw, Poland). Contigs were assembled with the DNA Sequence Assembler v5 (Heracle

BioSoft, <https://www.dnabaser.com/> (access on 25 September 2024) and compared to the known sequences of the ITS region in the NCBI GenBank database by alignment with the BLAST algorithm, and evolutionary analyses were conducted in MEGA11. The phylogenetic tree was created based on the ITS region sequences, using the maximum likelihood method and the best-fit Kimura two-parameter model with a discrete gamma distribution (+G) and 1000 bootstrap replication [22,23].

2.2. Evaluation of Potentially Probiotic Traits

2.2.1. Growth and Survival at 37 °C

To test the strains' capability to thrive at human body temperatures, 10 µL of a fresh yeast culture was introduced into 1 mL of YPD broth and incubated at 37 °C for a period of 48 h. Survival under these specific conditions was determined by observing either growth or the absence of growth after the 48-h incubation period. If a strain demonstrated an inability to grow under these conditions, it was excluded from subsequent analyses.

2.2.2. Growth and Survival Under Gastrointestinal Tract Conditions

All the tested strains were subjected to the *in vitro* digestion procedure described by Fernandez-Pacheco et al. [24] with the modifications mentioned in Staniszewski and Kordowska-Wiater (2023) [6]. To determine the viability and growth capacity of the strains after *in vitro* digestion, serial dilutions of all samples were prepared and spread on Petri dishes with YPD agar [25]. After incubation at 37 °C for 48–72 h, the survival rate and growth were calculated as a % using the following formula:

$$\text{survival rate [\%]} = \text{number of living cells/mL after in vitro digestion} / \text{number of living cells/mL before in vitro digestion} \times 100\%$$

2.2.3. Autoaggregation Assay

The autoaggregation test was performed according to Amorim et al. [14] and Gil-Rodriguez et al. [26]. After overnight cultivation in YPD broth at 37 °C, the yeasts' biomass was centrifuged (5000 rpm, 10 min), washed twice with PBS (phosphate-buffered saline) at pH = 7, and resuspended in PBS. To evaluate autoaggregation, 3 mL of the cell suspension was vortexed for 10 s. Autoaggregation was determined spectrophotometrically after 2, 4, and 24 h of incubation at 37 °C by absorbance (A) (OD₆₀₀).

It was expressed as a % using the following formula:

$$\text{Autoaggregation [\%]} = [1 - (A_t/A_0)] \times 100\%$$

where A_t is the absorbance at 2, 4, or 24 h and A_0 is at zero time.

2.2.4. Hydrophobicity Assay

The hydrophobicity of the cell surface was evaluated according to the method described by Amorim et al. [14]. One milliliter of fresh culture was centrifuged (5000 rpm, 10 min), then the yeast biomass was washed twice and resuspended in 5 mL of PBS at pH = 7. A mixture of 3 mL of yeast suspension and 1 mL of xylene was vigorously vortexed for 2 min and then allowed to settle undisturbed at 37 °C for 30 min to allow the complete separation of the phases. After carefully removing the aqueous phase, the absorbance at 600 nm was measured spectrophotometrically. The value for the decrease in absorbance was taken as a measure of cell surface hydrophobicity and calculated with the following formula:

$$\text{Hydrophobicity [\%]} = [1 - ((\text{OD}_{\text{initial}} - \text{OD}_{\text{final}}) / \text{OD}_{\text{initial}})] \times 100\%$$

where $\text{OD}_{\text{initial}}$ and OD_{final} are the absorbance (at 600 nm) before and after extraction with xylene.

2.2.5. Antioxidant Activity

To evaluate the antioxidant activity of each strain, an assay was performed according to the method of Gil-Rodriguez et al. [26]. One milliliter of yeast culture in YPD broth was centrifuged (5000 rpm, 10 min), washed twice with a sterile 0.9% NaCl solution, and the pellet was resuspended in 1 mL of this physiological saline. In the next step, one mL of a DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) solution (0.2 mM in methanol) was added to the cell suspension (800 µL) in a new tube. After vortexing, the blend was incubated in darkness at room temperature for 30 min. After incubation, the reaction tubes were centrifuged (12,000 rpm, 5 min), and 300 µL of each supernatant was transferred to a 96-well plate to measure the absorbance at 517 nm (A_{517}). The percentage reduction in DPPH was then calculated with the formula:

$$\text{Percentage of reduction of DPPH [\%]} = [(A_{517 \text{ control}} - A_{517 \text{ sample}})/A_{517 \text{ control}}] \times 100\%$$

where $A_{517 \text{ control}}$ —the absorbance of the control (DPPH solution without yeast), $A_{517 \text{ sample}}$ —the absorbance of the sample (yeast culture treated with DPPH solution).

2.2.6. Antimicrobial Activity

To estimate the antimicrobial activity of the yeast strains against various bacterial species, we used the well-diffusion method [27]. Within the experiment, the yeasts' antimicrobial activity was tested against the following Gram-positive bacteria: *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, and *Staphylococcus aureus*, as well as the following Gram-negative ones: *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* obtained from the culture collection of the Department of Biotechnology, Microbiology and Human Nutrition of University of Life Sciences in Lublin (Poland). The bacteria were cultivated in BHI (Brain Heart Infusion) broth at 37 °C overnight, and 1 mL of each culture was inoculated onto BHI agar plates, spread, and left to allow for absorption of the liquid. Next, three wells (5 mm diameter each) were cut in an inoculated agar medium at equal intervals between each other and filled with fresh yeast culture. Incubation of the plates was carried out at 37 °C for 24 h, and the bacterial growth inhibition zones around the wells were measured.

2.3. Safety and Virulence Related Traits

2.3.1. Haemolytic Activity

The yeast inoculum was streaked onto blood agar plates (Columbia agar supplemented with 5% defibrinised sheep's blood, Biomaxima, Lublin, Poland). The plates were incubated at 37 °C for 72 h. After the incubation, the plates were observed for any signs of haemolysis. *Staphylococcus aureus*, known to exhibit haemolysis, was used as a positive control in the experiment.

2.3.2. Biogenic Amine Production

Biogenic amine (BA) production for each yeast strain was evaluated using the method described by Aslankoohi et al. [28] with the modifications mentioned in Staniszeński and Kordowska-Wiater (2023) [6]. The strains producing BAs present with a purple halo surrounding the growth area, representing the decarboxylation of amino acids, while those that do not produce BAs exhibit a yellow halo showing only glucose fermentation.

2.4. Enzymatic Activity

We used the API ZYM system (bio-Merieux, Craaponne, France) to determine the enzymatic activities of the strains, following the instructions provided by the manufacturer. We prepared yeast cell suspensions and transferred them into the wells of the API ZYM strips. The strips were then incubated at 37 °C for 4 h. After the incubation period, we added one drop of reagent ZYM A and one drop of reagent ZYM B to each well. The colour changes observed in the wells were noted and used for evaluation using the API ZYM colour chart [29].

2.5. Statistical Analysis

Statistical analysis of the obtained results was carried out using Statistica ver. 13.3 (2017) for Windows (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). One-way ANOVA followed by Tukey HSD post hoc tests ($p < 0.05$) were used to compare the results for survivability, hydrophobicity, and antioxidant activity for each strain, and the mixed two-way ANOVA was used to evaluate the level of autoaggregation for those strains tested after 2, 4, and 24 h. Detailed results of the analyses are included in the Supplementary Materials.

3. Results and Discussion

3.1. Strain Identification

The isolation procedure for obtaining yeast from fermented products allowed us to obtain morphologically different yeasts that have been subjected to genetic identification. We identified and isolated twenty-seven strains to the species level. These strains belonged to four genera and six species, as follows: *Candida metapsilosis*, *Candida zeylanoides*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Meyerozyma caribbica*, *Pichia kudriavzevii*, and *Pichia manshurica*. Figure 1 presents the results of the phylogenetic analysis. The isolates obtained from the WL medium grew in the form of green colonies of various morphologies, confirming that they did not belong to the *Saccharomyces* genus. Most of the obtained species were isolated from food of plant origin found in many parts of the world by other researchers and described in the literature as having probiotic potential based on the in vitro analyses presented below [8,10,11,13,15,16].

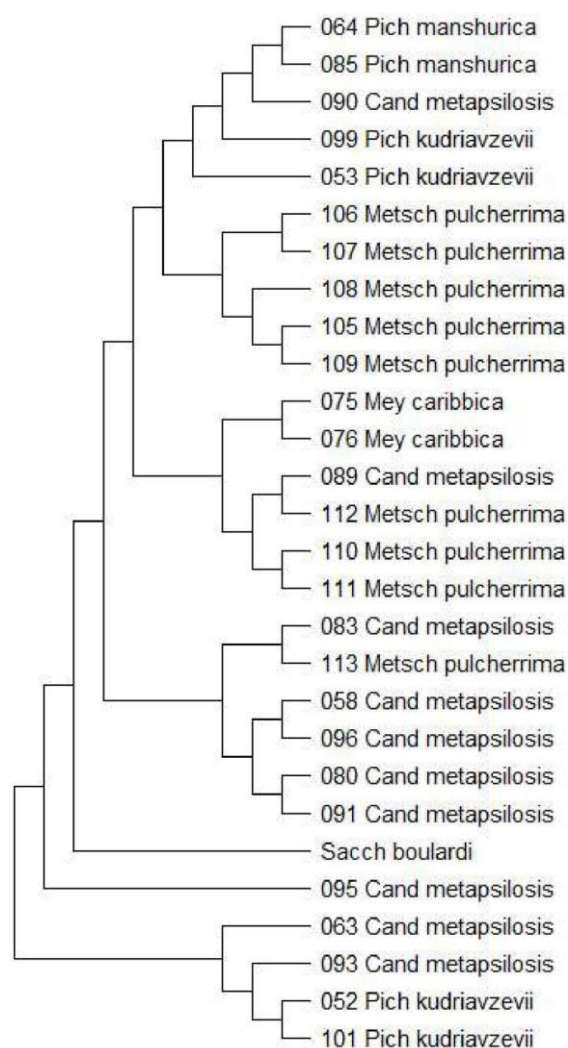


Figure 1. Maximum likelihood tree of the studied isolates based on ITS sequences.

3.2. Evaluation of Potentially Probiotic Traits

3.2.1. Growth and Survival at 37 °C

All the tested strains grew at 37 °C, meeting the basic selection criterion for being viable in a human body. Previous studies have shown that strains of the above-mentioned species were able to grow at human body temperatures, e.g., *Metschnikowia* species [6,28], *P. kudriavzevi* [10,11,13,15], and *M. caribica* [8,14,16].

3.2.2. Growth and Survival Under Gastrointestinal Tract Conditions

All the examined strains were subjected to in vitro digestion and presented with various survival abilities under simulated gastrointestinal (GI) conditions (Figure 2). Only 11 strains showed the same or higher survivability than the positive control (commercial probiotic *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*), with survivability at 48.70% in experimental conditions. These strains belonged to *Candida metapsilosis* (058_Cand_metapsilosis, 66.22%), *Metschnikowia pulcherrima* (105_Metsch_pulcherrima, 52.18%; 107_Metsch_pulcherrima, 54.31%; 110_Metsch_pulcherrima, 85.25%; 111_Metsch_pulcherrima, 71.55%; 112_Metsch_pulcherrima, 62.37%; and 113_Metsch_pulcherrima, 104.99%), and *Pichia kudriavzevii* (052_Pich_kudriavzevii, 100.61%; 053_Pich_kudriavzevii, 103.47%; 099_Pich_kudriavzevii, 82.44%; and 101_Pich_kudriavzevii, 78.94%). Similar to the findings from our last study, where yeast strains were derived from wines, some strains of *Hanseniaspora uvarum*, *Metschnikowia pulcherrima*, and *Saccharomyces cerevisiae* presented with above 100% survivability rates, which may suggest that GI tract conditions favour their proliferation [6]. In the cases of spoilage yeast, three out of the twenty-seven strains presented with such properties, including two *Pichia kudriavzevii* (052_Pich_kudriavzevii; 053_Pich_kudriavzevii) and one *Metschnikowia pulcherrima* (113_Metsch_pulcherrima). A similarly high ability to survive the GI tract was found for *M. pulcherrima*, and its probiotic potential is presented by Al-Nijir et al., 2024 [30] and Abolghasemi et al. [31]. Also, in the case of *P. kudriavzevii*, various authors present its promising ability to survive GI tract conditions and suggest its probiotic potential [10,11,15,19,32–35]. Aydin et al. [13] isolated six strains of *P. kudriavzevi* from fermented products like traditional cheese, sourdough, olive brine, and Shalgam, which showed survival rates ranging from 51% to 84.4% for the most resistant strains and yielded similar results to those presented here. In the other article, Piraine et al. [33] described the food-derived strain *Pichia kluyveri* LAR001 which showed probiotic potential and properties that may allow its use in further beverage production. Strains with survivability lower than the *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* CNCM I-745 were excluded from further studies.

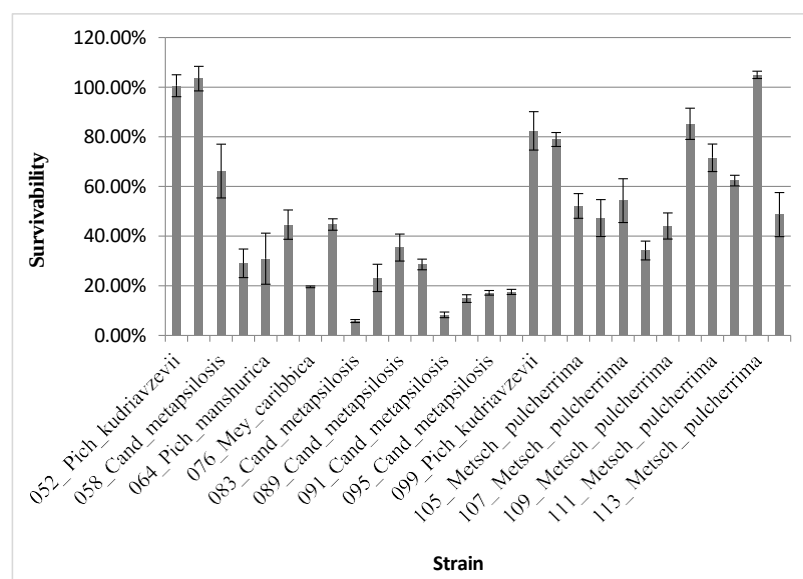


Figure 2. Survival of examined strains under gastrointestinal tract conditions (One-Way ANOVA: strain: $F(27,56) = 85.544$, $p = 0.0000$, $se \pm 0.031514$).

3.2.3. Autoaggregation Assay

The assessment of autoaggregation ability, next to hydrophobicity, allows for the estimation of the behaviour of the studied strains in the conditions of the digestive system, and values above eighty percent are considered high [14,36]. Each of the studied strains demonstrated autoaggregation values above 80%, except for 110_Metsch_pulcherrima, which showed results at 78.96% after 24 h. However, the positive control, *Sacch_boulardi*, presented with very high results in the assay in all tested times (2, 4, and 24 h), with values of 30.71%, 50.02%, and 96.91%. Comparing these values to other tested strains, only three strains presented with better results than the control: 107_Metsch_pulcherrima (21.39%; 40.77%; 99.27%), 101_Pich_kudriavzevii (19.36%; 40.76%; 97.10%), and 058_Cand_metapsilosis (53.58%; 70.39%; 98.41%). The results of the assay are presented in Figure 3. The *P. kudriavzevii* strains isolated by Aydin et al. [13] showed a higher degree of aggregation, with most already reaching values of around 80% after 3 h, except for one strain. After 24 h, all strains aggregated in the range of 94.4–99.8%, which was similar to the reference strain of *S. boulardii* (98.7%). A high degree of autoaggregation was also achieved by Hsu and Chou [19] for its *P. kudriavzevii* isolate, with results of 76% and approximately 100% after 2 h and 24 h, respectively. On the other hand, the *P. kudriavzevii* IPNFG1 isolated by Lara-Higaldo et al. [15] exhibited a high autoaggregation percentage after 15 min of incubation, reaching $79.2 \pm 6.6\%$. After 1 h, these yeasts demonstrated an autoaggregation ability exceeding 99%.

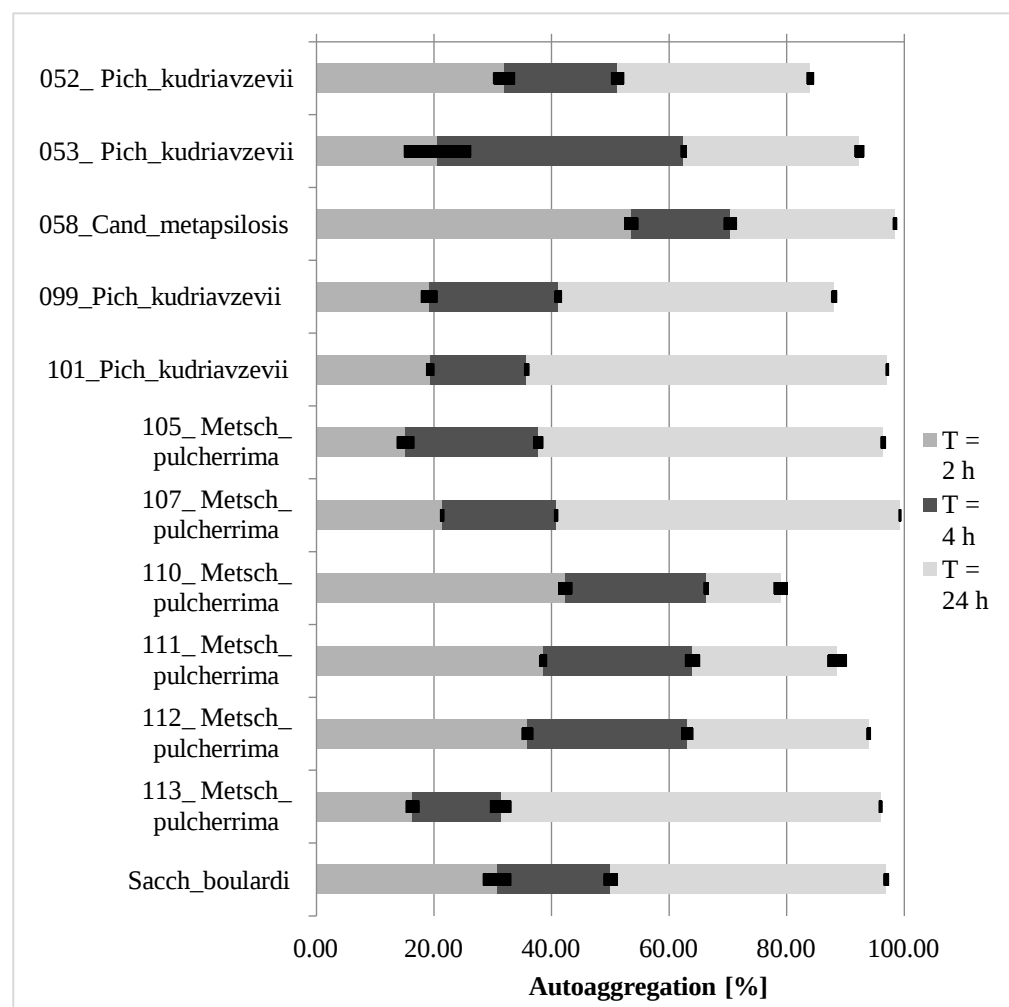


Figure 3. Results of the autoaggregation assay of tested strains within 2, 4, and 24 h (Two-Way ANOVA: strain: $F(27,168) = 580.26$, $p = 0.0000$, $se \pm 0.376682$; time: $F(2168) = 71,106$, $p = 0.0000$, $se \pm 0.123298$; strain $\times$ time: $F(54,168) = 294.56$, $p = 0.0000$, $se \pm 0.652432$).

3.2.4. Hydrophobicity Assay

The hydrophobicity assay, next to autoaggregation, allows us to estimate the microorganisms' ability to survive and adhere to the mucosa due to the high correlation between high hydrophobicity assay values and the strains' ability to adhere to intestinal cell lines [37–40]. The ability of probiotics to adhere to the host intestinal mucosa is one of the mechanisms of protection against enteropathogens by competing for attachment sites to host cells. Additionally, the adhesion ability of a probiotic may prolong the time of interaction with the cells of the gastrointestinal tract and thus prolong the time of the intended beneficial effect [39]. Lara-Hidalgo et al. [15] stated that yeast isolates with hydrophobicity levels exceeding 40% may be considered hydrophobic. In our research, the yeast strains showed moderate to high hydrophobicity in xylene, with values ranging from 54.35% to 98.16%, except for 107_Metsch_pulcherrima, which showed weaker hydrophobicity. Detailed results of the assay are presented in Figure 4. Seven strains presented with lower values than the control and only four strains showed hydrophobicity values higher than *S. cerevisiae* var. *boulardi*: 110_Metsch_pulcherrima (88.44%), 111_Metsch_pulcherrima (82.97%), 113_Metsch_pulcherrima (83.16%), and 058_Cand_metapsilosis (98.16%), which is consistent with the observations of other authors for both *M. pulcherrima* and *C. metapsilosis* [30,41–43]. In turn, *P. kudriavzevii* strains showed hydrophobicities in the range of 54–67%, which was lower than the result obtained for *P. kudriavzevii* isolated from kombucha by Wang et al. [10]. On the other hand, Aydin et al. [13] isolated six strains of *P. kudriavzevii*, which showed hydrophobicities in the range of 18.56–61.12%. They stated that large differences in the hydrophobic capacity of yeasts indicate that this feature is strain-dependent. Hsu and Chou [19] reported that 23 isolated yeast strains (38.3%) showed moderate to high hydrophobicity, with values ranging from 25% to 50%, and 21 strains (35%) had a high hydrophobicity rate above 50%, with many isolates outperforming *S. cerevisiae* var. *boulardii*.

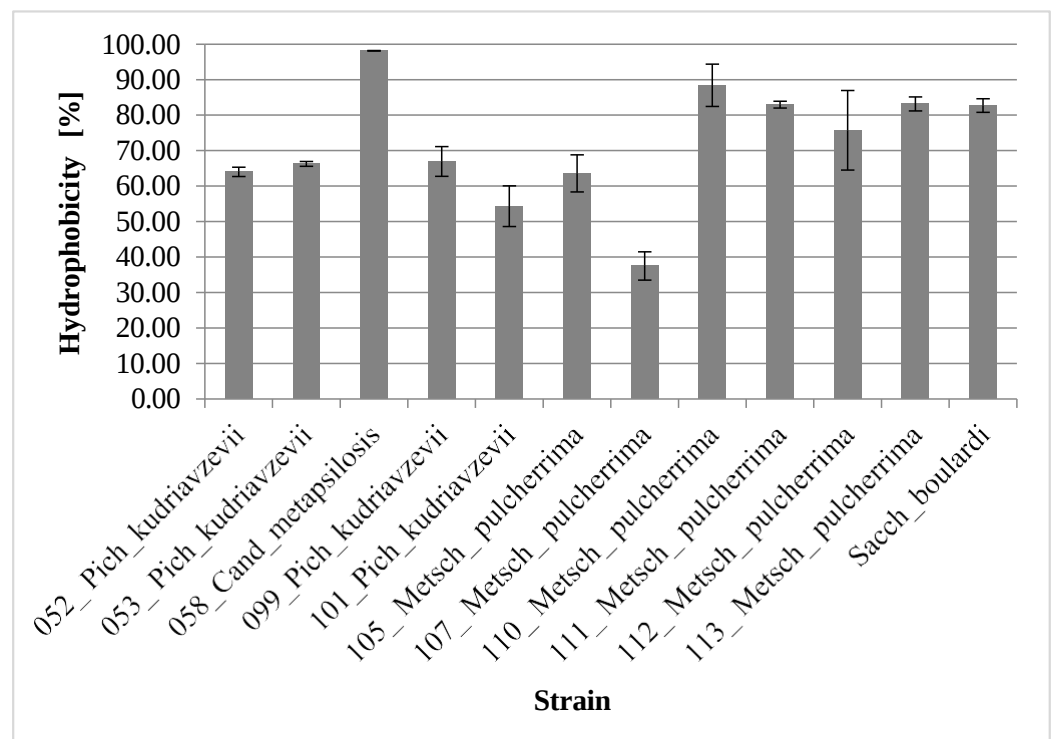


Figure 4. Results of the hydrophobicity assay of tested strains (One-Way ANOVA: strain: $F(27,56) = 38.982$, $p = 0.0000$, $se \pm 0.027319$).

3.2.5. Antioxidant Activity

The antioxidant activity assay showed that all the tested strains had high antioxidant abilities. In comparison to the control sample of *Sacch_boulardi* (65.10%), eight strains presented with a higher antioxidant activity. The strains included two *P. kudriavzevii* (099_Pich_kudriavzevii, 67.05% and 101_Pich_kudriavzevii, 81.36%) and six *M. pulcherrima* (105_Metsch_pulcherrima, 74.01%; 107_Metsch_pulcherrima, 76.47%; 110_Metsch_pulcherrima, 81.90%; 111_Metsch_pulcherrima, 82.05%; 112_Metsch_pulcherrima, 80.92%; and 113_Metsch_pulcherrima, 81.23%). The results of the assay are presented in Figure 5. Our results are similar to the results obtained by Staniszewski and Kordowska-Wiater [6]. Hsu and Chou [19] obtained high results (above 50%) only for 31.6% of their isolated yeast strains but not for *P. kudriavzevii*, which showed about 35% antioxidant activity. Agarbati et al. [7] reported antioxidant activity for *M. pulcherrima* strains in the range of 11.65–60.12% and for *S. cerevisiae* between 46.12 and 66.49%, with the reference CODEX strain showing 65.58%. This was below the results obtained by our strains. Wang et al. [10] obtained very good results from yeast isolates in reaction with DPPH, which exceeded 80%, and in *P. kudriavzevii* and *S. cerevisiae* which exceeded 90%. In the study by Fernandez-Pacheco et al. [44], the highest percentage in the reduction of DPPH was for two *Saccharomyces* strains (3 and 6) and one *P. kudriavzevii* (1200) with values of 33.71%, 32.66%, and 33.42%, respectively, which was 2–2.5 times less than in this analysis report.

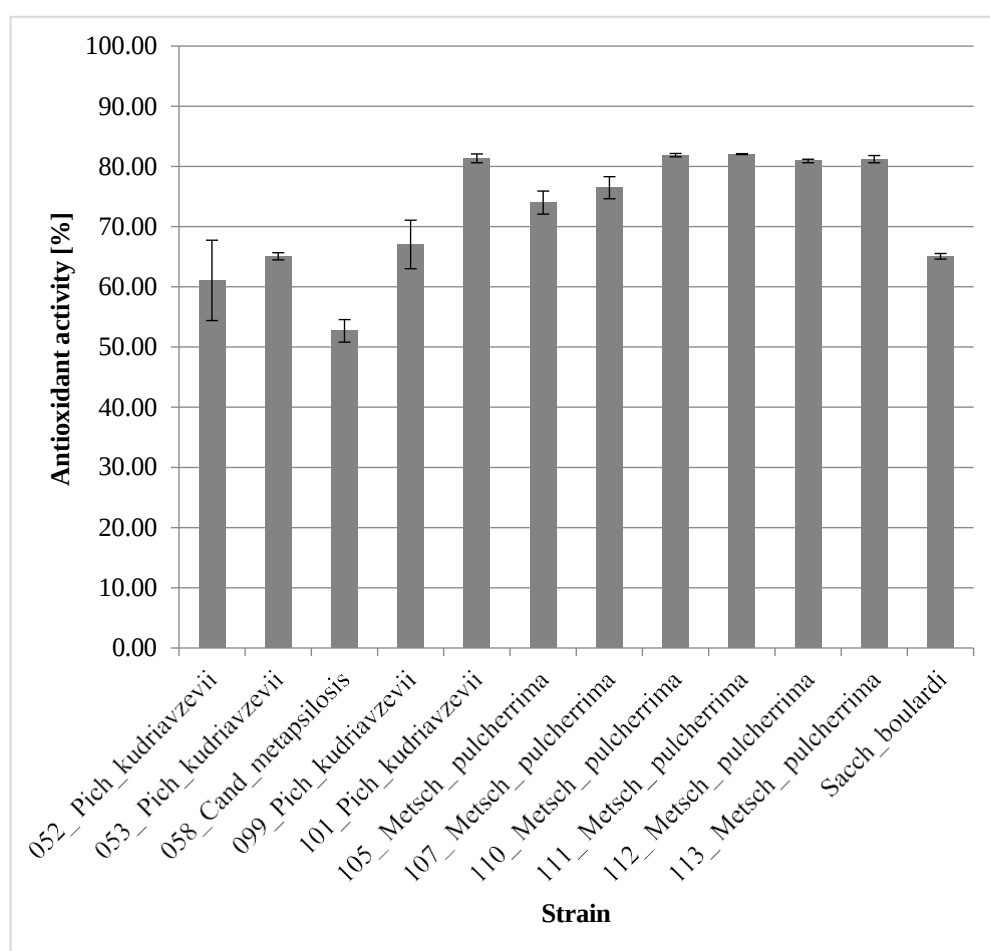


Figure 5. Results of the antioxidant activity of tested strains (One-Way ANOVA: strain: $F(27,56) = 72.221, p = 0.0000, se \pm 0.011803$).

In general, it can be stated that such differences in this activity can arise from various factors—from genetic variations, differences in the strains' metabolic activity, or even other environmental conditions, which may influence the metabolic activity of individual strains [45–47].

3.2.6. Antimicrobial Activity

None of the examined strains presented with antimicrobial activity towards the tested Gram-positive and Gram-negative bacterial strains, which is consistent with the reports by Wang et al. [10] and Binetti et al. [48], whose yeast from kombucha and cheese, respectively, did not inhibit the growth of pathogens. On the other hand, Muche et al. [11] found that the strains of *S. cerevisiae*, *C. humilis*, and *P. kudriavzevii* inhibited, to varying extents, the growth of clinical strains of pathogenic bacteria, including *Salmonella* Typhi, *Escherichia coli*, and *Staphylococcus aureus*. Similarly, Agarbati et al. [7] obtained varying antimicrobial activities of isolated strains, e.g., *M. pulcherrima* and *P. fermentans* showed antimicrobial activity against *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *E. coli*, and *S. enterica*. The ability of probiotic strains to combat harmful bacteria is seen as an essential feature of their action against pathogens in the human digestive tract. However, as can be seen from the above reports, not all yeasts exhibit this valuable property.

3.3. Safety and Virulence-Related Traits

3.3.1. Haemolytic Activity

Determination of the haemolytic activity of a microorganism is the basic test for determining the safety of a potentially probiotic strain and is often performed during screening studies [10,44,49,50]. None of the tested yeast strains presented with haemolytic activity in this study, which is consistent with the results of such an analysis performed by Fernandez-Pacheco et al. [44], Corbu et al. [49], Menezes et al. [50], and Wang et al. [10] on their isolates including, i. a., *S. cerevisiae*, *P. kudriavzevii*, and *M. pulcherrima*. Although the in vitro tests showed no harmful effects due to the yeasts, in vivo safety testing is necessary to confirm that probiotics are safe for human use [10].

3.3.2. Biogenic Amine Production

Another important feature in terms of the safety of probiotic microorganisms is their inability to produce biogenic amines, which can have adverse effects on the human body after consumption. From all the strains tested in this study, only two *Metschnikowia pulcherrima* strains, 107_Metsch_pulcherrima and 111_Metsch_pulcherrima, presented with the ability to produce biogenic amines and, for this reason, they cannot be considered as probiotic candidates. In their study, Caruso et al. [51] found that strains of *M. pulcherrima*, *S. cerevisiae*, and *Brettanomyces bruxellensis* can produce specific biogenic amines (BAs). In addition, Delgado-Ospina et al. [52] demonstrated these abilities for 58% of *S. cerevisiae* strains and 37% of *P. kudriavzevii* strains isolated from cocoa beans during fermentation. Aslankoohi et al. [28], while studying unconventional yeasts, found that *Lachancea thermotolerans*, *Wickerhamomyces subpelliculosa*, and *P. kudriavzevii* produce these compounds in small amounts. Landete et al. [53], on the other hand, found no ability to produce biogenic amines in the wine yeast strains they studied. The results presented in our work confirm the observation that the ability of yeast to produce biogenic amines is strain-dependent.

3.3.3. Other Safety Aspects

Additionally, the *Candida metapsilosis* presented in this study belongs to the *Candida parapsilosis* complex, which is described by many authors as containing emerging pathogens. Therefore, the possibility of using it as a probiotic candidate might require further discussion and multiple additional tests [43,54–56].

3.4. Enzymatic Activity

The API ZYM assay results are presented in Table 2. All the strains presented with the activity of leucine arylamidase, alkaline phosphatase, and acid phosphatase, and none of the strains presented with the activity of α -fucosidase. All but one (085_Pich_manshurica) presented with the activity of esterase C4 and esterase lipase C8. Also, only two strains (110_Metsch_pulcherrima and 111_Metsch_pulcherrima) presented with the activity of trypsin and β -glucuronidase, and only 063_C_ metapsilosis presented with the activity of lipase (C14). In opposition to the results of similar assays published by Fernandez-Pacheco et al. [44], where nearly no activity of alkaline phosphatase, valine arylamidase, and cysteine arylamidase were presented, these activities are widely present in the strains tested in this article. On the other hand, the results obtained by yeasts in the study by Fernandez-Pacheco et al. [44] show similar enzymatic activity abundance to strains presented in our study in the aspects of esterase (C4), esterase lipase (C14), and leucine arylamidase. Similar enzymatic activities in probiotic strains were observed by Bilski et al. [57] and Psomas et al. [58]. The activity of alkaline phosphatase in probiotic strains may positively impact patients with inflammatory disorders of the gastrointestinal tract and, furthermore, the activity of leucine and cysteine arylamidases, acid phosphatase, and naphthol-AS-BI-phosphohydrolase is within the range of an adequate enzymatic activity profile for probiotic strains [57–59]. On the other hand, only two strains of *M. pulcherrima* showed the presence of trypsin and β -glucuronidase, which may have detrimental effects on human health [60,61].

Table 2. Results of the API-ZYM assay.

[illegible]

Table 2. Cont.

Strain Number	Esterase (C4)	Esterase Lipase (C8)	Lipase (C14)	Valine Arylamidase	Cystine Arylamidase	Trypsin	α -Chymotrypsin	Naphthol-AS-BI-Phosphohydrolase	α -Galactosidase	β -Galactosidase	β -Glucuronidase	α -Glucosidase	β -Glucosidase	N-Acetyl- β -Glucosaminidase	α -Mannosidase
095	+	+	—	+	+	—	—	+	—	—	—	+	+	—	+
096	+	+	—	+	+	—	+	+	—	—	—	—	—	—	+
099	+	+	—	+	+	—	+	+	—	—	—	+	—	—	+
101	+	+	—	+	+	—	—	+	—	—	—	+	—	—	+
105	+	+	—	—	—	—	—	+	—	—	—	+	+	—	+
106	+	+	—	+	+	—	—	+	—	+	—	+	+	+	—
107	+	+	—	+	+	—	+	+	—	—	—	+	+	—	+
108	+	+	—	+	+	—	—	—	—	+	—	+	+	+	—
109	+	+	—	+	+	—	+	—	—	—	—	+	+	—	+
110	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
111	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
112	+	+	—	+	+	—	+	—	—	—	—	+	+	—	+
113	+	+	—	+	+	—	+	—	—	—	—	+	+	—	+

4. Conclusions

Over the decades, we have looked at food spoilage yeasts as unnecessary and unwanted without considering whether they may possess any positive properties. This often led to oversights and the loss of many potentially interesting strains. The screening procedure used in this study identified eleven isolates, selected on the basis of their gastrointestinal viability at levels similar to or higher than the reference strain *S. cerevisiae* var. *boulardii*. The strains included the following: one strain of *Candida metapsilosis* from fermented red kale, six strains of *Metschnikowia pulcherrima* from fermented fruit juice, and four strains of *Pichia kudriavzevii* isolated from fermented strawberry jam, pumpkin jam, and sourdough. Some of these isolates showed survival rates approximately 1.5–2 times higher than the reference strain. The elimination factor for 107_Metsch_pulcherrima and 111_Metsch_pulcherrima appeared to be the ability to produce biogenic amines, while for 110_Metsch_pulcherrima it was the enzymatic activity of trypsin and beta-glucuronidase. Many of the strains tested were similar to the reference strain or even better in terms of their autoaggregation capacity, hydrophobicity, or antioxidant properties. All isolates showed no haemolytic or antimicrobial activity against important foodborne pathogenic bacteria. We selected the two most promising strains from the screening procedure, 113_Metsch_pulcherrima and 101_Pich_kudriavzevii. However, these yeasts require further genetic and safety studies, including in vivo testing, to confirm their probiotic potential and to conclusively prove that they are safe for humans, although they have been used in biotechnological processes for years.

As far as we know, this is the first study to focus on the probiotic potential of yeast isolates obtained from spoiled food and beverages by unwanted fermentation. Our research shows that some of the spoilage-derived yeast strains could have probiotic properties, and spoiled food could be used as a source of potentially probiotic strains. We hope that our work will encourage other researchers to look into this direction.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/app142411698/s1>, Spreadsheet S1: Figure S1. Survivability_Tukey results, Figure S2. Autoaggregation_Tukey results, Figure S3. Hydrophobicity_Tukey results, Figure S4. Antioxidant activity_Tukey results, Figure S5: Simplified scheme of the experiment.

Author Contributions: Conceptualisation, A.S. and M.K.-W.; methodology, A.S. and M.K.-W.; software, A.S. and P.S.; validation, M.K.-W.; formal analysis, A.S.; investigation, A.S.; resources, A.S.; data curation, A.S.; writing—original draft preparation, A.S.; writing—review and editing, M.K.-W. and A.S.; visualisation, A.S. and P.S.; supervision, M.K.-W.; project administration, A.S.; and funding acquisition, A.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Doctoral School of the University of Life Sciences in Lublin, Grant Number: SzD/18/TZ /2021.

Data Availability Statement: Data will be made available on request.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

- Skowron, K.; Budzyńska, A.; Grudlewska-Buda, K.; Wiktorczyk-Kapischke, N.; Andrzejewska, M.; Wałęcka-Zacharska, E.; Gospodarek-Komkowska, E. Two Faces of Fermented Foods—The Benefits and Threats of Its Consumption. *Front. Microbiol.* **2022**, *13*, 845166. [CrossRef] [PubMed]
- Jakobsen, M.; Narvhus, J. Yeasts and Their Possible Beneficial and Negative Effects on the Quality of Dairy Products. *Int. Dairy J.* **1996**, *6*, 755–768. [CrossRef]
- Fleet, G.H. Yeasts in Foods and Beverages: Impact on Product Quality and Safety. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2007**, *18*, 170–175. [CrossRef] [PubMed]
- Sadurski, J.; Polak-Berecka, M.; Staniszewski, A.; Waśko, A.W. Step-by-Step Metagenomics for Food Microbiome Analysis: A Detailed Review. *Foods* **2024**, *13*, 2216. [CrossRef]
- Hatoum, R.; Labrie, S.; Fliss, I. Antimicrobial and Probiotic Properties of Yeasts: From Fundamental to Novel Applications. *Front. Microbiol.* **2012**, *3*, 33922. [CrossRef]
- Staniszewski, A.; Kordowska-Wiater, M. Probiotic Yeasts and How to Find Them—Polish Wines of Spontaneous Fermentation as Source for Potentially Probiotic Yeasts. *Foods* **2023**, *12*, 3392. [CrossRef] [PubMed]
- Agarbat, A.; Canonico, L.; Marini, E.; Zannini, E.; Ciani, M.; Comitini, F. Potential Probiotic Yeasts Sourced from Natural Environmental and Spontaneous Processed Foods. *Foods* **2020**, *9*, 287. [CrossRef]
- Simões, L.A.; Cristina de Souza, A.; Ferreira, I.; Melo, D.S.; Lopes, L.A.A.; Magnani, M.; Schwan, R.F.; Dias, D.R.; Aparecida Simões, L.; Cristina de Souza, A.; et al. Probiotic Properties of Yeasts Isolated from Brazilian Fermented Table Olives. *J. Appl. Microbiol.* **2021**, *131*, 1983–1997. [CrossRef] [PubMed]
- Banik, A.; Mondal, J.; Ghosh, K.; Sha, S.P.S.P.; Halder, S.K.S.K.; Ghosh, C.; Mondal, K.C.K.C.; Rakshit, S.; Ghosh, K.; Sha, S.P.S.P.; et al. Amelioration of Cold-Induced Gastric Injury by a Yeast Probiotic Isolated from Traditional Fermented Foods. *J. Funct. Foods* **2019**, *59*, 164–173. [CrossRef]
- Wang, B.; Rutherford-Markwick, K.; Liu, N.; Zhang, X.X.; Mutukumira, A.N. Evaluation of the Probiotic Potential of Yeast Isolated from Kombucha in New Zealand. *Curr. Res. Food Sci.* **2024**, *8*, 100711. [CrossRef]
- Muche, N.; Geremew, T.; Jiru, T.M. Isolation and Characterization of Potential Probiotic Yeasts from Ethiopian Injera Sourdough. *3 Biotech* **2023**, *13*, 300. [CrossRef] [PubMed]
- Lata, P.; Sharma, K.B.; Rangra, S.; Kumari, R. Savitri Probiotic Characterization Of *Saccharomyces Cerevisiae* Y196 And Y197 Isolated From Rice Chhang-A Fermented Beverage Of Lahaul Spiti. *J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci.* **2023**, *12*, e5817. [CrossRef]
- Aydın, F.; Aktepe, Y.; Kahve, H.I.; Çakır, İ. In Vitro Probiotic Characterization of Yeasts with Their Postbiotics' Antioxidant Activity and Biofilm Inhibition Capacity. *Curr. Microbiol.* **2024**, *81*, 364. [CrossRef]
- Amorim, J.C.; Piccoli, R.H.; Duarte, W.F. Probiotic Potential of Yeasts Isolated from Pineapple and Their Use in the Elaboration of Potentially Functional Fermented Beverages. *Food Res. Int.* **2018**, *107*, 518–527. [CrossRef]
- Lara-Hidalgo, C.E.; Dorantes-Álvarez, L.; Hernández-Sánchez, H.; Santoyo-Tepole, F.; Martínez-Torres, A.; Villa-Tanaca, L.; Hernández-Rodríguez, C. Isolation of Yeasts from Guajillo Pepper (*Capsicum annuum* L.) Fermentation and Study of Some Probiotic Characteristics. *Probiotics Antimicrob. Proteins* **2019**, *11*, 748–764. [CrossRef] [PubMed]

16. Shruthi, B.; Adithi, G.; Deepa, N.; Divyashree, S.; Sreenivasa, M.Y. Probiotic and Functional Attributes of Yeasts Isolated from Different Traditional Fermented Foods and Products. *Probiotics Antimicrob. Proteins* **2024**. [\[CrossRef\]](#)
17. Murad, A.S.; Zuhairi, N.A.; Mohd-Aspar, M.A.S.; Azhar, M.A. Isolation and Characterisation of Potential Probiotic Yeast Strains from Local Fermented Foods: Gastrointestinal Tolerance and Antimicrobial Activity Assessment. *Asia-Pacific J. Mol. Biol. Biotechnol.* **2024**, *32*, 116–125. [\[CrossRef\]](#)
18. Chen, L.S.; Ma, Y.; Maubois, J.L.; Chen, L.J.; Liu, Q.H.; Guo, J.P. Identification of Yeasts from Raw Milk and Selection for Some Specific Antioxidant Properties. *Int. J. Dairy Technol.* **2010**, *63*, 47–54. [\[CrossRef\]](#)
19. Hsu, S.-A.; Chou, J.-Y. Yeasts In Fermented Food And Kefir: In Vitro Characterization Of Probiotic Traits. *J. Animal & Plant Sci.* **2020**, *31*, 567–582. [\[CrossRef\]](#)
20. Hsiung, R.T.; Fang, W.T.; LePage, B.A.; Hsu, S.A.; Hsu, C.H.; Chou, J.Y. In Vitro Properties of Potential Probiotic Indigenous Yeasts Originating from Fermented Food and Beverages in Taiwan. *Probiotics Antimicrob. Proteins* **2021**, *13*, 113–124. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
21. Astuti, R.I.; Prastya, M.E.; Wulan, R.; Anam, K.; Meryandini, A. Current Trends and Future Perspective of Probiotic Yeasts Research in Indonesia. *FEMS Yeast Res.* **2023**, *23*, foad013. [\[CrossRef\]](#)
22. White; Bruns, T.; Lee, S.; Taylor, J.; White, T.J.; Bruns, T.D.; Lee, S.B.; Taylor, J.W. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. In *PCR—Protocols and Applications—A Laboratory Manual*; Academic Press Inc.: Cambridge, MA, USA, 1990; pp. 315–322. ISBN 0-12-372180-6.
23. Altschul, S.F.; Boguski, M.S.; Gish, W.; Wootton, J.C. Issues in Searching Molecular Sequence Databases. *Nat. Genet.* **1994**, *6*, 119–129. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Fernandez-Pacheco Rodríguez, P.; Arévalo-Villena, M.; Zaparoli Rosa, I.; Briones Pérez, A. Selection of Potential Non-Sacharomyces Probiotic Yeasts from Food Origin by a Step-by-Step Approach. *Food Res. Int.* **2018**, *112*, 143–151. [\[CrossRef\]](#)
25. Sanders, E.R. Aseptic Laboratory Techniques: Plating Methods. *J. Vis. Exp.* **2012**, *63*, e3064. [\[CrossRef\]](#)
26. Gil-Rodríguez, A.M.; Carrascosa, A.V.; Requena, T. Yeasts in Foods and Beverages: In Vitro Characterisation of Probiotic Traits. *LWT—Food Sci. Technol.* **2015**, *64*, 1156–1162. [\[CrossRef\]](#)
27. Magaldi, S.; Mata-Essayag, S.; Hartung de Capriles, C.; Perez, C.; Colella, M.; Olaizola, C.; Ontiveros, Y.; Ellis, M.; Ain, A. Well Diffusion for Antifungal Susceptibility Testing. *Int. J. Infect. Dis.* **2004**, *8*, 39–45. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
28. Aslankooi, E.; Herrera-Malaver, B.; Rezaei, M.N.; Steensels, J.; Courtin, C.M.; Verstrepen, K.J. Non-Conventional Yeast Strains Increase the Aroma Complexity of Bread. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0165126. [\[CrossRef\]](#)
29. Jung, M.Y.; Lee, C.; Seo, M.J.; Roh, S.W.; Lee, S.H. Characterization of a Potential Probiotic Bacterium *Lactococcus Raffenolactis* WiKim0068 Isolated from Fermented Vegetable Using Genomic and in Vitro Analyses. *BMC Microbiol.* **2020**, *20*, 136. [\[CrossRef\]](#)
30. Al-Nijir, M.; Henk, D.A.; Bedford, M.R.; Chuck, C.J. Assessing *Metschnikowia Pulcherrima* as a Potential Probiotic Yeast for Animal Feed. *Sustain. Microbiol.* **2024**, *1*, qvae008. [\[CrossRef\]](#)
31. Abolghasemi, H.; Larypoor, M.; Hosseini, F. Probiotic Effects of *Metschnikowia* Isolated from Dairy Products Aquatic Environments. *Int. J. Mol. Clin. Microbiol.* **2022**, *12*, 1692–1703. [\[CrossRef\]](#)
32. Agarbati, A.; Moretti, L.; Canonico, L.; Ciani, M.; Comitini, F. Agro-Ecosystem of Honeybees as Source for Native Probiotic Yeasts. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2024**, *40*, 147. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Piraine, R.E.A.; Retzlaf, G.M.; Gonçalves, V.S.; Cunha, R.C.; Conrad, N.L.; Bochman, M.L.; Leite, F.P.L. Brewing and Probiotic Potential Activity of Wild Yeasts *Hanseniaspora Uvarum* PIT001, *Pichia Kluyveri* LAR001 and *Candida Intermedia* ORQ001. *Eur. Food Res. Technol.* **2023**, *249*, 133–148. [\[CrossRef\]](#)
34. Tamang, J.P.; Lama, S. Probiotic Properties of Yeasts in Traditional Fermented Foods and Beverages. *J. Appl. Microbiol.* **2022**, *132*, 3533–3542. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Paul, C.; Mishu, I.D.; Miah, M.I.; Bari, M.L.; Rahman, S.R.; Malek, M.A. Isolation, Identification and Probiotic Potential of Lactic Acid Bacteria and Yeasts from Commercial Yogurt and Homemade Non-Dairy Fermented Food “KANJI.” *Int. J. Gastron. Food Sci.* **2023**, *34*, 100787. [\[CrossRef\]](#)
36. Pizzolitto, R.P.; Armando, M.R.; Salvano, M.A.; Dalcero, A.M.; Rosa, C.A. Evaluation of *Saccharomyces Cerevisiae* as an Antiaflatoxicogenic Agent in Broiler Feedstuffs. *Poult. Sci.* **2013**, *92*, 1655–1663. [\[CrossRef\]](#)
37. Pan, W.H.; Li, P.L.; Liu, Z. The Correlation between Surface Hydrophobicity and Adherence of *Bifidobacterium* Strains from Centenarians’ Faeces. *Anaerobe* **2006**, *12*, 148–152. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
38. Bautista-Gallego, J.; Arroyo-López, F.N.; Rantsiou, K.; Jiménez-Díaz, R.; Garrido-Fernández, A.; Cocolin, L. Screening of Lactic Acid Bacteria Isolated from Fermented Table Olives with Probiotic Potential. *Food Res. Int.* **2013**, *50*, 135–142. [\[CrossRef\]](#)
39. Monteagudo-Mera, A.; Rastall, R.A.; Gibson, G.R.; Charalampopoulos, D.; Chatzifragkou, A. Adhesion Mechanisms Mediated by Probiotics and Prebiotics and Their Potential Impact on Human Health. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2019**, *103*, 6463–6472. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
40. García-Hernández, Y.; Pérez-Sánchez, T.; Boucourt, R.; Balcázar, J.L.; Nicoli, J.R.; Moreira-Silva, J.; Rodríguez, Z.; Fuertes, H.; Nuñez, O.; Albelo, N.; et al. Isolation, Characterization and Evaluation of Probiotic Lactic Acid Bacteria for Potential Use in Animal Production. *Res. Vet. Sci.* **2016**, *108*, 125–132. [\[CrossRef\]](#)
41. Vergara Alvarez, S.C.; Leiva Alaniz, M.J.; Mestre Furlani, M.V.; Vazquez, F.; Mancha Agresti, P.; Cristina Nally, M.; Paola Maturano, Y. Bioprospecting of the Probiotic Potential of Yeasts Isolated from a Wine Environment. *Fungal Genet. Biol.* **2023**, *164*, 103767. [\[CrossRef\]](#)

42. Liao, Q.; Jiang, Q.; Qin, Y.; Jiang, Y.; Wang, Z.; Tang, M.; Huang, L.; Shen, P. Improvements in the Growth Performance, Morphology, Gut Microbiota, Hepatic Health, and Immune Response of Juvenile Tilapia (*Oreochromis Niloticus*) Fed *Metschnikowia* Sp. GXUS03. *Aquaculture* **2023**, *577*, 739954. [[CrossRef](#)]
43. Gómez-Gaviria, M.; García-Carnero, L.C.; Baruch-Martínez, D.A.; Mora-Montes, H.M. The Emerging Pathogen *Candida Metapsilosis*: Biological Aspects, Virulence Factors, Diagnosis, and Treatment. *Infect. Drug Resist.* **2024**, *17*, 171–185. [[CrossRef](#)]
44. Fernández-Pacheco, P.; Pintado, C.; Pérez, A.B.; Arévalo-Villena, M.; Briones Pérez, A.; Arévalo-Villena, M.; Pérez, A.B.; Arévalo-Villena, M. Potential Probiotic Strains of *Saccharomyces* and Non-*Saccharomyces*: Functional and Biotechnological Characteristics. *J. Fungi* **2021**, *7*, 177. [[CrossRef](#)]
45. Fakruddin, M.; Hossain, M.N.; Ahmed, M.M. Antimicrobial and Antioxidant Activities of *Saccharomyces Cerevisiae* IFST062013, a Potential Probiotic. *BMC Complement. Altern. Med.* **2017**, *17*, 64. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Sarwar, A.; Al-Dalali, S.; Aziz, T.; Yang, Z.; Din, J.U.; Khan, A.A.; Daudzai, Z.; Syed, Q.; Nelofer, R.; Qazi, N.U.; et al. Effect of Chilled Storage on Antioxidant Capacities and Volatile Flavors of Synbiotic Yogurt Made with Probiotic Yeast *Saccharomyces Boulardii* CNCM I-745 in Combination with Inulin. *J. Fungi* **2022**, *8*, 713. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Feng, T.; Wang, J. Oxidative Stress Tolerance and Antioxidant Capacity of Lactic Acid Bacteria as Probiotic: A Systematic Review. *Gut Microbes* **2020**, *12*, 1801944. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Binetti, A.; Carrasco, M.; Reinheimer, J.; Suárez, V. Yeasts from Autochthonal Cheese Starters: Technological and Functional Properties. *J. Appl. Microbiol.* **2013**, *115*, 434–444. [[CrossRef](#)]
49. Corbu, V.M.; Csutak, O. Molecular and Physiological Diversity of Indigenous Yeasts Isolated from Spontaneously Fermented Wine Wort from Ilfov County, Romania. *Microorganisms* **2023**, *11*, 37. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Menezes, A.G.T.; Ramos, C.L.; Cenzi, G.; Melo, D.S.; Dias, D.R.; Schwan, R.F. Probiotic Potential, Antioxidant Activity, and Phytase Production of Indigenous Yeasts Isolated from Indigenous Fermented Foods. *Probiotics Antimicrob. Proteins* **2020**, *12*, 280–288. [[CrossRef](#)]
51. Caruso, M.; Fiore, C.; Contursi, M.; Salzano, G.; Paparella, A.; Romano, P. Formation of Biogenic Amines as Criteria for the Selection of Wine Yeasts. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2002**, *18*, 159–163. [[CrossRef](#)]
52. Delgado-Ospina, J.; Acquaticci, L.; Molina-Hernandez, J.B.; Rantsiou, K.; Martuscelli, M.; Kamgang-Nzekoue, A.F.; Vittori, S.; Paparella, A.; Chaves-López, C. Exploring the Capability of Yeasts Isolated from Colombian Fermented Cocoa Beans to Form and Degrade Biogenic Amines in a Lab-Scale Model System for Cocoa Fermentation. *Microorganisms* **2020**, *9*, 28. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Landete, J.M.; Ferrer, S.; Pardo, I. Biogenic Amine Production by Lactic Acid Bacteria, Acetic Bacteria and Yeast Isolated from Wine. *Food Control* **2007**, *18*, 1569–1574. [[CrossRef](#)]
54. Orsi, C.F.; Colombari, B.; Blasi, E. *Candida Metapsilosis* as the Least Virulent Member of the “*C. Parapsilosis*” Complex. *Med. Mycol.* **2010**, *48*, 1024–1033. [[CrossRef](#)]
55. Rodríguez, M.L.; Rosa, A.C.; Rodríguez, J.G.; Nastri, M.L.; Jewtuchowicz, V.M. The Oral Cavity: A Reservoir That Favors Colonization and Selection of *Candida Parapsilosis* Sensu Stricto Strains with High Pathogen Potential Under Conditions of Gingival-Periodontal Disease. *J. Dent. Sci. Ther.* **2018**, *2*, 9–19. [[CrossRef](#)]
56. Trofa, D.; Gácsér, A.; Nosanchuk, J.D. *Candida Parapsilosis*, an Emerging Fungal Pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* **2008**, *21*, 606–625. [[CrossRef](#)]
57. Bilski, J.; Mazur-Bialy, A.; Wojcik, D.; Zahradnik-Bilska, J.; Brzozowski, B.; Magierowski, M.; Mach, T.; Magierowska, K.; Brzozowski, T. The Role of Intestinal Alkaline Phosphatase in Inflammatory Disorders of Gastrointestinal Tract. *Mediators Inflamm.* **2017**, *2017*, 9074601. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Psomas, E.; Andrighetto, C.; Litopoulou-Tzanetaki, E.; Lombardi, A.; Tzanetakis, N. Some Probiotic Properties of Yeast Isolates from Infant Faeces and Feta Cheese. *Int. J. Food Microbiol.* **2001**, *69*, 125–133. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Kunyeit, L.; Rao, R.P.; Anu-Appaiah, K.A. Yeasts Originating from Fermented Foods, Their Potential as Probiotics and Therapeutic Implication for Human Health and Disease. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2023**, *64*, 6660–6671. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Tanner, A.C.R.; Strzempko, M.N.; Belsky, C.A.; McKinley, G.A. API ZYM and API An-Ident Reactions of Fastidious Oral Gram-Negative Species. *J. Clin. Microbiol.* **1985**, *22*, 333–335. [[CrossRef](#)]
61. Monteagudo-Mera, A.; Caro, I.; Rodríguez-Aparicio, L.B.; Rua, J.; Ferrero, M.A.; García-Armesto, M.R. Characterization of Certain Bacterial Strains for Potential Use as Starter or Probiotic Cultures in Dairy Products. *J. Food Prot.* **2011**, *74*, 1379–1386. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Article

Probiotic Yeast and How to Use Them—Combining Traditions and New Waves in Fermented Beverages

Adam Staniszewski ¹, Patrycja Staniszevska ², Elwira Komoń-Janczara ¹ and Monika Kordowska-Wiater ^{1,*}

¹ Department of Biotechnology, Microbiology and Human Nutrition, University of Life Sciences in Lublin, Skromna 8, 20-704 Lublin, Poland; adam.staniszewski@up.lublin.pl (A.S.); elwira.komon.janczara@up.lublin.pl (E.K.-J.)

² Department of Invertebrate Ecophysiology and Experimental Biology, University of Life Sciences in Lublin, Dos'wiadczalna 50a, 20-280 Lublin, Poland; patrycja.staniszevska@up.lublin.pl

* Correspondence: monika.kordowska-wiater@up.lublin.pl

Abstract

Potentially probiotic yeasts isolated from foodstuffs can be used as components in functional fermented beverages. To date, there have been no reports on the use of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*, *Pichia kudriavzevii*, *Metschnikowia pulcherrima*, or *Hanseniaspora uvarum* isolates in the production of a traditional Polish beverage called underbeer (podpiwek). The aim of the study was to determine the usefulness of six isolates of the above-mentioned species as starter cultures for the fermentation of underbeer. First, the important characteristics of the yeasts, like ethanol tolerance and H₂S production, were examined. In the next stage, the wort was fermented by the tested yeasts, and cell viability, fermentation vigor, sugar assimilation, and production of metabolites, as well as properties of the beverage (pH, titratable acidity, color, and turbidity), were determined. *Saccharomyces* yeasts tolerated the addition of ethanol up to 16% (v/v), while *Pichia*, *Metschnikowia*, and *Hanseniaspora* tolerated up to 10% (v/v) ethanol, and all except *H. uvarum* produced H₂S. The yeasts remained viable in the beverages for 1 month at the required level, utilized glucose, fructose and partially complex carbohydrates, and produced ethanol (*S. cerevisiae*, *P. kudriavzevii*, and *M. pulcherrima*) and organic acids such as tartaric, malic, and citric acid. The underbeers became sour and showed varying turbidity and a color corresponding to pale-amber beers. All tested strains produced fermented beverages that were low- or non-alcoholic with different properties. This experiment may be a starting point for research into regional products as probiotic or synbiotic foods; however, further research is required for selection of the best strains for underbeer fermentation.

Keywords: probiotic yeast; podpiwek; underbeer; *Saccharomyces boulardii*; *Hanseniaspora uvarum*; *Metschnikowia pulcherrima*; *Saccharomyces cerevisiae* var *boulardii*; *Saccharomyces cerevisiae*; *Pichia kudriavzevii*; fermented beverages; functional food



Academic Editor: Ioanna Mantzourani

Received: 21 July 2025

Revised: 16 August 2025

Accepted: 19 August 2025

Published: 21 August 2025

Citation: Staniszewski, A.; Staniszevska, P.; Komoń-Janczara, E.; Kordowska-Wiater, M. Probiotic Yeast and How to Use Them—Combining Traditions and New Waves in Fermented Beverages. *Foods* **2025**, *14*, 2921. <https://doi.org/10.3390/foods14162921>

Copyright: © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Fermented beverages have accompanied humanity since the dawn of time and have remained an important part of the human diet all over the world, and within such, the most commonly used beverages are wine, cider, kombucha, and beer [1–5].

The key stage in the production of this type of beverage is fermentation, often carried out by yeast, bacteria, or their co-cultures. The genera of yeasts most commonly found in fermented foods and beverages include *Debaryomyces*, followed by *Candida*, *Saccharomyces*,

Pichia, *Kluyveromyces*, *Wickerhamomyces*, *Torulaspora*, *Yarrowia*, and *Metschnikowia* [6–8]. Several examples of the use of the commercial probiotic yeast *S. cerevisiae* var. *boulardii*, either alone or in co-cultures, for the production of probiotic beer based on cereal wort containing hops and other additives can be found in the scientific literature [9–13]. However, apart from the commonly used commercial species and strains (i.e., *Saccharomyces cerevisiae*), recent research has shown the potential of various yeast species, including probiotic strains belonging to the genera *Kluyveromyces*, *Debaryomyces*, *Candida*, *Pichia*, *Hanseniaspora*, and *Metschnikowia*, isolated from numerous sources and suggests the possibility of the usage of these non-conventional yeasts as inoculum in the fermentation of novel fermented food and beverages [6,7,14,15]. There are also reports of the use of unconventional yeasts in co-cultures with other yeasts, including *Saccharomyces* or lactic acid bacteria, to produce innovative fermented beverages such as craft beers, bitter beers, ciders, and others [16–21]. Numerous species of the aforementioned yeasts have been classified as moderate or weak fermenters, so they can potentially be used to produce non-alcoholic or low-alcohol beverages [22].

P. kudriavzevii was found in the fermentation of some alcoholic beverages, including beer, fermented fruits or berries, and traditional cereal beverages [23].

Metschnikowia spp. and *Hanseniaspora* spp. play a significant role in winemaking during spontaneous fermentation, as well as in fruit wine fermentation [24,25].

Hence, we arrived at the idea of combining two aspects important in the human diet: the consumption of beverages with desirable taste values and the addition of live cultures of organisms with probiotic potential. This combination makes such fermented beverages into functional foods according to the definition proposed by Temple, 2022, stating that “Functional foods are novel foods that have been formulated so that they contain substances or live microorganisms that have a possible health-enhancing or disease-preventing value, and at a concentration that is both safe and sufficiently high to achieve the intended benefit. The added ingredients may include nutrients, dietary fiber, phytochemicals, other substances, or probiotics” [26]. Nowadays, the development of plant-based functional foods including cereals is a topic of interest due to their content of vitamins, minerals, and dietary fiber [12].

As a continuation of our previous research on the isolation of yeasts with probiotic potential, we decided to combine tradition with modernity and attempted to produce the Polish traditional fermented beverage “podpiwek” using strains with probiotic potential that we had previously isolated [14,15]. The English name of the “podpiwek” beverage is not well established and is present in various sources in untranslated and translated forms [27,28]; hence, for the purposes of the article, we decided to use the term “underbeer”, which is the literal translation from the Polish language.

Underbeer is considered traditional to Poland and Lithuania and may date back to the times of the Polish-Lithuanian Commonwealth. Its first commercial production began in the mid-19th century. This drink was very popular until the end of the 1980s as an alternative to commercially available sweetened drinks, which were largely not easily accessible during the times of socialism. Underbeer is a fermented beverage made from roasted barley grains, known as cereal coffee, and ground chicory root with the addition of hops. The beverage does not contain malt. During fermentation, similar to the production of beer, yeasts assimilate sugar and produce alcohol and carbon dioxide, which means that the drink does not need to be artificially enriched with carbon dioxide. The finished drink has a slightly sour, refreshing taste with a hint of bitterness and a distinctive aroma of cereal coffee and yeast. Furthermore, due to its intense flavor, color and aroma, obtained through traditional production methods, this beverage does not require the addition of chemical preservatives, flavorings or colorings [3,27–29].

The aim of the research is to evaluate the usefulness of selected probiotic yeast strains as potential starter cultures for underbeer fermentation in terms of cell survival, sugar utilization, and production of metabolites influencing the physicochemical properties of beverages. Additionally, important characteristics of the strains used as starter cultures, such as ethanol tolerance and H₂S production, were examined.

2. Materials and Methods

2.1. Strains and Inoculum Preparation

As starter cultures, the six yeast isolates with probiotic potential, originating from various types of fermented food and beverages, were obtained during our previous work [14,15]. As the positive control, we used *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* CNCM I-745 (Enterol, Biocodex, Gentilly, France).

The cultures were stored frozen in 30% glycerol at -80°C , and before usage, the strains were cultured for 72 h at 28°C in YPD broth (BTL, Łódź, Poland).

More detailed data about each strain (code names for individual strains, species) are included in Table 1.

Table 1. Strain details.

Strain Number	Strain Species	Strain Code ¹
15	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	15_Hans_uvarum
16	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	16_Hans_uvarum
37	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	37_Sacch_cerevisiae
101	<i>Pichia kudriavzevii</i>	101_Pich_kudriavzevii
110	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	110_Metsch_pulcherrima
113	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	113_Metsch_pulcherrima
SB	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i>	Sacch_boulardi

¹ Strain codes used in our previous articles [9,10] where the probiotic potential of the strains was tested.

To ensure uniformity of measurement, the original optical density at 600 nm (OD₆₀₀) was determined for all cultured strains. Before the inoculation of the underbeers, liquid yeast cultures in YPD medium, after incubation at 28°C for 48 h, were centrifuged for 10 min at 8000 rpm, washed, and the cell biomass was suspended in sterile water. The suspensions were then normalized to an OD₆₀₀ of 1.0, and 2% (v/v) of such was used as inoculum for underbeer preparation.

2.2. Underbeer Preparation

In order to ensure homogeneity and limit the influence of raw materials on the properties of the tested underbeer, a decision was made to use a commercial underbeer base, “Podpiwek” (Bakalland S.A., Warsaw, Poland); the base includes the following: roasted sugar beet, barley, and chicory, hops, and acidity regulators (diphosphates and citric acid; 0.15% ($\pm 0.05\%$)). The wort was prepared according to the manufacturer’s recommendations with the addition of 500 g of sucrose for every 10 l of wort; wort was poured into 500 mL conical flasks, sterilized, inoculated in sterile conditions, and rubber stoppers with fermentation tubes were fitted on. Fermentations were carried out over 14 days at room temperature, and then the flasks were moved to fridge. The samples were taken on days 0 (control), 7, 14, and 30.

2.3. Properties of Strains Related to Beverage Production

2.3.1. Ethanol Tolerance

The strains were cultured at 28 °C for 48 h in YPD broth with addition of different concentrations of ethanol. The ethanol concentration for each species was selected based on the scientific literature [30–34].

For *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces cerevisiae* var. *bouardi* (strains 37_Sacch_cerevisiae and Sacch_boulardi), the ethanol concentration used were 8, 10, 12, 14, and 16% of EtOH (v/v). For the rest of the species, the ethanol concentrations were 2, 4, 6, 8, and 10% of EtOH (v/v). Control cultures of each strain were grown in YPD medium without ethanol. The growth of the tested strains was evaluated spectrophotometrically at OD₆₀₀. The survivability (S) of yeast was calculated according to the following formula:

$$S = \frac{OD_{600_sample}}{OD_{600_control}} \times 100\%$$

2.3.2. H₂S Production

The tested strains were inoculated with a loop on Biggy Agar (Biomaxima, Lublin, Poland) in Petri dishes and incubated at 28 °C for 48 h. The growth of colonies and their change in the color to brown or black indicates the ability to produce H₂S [35,36].

2.4. Parameters Related to Fermentation

2.4.1. Yeast Viability in Fermented Beverages

In order to assess the number of live yeast cells in underbeer, serial dilutions of the samples were prepared in saline solution and 0.2 mL of each dilution was spread on Petri dishes with YGC (yeast extract, glucose, chloramphenicol) agar (BTL, Łódź, Poland) on days 0, 7, 14, and 30 and incubated at 28 °C for 72 h. After incubation, the colonies were counted and their numbers were converted to 1 mL of beverage [37].

2.4.2. pH

The pH values were determined using a pH meter HI2210-02 (Hanna Instruments, Olsztyn, Poland). The pH of the wort at the beginning was 6.71.

2.4.3. Titratable Acidity

Total titratable acidity (TTA) was determined according to Neffe-Skocińska et al., 2017 and Oliveira Alves et al., 2025 [38,39]. The samples were prepared by 10-fold dilution of underbeer (10 mL of underbeer, 90 mL of distilled water) and titrating 100 mL of the samples with 0.01 M NaOH. The value was expressed in g of acetic acid equivalent per liter (g/L) and was calculated from the following equation:

$$TTA = ((V_{NaOH} \times 0.01 \times 60.05)/V) \times 10$$

where

V_{NaOH} = volume of NaOH used in the titration (in mL);

0.01 = molarity of the NaOH solution used in titration (in mol/L);

60.05 = equivalent weight of acetic acid (60.05 g/mol);

V = volume of sample titrated (in mL);

10 = dilution factor.

2.4.4. Fermentative Vigor

The fermentative vigor (FV) was evaluated as the weight loss in g of CO₂ to the atmosphere during fermentation. The fermentation vessels were weighed at the beginning of fermentation and days seven and fourteen [36].

2.4.5. ASBC Turbidity

The American Society of Brewing Chemists Turbidity (ASBC Turbidity) was evaluated at time 0, 7, and 14 days according to the methodology used by Pyrovolou et al., 2024 [40].

2.4.6. ASBC Color

Color measurement was performed at time 0, 7, and 14 days according to the methodology used by Pyrovolou et al., 2024 [40]. The EBC (European Brewery Convention) scale is used to express color units. The color value in EBC units is determined using the following formula:

$$\text{Beer Color (EBC)} = 25 \times A_{430}.$$

2.4.7. High-Performance Liquid Chromatography Analysis

Samples collected after 7, 14, and 30 days were filtered using 0.22 µm pore size PTFE membrane syringe filters and subsequently diluted with distilled water. The quantification of post-fermentation products and substrate residues was conducted on the HPLC system Dionex UltiMate 3000 (Thermo Scientific, Mundelein, IL, USA) comprised of a pump (LPG-3400SD), an autosampler (WPS-3000SL), a column oven (TCC-3000SD), and Aminex HPX-87H column (300 × 7.8 mm, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). A measure of 3 mM sulfuric acid aqueous solution was used as the mobile phase. A 20 µL sample was analyzed on a column maintained at 60 °C with a flow rate of 0.5 mL/min. The absorbance of organic acids at 210 nm was monitored using a UV-Vis detector (Dionex Ultimate, Thermo Scientific), while a refractometric detector (RefractoMax 521, Thermo Scientific, Mundelein, IL, USA) was employed to identify carbohydrates, ethanol, and glycerol [41]. Chromatograms were analyzed using the Chromeleon 7.3 software suite (Thermo Scientific, Mundelein, IL, USA).

2.5. Statistical Analysis

Statistical analysis of the obtained results was carried out using Statistica ver. 13.3 (2017) for Windows (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). Two-way ANOVA followed by Tukey HSD post hoc tests ($p < 0.05$) were used to compare the results for ethanol tolerance (2–10% EtOH in 24 and 48 h) for strains no. 15, 16, 101, 110, and 113, yeast viability (for 0, 7, 14, and 30 days), underbeer pH (7, 14, and 30 days), total titratable acidity (TTA) (for 7, 14, and 30 days), fermentative vigor (7 and 14 days), turbidity (0, 7, and 14 days) and color (0, 7, and 14 days) for each strain. One-way ANOVA was used to evaluate the level of ethanol tolerance (8–16% EtOH in 24 and 48 h) for strains no. 37 and SB and concentrations of sugars, ethanol, and organic acids for each strain (for 0, 7, 14, and 30 days). Detailed results (statistical significance) of the analyses are included in the Supplementary Materials.

3. Results

3.1. Properties of Strains Related to Beverage Production

3.1.1. Ethanol Tolerance

The change in cell number is presented as a percentage of growth decrease relative to the control at the appropriate ethanol concentrations. For *Saccharomyces* spp. (strains 37_Sacch_cerevisiae and Sacch_boulardi), ethanol concentrations were in the range of 8–16% (v/v). For the rest of the species, ethanol concentrations were in the range of 2–12% (v/v). The ethanol tolerances of *Saccharomyces* yeasts are presented at Figures 1 and 2. The

strain with the highest ethanol tolerance is the strain 37_Sacch_cerevisiae, still presenting about 32 and 23–29% survivability at 14 and 16% ethanol concentration after 24 and 48 h, respectively; the next-highest is the strain Sacch_boulardi, which presents 25 and 18% for 14 and 16% of ethanol after 24 h, with a slight decrease following after 48 h. In the case of a non-Saccharomyces yeast, 101_Pich_kudriavzevii showed the highest survival rate after 24 h of cultivation in the presence of 2, 6, and 8% ethanol, while after 48 h, 16_Hans_uvarum showed higher survival rates in the presence of all tested concentrations of added ethanol. Overall, even in the presence of 10% ethanol, yeasts survived at a rate of 25.5–35% after 24 h and 14.8–22.8% after 48 h, as is presented in Figures 3 and 4.

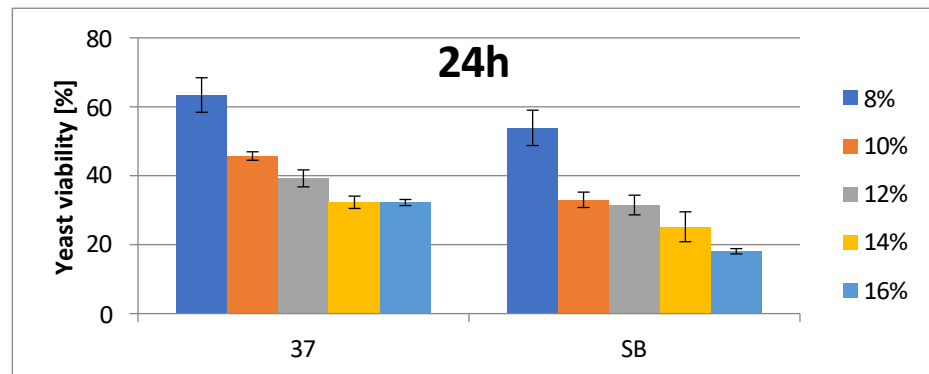


Figure 1. Ethanol tolerance for *Saccharomyces* spp. strains (37 and SB) at various EtOH concentrations after 24 h. Survivability of tested strains no. 37 and SB within 24 h in 8, 10, 12, 14, and 16% EtOH (two-way ANOVA: strain: $F(1,20) = 72,703$, $p = 0.00000$, $se \pm 0.004721$; EtOH %: $F(4,20) = 20,349$, $p = 0.00000$; $se \pm 0.007465$; strain $\times$ EtOH %: $F(4,20) = 25,313$; $p = 0.00000$, $se \pm 0.010557$). Statistical significance of the analyses is included in the Supplementary Spreadsheet S1.

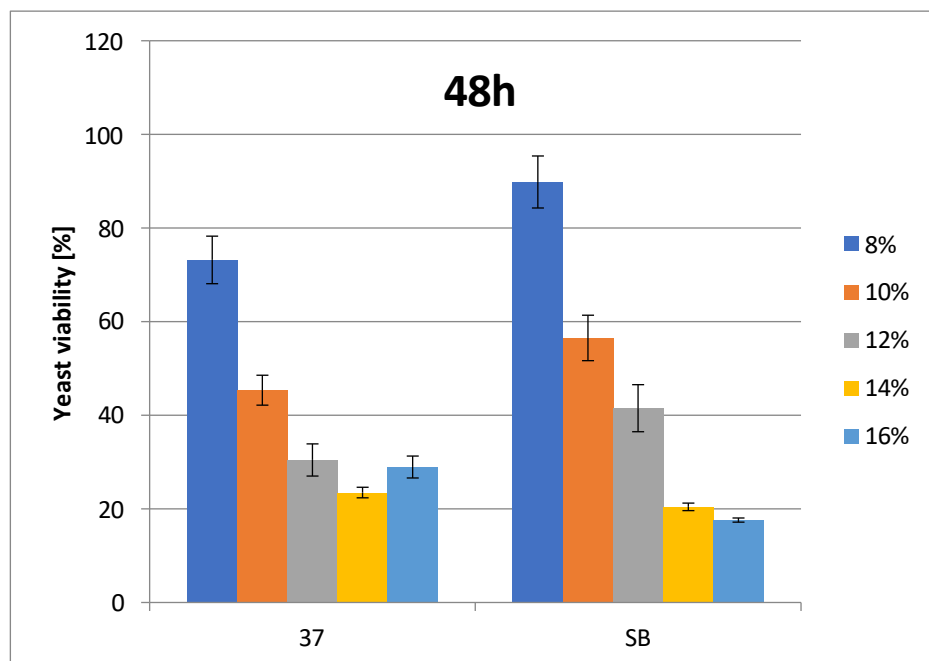


Figure 2. Ethanol tolerance for *Saccharomyces* spp. strains (37 and SB) at various EtOH concentrations after 48 h. Survivability of tested strains no. 37 and SB within 48 h in 8, 10, 12, 14, and 16% EtOH (two-way ANOVA: strain: $F(1,20) = 83,267$, $p = 0.00000$, $se \pm 0.005503$; EtOH %: $F(4,20) = 24,112$, $p = 0.00000$; $se \pm 0.008701$; strain $\times$ EtOH %: $F(4,20) = 41,191$; $p = 0.00000$, $se \pm 0.012305$). Statistical significance of the analyses is included in the Supplementary Spreadsheet S1.

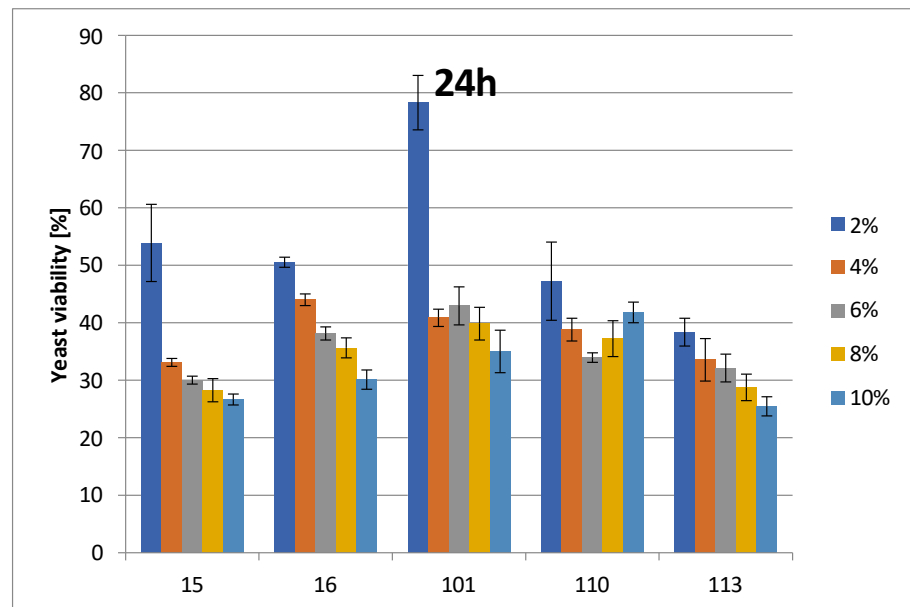


Figure 3. Ethanol tolerance for non-Saccharomyces strains at various EtOH concentrations after 24 h. Survivability of tested strains no. (15, 16, 101, 110, and 113) within 24 h in 0, 2, 4, 6, 8, 10, and 12% EtOH (two-way ANOVA: EtOH %: $F(5,62) = 27,461$, $p = 0.00000$; $se \pm 0.006318$ – 0.014128 ; strain $\times$ EtOH %: $F(20,62) = 25,563$; $p = 0.00000$, $se \pm 0.014128$; One-Way ANOVA: strain: $F(4,88) = 5.2884$, $p = 0.00073$, $se \pm 0.063141$ – 0.068200). Statistical significance is included in the Supplementary Spreadsheet S1.

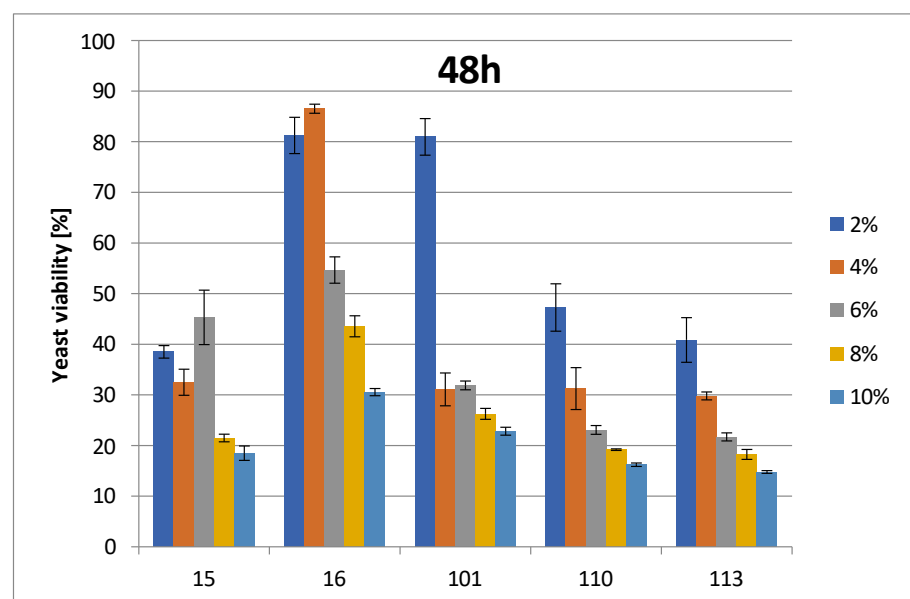


Figure 4. Ethanol tolerance for non-Saccharomyces strains at various EtOH concentrations after 48 h. Survivability of tested strains no. (15, 16, 101, 110, and 113) within 48 h in 0, 2, 4, 6, 8, 10, and 12% EtOH (two-way ANOVA: EtOH %: $F(5,62) = 117.35$, $p = 0.00000$, $se \pm 0.006299$ – 0.014084 ; strain $\times$ EtOH %: $F(20,62) = 40,080$, $p = 0.00000$, $se \pm 0.014084$; One-Way ANOVA: strain: $F(4,88) = 4.5875$, $p = 0.00206$, $se \pm 0.079084$ – 0.085420). Statistical significance of the analyses is included in the Supplementary Spreadsheet S1.

3.1.2. H₂S Production

All tested strains with exception of 15_Hans_uvarum and 16_Hans_uvarum presented the ability to produce H₂S (brown and dark brown colonies on Biggy Agar).

3.2. Parameters Related to Fermentation

3.2.1. Yeast Viability in Fermented Beverages

The viability of the yeast in the wort was assessed at days 0, 7, 14, and 30. Generally, all of the strains presented growth within tested fermentation time, although some strains (16_Hans_uvarum, 37_Sacch_cerevisiae, 101_Pich_kudriavzevii) presented a temporary, slight decrease in the number of cells. The results presented in Figure 5 indicate that all strains retained their viability above 10^6 CFU/mL throughout the entire analysis period.

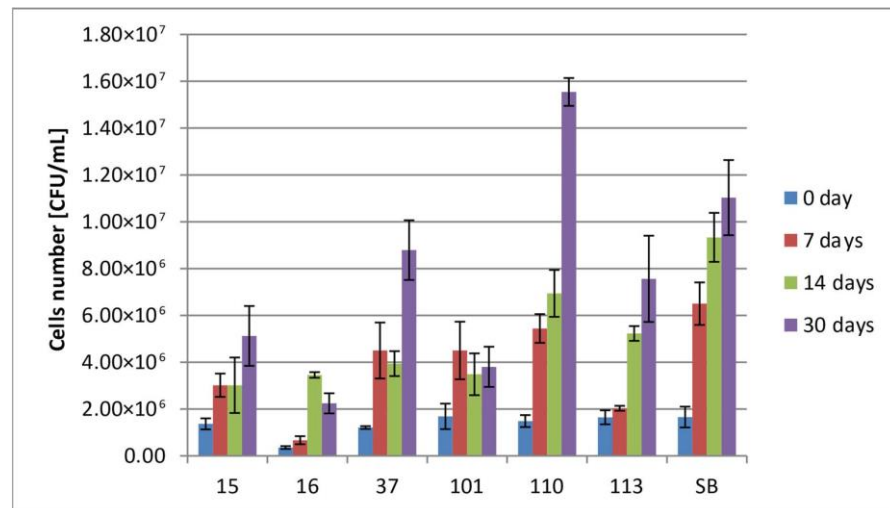


Figure 5. Yeast viability at day 0, 7, 14, and 30. Survivability of tested strains no. (15, 16, 37, 101, 110, 113, and SB) within 0, 7, 14, and 30 days (two-way ANOVA: strain: $F(5,60) = 15,718$, $p = 0.0000$, $se \pm 494,907.0$; time: $F(3,60) = 49,091$, $p = 0.0000$; $se \pm 386,886.6$; strain $\times$ time: $F(15,60) = 4.1785$; $p = 0.00003$, $se \pm 699,904.1$ – $989,813.9$). Statistical significance of the analyses is included in the Supplementary Spreadsheet S1.

3.2.2. pH

The pH results for whole period of fermentation are presented at Figure 6. The pH decreased during the fermentation period for all tested strains, with the highest pH value in 15_Hans_uvarum and the lowest pH value in Sacch_boulardi.

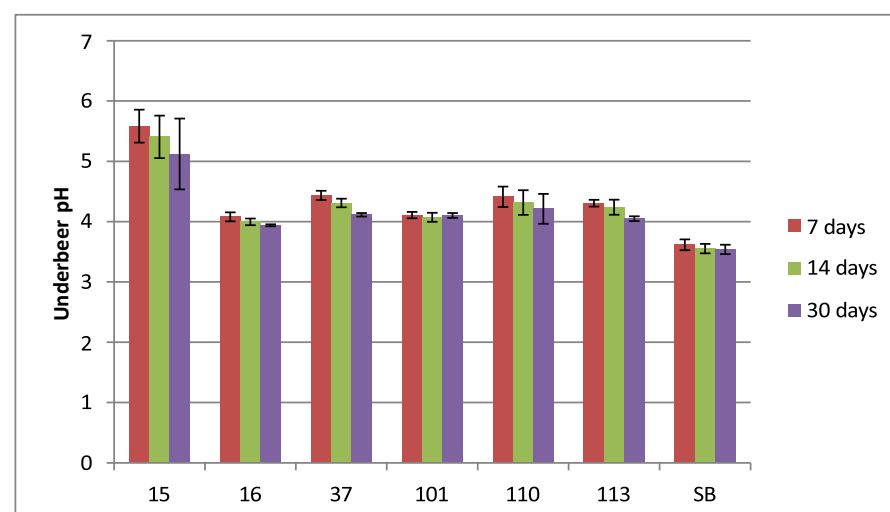


Figure 6. Underbeer at day 0, 7, 14, and 30. pH of tested strains no. (15, 16, 37, 101, 110, 113, and SB) within 7 and 14 day (two-way ANOVA: strain: $F(5,45) = 49,379$, $p = 0.0000$, $se \pm 0.082286$; time: $F(2,45) = 4.5594$, $p = 0.01574$; $se \pm 0.055708$; strain $\times$ time: $F(10,45) = 0.37153$; $p = 0.95266$, $se \pm 0.142523$). Statistical significance of the analyses is included in the Supplementary Spreadsheet S1.

3.2.3. Titratable Acidity

All the strains showed an increase in total titratable acidity (TTA) within the duration of the experiment. The lowest TTA value was determined for the beverage made with the strain 15_Hans_uvarum and the highest TTA value was in the beverage produced by *Sacch_boulardi* during the experiment. The TTA ranged from 0.094 g of acetic acid equivalent per liter for strain 15_Hans_uvarum to 0.97 g/L for control *Sacch_boulardi* at day 7. For day 14 TTA ranged from 0.102 g/L of acetic acid equivalent per liter for strain 15_Hans_uvarum up to 1.02085 g/L for the control *Sacch_boulardi*. At day 30, the TTA ranged between 0.114 g/L for the strain 15_Hans_uvarum and 1.085 g/L for the SB.

The results of the assay are presented in Figure 7.

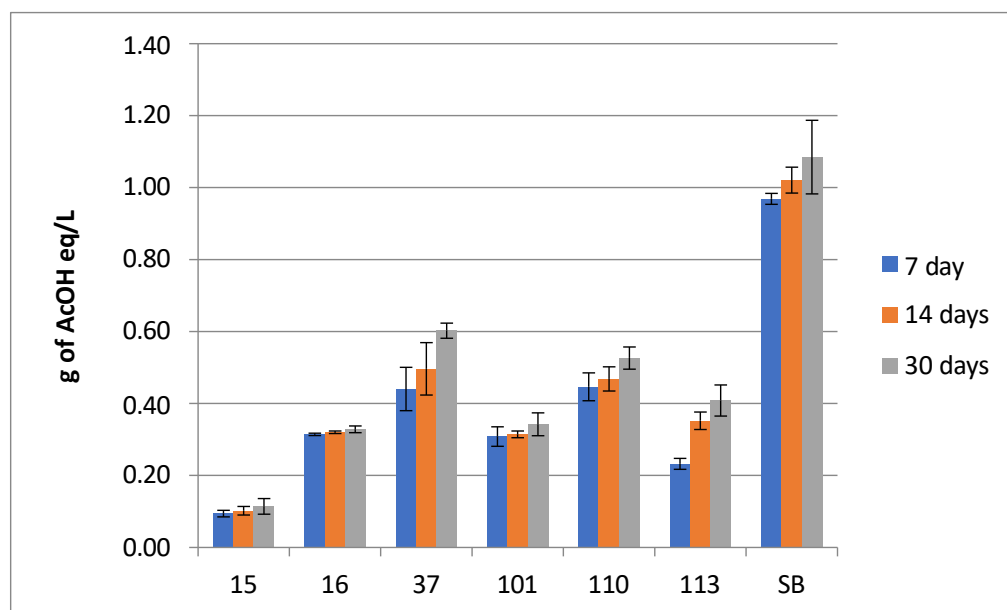


Figure 7. Total titratable acidity (TTA) of beverages produced by the tested strains. TTA of tested strains no. (15, 16, 37, 101, 110, 113, and SB) within 7, 14, and 30 days (two-way ANOVA: strain: $F(5,24) = 5.0736$, $p = 0.00259$, $se \pm 0.070830$ – 0.100168 ; time: $F(2,24) = 0.20727$, $p = 0.81424$; $se \pm 0.067814$; strain $\times$ time: $F(10,24) = 0.06997$; $p = 0.99994$, $se \pm 0.173497$). Statistical significance of the analyses is included in the Supplementary Spreadsheet S1.

3.2.4. Fermentative Vigor

The fermentative vigor (FV) was evaluated as weight loss expressed as g of CO_2 (v/v) per 100 mL of wort. The fermentation vessels were weighted at the beginning of fermentation and days 7 and 14. The difference in fermentative vigor was strain-dependent and increased during the fermentation period. The strain 15_Hans_uvarum presented the lowest FV both at 7 d and 14 d (acc. 0.357 g and 0.557 g). Conversely, the control strain, *Sacch_boulardi*, presented the highest FV on days 7 and 14 (acc. 6.587 g and 10.83 g).

The results of the assay are presented in Figure 8.

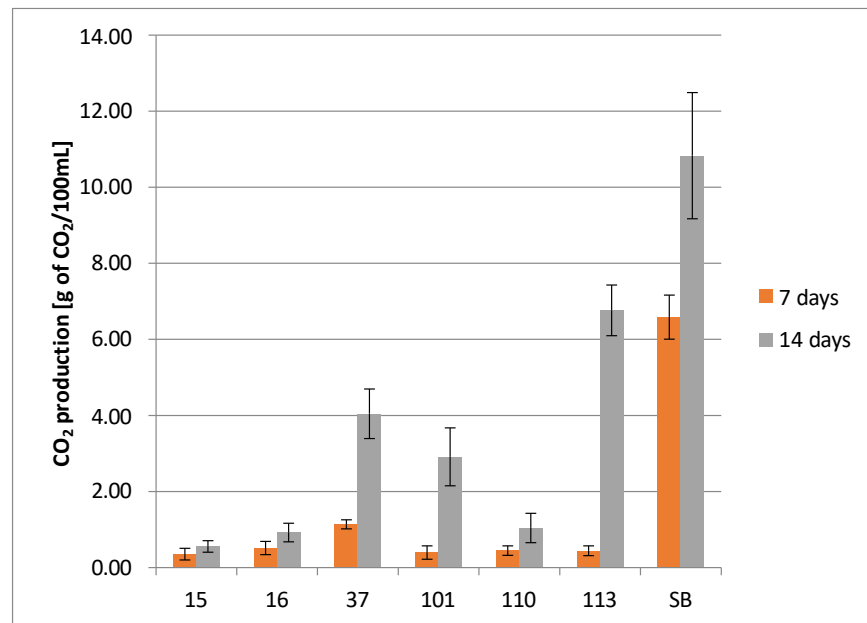


Figure 8. Fermentative vigor of the tested yeast strains. Fermentative vigor of tested strains no. (15, 16, 37, 101, 110, 113, and SB) within 7 and 14 days (two-way ANOVA: strain: $F(6,28) = 46,242$, $p = 0.00000$, $se \pm 0.427739$; time: $F(1,28) = 57,659$, $p = 0.00000$; $se \pm 0.228636$; strain $\times$ time: $F(6,28) = 7.0805$, $p = 0.00012$, $se \pm 0.604914$). Statistical significance of the analyses is included in the Supplementary Spreadsheet S1.

3.2.5. ASBC Turbidity

The results of turbidity assay at days 0, 7, and 14 are presented in Figure 9. Almost all the tested strains presented increases in turbidity within the whole fermentation period, except the strains 15_Hans_uvarum, 37_Sacch_cerevisiae, and Sacch_boulardi. In the case of the strains 15_Hans_uvarum and 37_Sacch_cerevisiae, turbidity remained quite similar for the entire fermentation period, although 101_Pich_kudriavzevii and Sacch_boulardi showed slight decreases in turbidity at day 14.

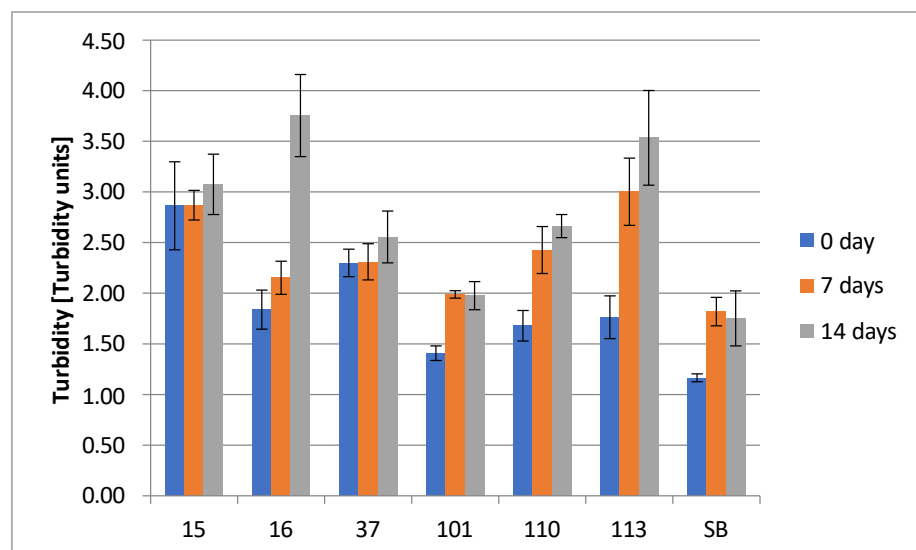


Figure 9. ASBC Turbidity of the tested underbeers. Results of the turbidity of tested strains no. (15, 16, 37, 101, 110, 113, and SB) within 0, 7, and 14 days (two-way ANOVA: strain: $F(5,45) = 44,535$, $p = 0.0000$, $se \pm 0.081080$; time: $F(2,45) = 17,763$, $p = 0.0000$, $se \pm 0.054891$; strain $\times$ time: $F(10,45) = 21,912$; $p = 0.0000$, $se \pm 0.099302$ – 0.140435). Statistical significance of the analyses is included in the Supplementary Spreadsheet S1.

3.2.6. ASBC Color

ASBC Color was assessed at days 0, 7, and 14. The higher the ASBC Beer Color value, the darker the color of the beer. Light beers usually are in the range of 1.5–3.0 ASBC color units, pale and amber beers in the range of 3.0–15.0, and dark beers in the range of 15.0–200 and more [42]. The results of the color assay are presented in Figure 10.

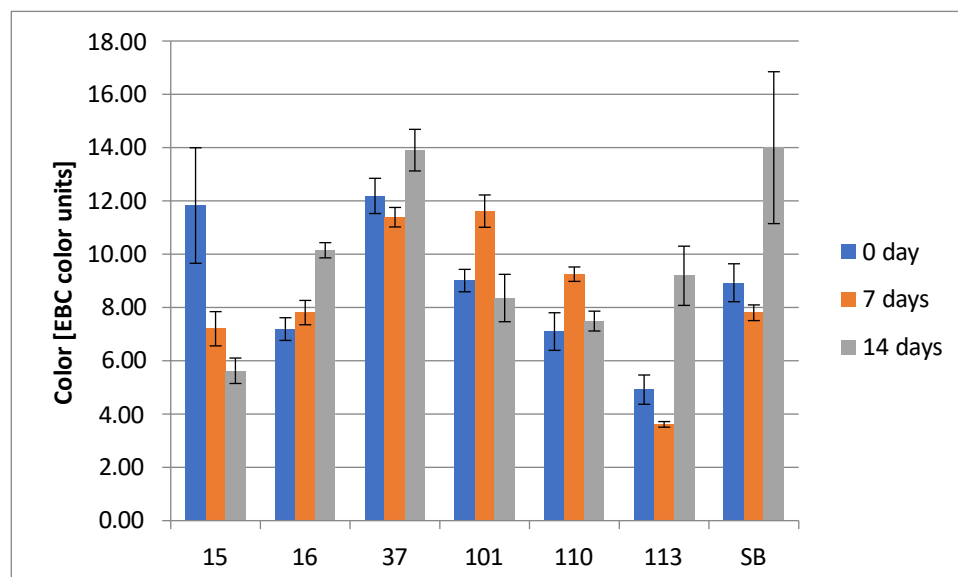


Figure 10. ASBC Color (EBC units) of the underbeers produced by the selected yeast strains. Results in the color assay of tested strains no. (15, 16, 37, 101, 110, 113, and SB) within 0, 7, and 14 days (two-way ANOVA: strain: $F(5,45) = 19,232$, $p = 0.0000$, $se \pm 0.365406$ – 0.516763 ; time: $F(2,45) = 4.2397$, $p = 0.02056$; $se \pm 0.349850$; strain $\times$ time: $F(10,45) = 5.7225$; $p = 0.00002$, $se \pm 0.632903$ – 0.895059). Statistical significance of the analyses is included in the Supplementary Spreadsheet S1.

3.2.7. High-Performance Liquid Chromatography Analysis

The wort prepared after sterilization and before inoculation contained carbohydrates: glucose (35.26 g/L) and fructose (30.42 g/L), originating from the hydrolysis of sucrose and complexed carbohydrates (104.30 g/L) containing products of partial starch hydrolysis released during grain roasting (e.g., maltodextrin) and inulin present in chicory (retention times were the same under separation conditions). The small amount of citric acid (0.13 g/L), which was a component of the mixture as an acidity regulator, was also detected. During incubation, changes in the sugar content occurred in the wort due to their assimilation by yeast cells and metabolism (including ethanol fermentation). Detailed data on substrate consumption by six strains of potentially probiotic yeasts and *Sacch_boulardi* are presented in Figure 11A–C. Significant changes in the composition of the wort were observed within the first days of fermentation, which depended on the yeast used. It is clearly visible that the monosaccharides glucose and fructose were used the fastest by *Sacch_boulardi*, at 28.68 g/L and 13.87 g/L, respectively. The strain 37_ *Sacch_cerevisiae* assimilated 15.47 g/L glucose and 7.97 g/L fructose and was the best in assimilation of the complexed sugars. *M. pulcherrima* and *P. kudriavzevii* yeasts assimilated 16.36–27.45% of glucose and 15.94–30.86 of fructose at that time, and *H. uvarum* strains assimilated sugars the least, about 10–11% of glucose and 12–13% of fructose. The consumption of complexed carbohydrates was also low. Rapid sugar consumption was compatible with ethanol production (Figure 12), and the highest amount was produced by *Sacch_boulardi*, with as much as 22.51 g/L after 7 d, while 37_ *Sacch_cerevisiae* produced 8.4 g/L of ethanol during this time and 110_ *Metsch_pulcherrima*, 101_ *Pich_kudriavzevii*, and 113_ *Metsch_pulcherrima* produced 4.91 g/L, 1.29 g/L, and 1.07 g/L, respectively. Both strains of *H. uvarum* were

not able to produce ethanol in the conditions used. In *Saccharomyces* yeast, an increase in citric acid concentration was observed above the concentration in the broth by 0.1 g/L and 0.42 g/L for strains 37_Sacch_cerevisiae and Sacch_boulardi, respectively (Figure 13C). Tartaric acid was also detected in small amounts during fermentation carried out by *Saccharomyces* spp., with 1.63 g/L and 0.71 g/L for Sacch_boulardi and 37_Sacch_cerevisiae, respectively, and by 110_Metsch_pulcherrima, with 0.15 g/L (Figure 13A). Malic acid appeared in the cultures of all strains in concentrations of 0.16–0.39 g/L, with the exception of 110_Metsch_pulcherrima, where 1.27 g/L was detected after 7 d of fermentation (Figure 13B). In the following weeks, when the batches were stored at refrigeration temperature, *Saccharomyces* yeast consumed glucose and fructose slowly and also produced ethanol to final concentrations of 9.69 g/L for 37_Sacch_cerevisiae and 24.27 g/L for Sacch_boulardi. Ethanol was also present throughout the duration of the experiment in the 110_Metsch_pulcherrima culture (up to 6.20 g/L). The remaining yeasts also assimilated sugars slowly but showed no metabolic activity. During the storage of samples in refrigerated conditions, stabilization of the composition of the beverages was visible (Figures 12 and 13A–C).

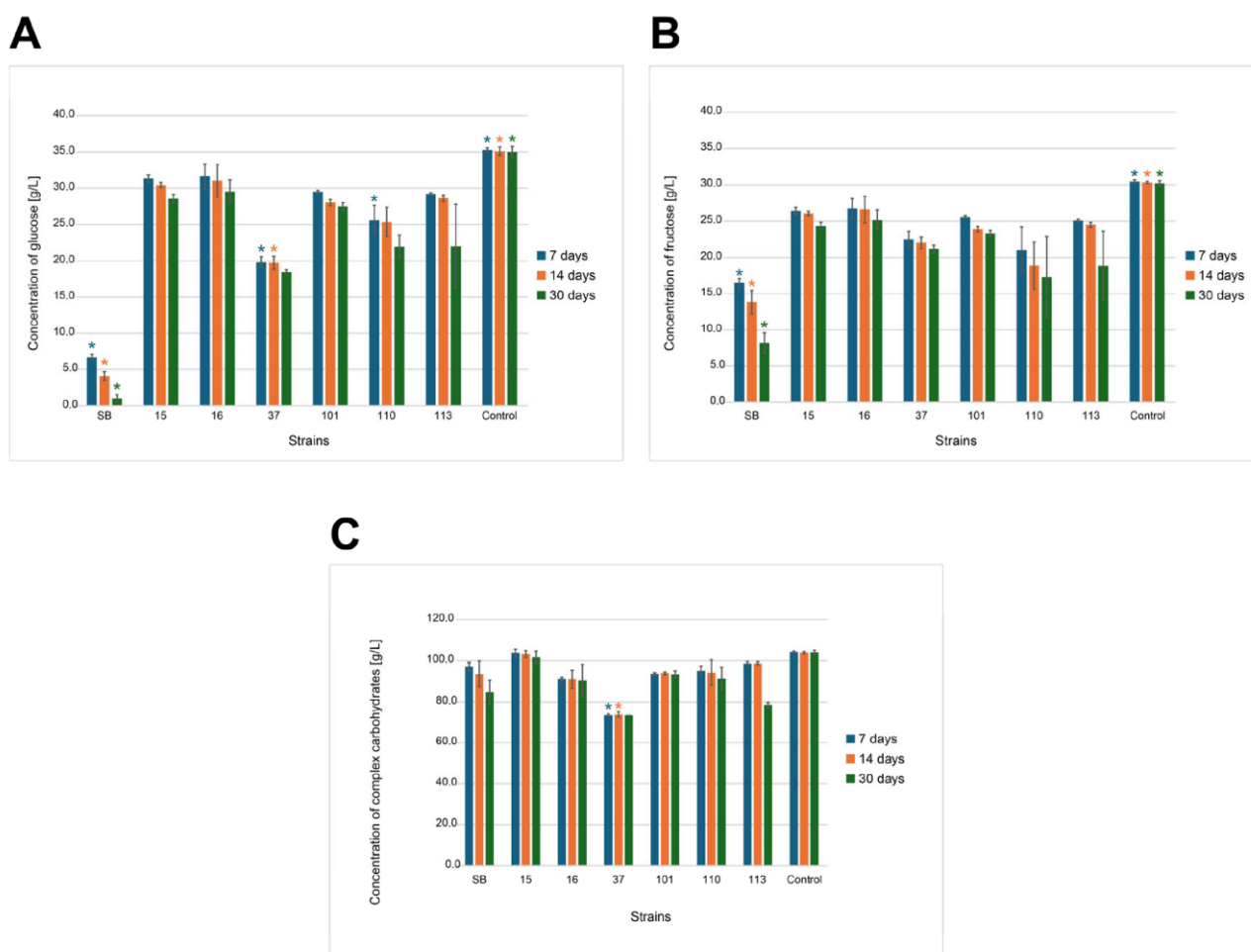


Figure 11. Changes in the concentration of glucose (A), fructose (B), and complex carbohydrates (C) (g/L) in underbeer fermented with various yeast strains (SB, 15, 16, 37, 101, 110, and 113) and a control sample after 7, 14, and 30 days of fermentation. Bars represent mean values $\pm$ standard deviation ($n = 3$). Colored asterisks (*) indicate statistically significant differences ($p < 0.05$) between all the strains and the control within the same time point (7, 14, or 30 days), as determined by Tukey's HSD test (Supplementary Spreadsheet S2).

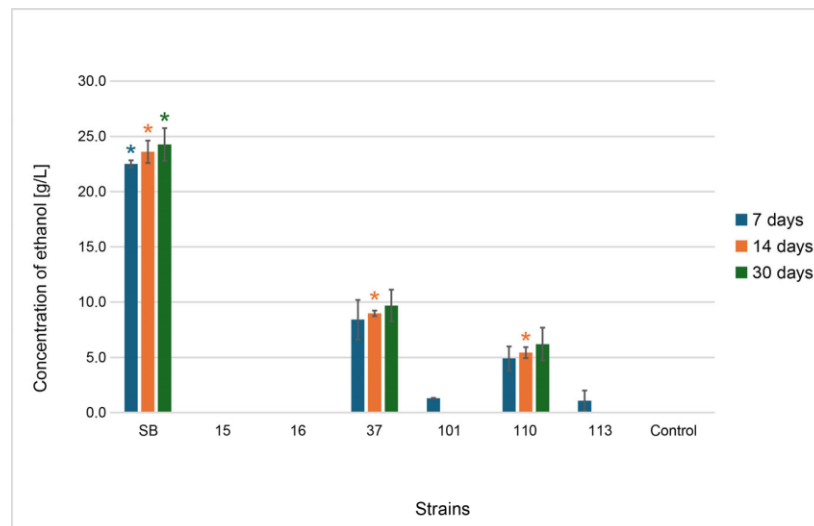


Figure 12. Changes in the concentration of ethanol (g/L) in underbeer fermented with various yeast strains (SB, 15, 16, 37, 101, 110, and 113) and a control sample after 7, 14, and 30 days of fermentation. Bars represent mean values $\pm$ standard deviation ($n = 3$). Colored asterisks (*) indicate statistically significant differences ($p < 0.05$) between all the strains and the control within the same time point (7, 14, or 30 days), as determined by Tukey's HSD test (Supplementary Spreadsheet S3).

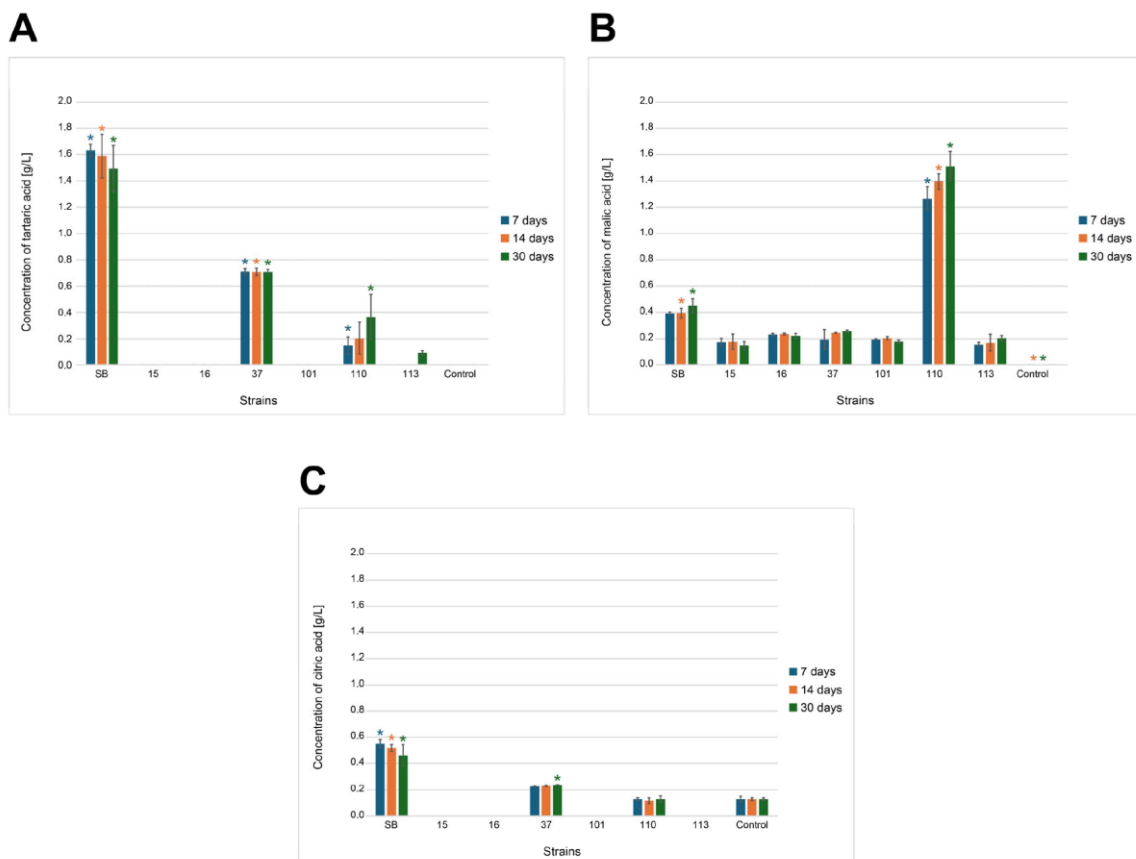


Figure 13. Changes in the concentration of tartaric acid (A), malic acid (B) and citric acid (C) (g/L) in underbeer fermented with various yeast strains (SB, 15, 16, 37, 101, 110, and 113) and a control sample after 7, 14, and 30 days of fermentation. Bars represent mean values $\pm$ standard deviation ($n = 3$). Colored asterisks (*) indicate statistically significant differences ($p < 0.05$) between all the strains and the control within the same time point (7, 14, or 30 days), as determined by Tukey's HSD test (Supplementary Spreadsheet S3).

4. Discussion

In the experiment, yeasts with probiotic potential were used as starter monocultures for the production of a traditional Polish fermented beverage called underbeer, which belongs to the group of low-alcohol or non-alcoholic products. The yeast strains were initially tested for tolerance to ethanol as a stress agent and their ability to produce H_2S , as these are characteristics describing starter cultures. The analysis showed differences between strains in ethanol tolerance according to expectations for both *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeast. Taking into account *S. cerevisiae* strains, such performance is comparable to classical wine *Saccharomyces* strains, which commonly ferment to 12–15% ethanol concentration [43–45]. Results obtained for the strain *Sacch_boulardii* (*S. cerevisiae* var. *boulardii* CNCM I-745) align with the ethanol tolerance assay presented by Ramirez-Cota et al., 2020 [30]. In the case of non-*Saccharomyces* yeasts, strains 15 and 16, belonging to *H. uvarum*, showed slight growth even at 10% ethanol, which is consistent with Matraxia et al.'s, 2021, observation [17]. These strains showed very limited ethanol tolerance, in line with their known role as early-phase fermenters in wine and cider [46,47], which may depend on the incubation temperature [22]. Both *H. uvarum* strains failed to propagate vigorously once ethanol exceeded 6–8%, which matches numerous literature reports for this genus [46–51]. The strain 101_Pich_kudriavzevii showed a moderate ethanol tolerance, better than *Metschnikowia* strains but still lower than *Saccharomyces*. So, for practical purposes, this *Pichia* strain could actively grow up to around 6–8% ethanol. This behavior aligns with literature: *Pichia kudriavzevii* is often noted to tolerate around 7% ethanol in traditional fermentation environments [52]. The strain's limit (8% with slight growth) is slightly above that typical range but still far below *S. cerevisiae*'s typical ethanol tolerance threshold [23,44]. Both of the *M. pulcherrima* strains (110 and 113) proved to be quite sensitive to ethanol, which aligns with literature observations, where *Metschnikowia* strains usually show survivability in 3–5% ethanol and are used mainly in cofermentation with *Saccharomyces cerevisiae* [53–55].

Another important feature of the yeast used in fermentation processes is H_2S . This sulfur compound is of great importance in industries producing alcoholic beverages such as wine, beer, or cider. Most often, yeast produces it as a result of the reduction of inorganic sulfur compounds, most commonly from sulfides released during the decomposition of organic compounds. For example, the amount of H_2S during beer fermentation is related to the boiling time of the wort. H_2S was suggested to play metabolic and protective roles in the cell during the early phase of fermentative transition, where a time-critical nutritional switch and oxidative stress response occur [56]. The process of releasing this compound has been fairly well understood for *Saccharomyces* yeasts [57]. Our isolates 37_Sacch_cerevisiae and *Sacch_boulardii* also showed the ability to produce H_2S on BIGGY agar. Positive results were obtained for all strains with the exception of *Hanseniaspora uvarum* strains and were typical for individual species [17,56,57].

The monocultures of studied yeasts were used for fermentation of the prepared wort based on roasted barley grain, chicory root and hops. Yeast viability during fermentation plays a crucial role in both fermentation efficiency and the stability of the final product, and in the context of probiotic food products, survivability of probiotic strains is a key [30,58–61]. Slight fluctuations in yeast counts observed during fermentation may be related to stress responses initiated by challenging environmental conditions during fermentation. Such stressors, like rising ethanol levels, nutrient shortages, changes in osmotic pressure, etc., trigger survival mechanisms. These include metabolism shifts and changes in gene expression levels, which can temporarily reduce yeast growth or viability. Research indicates that these stress responses are key to how yeast adapts, and they often lead to short-term declines in cell counts during fermentation [61–66]. All of the tested strains exceeded the

minimum viable cell count of 10^6 recommended by World Health Organization (WHO), which suggests their potential use in probiotic underbeer preparation in the context of survivability during fermentation [7,67]. Additionally, taking into account the size of the typical served portion of underbeer (250–500 mL), the viable cell count of 10^9 suggested by other authors should be reached [68]. The yeast remained viable throughout the entire storage period (1 month). Our results are in agreement with Hinojosa-Avila, 2025 [13], who, during the production of beer based on mixed wort, found that commercial *S. cerevisiae* var. *boulardii* yeast reached 6.2 Log CFU/mL at the end of fermentation, whereas Mulero-Cerezo, when trying to use *S. cerevisiae* var. *boulardii* to produce probiotic craft beer, obtained a cell count of 8.3×10^6 CFU/mL.

The fermentation process lasted 14 days at room temperature, after which the products were stored in a refrigerator. Fermentation conditions were standardized for all strains due to the preliminary nature of the research and the possibility of comparing yeast performance. Certainly, in order to achieve optimal results, fermentation requires optimization with respect to temperature, pH, culture time, and oxygen access, depending on the preferences of individual strains. Analyses of underbeers conducted in terms of substrate consumption, basic metabolites production, and fermentation vigor indicate the fermentative activity of the yeast. The analyses showed that *Sacch_boulardii* was the most active, utilizing sugars the fastest, exhibiting the highest fermentation vigor, and producing the highest concentrations of ethanol, tartaric acid, and citric acid. The next strain was the wine-derived isolate 37_Sacch_cerevisiae, which had lower activity in the wort environment but maintained a similar trend. These *Saccharomyces* spp. strains exhibited one of the highest levels of CO₂ production from all tested yeasts, underscoring their vigorous fermentative capability. Such characteristics make them suitable for fermentations aimed at rapid conversion of sugars to alcohol and CO₂, which aligns well with previous studies in the field of beer fermentations [69–71]. It should be emphasized that the commercial probiotic yeast *S. cerevisiae* var. *boulardii* was used by other researchers to produce probiotic beer with good results [10,12]. Silva stated that wheat and sour beers can be highlighted as useful matrices to deliver probiotic strains, and Gutiérrez-Nava confirmed the usefulness of barley wort as a potential medium to produce probiotic beverages with the yeast *S. boulardii*. At the opposite end of the spectrum were the *H. uvarum* strains, also derived from wine, which, however, did not perform well in the wort environment, as they consumed little sugar, had very low fermentation vigor, and did not produce ethanol. In general, *Hanseniaspora* yeasts are glucophilic in nature, but they do not completely consume the sugars in grape must. Ethanol production, on the other hand, is species-dependent, and these yeasts are mainly known for the production of aromatic compounds and acids. On the other hand, *Hanseniaspora* does not have the ability to assimilate maltose, and only a few species of this genus can utilize sucrose. Therefore, they are not considered components of the natural microbiota of grain-based fermentation, but their use is in line with the trend towards the production of low-alcohol or non-alcoholic beers [17,25]. The isolates 101_Pich_kudriavzevii, 110_Metsch_pulcherrima, and 113_Metsch_pulcherrima had slightly higher fermentation activity, especially strain 110, which produced ethanol and a lot of malic acid. Additionally, one strain of *Metschnikowia pulcherrima* (113_Metsch_pulcherrima) presented high FV at 14 d, with 6.76 g compared to only 0.44 g at day 7, which might be caused by the evolutionary adaptation of the strain during the fermentation process [62,72]. The adaptive mechanisms of *Metschnikowia* yeast to fermentation environments have been studied to some extent at various levels: genetic, cellular, and extracellular (cellular response). In-depth research by Sipiczki et al., 2024, comprehensively explains the unique adaptive abilities of these yeasts at the genetic level due to the presence of a chimeric genome structure (heterozygosity, multiple gene alleles) and gene regulation, which allows for the switching of allele expression to suit conditions

and further adaptation of metabolism to the environment [73]. It is very interesting that these yeasts assimilated sugars poorly and used them mainly for growth, as evidenced by the number of live yeast cells analyzed during the experiment.

During and after fermentation, the selected underbeers' properties were examined on the basis of beer characteristics such as pH, titratable acidity, turbidity, and color [13]. The acidity analysis was consistent with the pH and metabolite analysis, as the highest acidity and lowest pH were correlated with the highest concentrations of acids produced by the tested yeasts.

Turbidity is considered a decrease in a liquid's transparency due the presence of undissolved substances, and turbidity is very often indicative of biomass formation, yeast suspension, and the colloidal stability of a beverage. With progressing fermentation, flocculating strains begin to sediment, reducing turbidity, while non-flocculating strains may maintain high levels of suspended cells. However, increased turbidity over time is not always solely attributable to biomass growth. Other contributing factors include the accumulation of extracellular polysaccharides, mannoproteins, and β -glucans released during autolysis or cell wall remodeling [74,75]. These macromolecules can increase colloidal instability and haze formation in the liquid phase. Additionally, mannoproteins might provide various prohealth properties such as prebiotic, antimicrobial, immunostimulating, and antioxidant activities [76]. The release of vesicles and exometabolites into the medium during late fermentation stages can affect turbidity levels [74,77,78]. The level of turbidity may vary during incubation, and decreases in its value may indicate the ability of a yeast to form aggregates and sediments at the bottom of fermentation vessels, as was observed for 101_Pich_kudriavzevii and Sacch_boulardi at 14 days. Such an observation could result from increased flocculation activity or partial cell sedimentation during the final fermentation stage, which might be connected with reduced metabolic activity of yeast and lower amount of excreted extracellular metabolites, which can also affect the turbidity [69]. Additionally, autolysis processes might lead to partial clarification as larger colloidal particles settle or degrade [79].

All yeast strains increased the titratable acidity (TTA) of the beverage during fermentation, which is a typical outcome due to the production of organic acids by yeast metabolism [80,81]. Both *Saccharomyces* spp. strains (37_Sacch_cerevisiae and Sacch_boulardi) exhibited the highest TTA, reflecting their robust metabolic activity and known acidification capacity. This high level of acid production is consistent with their role in wine and beer fermentation, where they generate various acids such as acetic, succinic, and lactic acids as byproducts of their metabolism [81–83]. Strains 15_Hans_uvarum and 16_Hans_uvarum showed low increases in acidity during the whole fermentation period, which is consistent with the observations of other authors where *H. uvarum* contributes to acidification through limited acetic acid production that could enhance freshness perception in fermented beverages [50,84,85]. Both *M. pulcherrima* strains (110_Metsch_pulcherrima and 113_Metsch_pulcherrima) presented values of TTA between those of the tested strains belonging to *Hanseniaspora* and *Saccharomyces*. This observation is consistent with prior studies showing that *M. pulcherrima* produces relatively fewer organic acids, partly due to its lower fermentative capacity and slower metabolism [53,72,86–88].

The color of all tested samples changed throughout the experiment and did not show any trend or tendency related to the species or fermentation period, which allows us to assume that this is a strain-specific feature of the tested yeasts. All underbeers were classified as pale and amber beers, taking into account EBC values. However, the following trends can be observed by analyzing the obtained results: (1) Gradual color reduction (strain 15_Hans_uvarum): characterized by a consistent decline in EBC values across time points. This may reflect steady polyphenol adsorption or enzymatic transformation processes,

often associated with yeasts' metabolic activity [81,89]. (2) Gradual color increase (strain 16_Hans_uvarum): characterized by a consistent increase in EBC values across time points, which may result from progressive pigment release from ingredients due to mild enzymatic activity or structural disruption of material matrices. Moreover, limited pigment adsorption to yeast cell walls and continued extraction in a low-ethanol environment could explain this rise [89–91]. (3) Initial increase followed by decline (strains 101_Pich_kudriavzevii and 110_Metsch_pulcherrima): those two strains showed a temporary rise in color intensity before a drop. This could be due to delayed autolysis, cell wall disruption, or pigment release followed by precipitation or adsorption of color-related substances by [92,93]. (4) Initial decrease followed by increase (strains 37_Sacch_cerevisiae, 113_Metsch_pulcherrima, and Sacch_boulardi): such a pattern may reflect early adsorption of polyphenols onto yeast cell walls or enzymatic transformation, reducing color initially. In later stages, autolysis or changes in cell surface chemistry may result in the release of previously bound pigments into the medium [92,93].

Our study is part of the current trend of searching for optimal food matrices for probiotic and potentially probiotic yeasts in order to obtain functional products. In recent years, there has been an intense increase in research on the use of unconventional yeasts, e.g., *Pichia*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, and others, for the production of fermented beverages such as low-alcohol and non-alcoholic beers, ciders, kombucha, and other plant-based fermented beverages [1,2,6,8]. The results presented here are only a preliminary step towards further research, which can be conducted in many ways: (1) the use of yeast monocultures or yeast co-cultures or yeast-bacterial co-cultures, (2) the addition of health-promoting additives, e.g., prebiotics; (3) the optimization of fermentation conditions and upscaling. These research proposals have a chance of being implemented, as market trends in recent years are optimistic. According to Research and Market, the global probiotics market was worth approximately USD 59.3 billion in 2022, and estimates predict strong growth to approximately USD 91.7 billion by 2030. Bacteria are the main segment of probiotics, but the yeast segment is expected to see dynamic growth over the next 8 years [2]. According to an analysis by Future Market Insight, the probiotic beverage market will grow from USD 22,069 million to USD 43,009 million by 2035, reflecting consumers' ever-increasing awareness of health and well-being and the prevention of many diseases [94]. The functional beverage category is expanding through the introduction of, among other things, dairy-free options, i.e., plant-based alternatives. The growing interest of societies on all continents in functional probiotic beverages is forcing the adaptation of appropriate global legal regulations for manufacturers, as can be learned from a detailed article by Mukherjee et al., 2022 [95]. In summary, in the context of the research conducted, it is certainly worthwhile to continue it by following the latest market trends and consumer expectations.

5. Conclusions

All of the tested probiotic yeast strains presented the ability to conduce underbeer fermentation. None of the tested strains presented properties above expectations for already-examined strains belonging to the same genus in the context of beverage fermentation. However, due our previous findings regarding the probiotic potential of the yeast strains used in the study and the inulin presented in underbeer wort, the study can be a starting point for further research on aspects of the production of both probiotic and synbiotic beverage preparations, as well as an impulse to search for often-forgotten regional products that can be an interesting base for probiotic products.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/foods14162921/s1>, the Supplementary Spreadsheet S1 (Tukey tests for Figures 1–10): Supplementary_1.xlsx; Supplementary Spreadsheet S2 (Tukey test for Figure 11): Supplementary_2.xlsx; Supplementary Spreadsheet S3 (Tukey tests for Figures 12 and 13): Supplementary_3.xlsx.

Author Contributions: Conceptualization, A.S. and M.K.-W.; methodology, A.S. and M.K.-W.; software, A.S. and P.S.; validation, M.K.-W.; formal analysis, A.S. and E.K.-J.; investigation, A.S.; resources, A.S.; data curation, A.S.; writing—original draft preparation, A.S.; writing—review and editing, M.K.-W. and A.S.; visualization, A.S., P.S., and E.K.-J.; supervision, M.K.-W.; project administration, A.S.; funding acquisition, A.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Doctoral School of the University of Life Sciences in Lublin, Grant Number: SzD/18/TZ /2021.

Data Availability Statement: Data will be made available on request.

Acknowledgments: The authors would like to thank Monika Pytka from Department of Biotechnology, Microbiology and Human Nutrition, University of Life Sciences in Lublin, for valuable inspiration in choosing underbeer as a research matrix in studies on probiotic yeast.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

- Giri, N.A.; Sakhale, B.K.; Nirmal, N.P. Functional Beverages: An Emerging Trend in Beverage World. In *Recent Frontiers of Phytochemicals Applications in Food, Pharmacy, Cosmetics, and Biotechnology*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2023; pp. 123–142. [\[CrossRef\]](#)
- Abdul Manan, M. Progress in Probiotic Science: Prospects of Functional Probiotic-Based Foods and Beverages. *Int. J. Food Sci.* **2025**, *2025*, 5567567. [\[CrossRef\]](#)
- Śmiechowska, M.; Jakubowski, M.; Dmowski, P. Nowe Trendy Na Rynku Niskoalkoholowych Napojów Fermentowanych. *Kosmos* **2018**, *67*, 575–582. [\[CrossRef\]](#)
- Cuvas-Limon, R.B.; Nobre, C.; Cruz, M.; Rodriguez-Jasso, R.M.; Ruíz, H.A.; Loredó-Treviño, A.; Texeira, J.A.; Belmares, R. Spontaneously Fermented Traditional Beverages as a Source of Bioactive Compounds: An Overview. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2021**, *61*, 2984–3006. [\[CrossRef\]](#)
- Tireki, S. A Review on Packed Non-Alcoholic Beverages: Ingredients, Production, Trends and Future Opportunities for Functional Product Development. *Trends Food Sci. Technol.* **2021**, *112*, 442–454. [\[CrossRef\]](#)
- Tamang, J.P.; Lama, S. Probiotic Properties of Yeasts in Traditional Fermented Foods and Beverages. *J. Appl. Microbiol.* **2022**, *132*, 3533–3542. [\[CrossRef\]](#)
- Staniszewski, A.; Kordowska-Wiater, M. Probiotic and Potentially Probiotic Yeasts—Characteristics and Food Application. *Foods* **2021**, *10*, 1306. [\[CrossRef\]](#)
- De Guidi, I.; Legras, J.L.; Galeote, V.; Sicard, D. Yeast Domestication in Fermented Food and Beverages: Past Research and New Avenues. *Curr. Opin. Food Sci.* **2023**, *51*, 101032. [\[CrossRef\]](#)
- Mulero-Cerezo, J.; Briz-Redón, Á.; Serrano-Aroca, Á. *Saccharomyces cerevisiae* Var. *Boulardii*: Valuable Probiotic Starter for Craft Beer Production. *Appl. Sci.* **2019**, *9*, 3250.
- Silva, L.C.; Schmidt, G.B.; Alves, L.G.O.; Oliveira, V.S.; Laureano-Melo, R.; Stutz, E.; Martins, J.F.P.; Paula, B.P.; Luchese, R.H.; Guerra, A.F.; et al. Use of Probiotic Strains to Produce Beers by Axenic or Semi-Separated Co-Culture System. *Food Bioprod. Process.* **2020**, *124*, 408–418. [\[CrossRef\]](#)
- Andrade, V.T.; de Castro, R.J.S. Fermented Grain-Based Beverages as Probiotic Vehicles and Their Potential Antioxidant and Antidiabetic Properties. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* **2023**, *53*, 102873. [\[CrossRef\]](#)
- Gutiérrez-Nava, M.A.; Jaén-Echeverría, E.; Acevedo-Sandoval, O.A.; Román-Gutiérrez, A.D. Fermentation of Barley Wort with *Saccharomyces Boulardii* to Generate a Beverage with Probiotic Potential. *Futur. Foods* **2024**, *9*, 100373. [\[CrossRef\]](#)
- Hinojosa-Avila, C.R.; Chedraui-Urrea, J.J.T.T.; Estarrón-Espinosa, M.; Gradilla-Hernández, M.S.; García-Cayuela, T.; Sebastián Gradilla-Hernández, M.; García-Cayuela, T. Chemical Profiling and Probiotic Viability Assessment in Gueuze-Style Beer: Fermentation Dynamics, Metabolite and Sensory Characterization, and in Vitro Digestion Resistance. *Food Chem.* **2025**, *462*, 140916. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

14. Staniszewski, A.; Kordowska-Wiater, M. Probiotic Yeasts and How to Find Them—Polish Wines of Spontaneous Fermentation as Source for Potentially Probiotic Yeasts. *Foods* **2023**, *12*, 3392. [CrossRef]
15. Staniszewski, A.; Staniszewska, P.; Kordowska-Wiater, M. Probiotic Yeasts and How to Find Them—From Spoilage to Probiotic. *Appl. Sci.* **2024**, *14*, 11698. [CrossRef]
16. Pirrone, A.; Naselli, V.; Gugino, I.M.; Porrello, A.; Viola, E.; Craparo, V.; Vella, A.; Alongi, D.; Seminerio, V.; Carusi, M.; et al. Use of Non-Conventional Yeasts for Enhancing the Sensory Quality of Craft Beer. *Food Res. Int.* **2025**, *208*, 116164. [CrossRef]
17. Matraxia, M.; Alfonzo, A.; Prestianni, R.; Francesca, N.; Gaglio, R.; Todaro, A.; Alfeo, V.; Perretti, G.; Columba, P.; Settanni, L.; et al. Non-Conventional Yeasts from Fermented Honey by-Products: Focus on *Hanseniaspora Uvarum* Strains for Craft Beer Production. *Food Microbiol.* **2021**, *99*, 103806. [CrossRef]
18. Fu, X.; Guo, L.; Li, Y.; Chen, X.; Song, Y.; Li, S. Transcriptional Analysis of Mixed-Culture Fermentation of *Lachancea Thermotolerans* and *Saccharomyces cerevisiae* for Natural Fruity Sour Beer. *Fermentation* **2024**, *10*, 180. [CrossRef]
19. Guerrini, S.; Galli, V.; Barbato, D.; Facchini, G.; Mangani, S.; Pierguidi, L.; Granchi, L. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* and *Starmerella bacillaris* on the Physicochemical and Sensory Characteristics of Sparkling Pear Cider (Perry). *Eur. Food Res. Technol.* **2023**, *249*, 341–352. [CrossRef]
20. Liu, Y.; Lu, Y.; Liu, S.Q. Transforming Spent Coffee Grounds' Hydrolysates with Yeast *Lachancea Thermotolerans* and Lactic Acid Bacterium *Lactiplantibacillus Plantarum* to Develop Potential Novel Alcoholic Beverages. *Foods* **2023**, *12*, 1161. [CrossRef]
21. Nikolaou, A.; Nelios, G.; Kanellaki, M.; Kourkoutas, Y. Freeze-Dried Immobilized Kefir Culture in Cider-Making. *J. Sci. Food Agric.* **2020**, *100*, 3319–3327. [CrossRef] [PubMed]
22. Hutzler, M.; Riedl, R.; Koob, J.; Jacob, F. Fermentation and Spoilage Yeasts and Their Relevance for the Beverage Industry—A Review. *BrewingScience* **2012**, *65*, 33–52.
23. Chu, Y.; Li, M.; Jin, J.; Dong, X.; Xu, K.; Jin, L.; Qiao, Y.; Ji, H. Advances in the Application of the Non-Conventional Yeast *Pichia kudriavzevii* in Food and Biotechnology Industries. *J. Fungi* **2023**, *9*, 170. [CrossRef]
24. Haniffadli, A.; Ban, Y.; Rahmat, E.; Kang, C.H.; Kang, Y. Unforeseen Current and Future Benefits of Uncommon Yeast: The *Metschnikowia* Genus. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2024**, *108*, 534. [CrossRef]
25. van Wyk, N.; Badura, J.; von Wallbrunn, C.; Pretorius, I.S. Exploring Future Applications of the Apiculate Yeast *Hanseniaspora*. *Crit. Rev. Biotechnol.* **2024**, *44*, 100–119. [CrossRef]
26. Temple, N.J. A Rational Definition for Functional Foods: A Perspective. *Front. Nutr.* **2022**, *9*, 957516. [CrossRef]
27. Podpiwek, the Traditional Polish Refreshing Soft-Drink—3 Seas Europe. Available online: <https://3seaseurope.com/podpiwek-refreshing-soft-drink-underbeer-poland/> (accessed on 20 April 2025).
28. Podpiwek|FermXpert. Available online: <https://fermxpert.com/pl/podpiwek/> (accessed on 20 April 2025).
29. Modzelan, M. Podpiwek Kujawski. *Wiedza I Jakos'c* **2020**, *2*, 11–12.
30. Ramírez-Cota, G.Y.; López-Villegas, E.O.; Jiménez-Aparicio, A.R.; Hernández-Sánchez, H. Modeling the Ethanol Tolerance of the Probiotic Yeast *Saccharomyces cerevisiae* Var. *Boulardii* CNCM I-745 for Its Possible Use in a Functional Beer. *Probiotics Antimicrob. Proteins* **2021**, *13*, 187–194. [CrossRef]
31. Barbosa, C.; Lage, P.; Esteves, M.; Chambel, L.; Mendes-Faia, A.; Mendes-Ferreira, A. Molecular and Phenotypic Characterization of *Metschnikowia Pulcherrima* Strains from Douro Wine Region. *Fermentation* **2018**, *4*, 8. [CrossRef]
32. Hsiung, R.T.; Fang, W.T.; LePage, B.A.; Hsu, S.A.; Hsu, C.H.; Chou, J.Y. In Vitro Properties of Potential Probiotic Indigenous Yeasts Originating from Fermented Food and Beverages in Taiwan. *Probiotics Antimicrob. Proteins* **2021**, *13*, 113–124. [CrossRef] [PubMed]
33. Aguiar-Cervera, J.; Visinoni, F.; Zhang, P.; Hollywood, K.; Vrhovsek, U.; Severn, O.; Delneri, D. Effect of *Hanseniaspora Vineae* and *Saccharomyces cerevisiae* Co-Fermentations on Aroma Compound Production in Beer. *Food Microbiol.* **2024**, *123*, 104585. [CrossRef] [PubMed]
34. Feng, C.T.; Du, X.; Wee, J. Microbial and Chemical Analysis of Non-*Saccharomyces* Yeasts from Chambourcin Hybrid Grapes for Potential Use in Winemaking. *Fermentation* **2021**, *7*, 15. [CrossRef]
35. Jiranek, V.; Langridge, P.; Henschke, P.A. Validation of Bismuth-Containing Indicator Media for Predicting H₂S-Producing Potential of *Saccharomyces cerevisiae* Wine Yeasts Under Enological Conditions. *Am. J. Enol. Vitic.* **1995**, *46*, 269–273. [CrossRef]
36. Bağ' der Elmaci, S.; Özçelik, F.; Tokatli, M.; Çakir, I. Technological Properties of Indigenous Wine Yeast Strains Isolated from Wine Production Regions of Turkey. *Antonie Leeuwenhoek* **2014**, *105*, 835–847. [CrossRef]
37. Sanders, E.R. Aseptic Laboratory Techniques: Plating Methods. *J. Vis. Exp.* **2012**, *63*, e3064. [CrossRef]
38. Neffe-Skocińska, K.; Sionek, B.; Ścibisz, I.; Kołożyn-Krajewska, D. Acid Contents and the Effect of Fermentation Condition of Kombucha Tea Beverages on Physicochemical, Microbiological and Sensory Properties. *Cyta-J. Food* **2017**, *15*, 601–607. [CrossRef]
39. Oliveira Alves, R.; Lins, A.; Monteiro, B.; Da Macaúbas Silva, C.; Da Sarmiento Silva, T.M.; De Lira Oliveira, R.; Porto, C.S.; Souza Porto, T. Investigation of the Influence of Different *Camellia Sinensis* Teas on Kombucha Fermentation and Development of Flavored Kombucha with Brazilian Fruits. *Beverages* **2025**, *11*, 13. [CrossRef]

40. Pyrovolou, K.; Tataridis, P.; Revelou, P.K.; Strati, I.F.; Konteles, S.J.; Tarantilis, P.A.; Houhoula, D.; Batrinou, A. Fermentation of a Strong Dark Ale Hybrid Beer Enriched with Carob (*Ceratonia siliqua* L.) Syrup with Enhanced Polyphenol Profile. *Appl. Sci.* **2024**, *14*, 1199. [CrossRef]
41. Da Costa, M.P.; Frasao, B.D.S.; Lima, B.R.C.D.C.; Rodrigues, B.L.; Junior, C.A.C. Simultaneous Analysis of Carbohydrates and Organic Acids by HPLC-DAD-RI for Monitoring Goat's Milk Yogurts Fermentation. *Talanta* **2016**, *152*, 162–170. [CrossRef] [PubMed]
42. Is the Color of Beer Related to the Color of the Distillers Grain?—Hunterlab. Available online: <https://support.hunterlab.com/hc/en-us/articles/202022605-Is-the-color-of-beer-related-to-the-color-of-the-distillers-grain> (accessed on 3 July 2025).
43. Ji, X.X.; Zhang, Q.; Yang, B.X.; Song, Q.R.; Sun, Z.Y.; Xie, C.Y.; Tang, Y.Q. Response Mechanism of Ethanol-Tolerant *Saccharomyces cerevisiae* Strain ES-42 to Increased Ethanol during Continuous Ethanol Fermentation. *Microb. Cell Fact.* **2025**, *24*, 33. [CrossRef]
44. Stewart, G.G. *Saccharomyces* Species in the Production of Beer. *Beverages* **2016**, *2*, 34. [CrossRef]
45. Wimalasena, T.T.; Greetham, D.; Marvin, M.E.; Liti, G.; Chandel, Y.; Hart, A.; Louis, E.J.; Phister, T.G.; Tucker, G.A.; Smart, K.A. Phenotypic Characterisation of *Saccharomyces* Spp. Yeast for Tolerance to Stresses Encountered during Fermentation of Lignocellulosic Residues to Produce Bioethanol. *Microb. Cell Fact.* **2014**, *13*, 47. [CrossRef] [PubMed]
46. Sola, I.M.M.S.; Evers, L.D.; Wojeicchowski, J.P.; de Assis, T.M.; Marinho, M.T.; Demiate, I.M.; Alberti, A.; Nogueira, A. Impact of Pure, Co-, and Sequential Fermentations with *Hanseniaspora* Sp. and *Saccharomyces cerevisiae* on the Volatile Compounds of Ciders. *Fermentation* **2024**, *10*, 177. [CrossRef]
47. Martin, V.; Valera, M.J.; Medina, K.; Dellacassa, E.; Schneider, R.; Boido, E.; Carrau, F. Application of *Hanseniaspora Vineae* to Improve White Wine Quality. In *White Wine Technology*; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2022; pp. 99–115. [CrossRef]
48. Al Daccache, M.; Koubaa, M.; Salameh, D.; Vorobiev, E.; Maroun, R.G.; Louka, N. Control of the Sugar/Ethanol Conversion Rate during Moderate Pulsed Electric Field-Assisted Fermentation of a *Hanseniaspora* Sp. Strain to Produce Low-Alcohol Cider. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2020**, *59*, 102258. [CrossRef]
49. Xu, A.; Xiao, Y.; He, Z.; Liu, J.; Wang, Y.; Gao, B.; Chang, J.; Zhu, D. Use of Non-*Saccharomyces* Yeast Co-Fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* to Improve the Polyphenol and Volatile Aroma Compound Contents in Nanfeng Tangerine Wines. *J. Fungi* **2022**, *8*, 128. [CrossRef]
50. Du Plessis, H.; Du Toit, M.; Nieuwoudt, H.; Van der Rijst, M.; Hoff, J.; Jolly, N. Modulation of Wine Flavor Using *Hanseniaspora Uvarum* in Combination with Different *Saccharomyces cerevisiae*, Lactic Acid Bacteria Strains and Malolactic Fermentation Strategies. *Fermentation* **2019**, *5*, 64. [CrossRef]
51. Del Fresno, J.M.; Loira, I.; Escott, C.; Carrau, F.; González, C.; Cuerda, R.; Morata, A. Application of *Hanseniaspora Vineae* Yeast in the Production of Rosé Wines from a Blend of Tempranillo and Albillo Grapes. *Fermentation* **2021**, *7*, 141. [CrossRef]
52. Candida Krusei|Viticulture and Enology. Available online: <https://wineserver.ucdavis.edu/industry-info/enology/wine-microbiology/yeast-mold/candida-krusei> (accessed on 25 June 2025).
53. Torres-Díaz, L.L.; Murillo-Peña, R.; Iribarren, M.; de Sáenz Urturi, I.; Marín-San Román, S.; González-Lázaro, M.; Pérez-Álvarez, E.P.; Garde-Cerdán, T. Exploring *Metschnikowia Pulcherrima* as a Co-Fermenter with *Saccharomyces cerevisiae*: Influence on Wine Aroma during Fermentation and Ageing. *Beverages* **2024**, *10*, 26. [CrossRef]
54. Canonico, L.; Comitini, F.; Ciani, M. *Metschnikowia Pulcherrima* Selected Strain for Ethanol Reduction in Wine: Influence of Cell Immobilization and Aeration Condition. *Foods* **2019**, *8*, 378. [CrossRef]
55. Morata, A.; Loira, I.; Escott, C.; del Fresno, J.M.; Bañuelos, M.A.; Suárez-Lepe, J.A. Applications of *Metschnikowia Pulcherrima* in Wine Biotechnology. *Fermentation* **2019**, *5*, 63. [CrossRef]
56. Hou, R.; Jolley, R.E.; van Leeuwen, K.A.; Pinu, F.R.; Fedrizzi, B.; Deed, R.C. Hydrogen Sulfide Production during Early Yeast Fermentation Correlates with Volatile Sulfur Compound Biogenesis but Not Thiol Release. *FEMS Yeast Res.* **2023**, *23*, foad031. [CrossRef] [PubMed]
57. Wainwright, T. Production of H₂S by Yeasts: Role of Nutrients. *J. Appl. Bacteriol.* **1971**, *34*, 161–171. [CrossRef] [PubMed]
58. Azhar, M.A.; Munaim, M.S. Survival of Isolated Probiotic Yeast Strains from Kefir Towards Bile and Acidic Environments. *Int. J. Chem. Biochem. Sci.* **2023**, *23*, 63–67.
59. de Pereira Paula, B.; de Souza Lago, H.; Firmino, L.; Fernandes Lemos Júnior, W.J.; Ferreira Dutra Corrêa, M.; Fioravante Guerra, A.; Signori Pereira, K.; Zarur Coelho, M.A. Technological Features of *Saccharomyces cerevisiae* Var. *Boulardii* for Potential Probiotic Wheat Beer Development. *LWT* **2021**, *135*, 110233. [CrossRef]
60. Sadurski, J.; Polak-Berecka, M.; Staniszewski, A.; Wa'sko, A.W. Step-by-Step Metagenomics for Food Microbiome Analysis: A Detailed Review. *Foods* **2024**, *13*, 2216. [CrossRef]
61. Youn, H.Y.; Kim, D.H.; Kim, H.J.; Bae, D.; Song, K.Y.; Kim, H.; Seo, K.H. Survivability of *Kluyveromyces Marxianus* Isolated From Korean Kefir in a Simulated Gastrointestinal Environment. *Front. Microbiol.* **2022**, *13*, 842097. [CrossRef]
62. Bauer, F.F.; Pretorius, I.S. Yeast Stress Response and Fermentation Efficiency: How to Survive the Making of Wine—A Review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **2000**, *21*, 27–51. [CrossRef]

63. Postaru, M.; Tucaliuc, A.; Cascaval, D.; Galaction, A.I. Cellular Stress Impact on Yeast Activity in Biotechnological Processes—A Short Overview. *Microorganisms* **2023**, *11*, 2522. [\[CrossRef\]](#)
64. de Paula, B.P.; Chávez, D.W.H.; Lemos Junior, W.J.F.; Guerra, A.F.; Corrêa, M.F.D.; Pereira, K.S.; Coelho, M.A.Z. Growth Parameters and Survivability of *Saccharomyces Boulardii* for Probiotic Alcoholic Beverages Development. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 474445. [\[CrossRef\]](#)
65. Walker, G.M.; Basso, T.O. Mitigating Stress in Industrial Yeasts. *Fungal Biol.* **2020**, *124*, 387–397. [\[CrossRef\]](#)
66. Costa, A.C.T.; Russo, M.; Fernandes, A.A.R.; Broach, J.R.; Fernandes, P.M.B. Transcriptional Response of Multi-Stress-Tolerant *Saccharomyces cerevisiae* to Sequential Stresses. *Fermentation* **2023**, *9*, 195. [\[CrossRef\]](#)
67. Morelli, L.; Capurso, L. FAO/WHO Guidelines on Probiotics: 10 Years Later. *J. Clin. Gastroenterol.* **2012**, *46*, S1–S2. [\[CrossRef\]](#)
68. Hill, C.; Guarner, F.; Reid, G.; Gibson, G.R.; Merenstein, D.J.; Pot, B.; Morelli, L.; Canani, R.B.; Flint, H.J.; Salminen, S.; et al. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics Consensus Statement on the Scope and Appropriate Use of the Term Probiotic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2014**, *11*, 506–514. [\[CrossRef\]](#)
69. Sica, P.; Tonoli, F.; Silverio, M.S.; Douradinho, R.; Mota, L.A.; Prado, L.; Leite, G.M.G.L.; Carvalho, R.S.; Pinto, A.U.; Baptista, A.S. Pre-Adaptation of Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) Strains to Very High Gravity Can Improve Fermentation Parameters and Reduce Osmotic Stress. *Biomass Convers. Biorefinery* **2024**, *15*, 9123–9137. [\[CrossRef\]](#)
70. Steensels, J.; Verstrepen, K.J. Taming Wild Yeast: Potential of Conventional and Nonconventional Yeasts in Industrial Fermentations. *Annu. Rev. Microbiol.* **2014**, *68*, 61–80. [\[CrossRef\]](#)
71. Chen, A.; Si, Q.; Xu, Q.; Pan, C.; Qu, T.; Chen, J. Evaluation of Stress Tolerance and Fermentation Performance in Commercial Yeast Strains for Industrial Applications. *Foods* **2025**, *14*, 142. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
72. Vicente, J.; Ruiz, J.; Belda, I.; Benito-Vázquez, I.; Marquina, D.; Calderón, F.; Santos, A.; Benito, S. The Genus *Metschnikowia* in Enology. *Microorganisms* **2020**, *8*, 1038. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
73. Sipiczki, M.; Czentye, K.; Kállai, Z. High Intragenomic, Intergenomic, and Phenotypic Diversity in Pulcherrimin-Producing *Metschnikowia* Yeasts Indicates a Special Mode of Genome Evolution. *Sci. Rep.* **2024**, *14*, 10521. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
74. Steiner, E.; Becker, T.; Gastl, M. Turbidity and Haze Formation in Beer—Insights and Overview. *J. Inst. Brew.* **2010**, *116*, 360–368. [\[CrossRef\]](#)
75. Alexandre, H.; Guilloux-Benatier, M. Yeast Autolysis in Sparkling Wine—A Review. *Aust. J. Grape Wine Res.* **2006**, *12*, 119–127. [\[CrossRef\]](#)
76. Chraniuk, P.; Bzducha-Wróbel, A. Functional Properties of Yeast Mannoproteins—Current Knowledge and Future Perspectives. *Fermentation* **2025**, *11*, 374. [\[CrossRef\]](#)
77. Mencher, A.; Morales, P.; Valero, E.; Tronchoni, J.; Patil, K.R.; Gonzalez, R. Proteomic Characterization of Extracellular Vesicles Produced by Several Wine Yeast Species. *Microb. Biotechnol.* **2020**, *13*, 1581–1596. [\[CrossRef\]](#)
78. Speers, R.A.; Jin, Y.L.; Paulson, A.T.; Stewart, R.J. Effects of β -Glucan, Shearing and Environmental Factors on the Turbidity of Wort and Beer. *J. Inst. Brew.* **2003**, *109*, 236–244. [\[CrossRef\]](#)
79. Meledina, T.V.; Davydenko, S.G.; Dedegkaev, A.T. Yeast Physiological State Influence on Beer Turbidity. *Agron. Res.* **2015**, *13*, 992–1001.
80. Rozès, N.; Vion, C.; Yeramian, N.; Hranilovic, A.; Masneuf-Pomarède, I.; Marullo, P. Influence of Yeasts on Wine Acidity: New Insights into *Saccharomyces cerevisiae*. *OENO One* **2024**, *58*, 1–17. [\[CrossRef\]](#)
81. Sánchez-Suárez, F.; Peinado, R.A. Use of Non-Saccharomyces Yeast to Enhance the Acidity of Wines Produced in a Warm Climate Region: Effect on Wine Composition. *Fermentation* **2024**, *10*, 17. [\[CrossRef\]](#)
82. Pinu, F.R.; Villas-Boas, S.G.; Martin, D. Pre-Fermentative Supplementation of Fatty Acids Alters the Metabolic Activity of Wine Yeasts. *Food Res. Int.* **2019**, *121*, 835–844. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
83. Ambroset, C.; Petit, M.; Brion, C.; Sanchez, I.; Delobel, P.; Guérin, C.; Chiapello, H.; Nicolas, P.; Bigey, F.; Dequin, S.; et al. Deciphering the Molecular Basis of Wine Yeast Fermentation Traits Using a Combined Genetic and Genomic Approach. *G3 Genes/Genomes/Genetics* **2011**, *1*, 263–281. [\[CrossRef\]](#)
84. 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.* **2016**, *7*, 185047. [\[CrossRef\]](#)
85. Manc'ic', S.; Stojanovic', S.S.; Danilovic', B.; Djordjevic', N.; Malic'anin, M.; Lazic', M.; Karabegovic', I. Oenological Characterization of Native *Hanseniaspora Uvarum* Strains. *Fermentation* **2022**, *8*, 92. [\[CrossRef\]](#)
86. Vilela, A. Use of Nonconventional Yeasts for Modulating Wine Acidity. *Fermentation* **2019**, *5*, 27. [\[CrossRef\]](#)
87. Jolly, N.P.; Varela, C.; Pretorius, I.S. Not Your Ordinary Yeast: Non-Saccharomyces Yeasts in Wine Production Uncovered. *FEMS Yeast Res.* **2014**, *14*, 215–237. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
88. Pawlikowska, E.; Kre_giel, D. Enzymatic profiles and Antimicrobial activity of the yeast *metschnikowia pulcherrima*. *Acta Innov.* **2017**, *23*, 17–24.
89. Karabegovic', I.; Malic'anin, M.; Danilovic', B.; Stanojevic', J.; Stojanovic', S.S.; Nikolic', N.; Lazic', M. Potential of Non-Saccharomyces Yeast for Improving the Aroma and Sensory Profile of Prokupac Red Wine. *OENO One* **2021**, *55*, 181–195. [\[CrossRef\]](#)

90. Wang, J.; Wang, Z.; Gao, H.; Bai, X.; Li, L.; Wei, R.; Dong, Z. Metabolomics and Flavor Diversity in Cabernet Sauvignon Wines Fermented by Various Origins of *Hanseniaspora Uvarum* in the Presence and Absence of *Saccharomyces cerevisiae*. *LWT* **2024**, *203*, 116396. [[CrossRef](#)]
91. Wang, C.; Mas, A.; Esteve-Zarzoso, B. Interaction between *Hanseniaspora Uvarum* and *Saccharomyces cerevisiae* during Alcoholic Fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* **2015**, *206*, 67–74. [[CrossRef](#)]
92. Benito, S.; Morata, A.; Palomero, F.; González, M.C.; Suárez-Lepe, J.A. Formation of Vinylphenolic Pyranoanthocyanins by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia guilliermondii* in Red Wines Produced Following Different Fermentation Strategies. *Food Chem.* **2011**, *124*, 15–23. [[CrossRef](#)]
93. Pons-Mercadé, P.; Giménez, P.; Vilomara, G.; Conde, M.; Cantos, A.; Rozès, N.; Ferrer, S.; Canals, J.M.; Zamora, F.; Pons-Mercadé, P.; et al. New Insights about the Influence of Yeasts Autolysis on Sparkling Wines Composition and Quality. In *Grapes and Wine*; IntechOpen: London, UK, 2021. [[CrossRef](#)]
94. Probiotic Drink Market Size, Growth & Trends 2025 to 2035. Available online: <https://www.futuremarketinsights.com/reports/probiotic-drink-market> (accessed on 15 August 2025).
95. Mukherjee, A.; Gómez-Sala, B.; O'Connor, E.M.; Kenny, J.G.; Cotter, P.D. Global Regulatory Frameworks for Fermented Foods: A Review. *Front. Nutr.* **2022**, *9*, 902642. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

10. Oświadczenia autorów

Lublin, 19.09.2025

mgr inż. Adam Staniszewski
Porzeczkowa 10
20-141, Lublin
504063084
adam.staniszewski@up.lublin.pl

Rada Dyscypliny
Technologia Żywności i
Żywienia Uniwersytetu
Przyrodniczego w Lublinie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, iż w pracach:

- (1) Staniszewski, Adam, and Monika Kordowska-Wiater. "Probiotic and potentially probiotic yeasts - Characteristics and food application." Foods 10.6 (2021): 1306.
- (2) Adam Staniszewski, Monika Kordowska-Wiater. "Probiotic yeasts and how to find them - polish wines of spontaneous fermentation as source for potentially probiotic yeasts." Foods 12.18 (2023): 3392.
- (3) Adam Staniszewski, Patrycja Staniszevska, Monika Kordowska-Wiater. "Probiotic Yeasts and How to Find Them - From Spoilage to Probiotic." Applied Sciences 14.24 (2024): 11698.
- (4) Adam Staniszewski, Patrycja Staniszevska, Elwira Komoń-Janczara, Monika Kordowska-Wiater. "Probiotic Yeast and How to Use Them - Combining Traditions and New Waves in Fermented Beverages. Foods, 14.16 (2025): 2921.

Mój udział polegał na

- współtworzeniu koncepcji publikacji przeglądowej (1), zebraniu literatury naukowej, przygotowaniu i napisaniu pierwszej wersji manuskryptu i współredagowaniu manuskryptu.
- opracowaniu koncepcji badań, metodyki, zaprojektowaniu i przeprowadzeniu wszystkich doświadczeń, analizie większości wyników, przygotowaniu pierwszych wersji manuskryptów, odpowiedzi na recenzje (2), (3), (4).

Wkład w artykuły wyniósł kolejno: (1) 80%, (2) 85%, (3) 80%, (4) 70%

Podpis

Adam Staniszewski

Lublin, 19.09.2025

dr hab. Monika Kordowska-
Wiater, prof. uczelni
ul. Gwieździsta 99
21-002 Natalin
Tel. 664-196-216
monika.kordowska-wiater@up.lublin.pl

Rada Dyscypliny
Technologia Żywności i
Żywienia Uniwersytetu
Przyrodniczego w Lublinie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, iż w pracach:

- (1) Staniszewski, Adam, and Monika Kordowska-Wiater. "Probiotic and potentially probiotic yeasts - Characteristics and food application." *Foods* 10.6 (2021): 1306.
- (2) Adam Staniszewski, Monika Kordowska-Wiater. "Probiotic yeasts and how to find them - Polish wines of spontaneous fermentation as source for potentially probiotic yeasts." *Foods* 12.18 (2023): 3392.
- (3) Adam Staniszewski, Patrycja Staniszewska, Monika Kordowska-Wiater. "Probiotic Yeasts and How to Find Them - From Spoilage to Probiotic." *Applied Sciences* 14.24 (2024): 11698.
- (4) Adam Staniszewski, Patrycja Staniszewska, Elwira Komoń-Janczara, Monika Kordowska-Wiater. "Probiotic Yeast and How to Use Them - Combining Traditions and New Waves in Fermented Beverages." *Foods*, 14.16 (2025): 2921.

Mój udział polegał na

- współtworzeniu koncepcji publikacji przeglądowej (1) i współredagowaniu manuskryptu, pełnieniu roli autora korespondencyjnego.

- współtworzeniu koncepcji badań, konsultacjach dotyczących metodyki i analizy wyników, współredagowaniu manuskryptów, pełnieniu roli autora korespondencyjnego (2), (3), (4).

Wkład w artykuły wyniósł kolejno: (1) 20%, (2) 15%, (3) 15%; (4) 15%.

Monika Kordowska-Wiater
Podpis

Lublin, 19.09.2025

dr inż. Elwira Komoń-Janczara
Piaskowa 19c/7
21-100 Lubartów
792351646
elwira.komon.janczara@up.lublin.pl

Rada Dyscypliny
Technologia Żywności i
Żywienia Uniwersytetu
Przyrodniczego w Lublinie

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, iż w pracach:

- (1) Adam Staniszewski, Patrycja Staniszevska, Elwira Komoń-Janczara, Monika Kordowska-Wiater. "Probiotic Yeast and How to Use Them - Combining Traditions and New Waves in Fermented Beverages. Foods, 14.16 (2025), 2921.

Mój udział polegał na przeprowadzeniu analiz chromatograficznych podpiwków oraz opracowaniu związanych z nimi wyników.
Wkład w w/w artykuł wyniósł 10%



Podpis

Lublin, 19.09.2025

dr inż. Patrycja Staniszevska
Porzeczkowa 10
20-141, Lublin
608315787
patrycja.staniszevska@up.lublin.pl

**Rada Dyscypliny
Technologia Żywności i
Żywnienia Uniwersytetu
Przyrodniczego w Lublinie**

Oświadczenie o współautorstwie

Niniejszym oświadczam, iż w pracach:

- (1) Adam Staniszevski, Patrycja Staniszevska, Monika Kordowska-Wiater. "Probiotic Yeasts and How to Find Them - From Spoilage to Probiotic." Applied Sciences 14.24 (2024): 11698.
- (2) Adam Staniszevski, Patrycja Staniszevska, Elwira Komoń-Janczara, Monika Kordowska-Wiater. "Probiotic Yeast and How to Use Them - Combining Traditions and New Waves in Fermented Beverages. Foods, 14.16 (2025), 2921.

Mój udział polegał na pomocy w opracowaniu i przeprowadzeniu analiz statystycznych.
Wkład w każdy w/w artykułów wyniósł 5%


Podpis