

Biosynteza i charakterystyka toksyn killerowych
drożdży *Debaryomyces hansenii*

Barbara Żarowska

Biosynteza i charakterystyka
toksyn killerowych
drożdży *Debaryomyces*
hansenii

Autor
Barbara Żarowska

Opiniodawca
prof. dr hab. inż. Tadeusz Miśkiewicz

Redaktor merytoryczny
prof. dr hab. Ewelina Dziuba

Opracowanie redakcyjne
Magdalena Kozińska

Korekta
Elżbieta Winiarska-Grabosz

Łamanie i projekt okładki
Paweł Wójcik

Monografie CXLVI

© Copyright by Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Wrocław 2012

ISSN 2083-5531
ISBN 978-83-7717-089-2

WYDAWNICTWO UNIWERSYTETU PRZYRODNICZEGO WE WROCŁAWIU
Redaktor Naczelny – prof. dr hab. Andrzej Kotecki
ul. Sopocka 23, 50–344 Wrocław, tel. 71 328–12–77
e-mail: wyd@up.wroc.pl

Nakład 100 + 16 egz. Ark. wyd. 6,6. Ark. druk. 6,75
Druk i oprawa: EXPOL, P. Rybiński, J. Dąbek, Spółka Jawna
ul. Brzeska 4, 87-800 Włocławek

Spis treści

1. Wstęp	7
2. Cel pracy	16
3. Materiały i metody	17
3.1. Materiał biologiczny	17
3.2. Podłoża hodowlane	18
3.3. Metody hodowli	18
3.4. Metody wydzielania i zagęszczania toksyn killerowych	19
3.5. Oczyszczanie białek killerowych	19
3.6. Metody analiz	21
3.6.1. Oznaczanie aktywności toksyn killerowych	21
3.6.2. Ocena aktywności bójczej drożdży <i>D. hansenii</i>	22
3.6.3. Oznaczanie biomasy, glicerolu i kwasu cytrynowego	23
3.6.4. Metody mikroskopowe	23
3.6.5. Metody ekstrakcji i wizualizacji plazmidów	23
3.7. Analiza <i>in silico</i> genów kodujących toksyny killerowe	24
4. Wyniki	25
4.1. Dobór podłoża do biosyntezy toksyn killerowych przez drożdże <i>D. hansenii</i>	25
4.2. Izolacja i oczyszczanie białek killerowych	34
4.2.1. Ultrafiltracja i wysalanie	35
4.2.2. Chromatografia jonowymienna i powinowactwa	37
4.2.3. Sączenie molekularne	42
4.3. Charakterystyka toksyn killerowych <i>D. hansenii</i>	50
4.3.1. Aktywność i stabilność toksyn w różnym zakresie pH i temperatury	50
4.3.2. Podatność toksyn killerowych na enzymy proteolityczne	54
4.3.3. Wpływ β -merkaptoetanolu na aktywność killerową toksyn	56
4.4. Aktywność bójcza drożdży <i>D. hansenii</i> i ich toksyn wobec różnych drobnoustrojów	56
4.5. Badanie mechanizmu działania toksyn killerowych	59
4.6. Genetyczne uwarunkowania zjawiska killerowego u drożdży <i>D. hansenii</i>	73
5. Dyskusja nad wynikami	77
6. Wnioski	91
7. Piśmiennictwo	92

1. Wstęp

Zdolność drożdży do sekrecji toksyn (białek) killerowych, które działają bójczo na wrażliwe szczepy drożdży, jest znana od początku lat 60. W większości prac opisujących to zjawisko zakłada się, że toksyna killerowa wykazuje takie działanie w stosunku do drożdży blisko spokrewnionych z jej producentem [Schmitt, Breinig 2002, Woods, Bevan 1968], jednak wielu autorów opisuje również aktywność killerową drożdży wobec przedstawicieli innych gatunków i rodzajów, a nawet w stosunku do bakterii czy grzybów strzępkowych [Conti i in. 2000, Druvefors, Schnürer 2005, Izgü, Altinbay 1997, Liu, Tsao 2009, Santos, Marquina 2004, Séguy i in. 1996, 1998, Walker i in. 1995]. W odniesieniu do tej cechy wyróżnia się 3 główne fenotypy drożdży: killerowy (K), wrażliwy (S) i neutralny (N). Opisane zostały także dwa fenotypy powstałe na skutek mutacji jądrowych: „superkillerowy” (K++R+) i „samobójczy”, w których odpowiednio zachodzi nadprodukcja toksyny bądź uwrażliwienie na własne białko killerowe [Gniewosz i in. 1998].

Aktywność killerowa jest szeroko rozpowszechniona zarówno wśród drożdży przechowywanych w kolekcjach czystych kultur, jak i wśród szczepów izolowanych z różnych środowisk naturalnych/fermentacyjnych [Aguiar, Lucas 2000, Carreiro i in. 2002, Da Silva 1996, Heard i in. 1987, Izgü i in. 2004, Kapsopoulou i in. 2008, Santos i in. 2004, 2011, Stumm i in. 1977, Vadkertiova, Slavikova 1995, Zagorc i in. 2001]. Uważa się, iż odgrywa ona ważną rolę w ekologii drożdży, stanowiąc mechanizm współzawodnictwa umożliwiający killerowym drożdżom eliminację wrażliwych konkurentów i opanowanie danej niszy ekologicznej [Stramer i in. 1987].

Zjawisko killerowe zostało najlepiej poznane u drożdży *S. cerevisiae*, które odkryli Makower i Bevana w 1963 r. [Makower, Bevan 1963]. Jednakże zdolnością do tworzenia toksyn killerowych cechują się również drożdże z rodzajów *Candida*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Hansenula*, *Kloeckera*, *Zygosaccharomyces*, *Cryptococcus* i inne [Marquina i in. 2002, Palpacelli i in. 1991, Schmitt, Breinig 2002].

System killerowy u wielu gatunków drożdży, w tym *S. cerevisiae*, jest determinowany i kontrolowany obecnością w cytoplazmie cząstek VLP (Virus Like Particles), często określanych jako cząstki wirusopodobne. Utraciły one zdolność pozakomórkowego rozprzestrzeniania się. Do transmisji tych wirusów dochodzi jedynie na skutek wegetatywnych podziałów komórkowych lub płciowego rozmnażania się drożdży [Meinhardt, Klassen 2009]. Cząstki VLP stanowi podwójnie skręcony łańcuch kwasu rybonukleinowego (dsRNA) zamknięty w oktaedrycznym kapsydie białkowym [Bevan i in. 1973, Schmitt, Breinig 2002]. Wewnątrz kapsydu obecne są różne typy dsRNA, spośród których najistotniej-

szą rolę pełnią M-dsRNA (1,6-1,8 kbp) i L-dsRNA (4,6 kbp). Produkcja toksyny killerowej i odporność na nią kodowane są przez M-dsRNA. U drożdży *S. cerevisiae* wyróżnia się kilka rodzajów M-dsRNA: M_1 -dsRNA, M_2 -dsRNA i M_{28} -dsRNA, odpowiadające za produkcję toksyn killerowych, odpowiednio typu K1, K2 i K28. L-dsRNA występuje u wszystkich izolowanych szczepów drożdży killerowych oraz u większości szczepów wrażliwych na toksyny killerowe. Rodzaj L-dsRNA również jest zamknięty w VLP i warunkuje replikację M-dsRNA. Wyróżnia się dwa główne typy L-dsRNA. Pierwszy to L_A -dsRNA, w obrębie którego istnieją różne warianty, np. u *S. cerevisiae* L_{A1} -, L_{A2} - i L_{A28} -dsRNA [Icho, Wicker 1989, Schmitt, Tipper 1990]. Komórki zawierające L_A -dsRNA, ale pozbawione cząsteczek M-dsRNA, same nie produkują toksyny i dodatkowo są na nią wrażliwe. Drugi rodzaj L-dsRNA dzieli się na L_B -, L_C -, L_{BC} -dsRNA i jest niezależny od L_A -dsRNA i M-dsRNA [Gotowczyc i in. 1992].

W każdym kapsydzie znajduje się pojedyncza kopia liniowego L_A -dsRNA lub M-dsRNA [Huan i in. 1991]. L_A -dsRNA jest produktem replikacji $L_A(+)$ ssRNA. Rodzaj $L_A(+)$ ssRNA zawiera dwa miejsca ORF (*open reading frames*), które nakładają się na siebie fragmentem o długości 130 nukleotydów [Schmitt, Breinig 2002, Wickner 1996]. Pierwszy ORF koduje białko kapsydu i określane jest jako Gag, a drugi, nazywany mianem Pol, koduje polimerazę RNA zależną od RNA [Mitchell, Bevan 1987, Wickner 1996]. Połączenie się Gag – Pol jest niezbędne do replikacji zarówno M-dsRNA, jak i L_A -dsRNA, a C – końcowa domena Pol daje sygnał do zamknięcia kapsydu. Po transkrypcji nić $L_A(+)$ ssRNA jest wyrzucana do cytoplazmy, gdzie jest wykorzystana na dwa różne sposoby: z jednej strony ulega translacji, w wyniku czego powstają białka tworzące kapsyd, z drugiej natomiast stanowi matrycowy RNA i może ulegać kapsydacji, tworząc tym samym nową cząstkę wirusową. Kiedy kapsyd jest już całkowicie uformowany, polimeraza RNA zależna od RNA, zachowująca aktywność replikazy, syntetyzuje nową nić (-) i w konsekwencji powstaje kompletny genom dojrzałego wirusa [Schmitt Breinig 2006, Wickner 1996].

Budowa M(+)*ssRNA* jest prostsza – zawiera on tylko jeden ORF, który koduje prekursora toksyny, tzw. preprotoksynę. Cząstki M-dsRNA wykorzystują białka kapsydu będące wynikiem translacji $L_A((+))$ ssRNA). Ich replikacja zachodzi analogicznie do L_A -dsRNA, z tą różnicą, że nie wszystkie nici M((+))ssRNA są wyrzucane do cytoplazmy, ponieważ kapsyd zamiast jednej dużej cząsteczki może zawierać dwie mniejsze kopie M-dsRNA. Zjawisko to jest określane jako „headfull replication” [Schmitt, Breinig 2002, Wickner 1993].

U wielu szczepów drożdży *Saccharomyces cerevisiae* obecne są także inne, niespokrewnione ze sobą typy dsRNA, oznaczone jako T-dsRNA, W-dsRNA, XL-dsRNA i S-dsRNA. Funkcja dwóch pierwszych nie została jeszcze wyjaśniona, podobnie jak funkcja XL-dsRNA, który czasami jest spotykany u drożdży killerowych typu K1. Cząsteczka S-dsRNA jest fragmentem M_1 -dsRNA występującym u mutantów recesywnych [Huan i in. 1991]. Nie produkują one toksyny killerowej, ale po skrzyżowaniu ze szczepem killerowym dają niestabilne diploidy o fenotypie killerowym K^+R^+ , które dzieląc się, dają fenotyp wrażliwy K^-R^- [Gotowczyc i in. 1992].

Cząstki VLP nie są jednak jedynym wyznacznikiem charakteru killerowego. U niektórych drożdży informacja genetyczna niezbędna do ujawnienia fenotypu killerowego jest zapisana w genomie jądrowym (*Williopsis mrakii*, *Pichia farinosa*) [Ashida i in. 1983,

Hodgson i in. 1995] lub przenoszona jest przez liniowy plazmidowy dsDNA (*Kluyveromyces lactis*, *Pichia acaciae*, *Pichia inositovora*, *Wingea robertsiae*) [Klassen, Meinhardt 2003, Larsen, Meinhardt 2000, Magliani i in. 1997, Marquina i in. 2002, Sor, Fukuhara 1985, Worsham, Bolen 1990]. Większość toksyn kodowanych przez pozachromosomalny materiał genetyczny (dsRNA, liniowe plazmidy DNA) ma budowę podjednostkową i masę cząsteczkową powyżej 18 kDa, podczas gdy te, które kodowane są przez jądrowy DNA, są z reguły małymi (1–23 kDa), monomerycznymi białkami zdolnymi do integracji z błoną cytoplazmatyczną drożdży wrażliwych [Marquina i in. 2002]. Niezależnie od genetycznych uwarunkowań czynników killerowych białka te wykazują szereg cech wspólnych, zarówno pod względem budowy, jak i procesu ich syntezy.

Biosynteza jednej z najlepiej poznanych toksyn K1 drożdży *S. cerevisiae* zachodzi w trzech etapach. Pierwszy z nich to powstanie preprotoksyny stanowiącej podstawowy produkt translacji M_1 -dsRNA, zbudowanej z czterech domen α , β , γ i δ . Drugi etap odbywa się w retikulum endoplazmatycznym i polega na odcięciu peptydu sygnałowego z domeny δ , w efekcie czego powstaje protoksyna, która jest glikozylowana. Glikozylacji ulega domena γ . Jest ona następnie transportowana do aparatu Golgiego, gdzie pod wpływem endopeptydazy Kex2 fragment γ jest wycinany. W ten sposób powstają fragmenty α i β połączone trzema wiązaniami disiarczkowymi, które po dalszej obróbce tworzą dojrzałą toksynę wydzielaną na zewnątrz komórki [Schmitt, Breinig 2002, Zhu, Bussey 1991]. Toksyna K1 to białko o masie cząsteczkowej 35 kDa, najwyższą aktywność wykazuje w pH 4,6 i zachowuje ją w temperaturze 30°C, jest stabilna w zakresie pH 4,2–4,6 [Bussey i in. 1988].

Spośród toksyn produkowanych przez drożdże *Saccharomyces*, toksyna K2 jest najmniej znana. Białko to izolowane jest z drożdży zasiedlających środowiska fermentacyjne, stanowiących m.in. zanieczyszczenia w ciągłej produkcji piwa [Cansado i in. 1991, 1999, Vadasz i in. 2000]. Dojrzała toksyna K2 jest glikoproteiną o wielkości 21,5 kDa zbudowaną z dwóch podjednostek α i β , które są połączone jednym wiązaniem disiarczkowym [Marquina i in. 2002]. Badania potwierdzają, że toksyna K2 wyizolowana z różnych szczepów może się różnić sekwencją aminokwasową [Pfeiffer, Radler 1984]. Biosynteza toksyny K2 zachodzi podobnie do toksyny K1. Prekursorem tego białka jest polipeptyd o wielkości 38,7 kDa, zbudowany z 362 aminokwasów. Składa się on z dwóch podjednostek: α (w obrębie której wyróżnić można peptyd sygnałowy) i β . Toksyna ta ma trzy potencjalne miejsca glikozylacji. Podczas procesu dojrzewania odcinany jest peptyd sygnałowy przez egzopeptydazę Kex1, wskutek czego powstaje protoksyna. Ulegając dalszym przekształceniom, jest ona rozcinana przez endopeptydazę Kex2, w wyniku czego powstają, oddzielone od siebie, podjednostki α i β , które połączone wiązaniem disiarczkowym dają dojrzałą toksynę [Magliani i in. 1997].

Trzecia produkowana przez drożdże *S. cerevisiae* toksyna, K28, w dużym stopniu przypomina toksynę K1. Początkowo uważano, że jest bogata w serynę glikoproteiną o wielkości 16 kDa [Pfeiffer, Radler 1984]. Teoria ta okazała się jednak błędna, gdyż dojrzała toksyna K28 jest heterodimerem zbudowanym z podjednostki α (10,5 kDa) i β (11 kDa) połączonych jednym wiązaniem disiarczkowym [Riffer i in. 2002]. Powstaje ona w sposób analogiczny do wcześniej opisanych toksyn *S. cerevisiae*. Produktem translacji M_{28} -dsRNA (1,75 kb) jest preprotoksyna (38 kDa) zbudowana z 345 aminokwasów tworzących

cztery domeny: α , β , γ , δ [Schmitt, Tipper 1990]. Peptyd sygnałny jest częścią podjednostki δ , która bezpośrednio łączy się z fragmentem α . Podjednostki α i β oddziela od siebie peptyd γ , który zawiera wszystkie trzy potencjalne miejsca glikozylacji. Podjednostka β na C-końcu zawiera aminokwasowy fragment określany jako HDELR, który warunkuje przeniesienie toksyny do aparatu Golgiego. W aparacie Golgiego fragment ten ulega przekształceniu do HDEL pod wpływem proteazy Kex1 [Eisfeld i in. 2000, Riffer i in. 2002], tam też następuje usunięcie podjednostki γ przy udziale endopeptydazy Kex2. Dojrzała toksyna wydzielana jest na zewnątrz komórki.

Inną, dobrze poznaną toksyną jest białko killerowe drożdży *K. lactis* – zymocyna. Składa się z trzech podjednostek α (99kDa), β (30 kDa) i γ (27,5 kDa). Za fenotyp killerowy *K. lactis* odpowiedzialne są dwa liniowe dsDNA plazmidy, znane jako pGKL1 i pGKL2. Chociaż aktywność bójcza kodowana jest wyłącznie na pierwszym z wymienionych plazmidów, to tylko w obecności drugiego z nich możliwy jest proces transkrypcji genów tego białka. Podczas gdy mała podjednostka γ jest kodowana oddzielnie, dwie większe powstają jako transkrypt jednego genu. Prekursor ten ($\alpha\beta$) cechuje się obecnością N-terminalnej sekwencji sygnałnej oraz miejsca rozpoznania peptydazy sygnałnej lub endopeptydazy Kex2. Ulega on glikozylacji w retikulum endoplazmatycznym, skąd jest wydzielany do aparatu Golgiego. Na skutek aktywności wcześniej wspomnianych peptydaz następuje tu proces enzymatycznego dojrzewania podjednostek α i β . W dojrzałej zymocynie podjednostki β i γ są ze sobą kowalencyjnie połączone mostkiem disiarczkowym [Schaffrath i in. 1992, Schickel i in. 1996, Stark, Boyd 1986, Stark i in. 1990].

Działanie toksyn killerowych przebiega w dwóch etapach. Na pierwszym następuje wiązanie toksyny do receptorów znajdujących się w ścianach komórek wrażliwych. Dla wielu poznanych dotąd toksyn, w tym toksyn K1 i K2 *S. cerevisiae*, receptorem tym jest β -1,6-D-glukan, niemniej jednak funkcję tę mogą pełnić także inne składniki, np. α -1,3-mannan czy chityna wiążąca toksynę drożdży *K. lactis* i *P. acaciae* [Al-Aidroos 1978, Santos i in. 2002, Schmitt, Radler 1987]. Etap ten jest zależny od pH środowiska, przebiega bez dostarczenia energii, a w obecności jonów wapnia jest procesem odwracalnym. Drugi etap, nieodwracalny i wymagający nakładu energii, przebiega różnie, w zależności od rodzaju toksyny.

Białka killerowe K1 i K2 działają destrukcyjnie na błony cytoplazmatyczne, w których prawdopodobnie znajduje się drugi receptor. Jest nim przypuszczalnie glikoproteina Kre1p, a dokładniej jej C-terminalna podjednostka zakotwiczona w błonie cytoplazmatycznej [Breinig i in. 2002]. Toksyny wbudowują się w błonę, tworząc kanały, w wyniku czego z komórki wypływają jony potasu i sodu, następuje również wyciek większych metabolitów oraz ATP, co prowadzi do śmierci komórki [De la Peña i in. 1981, Marquina i in. 2002, Nowotná i in. 2004, Schmitt i Breining 2002, Schmitt, Compain 1995].

Spektrum działania toksyny K1 jest stosunkowo szerokie. Białko to zabija nie tylko komórki należące do tego samego gatunku, ale działa bójczo także na komórki drożdży *Candida glabrata*, *C. rugosa* czy *K. lactis* [Golubev 2006]. Udowodniono również jego toksyczny wpływ na sferoplasty *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Schwanniomyces alluvius*, *Candida utilis* oraz *Kluyveromyces lactis*, które poza wrażliwością na toksynę K1 reagują także na białko killerowe typu K2 [Golubev 2006, Martinac i in. 1990, Zhu, Bussey 1989]. Bartunek i in. [2001] dowiedli również, że aktywność bójcza toksyny K1 zależy

od fazy cyklu komórkowego, w jakiej znajduje się komórka drożdży wrażliwych. Badacze wykazali, że najbardziej wrażliwe są komórki w fazie S, cechujące się małymi pączkami, o średnicy nieprzekraczającej $\frac{1}{3}$ średnicy całej komórki. Najbardziej odporne są natomiast komórki w fazie M o średnicy pączka powyżej $\frac{2}{3}$ średnicy całej komórki.

Badania dowodzą, że poza toksynami K1 i K2 *S.cerevisiae*, również toksyna K-500, wydzielana przez *Williopsis mrakii* oraz białko killerowe drożdży *Pichia kluyveri* destabilizują strukturę błon cytoplazmatycznych, powodując uwalnianie zewnątrzkomórkowych metabolitów, a tym samym szybką śmierć komórek [Hodgson i in. 1995, Kagan 1983].

Odmienny mechanizm działania wykazuje trzecia z toksyn drożdży *S. cerevisiae* – toksyna K28. W pierwszym etapie białko killerowe wiąże się z mannoproteiną ściany komórkowej drożdży wrażliwych [Schmitt, Radler 1987]. Drugim etapem jest wiązanie z receptorem znajdującym się w błonie cytoplazmatycznej, którym prawdopodobnie jest białko Erd2p [cyt. za Schmitt, Breining 2006]. Dzięki tej interakcji toksyna wnika do wnętrza komórki na drodze endocytozy, przedostaje się do aparatu Golgiego, a następnie do retikulum endoplazmatycznego. Po wydzieleniu do cytozolu następuje degradacja podjednostki β , podczas gdy podjednostka α wnika do wnętrza jądra komórkowego. W ten sposób zapoczątkowana zostaje kaskada sygnałów, których efektem jest zatrzymanie syntezy DNA. W wyniku działania toksyny zahamowany zostaje nie tylko proces podziału materiału genetycznego, ale również proces tworzenia pączków, który zatrzymuje się na etapie wytworzenia niewielkiego pączka, jednak jądro DNA widoczne jest tylko w komórce macierzystej [Heiligenstein i in. 2006, Schmitt, Breinig 2006, Schmitt i in. 1996].

Zymocyna drożdży *Kluyveromyces lactis* także przyczynia się do nieodwracalnego hamowania wzrostu komórek szczepów wrażliwych w fazie bezpączkowej (G1) [Gunge i in. 1981]. Jak wspomniano wcześniej, zbudowana jest ona z trzech podjednostek. Podjednostka α jest odpowiedzialna za wiązanie z receptorem w ścianie komórkowej, wysoce hydrofobowa podjednostka β lokuje się w błonie cytoplazmatycznej i ułatwia transport podjednostce γ , która z kolei jest odpowiedzialna za efekt cytotoksyczny [Magliani i in. 1997, Schaffrath, Meinhardt 2005]. Cytotoksyczność tego białka killerowego związana jest z aktywnością endonukleazową podjednostki γ , która rozszczepia w miejscach antykodonu trzy rodzaje cząsteczek tRNA, znacznie obniżając ich zawartość w komórkach, a tym samym hamując proces syntezy białek [Lu i in. 2005]. W przypadku tej toksyny zaproponowano również inny mechanizm działania opierający się na enzymatycznej aktywności podjednostki α , która ma strukturę homologiczną do bakteryjnych oraz roślinnych chitynaz i wykazuje aktywność chitynolityczną [Butler i in. 1991]. Wskutek rozkładu chityny ściana komórkowa drożdży staje się mniej odporna na działanie czynników zewnętrznych.

Jeszcze inny mechanizm działania zaobserwowano u jednej z toksyn drożdży rodzaju *Pichia* – toksyny killerowej K5 produkowanej przez *Pichia anomala*. Wykazuje ona aktywność bójczą wobec szerokiego spektrum grzybów, przede wszystkim tych, które zawierają w ścianach komórkowych duże ilości β -1,3-glukanu [Ízgü, Altinbay 2004]. Wykazuje ona aktywność egzo- β -1,3-glukanazy, co nasuwa wniosek, iż jej efekt toksyczny wywołany jest hydrolityczną zdolnością do rozkładu jednego z podstawowych składników ściany komórkowej drożdży wrażliwych [Ízgü i in. 2005]. Ten sam mechanizm działania został określony w odniesieniu do toksyny killerowej KpKt syntezowanej przez drożdże *Kluyveromyces phaffii* i *Tetrapisispora phaffii* [Comitini i in. 2004b, 2009].

Interesującymi toksynami są białka killerowe drożdży z rodzaju *Williopsis*, wśród których wymienia się toksynę HM-1 (HMK) produkowaną przez *Williopsis mrakii* IFO 0895 [Kasahara i in. 1994, Kimura i in. 1999, Yamamoto i in. 1986a, 1986b, Yamamoto i in. 1988], toksynę HSK wykrytą u *Williopsis saturnus* var. *saturnus* IFO 0117 [Kimura i in. 1995, Magliani i in. 1997] i WmKT tworzoną przez *Williopsis saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968 [Guyard i in. 2002]. Białka te są odporne na działanie wysokiej temperatury (100°C przez 10 min), co uwarunkowane jest występowaniem licznych wiązań dwusiarczkowych oraz zachowują aktywność w szerokim zakresie pH, od 2 do 11 [Yamamoto i in. 1986a, Yamamoto i in. 1988]. Wśród nich najlepiej scharakteryzowana jest toksyna HM-1, która jest nieglikozylovanym polipeptydem zbudowanym z 88 aminokwasów i masie cząsteczkowej 10,7 kDa [Kimura i in. 1995, 1997, Takasuka i in. 1995, Yamamoto i in. 1986a].

HM-1 zabija komórki przez unikalny mechanizm hamowania syntezy β -1,3-glukanu [Selvakumar i in. 2006]. Badania prowadzone na protoplastach komórek wrażliwych, które nie są wrażliwe na toksynę HM-1, potwierdzają tę hipotezę [Kasahara i in. 1994]. Zakłócenia syntezy β -1,3-glukanu spowodowane są przez zahamowanie aktywności syntazy β -1,3-glukanowej, podczas gdy pozostałe komponenty ściany komórkowej syntetyzowane są w niezmienny sposób [Kasahara i in. 1994, Yamamoto i in. 1986a]. Komiyama i in. [2002] badając wpływ toksyny HMK na sferoplasty wrażliwych komórek drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, zaobserwowali, że przybierają one regularny, kulisty kształt i mają znacznie powiększoną wakuolę. Powierzchnia komórek jest nieregularna i pofałdowana, gdyż zahamowana zostaje synteza β -1,6-glukanu. Toksyna HMK charakteryzuje się szerokim spektrum działania. Dawka 25 μ g białka/ml wystarczy, aby całkowicie zahamować wzrost drożdży z rodzaju *Hansenula* (*H. wickerhamii*, *H. glucozyma*), podczas gdy dawka 0,4–6 μ g/ml hamuje wzrost *H. anomala*, *H. capsulata* oraz *H. jadinii*. Wrażliwością na tę toksynę cechują się również drożdże z rodzaju *Pichia* (*P. membranefaciens*, *P. fermentans*) i *Candida* (*C. boidinii*, *C. kefyr*, *C. crusei*, *C. famata*, *C. lipolytica*, *C. maltosa*, *C. intermedia*) [Lowes i in. 2000]. Jak sugerują cytowani autorzy, szerokie spektrum działania toksyny HMK oraz aktywność w dużym zakresie pH umożliwiają wykorzystanie jej w produkcji jogurtów jako naturalnego konserwantu. Jej obecność pozwala na utrzymanie wyższego stężenia kwasu mlekowego i co za tym idzie, niskiego pH.

W ostatnich dwóch dekadach obserwuje się wyraźny wzrost zainteresowania drożdżami killerowymi oraz produkowanymi przez nie toksynami. Liczne prowadzone badania owocują coraz większą znajomością zjawiska killerowego, co skutkuje systematycznie zwiększającymi się także możliwościami jego wykorzystania. W literaturze można znaleźć doniesienia na temat zastosowania toksyn killerowych w medycynie, gdzie w postaci swoistych paneli służą do szybkiej identyfikacji patogennych dla człowieka szczepów z gatunku *Candida albicans* [Buzzini, Martini 2001] oraz *Nocardia asteroides* [Provost i in. 1995]. Białka killerowe drożdży brane są również pod uwagę jako nowe, bardziej selektywne czynniki grzybobójcze, mogące znaleźć zastosowanie w leczeniu grzybic ludzkich. Na szczególną uwagę zasługują toksyny tworzone przez przedstawicieli rodzaju *Hansenula*, które nie tylko wiążą się z glukanami ściany komórkowej drożdży, ale również hamują ich biosyntezę. Są one porównywane do antybiotyków powstrzymujących syntezę ścian komórkowych bakterii.

Rozważana jest również możliwość wykorzystania drożdży killerowych i/lub ich toksyn w przemyśle spożywczym, głównie fermentacyjnym. Zagorc i in. [2001] wyizolowali z fermentującego moszczu killerowy szczep *Saccharomyces cerevisiae* Ss12/10, który zastosowany w tym samym regionie winiarskim Słowenii jako kultura starterowa zapewniał lepsze parametry fermentacji i wino o ciekawszej charakterystyce niż otrzymane w wyniku spontanicznej fermentacji oraz tej z użyciem komercyjnego startera. Z kolei Ciani i Faticenti [2001] wykazali możliwość zastosowania toksyny killerowej *K. phaffii* DBVPG 6076 do zabezpieczania win i drożdży nastawnych przed rozwojem drożdży dzikich. Aktywność hamująca tej toksyny wobec skażających drożdży *Hanseniaspora/Kloeckera* okazała się w środowisku soku gronowego porównywalna do osiągniętej przy zastosowaniu SO_2 . Zatem istnieje potencjalna możliwość użycia jej jako substytutu SO_2 , co przyczyniłoby się do ograniczenia zużycia tego chemicznego konserwantu w przemyśle winiarskim. Innym przykładem może być prewencja tlenowych zepsuć kiszonek roślinnych dzięki zastosowaniu genetycznie modyfikowanych (pozbawionych zdolności utylizowania kwasu mlekowego) killerowych drożdży *K. lactis* [Kitamoto, Ohmomo 1993, Kitamoto i in. 1998, Kitamoto i in. 1999]. Prowadzone są również badania mające na celu wzbogacenie szczepów przemysłowych w czynnik killerowy, który umożliwiłby ochronę środowiska fermentacyjnego przed zakażeniami. Przykładem mogą być, uzyskane na drodze fuzji protoplastów, killerowe drożdże *S. cerevisiae* Kyokai wykorzystywane do produkcji sake, które przy odpowiednio wysokim stężeniu etanolu tworzyły mniejszą ilość mocznika, zabezpieczając jednocześnie proces przed niepożądanymi drożdżami [Yoshiuchi i in. 2000]. Na drodze fuzji protoplastów killerowych drożdży rasy „Burgund” oraz *Schwanniomyces occidentalis* otrzymano również amylopolityczno-fermentujące hybrydy wykazujące cechę killerową, chroniące środowisko przed zakażeniami drożdżami dzikimi [Stobińska i in. 1997]. Fuzji protoplastów poddano także szczepy *S. cerevisiae* NCYC 761 (K3) i *S. cerevisiae* BSP 1, uzyskując szczep produkcyjny, wzbogacony o zdolność do biosyntezy toksyny K3, *S. cerevisiae* BSP 1 (K3), który był odporny na toksynę killerową szczepów *Candida tropicalis*, skażających środowiska fermentacyjne i jednocześnie wykazywał zdolność do inhibicji wzrostu tych szczepów [Izgü i in. 2004].

Ważnym kierunkiem potencjalnych aplikacji drożdży killerowych jest biologiczna ochrona płodów rolnych, głównie owoców i warzyw, przed zepsuciami powodowanymi przez grzyby strzępkowe podczas magazynowania. Santos i Marquina [2004] oraz Santos i in. [2009] wykazali, że zarówno drożdże *Pichia membranifaciens* CYC1106, jak i ich oczyszczona toksyna, aplikowane w miejscu porażenia jabłek, skutecznie hamowały rozwój grzyba *Botrytis cinerea* odpowiedzialnego za gnicie tych owoców. Natomiast w przypadku składowanych grejpfrutów antagonistyczne działanie wobec patogenicznego *Penicillium digitatum* wywierały killerowe drożdże *D. hansenii* / *C. famata* [Arras 1996]. Były one także z pozytywnym skutkiem stosowane do ochrony leżakującego bielma drewna *Pinus sylvestris* przed degradacją jego powierzchni przez pleśnie [Payne, Bruce 2001].

Zdolność drożdży do produkcji toksyn killerowych może być indukowana warunkami środowiskowymi. Dotyczy to przede wszystkim drożdży izolowanych z produktów o wysokim zasoleniu, których aktywność killerowa wzrasta wraz ze zwiększeniem stężenia soli w podłożu, a niekiedy do ujawnienia się ich aktywności bójczej obecność NaCl w środowisku jest czynnikiem niezbędnym. Przykładem mogą być halotolerancyjne droż-

dże *D. hansenii*, których killerowe szczepy izolowane były z solanek [Aguiar, Lucas 2000] oraz serów z przerostem pleśni [Żarowska i in. 2004]. Drożdże *Debaryomyces hansenii* i ich anamorficzna forma *Candida famata* zasiedlają różnorodnie środowiska: występują w wodach morskich, na roślinach, owocach i skórze ssaków. Są izolowane praktycznie ze wszystkich typów mrożonej i chłodzonej żywności. Powszechnie występują w takich produktach spożywczych jak: mleko, jogurty, lody, kiełbasy, szynki, sosy i dipy. Duże znaczenie gatunek ten ma w produkcji fermentowanych wędlin i serów, a głównym źródłem izolacji drożdży są sery dojrzewające [Almagro i in. 2000, Fleet 1990].

W odróżnieniu od innych gatunków drożdży, takich jak *C. vini*, *C. zeylanoides*, *C. catenulata*, *Yarrowia lipolytica*, *Kluyveromyces lactis*, *K. marxianus* czy *Saccharomyces cerevisiae*, których obecność zależy od rodzaju sera, *D. hansenii* jest gatunkiem dominującym w większości serów [Fleet 1990]. Drożdże te występują naturalnie w tych produktach w bardzo dużych ilościach [Encinas i in. 2000, Wojtatowicz i in. 2001] i są już nawet stosowane jako kultury starterowe. Uważa się, że ich obecność i aktywność biochemiczna są nie tylko pożądane, ale wręcz niezbędne w procesie dojrzewania i osiągania ostatecznej jakości serów pleśniowych i maziowych [Tempel, Jakobsen 2000]. Drożdże pełnią w serach ogromną rolę ze względu na m.in.: zdolność asymilacji kwasu mlekowego i resztkowych cukrów, aktywność proteolityczną i lipolityczną, pozytywne interakcje z innymi kulturami starterowymi czy wysoką tolerancję na NaCl [Juszczak i in. 2005, Tempel, Jakobsen 2000]. Inną pozytywną cechą drożdży *D. hansenii*/*C. famata* jest ich zdolność do hamowania wzrostu niepożądanych mikroorganizmów. Znamiennym przykładem może być tu antagonizm oddziaływanie na bakterie z gatunku *Clostridium butyricum* i *C. tyrobutyricum*, odpowiedzialne za wadliwe puchnięcie serów twardych [Faticenti i in. 1983]. Tworzenie toksyn killerowych może być jednym z czynników zapewniających szczepom *D. hansenii*/*C. famata* przewagę nad innymi drożdżami w fermentowanej żywności. W piśmiennictwie naukowym jest na ten temat niewiele informacji. Wcześniejsze badania pokazały, że izolaty *C. famata* z serów Rokpol wykazywały aktywność bójczą przede wszystkim wobec szczepów gatunku *Y. lipolytica* [Żarowska i in. 2004]. Podobnie do innych halofilnych drożdży stwierdzono, że dodatek NaCl do podłoża wzmacniał toksyczność białek killerowych *D. hansenii*. Natomiast w przeciwieństwie do poznanych białek killerowych drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis*, *Pichia membranifaciens* czy *Schwaniomyces occidentalis*, przejawiających najwyższą aktywność w temperaturze około 25°C, badane szczepy *D. hansenii* produkowały toksynę killerową o najwyższej aktywności w temperaturze 14°C, typowej w procesie dojrzewania sera [Wojtatowicz i in. 2002, Żarowska i in. 2004]. Zjawisko killerowe u drożdży *D. hansenii* jest jednak jak dotąd bardzo słabo poznane, a powyższe dane świadczą o tym, że toksyna killerowa drożdży *D. hansenii* jest nową, dotychczas właściwie niescharakteryzowaną substancją białkową. Pomimo niedawnego zsekwencjonowania genomu *D. hansenii* nadal nic nie wiadomo na temat lokalizacji i budowy genów kodujących produkcję toksyn killerowych i oporności na nie. Znajomość struktury genetycznej tych drożdży jest wciąż dalece niewystarczająca do racjonalnego ich użycia w procesach fermentacji i dojrzewaniu serów oraz niektórych produktów mięsnych. Aktywność killerowa może być również przydatna w przemysłowych biotechnologiach, tj. biosyntezie ryboflawiny czy ksylitolu, zapewniając produkcyjnym

kulturom *D. hansenii* swoistą ochronę przed zakażeniami obcą mikroflorą, szczególnie podczas hodowli ciągłych.

Podjęte badania wzbogacą zatem wiedzę na temat drożdży *D. hansenii* oraz wniosą nowe informacje do ekologii drożdży. Przyczynią się także do lepszego poznania mechanizmów kształtowania klimaksowych biocenoz w fermentowanej stałej żywności. Mają też znaczenie praktyczne ze względu na istniejące już i potencjalne zastosowania tych niekonwencjonalnych drożdży; umożliwią bardziej racjonalny skryning szczepów do drożdżowych szczepionek w serowarstwie i przemyśle mięsnym, jak również wskazać nowe aplikacje tych drożdży.

2. Cel pracy

Celem pracy było określenie środowiskowych i genetycznych uwarunkowań biosyntezy toksyn killerowych przez drożdże *Debaryomyces hansenii* oraz poznanie budowy, właściwości i spektrum ich aktywności biologicznej.

Realizacja celu obejmowała:

- Ustalenie warunków (tj. składu podłoża i pH) do efektywnej syntezy toksyn killerowych przez drożdże *D. hansenii*;
- Wydzielenie białek killerowych z hodowli drożdży i ich oczyszczenie;
- Biochemiczną charakterystykę białek killerowych;
- Określenie spektrum aktywności bójczej badanych toksyn wobec różnych mikroorganizmów;
- Wyjaśnienie mechanizmu działania toksyn killerowych;
- Określenie lokalizacji genów odpowiedzialnych za aktywność killerową u drożdży *D. hansenii*.

3. Materiały i metody

3.1. Materiał biologiczny

Trzy killerowe szczepy drożdży *Debaryomyces hansenii*: AII4b, MI1a i KI2a, wykazujące wysoką aktywność killerową [Żarowska i in. 2004], były przedmiotem niniejszych badań. Zostały one wyizolowane z serów pleśniowych Rokpol i pochodziły z Kolekcji Czystych Kultur Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Również wzorcowy, wrażliwy na toksyny killerowe szczep *Yarrowia lipolytica* PII6a, który stosowano do oceny aktywności bójczej w testach dyfuzyjnych, pochodził z tej samej kolekcji.

Referencyjny szczep *D. hansenii* CBS7848 o liniowych plazmidach i *D. robertsiae* CBS6693, cechujący się dodatkowo aktywnością killerową [Klassen, Meinhardt 2002] wykorzystano w badaniach mających na celu lokalizację genów kodujących toksyny killerowe. Szczepy pochodziły z holenderskiej Kolekcji Czystych Kultur CBS.

Ponadto, w badaniach mających określić zakres aktywności bójczej drożdży *D. hansenii* i ich toksyn, wykorzystano następujące drobnoustroje:

- bakterie *Bacillus cereus* C3, *B. cereus* B5Cls, *B. subtilis* B5, *B. subtilis* B3, *B. polymyxa* *Serratia marcescens*, *Escherichia coli* C1, *E. coli* pcm 2560 INCTC 10538, *Micrococcus flavus* C1, *Pseudomonas fluorescens* C2, *Flavobacterium multivorum* C1, *Sarcina lutea* C1, *Lactobacillus casei* C1, *Lb. Acidophilus* C2, *Lb. plantarum* C2, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* 1380, *Streptococcus cremoris* C2, *Str. salivarius* ssp. *termophilus* C2, *Str. lactis* ssp. *diacetilactis* C2;
- drożdże: *Candida albicans* KL-1¹, *C. inconspicua* KL-1¹, *C. zeylanoides* KL-1¹, *C. tropicalis* C-7, *G. candidum* SS32B1, *Geotrichum penicillatum* C1, *Hansenula anomala* C-2, *Kloeckera apiculata* C-3, *Pichia ohmeri* A-9-1-20, *P. membranifaciens* C-4, *Saccharomyces cerevisiae* SV30, *Schizosaccharomyces pombe* C-1, *Schwanniomyces occidentalis* ATCC 44442, *Sporobolomyces* sp., *Rhodotorula rubra* C-9, *Yarrowia lipolytica* ATCC 8661, *Y. lipolytica* ATCC 20320, *Y. lipolytica* ATCC 20460, *Y. lipolytica* ATCC 20461, *Y. lipolytica* A-101, *Y. lipolytica* A-101-1.31;
- grzyby strzępkowe: *Absidia glanca* 148², *Alternaria* sp., *Aspergillus niger* XP, *A. niger* 270, *A. cervinus* 219², *Botrytis cinerea* 409², *B. cinerea* 617², *Chaetomium* sp., *Fusarium graminearum* 109², *F. sambucinum* 42², *F. oxysporum* 184², *Mucor hiemalis*², *Penicillium* sp., *Trichoderma harzianum* T33, *T. reesei* 7-1, *T. reesei* QM9414, *T. hamatum* T2, *T. hamatum* 458, *T. hamatum* C1, *T. viride*1345/6, *T. koningi* 62-102/3, *Rhizopus* sp.

Szczypty wywodzą się z kolekcji Czystych Kultur Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu poza oznaczonymi symbolem ¹, które pochodziły z Akademii Medycznej we Wrocławiu i symbolem ², pochodzącymi z Zakładu Fitopatologii w Katedrze Ochrony Roślin Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu.

3.2. Podłoża hodowlane

Biosyntezę toksyn killerowych prowadzono w następujących podłożach:

- (1) WHY (serwatka kwasowa otrzymana z mleka mikrofiltrowanego po wydzieleniu skrzepu za pomocą 50% kwasu mlekowego w temperaturze 30°C);
- (2) ME (Malt Extract Bouillon, Merck);
- (3) podłoże YPG o składzie podstawowym: glukoza, 20 g/l; ekstrakt drożdżowy, 10 g/l; pepton bakteriologiczny oraz modyfikowanym poprzez zastąpienie glukozy syropem glukozowym (YP-SG), czystym glicerolem (YP-GliCz) lub glicerolem odpadowym (YPGliOd). Syrop glukozowy pochodził z firmy Cargill (Polska) Sp. z o.o., glicerol czysty z firmy POCH, natomiast glicerol odpadowy, uzyskany z produkcji estrów metylowych z SG Boddins GmbH (Niemcy). Podłoża (2) i (3) sporządzano w buforze cytrynianowo-fosforanowym o pH 4,6.

W procesie biosyntezy toksyn killerowych wykorzystywano również podłoża syntetyczne (SM) zawierające w 1 l buforu cytrynianowo-fosforanowego o pH 4,6: glukozę, 20 g; MgSO₄, 0,6 g; ekstrakt drożdżowy (YE), 1 g oraz jako źródło azotu:

- (NH₄)₂SO₄, 3,77 g – podłoże SM-NH₄-YE;
- mocznik, 1,7 g – podłoże SM-Ur-YE;
- pepton bakteriologiczny, 5, 10 oraz 20 g/l – podłoża SM-Pep 0,5%-YE; SM-Pep 1%-YE; SM-Pep 2%-YE.

Podłoże zawierające 2% peptonu modyfikowano poprzez zastąpienie ekstraktu drożdżowego biotyną w ilości 20 µg/l (SM-Pep 2%-Biot).

Ponadto, w pracy wykorzystano:

- bulion YPG-NaCl zawierający 12% NaCl, który stosowano do namnażania biomasy drożdży *D. hansenii* w celu izolacji plazmidów [Gunge i in. 1993];
- bulion YPG-KCl (podłoże YPG stabilizowane osmotycznie za pomocą 0,6 M KCl), używany do oceny wpływu toksyn na protoplasty szczepu wrażliwego;
- agar YPG-MB (YPG 1 l, błękit metylenowy, 0,03 g/l; agar 20 g/l; NaCl, 0–40 g/l), który zastosowano do oceny poziomu tworzonych toksyn i aktywności killerowej drożdży *D. hansenii* wobec drożdży i grzybów strzępkowych;
- agar Luria-Bertani [Izgü, Altinbay 1997] o pH 5,4 oraz agar MRS (Merck) o pH 4,6, wykorzystywany do badania wrażliwości/oporności bakterii na toksyny killerowe.

Wszystkie podłoża sterylizowano w autoklawie, w temperaturze 121°C przez 20 min. Roztwór mocznika, stanowiącego źródło azotu w podłożu SM-Ur-YE, wyjaławiano przez filtrację.

3.3. Metody hodowli

Zależnie od przeznaczenia hodowle drożdży prowadzono metodą wstrząsaną, w bioreaktorze i w postaci mikrohodowli w aparacie Bioscreen C.

Biosyntezę toksyn killerowych, namnażanie biomasy drożdży *D. hansenii* i *Y. lipolytica* do różnych celów (np. szczepienia pożywek do produkcji toksyn oraz podłoży stosowanych w testach dyfuzyjnych) prowadzono w kolbach o pojemności 250 ml zawierających 50 lub 100 ml odpowiedniego podłoża (p. 3.2.) na wytrząsarce rotacyjnej (Elphin) przy 150 rpm., w temperaturze 14 lub 30°C przez 72 godz.

Hodowle wstrząsane w podłożu YPG zawierającym 0 i 4% NaCl wykorzystywano również do badania kinetyki wymierania komórek szczepu *Y. lipolytica* PII6a pod wpływem toksyn killerowych *D. hansenii* oraz do oceny wpływu tych toksyn na protoplasty komórek *Y. lipolytica* PII6a, którą prowadzono w stabilizowanym osmotycznie podłożu YPG, za pomocą 0,6 M roztworu KCl. Protoplasty otrzymano metodą Spencer i Spencer [1981]. Wyjściowe stężenie komórek lub protoplastów *Y. lipolytica* w tych procesach wynosiło około 1×10^6 /ml.

Hodowle w większej skali prowadzono w bioreaktorze BIOSTAT B-PLUS (Sartorius, Germany) zawierającym 3 l podłoża YPG, w temperaturze 14°C, utrzymując przepływ powietrza na poziomie 0,36 vvm, a szybkość obrotową mieszadła 500 rpm, przez 24 godz.

Mikrohodowle w aparacie Bioscreen C (Labsystem Oy, Finlandia) prowadzono jednocześnie w dwóch kasetach zawierających po 100 studzienek do hodowli. Procesy prowadzono w objętości 400 μ l podłoża, w temperaturze 14°C przez 48 godz.

Mikrohodowle wykorzystano do identyfikacji receptorów toksyn killerowych. Zastosowano metodę zaproponowaną przez Chen i in. [2000] prowadząc hodowle w podłożu YPG zawierającym 4% NaCl oraz glukan, mannan lub laminaryn w ilości 10 mg/ml. Podłoże zaszczepiano zawiesiną drożdży *Y. lipolytica* PII6a o stężeniu 1×10^6 kom/ml.

Liczbę komórek drożdży i protoplastów *Y. lipolytica* przeżywających działanie toksyn oceniano metodą płytkową na agarze YPG (komórki) lub YPG-KCl (protoplasty). Płytki inkubowano w temperaturze 30°C przez 48 godz.

3.4. Metody wydzielania i zagęszczania toksyn killerowych

Supernatant pochodzący z 48-godz. hodowli drożdży *D. hansenii* wysalano siarczanem amonu do końcowego nasycenia 70% oraz wytrącano acetonem lub etanolem w temperaturze 4°C. W preparatach uzyskanych po rozpuszczeniu osadu w buforze cytrynianowo-fosforanowym oceniano aktywność killerową (jak opisano w pkt. 3.6.1).

Zagęszczanie supernatantu prowadzono metodą ultrafiltracji z użyciem dializatora kapilarnego Hemoflow F8 (Fresenius Medical Care) z membraną o punkcie odcięcia 18 kDa oraz aparatu Labscale™ (Millipore) na membranach 30 i 50 kDa przy ciśnieniu 0,5 atm.

Roztwory zawierające toksyny killerowe po uprzednim zamrożeniu do temperatury -36°C pod ciśnieniem 0,16 mBa, suszono przez 24 godz. na drodze próżniowej sublimacji w liofilizatorze Alpha 2-4 (Christ).

3.5. Oczyszczanie białek killerowych

Do oczyszczania toksyn killerowych wykorzystano następujące metody: chromatografię jonowymienną, chromatografię powinowactwa z konkanawaliną A i β -glukanem oraz sączenie molekularne.

Chromatografię jonowymienną prowadzono w temp. 4°C przy użyciu CM-Sephacrylu (kationit) lub DECE-Sephacrylu (anionit) na kolumnach zrównoważonych 0,02 M buforem cytrynianowo-fosforanowym o pH 4,6. Białka zaadsorbowane eluowano gradientem NaCl od 0-1 M w 0,02 M buforu cytrynianowo-fosforanowym.

Chromatografię powinowactwa z immobilizowaną konkanawaliną A prowadzono na kolumnie ConA-Sepharose (GE Healthcare) zrównoważonej buforem cytrynianowo-fosforanowym o pH 4,6 zawierającym 0,5 M NaCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂ i MnCl₂. Białka killerowe eluowano 0,25 M α-D metylo-glukopiranozydem w roztworze startowym z szybkością przepływu równą 0,1 ml/min.

Chromatografię powinowactwa z β-glukanem prowadzono zawieszając 20 mg/ml β-glukanu (z drożdży *S. cerevisiae*, Sigma) lub 150 mg/ml fragmentów ścian komórkowych drożdży *Y. lipolytica* i *S. cerevisiae* uzyskanych w wyniku bonifikacji (sonifikator Sonopuls Ultra) w zagęszczonych preparatach toksyn killerowych (o pH 4,6). Próbkę inkubowano w temperaturze 14°C przez 1–3 godz. W otrzymanym po odwirowaniu supernatancie (10 000 g, 20 min, temp. 4°C) oceniano aktywność killerową. Osady przemywano buforem cytrynianowo-fosforanowym o pH 4,6, a następnie zawieszano w 0,3 M roztworze glukozy lub w buforze cytrynianowo-fosforanowym o pH 3,0. Po delikatnym wytrząsaniu (Thermomixer Komfort, Eppendorf; 24 godz., temperatura 14°C) próbki wirowano, po czym płyn z nad osadu badano pod kątem aktywności killerowej. Doświadczenie wykonano również, prowadząc wiązanie toksyny z β-glukanem w pH 3,0, zwalnianie toksyn natomiast w buforze cytrynianowo-fosforanowym o pH 4,6.

Do oczyszczania białek killerowych wykorzystano też sączenie molekularne na złożach: Superdex 75 (Pharmacia), Superdex 200 HR 10/30, BioGel P-150 (Bio-Rad) i BioGel P-200 (Bio-Rad). Rozdziały prowadzono w buforze cytrynianowo-fosforanowym o pH 4,6 z szybkością przepływu równą odpowiednio 0,2, 0,25, 0,06, 0,1 ml/min. Zebrane frakcje o objętości 0,5 ml badano pod kątem aktywności killerowej.

Kalibrację kolumn przeprowadzono za pomocą następujących białek standardowych:

- złożo Superdex 75 – BSA (67 kDa), owoalbumina (45 kDa), chymotrypsynogen (25 kDa), rybonukleaza (13,7 kDa);
- złożo Superdex 200 – tyreoglobulina (669 kDa), ferrytyna (440 kDa), katalaza (232 kDa), BSA (67 kDa), owoalbumina (45 kDa), chymotrypsynogen (25 kDa);
- złożo BioGel P-150 – BSA (67 kDa), owoalbumina (45 kDa), chymotrypsynogen (25 kDa), rybonukleaza (13,7 kDa);
- złożo BioGel P-200 – β-amylaza (200 kDa), transferyna (84 kDa), BSA (67 kDa), owoalbumina (45 kDa), anhydraza karbonylowa (29 kDa).

Efekty oczyszczania toksyn metodą sączenia molekularnego sprawdzano za pomocą elektroforezy denaturującej SDS-PAGE w żelu poliakrylamidowym według Laemmli [1970]. W celu oznaczenia masy cząsteczkowej białka zastosowano standardy: *Unstained Protein Molecular Weight Marker* (Fermentas) i *Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis* (Pharmacia). W celu uwidocznienia prążków białkowych żel barwiono roztworem EZBlue™ Gel Staining Reagent (SIGMA) dla ilości białka powyżej 100 mg.

3.6. Metody analiz

3.6.1. Oznaczanie aktywności toksyn killerowych

Aktywność toksyn killerowych w supernatantach z hodowli produkcyjnych *D. hansenii* oraz preparatach toksyn otrzymanych za pomocą zagęszczania i wysalania oceniano metodą studzienkową wg Woods'a i Bevan'a [1968] wobec wrażliwego szczepu *Yarrowia lipolytica* PII6a. Oznaczenia prowadzono w podłożu YPG-MB zawierającym 4% NaCl wprowadzając do studzienek 100 μ l preparatu toksyn. Płytki inkubowano w temperaturze 14°C. Aktywność killerową supernatantów wyrażano jako wielkość strefy inhibicji wzrostu (mm) wrażliwego szczepu *Y. lipolytica* PII6a (promień klarownej strefy inhibicji wzrostu pomniejszony o promień studzienki, który w każdym teście wynosił 3 mm).

W ten sam sposób badano aktywność bójczą preparatów toksyn wobec różnych drożdży, grzybów strzępkowych i bakterii, z tą różnicą, że wrażliwość/oporność bakterii oceniano w agarowym podłożu MRS o pH 4,8 (bakterie mlekowe) oraz agarze LB o pH 5,0 (pozostałe bakterie).

Metodą studzienkową badano aktywność i stabilność toksyn killerowych w różnym zakresie pH i temperatury oraz wpływ wybranych czynników na tę aktywność.

Wpływ pH na aktywność bójczą toksyn oceniano w podłożu YPG-MB o pH od 2,5 do 6,0, wpływ temperatury badano natomiast po inkubacji płytek w temperaturze 10, 14, 20 i 25°C.

Wpływ pH na stabilność toksyn oceniano po ich przeprowadzeniu, przy użyciu kolumny PD-10, do buforu cytrynianowo-fosforanowego o pH w zakresie 2,5–6,0 (Healthcare) i 24 godz. inkubacji w temperaturze 4 i 20°C. Wpływ temperatury na stabilność toksyn killerowych badano w trakcie ich inkubacji w temperaturze 20, 30, 40 i 50°C.

Podatność toksyn killerowych na działanie enzymów proteolitycznych sprawdzano po ich 24-godz. inkubacji w temp. 4 i 20°C, w obecności 100 μ g/ml proteiny K, pepsyny i papainy. Stężenie enzymów proteolitycznych oraz warunki prowadzenia reakcji przyjęto za Buzzini i in. [2004]. Wpływ β -merkaptioetanolu na aktywność bójczą toksyn oceniano po ich 24-godz. inkubacji w temperaturze pokojowej, w obecności 1% β -merkaptioetanolu.

Efekty oczyszczania toksyn killerowych oraz wpływ różnych czynników na ich aktywność bójczą przedstawiano, poza strefą inhibicji (mm) wzrostu wrażliwego szczepu *Y. lipolytica* PII6a, również w jednostkach aktywności toksyn. Jednostkę tę (aU) ustalono na podstawie zależności wielkości strefy inhibicji wzrostu szczepu wrażliwego od ilości toksyny (1 μ l preparatu odpowiadał 50 μ l płynu pohodowlanego) wyznaczoną w teście studzienkowym. Zaobserwowano liniową zależność pomiędzy logarytmem naturalnym objętości toksyny (y) a wielkością strefy inhibicji (x) wrażliwego szczepu *Y. lipolytica* PII6a (rys. 1). W każdym szczepie *D. hansenii* zależność ta przedstawiała się nieco inaczej:

$$\text{– AII4b: } y = 1,5735 \ln(x) + 1,8645; \text{ wsp. korelacji } R^2 = 0,9791 \quad (1),$$

$$\text{– MI1a: } y = 1,5173 \ln(x) + 1,8656; \text{ wsp. korelacji } R^2 = 0,9922 \quad (2),$$

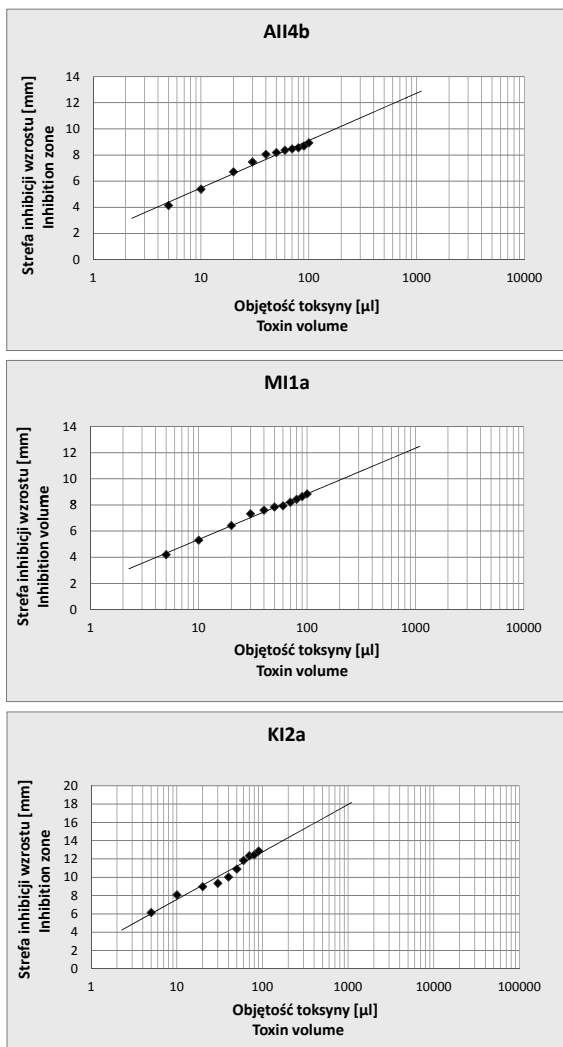
$$\text{– KI2a: } y = 2,2550 \ln(x) + 2,3823; \text{ wsp. korelacji } R^2 = 0,9604 \quad (3).$$

Na potrzeby niniejszej pracy, za jednostkę aktywności (aU), przyjęto aktywność toksyny zawartą w 50 μ l preparatu, dającą strefę (promień pomniejszony o promień studzienki) zahamowania wzrostu szczepu *Y. lipolytica* równą 2 mm.

3.6.2. Ocena aktywności bójczej drożdży *D. hansenii*

Aktywność killerową drożdży *D. hansenii* wobec drożdży i grzybów strzępkowych oznaczano za pomocą testu krzyżowego według Aguiar i Lucas [2000] w podłożu YPG-MB bez NaCl oraz w obecności 4% soli, w temperaturze 14 lub 20°C.

Spektrum aktywności bójczej drożdży wobec bakterii oceniano zmodyfikowaną (w zakresie pH) metodą Izgü i Altinbay [1997] na agarowym podłożu MRS o pH 4,6 (bakterie mlekowe) oraz na agarze LB o pH 5,4 (pozostałe bakterie). Podłoża zawierały różne stężenie NaCl (0 lub 4%), testy prowadzono w temperaturze 14 i 20°C.



Rys. 1. Zależność między logarytmem naturalnym objętości preparatu toksyny a wielkością tworzonej przez nią strefą inhibicji wzrostu szczepu wrażliwego *Y. lipolytica* PII6a

Fig. 1. Dependence of the natural logarithm of the toxin volume and the growth inhibition zone of the sensitive *Y. lipolytica* PII6a strain

3.6.3. Oznaczanie biomasy, glicerolu i kwasu cytrynowego

W hodowlach, których celem była biosynteza toksyn killerowych, oceniano wzrost drożdży, a w niektórych z nich również zużycie glicerolu i kwasu cytrynowego (składnika buforu stosowanego do sporządzania podłoży).

Biomasę oznaczano metodą wagową. Próby suszono w temperaturze 105°C do uzyskania stałej masy.

Glicerol i kwas cytrynowy oznaczano techniką HPLC na kolumnie Aminex HPX 87H połączonej z detektorem UV przy długości fali 210 nm, w temperaturze pokojowej. Szybkość przepływu 20 mM H₂SO₄ przez kolumnę wynosiła 0,6 ml/min.

3.6.4. Metody mikroskopowe

Badanie mechanizmu działania toksyn killerowych przeprowadzono metodą zaproponowaną przez Weiler i Schmitt [2003] z wykorzystaniem barwników fluorescencyjnych: Calcofluor white (Sigma), bromku etydyny (Sigma) oraz 4',6-diamidyno-2-fenylindolu (DAPI, Sigma). Barwienie komórek drożdży przeprowadzono zgodnie z instrukcjami producenta. Wybarwione preparaty obserwowano w mikroskopie fluorescencyjnym Axio Scope A1 (Zeiss) z podłączonym aparatem Canon PowerShot G9. Zdjęcia komórek szczepu wrażliwego, uzyskane po zastosowaniu ww. barwników fluorescencyjnych, poddano procesowi przetwarzania cyfrowego przy użyciu programu Adobe Photoshop CS3 (Adobe Systems).

Kolejne etapy przetwarzania zdjęć uzyskanych przy zastosowaniu barwnika Calcofluor white polegały na dodaniu skali, nałożeniu filtra „blask neonu”, zastosowaniu kontrastu z jednoczesnym zmniejszeniem jasności zdjęcia oraz zaznaczeniu strzałkami miejsca powstawania pączków. Przetwarzanie zdjęć, uzyskanych po barwieniu bromkiem etydyny, polegało na rozjaśnieniu i dodaniu skali, nałożeniu zdjęć widocznych pod UV oraz w świetle widzialnym (stopień krycia 50%). Cyfrowa optymalizacja zdjęć uzyskanych przy zastosowaniu DAPI celem uwidocznienia lokalizacji jądra w komórkach szczepu wrażliwego dotyczyła dodania skali oraz zastosowania kontrastu, z jednoczesnym zmniejszeniem jasności.

Pozytywną kontrolę, konieczną do oceny stopnia uszkodzenia błony cytoplazmatycznej komórek wrażliwych, przygotowano poprzez celowe uszkodzenie błon pod wpływem 70%, etanolu metodą zaproponowaną przez Slaninova i in. [2000].

3.6.5. Metody ekstrakcji i wizualizacji plazmidów

Izolację plazmidów z drożdży *D. hansenii* oraz *D. robertsiae* prowadzono metodą wg Gunge i Yamane [1984].

Wizualizację plazmidów przeprowadzano w żelu agarozowym o stężeniu 0,7% (Top Vision Agarose LE, Fermentas, Litwa) w obecności markera GeneRuler 1kb DNA Ladder (Fermentas) o zakresie 250–10 000 bp. Badania wykonywano przy użyciu zestawu do elektroforezy horyzontalnej Midi SubCell – GT z zasilaczem PowerPack Basic firmy Bio–Rad (USA).

3.7. Analiza *in silico* genów kodujących toksyny killerowe

Dostępne w bazach GenBanku sekwencje nukleotydowe toksyn killerowych w obrębie liniowych plazmidów drożdżowych porównywano z genomowym DNA drożdży *D. hanse-nii* z użyciem programu BLAST (www.blast.ncbi.nlm.nih.gov) zamieszczonego na stronach NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Korzystano z opcji: megablast – do porównywania sekwencji liniowych plazmidów z genomowym DNA drożdży oraz blastyn – do analizy sekwencji liniowych plazmidów.

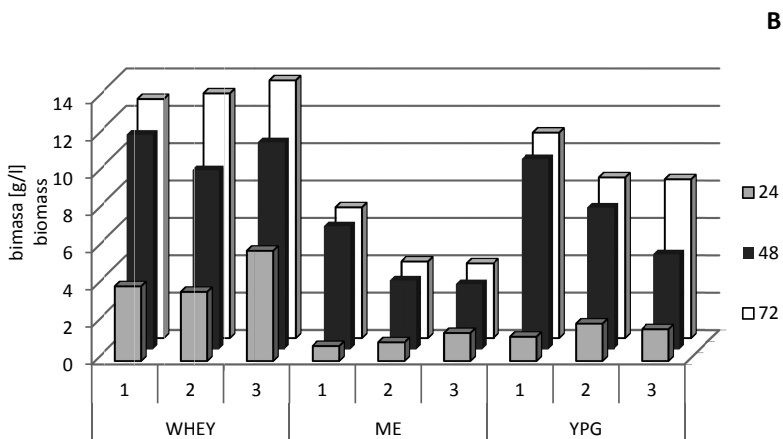
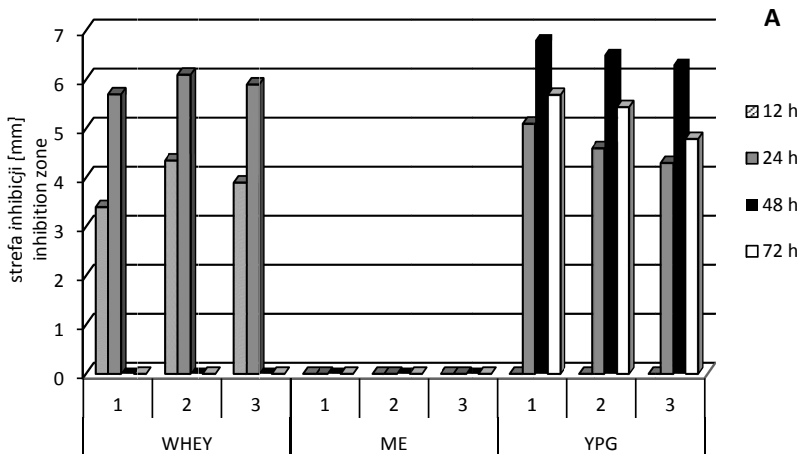
4. Wyniki

4.1. Dobór podłoża do biosyntezy toksyn killerowych przez drożdże *D. hansenii*

W pierwszej części badań oceniano efektywność biosyntezy toksyn killerowych w pożywkach naturalnych: serwatkowej i brzeczce słodowej oraz porównawczo w podłożu wzorcowym YPG. Procesy prowadzono w temperaturze 14°C, w której, jak wspomniano we wstępie, aktywność bójcza badanych szczepów przejawiała się najsilniej. Aktywność killerową supernatantów wyrażano wielkością strefy inhibicji wzrostu (mm) wrażliwego szczepu *Y. lipolytica* PII6a.

Drożdże produkowały białka killerowe tylko na serwatce i w bulionie YPG. W pożywce serwatkowej maksymalna aktywność białek killerowych była zbliżona do aktywności toksyn w podłożu wzorcowym; strefa inhibicji wzrostu szczepu wrażliwego równa była 5,7–6,8 mm. W pożywce tej drożdże *D. hansenii* wcześniej rozpoczynały produkcję białek killerowych – już po 12 godz. procesu, tworząc ich najwięcej w 24. godz. hodowli, podczas gdy w pożywce wzorcowej maksymalną aktywność toksyn stwierdzano w 48. godz. biosyntezy (rys. 2A). W kolejnych godzinach hodowli na serwatce nie odnotowano obecności aktywnych toksyn. Należy jednak zaznaczyć, że mimo podobnej aktywności – w podłożu serwatkowym drożdże *D. hansenii* rosły lepiej, poziom suchej biomasy w 24. godz. hodowli był o 2–6 g/l wyższy niż w podłożu YPG (rys. 2B). Aktywność właściwa toksyn na serwatce była więc niższa niż w podłożu wzorcowym.

W brzeczce słodowej, w której badane szczepy nie produkowały toksyn killerowych, obserwowano również słaby wzrost drożdży; poziom suchej biomasy w 72. godz. hodowli nie przekraczał 4–7 g/l (rys. 2).

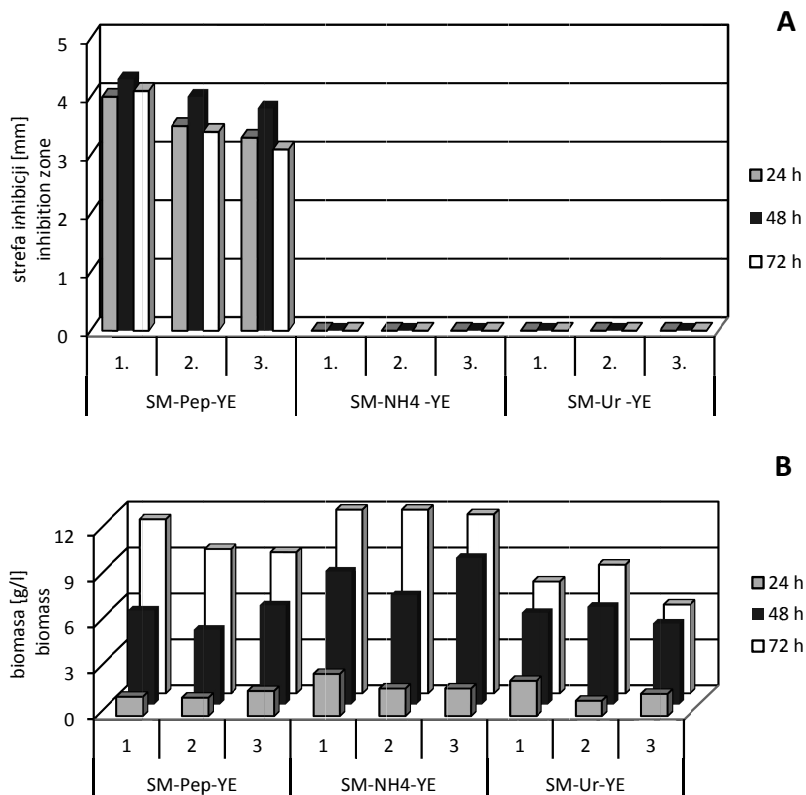


Rys. 2. (A) Aktywność killerowa supernatantów z hodowli 3 szczepów *D. hansenii*: (1) – KI2a, (2) – AII4b, (3) – MI1a, w serwatce (WHEY), brzeczce słodowej (ME) i porównawczo w podłożu wzorcowym (YPG) oraz (B) poziom biomasy w tych hodowlach

Fig. 2. (A) Killer activity of supernatants from three *D. hansenii* strains: (1) – KI2a, (2) – AII4b, (3) – MI1a in whey medium (WHEY), malt extract medium (ME) and standard broth (YPG) as comparison and (B) level of biomass in these cultures

Biosynteza toksyn w bogatych w białka podłożach kompleksowych stwarza trudności w procesie ich wydzielania i oczyszczania, gdyż tradycyjne metody izolacji białek killerowych skutkują wydzielaniem także niewykorzystanych przez drożdże białkowych składników podłoża. Zdolność drożdży *D. hansenii* do produkcji toksyn oceniano więc również w pożywkach syntetycznych (SM) zawierającym glukozę i ekstrakt drożdżowy w charakterze czynników wzrostowych oraz źródło azotu w postaci peptonu bakteriologicznego (SM-Pep-YE), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (SM- NH_4 -YE) lub mocznika (SM-Ura-YE).

Mimo dobrego wzrostu drożdży w każdym z zastosowanych podłoży obecność toksyn stwierdzano tylko w pożywce SM-Pep-YE, zawierającej pepton. Najwyższą aktywność białek killerowych obserwowano w 48. godz. hodowli (rys. 3A). Badane drożdże najlepiej rosły w pożywce zawierającej siarczan amonu jako źródło azotu; poziom biomasy w końcowych godzinach hodowli wynosił około 12 g/l (rys. 3B).

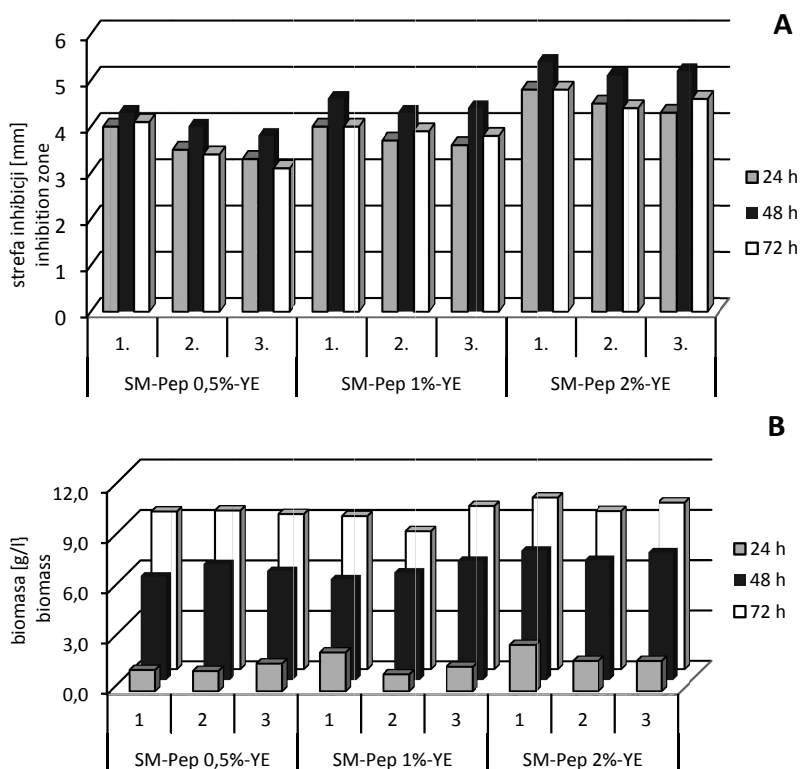


Rys. 3. (A) Aktywność killerowa supernatantów z hodowli 3 szczepów *D. hansenii*: (1) – KI2a, (2) – AII4b, (3) – MI1a, w pożywce syntetycznej, w zależności od rodzaju źródła azotu: peptonu (Pep), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (NH_4) i mocznika (Ura) oraz (B) poziom biomasy w tych hodowlach
 Fig. 3. (A) Killer activity of supernatants from three *D. hansenii* strains: (1) – KI2a, (2) – AII4b, (3) – MI1a in synthetic medium, depending on nitrogen sources: peptone (Pep), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (NH_4) and urea (Ura) and (B) level of biomass in these cultures

Uwzględniając fakt, że badane drożdże *D. hansenii* do efektywnej biosyntezy toksyn killerowych wymagają obecności w podłożu białkowych form azotu, następnie sprawdzono wpływ dawki peptonu na aktywność tworzonych toksyn przez te drożdże. Wyniki przedstawiono na rysunku 4.

Wyższe stężenie peptonu warunkowało wyższą aktywność białek. Strefy inhibicji w obecności 2% tego składnika były o ok. 1–2 mm większe niż w podłożu zawierającym 1%. Najwyższą aktywność toksyn obserwowano w 48. godz. hodowli.

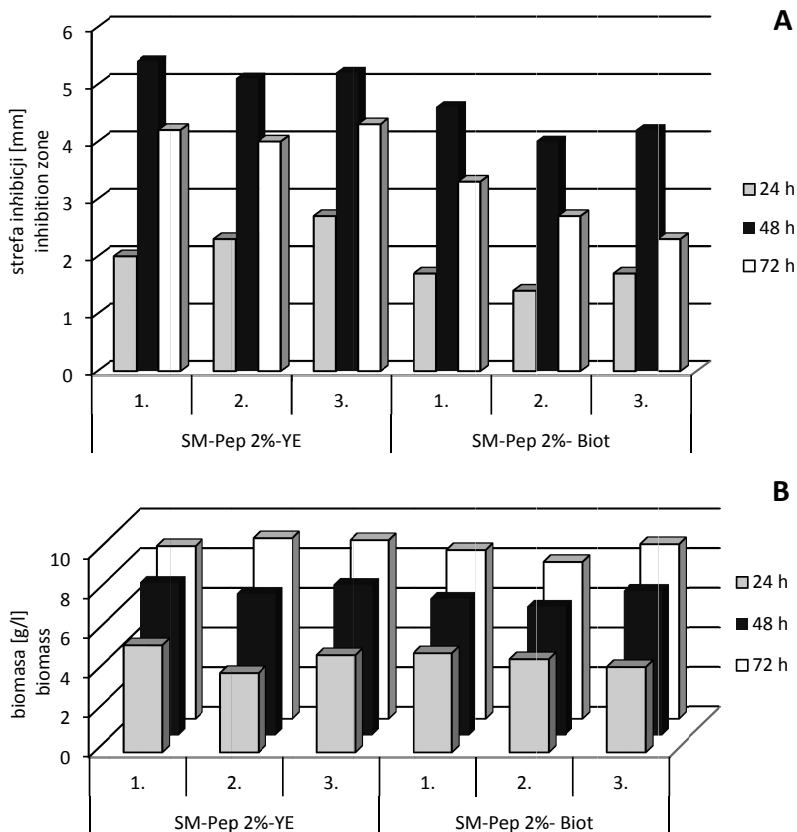
Nie stwierdzono znaczącego wpływu dawki peptonu na wzrost badanych drożdży. Poziom biomasy w hodowlach wszystkich badanych szczepów wynosił 8–10 g/l (rys. 4B).



Rys. 4. (A) Aktywność killerowa supernatantów z hodowli 3 szczepów *D. hansenii*: (1) – KI2a, (2) – AII4b, (3) – MI1a, w zależności od dawki peptonu w podłożu (0,5, 1 i 2%) oraz (B) poziom biomasy w tych hodowlach

Fig. 4. (A) Killer activity of supernatants from three *D. hansenii* strains: (1) – KI2a, (2) – AII4b, (3) – MI1a, depending on peptone dose in medium (0,5, 1 and 2%) and (B) level of biomass in these cultures

Ekstrakt drożdżowy, który był składnikiem wszystkich zastosowanych powyżej pożywek syntetycznych, dodawano do podłoża jako źródło czynników wzrostowych (w ilości 1g/l). Z uwagi na to, że oprócz witamin, głównie z grupy B, wносił on niewielkie ilości organicznego azotu w postaci aminokwasów, peptydów oraz polipeptydów, przeprowadzono ocenę efektywności biosyntezy toksyn killerowych w podłożu pozbawionym YE. Zważywszy na fakt, że badane drożdże *D. hansenii* są auksotrofami biotyno-zależnymi [Kurtzman, Fell 2000], w miejsce ekstraktu drożdżowego stosowano tę witaminę w stężeniu 20 ug/l. Na rysunku 5 przedstawiono aktywność toksyn killerowych oraz poziom biomasy obserwowany w 48. godz. hodowli w zależności od zastosowanych czynników wzrostowych.



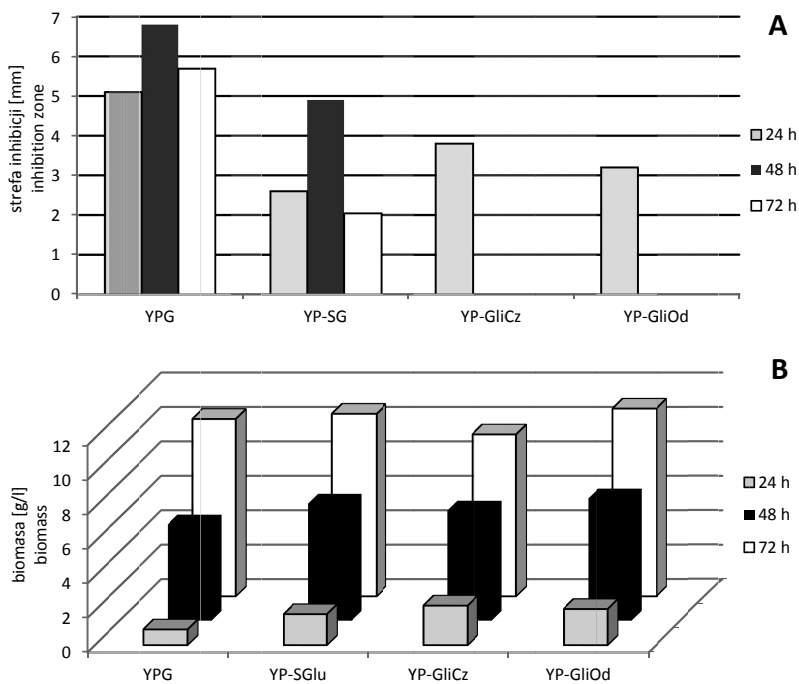
Rys. 5. (A) Aktywność killerowa supernatantów z hodowli 3 szczepów *D. hansenii*: (1) – KI2a, (2) – AII4b, (3) – MI1a, w podłożu syntetycznym, w zależności od rodzaju czynnika wzrostowego oraz (B) poziom biomasy w tych hodowlach

Fig. 5. (A) Killer activity of supernatants from three *D. hansenii* strains: (1) – KI2a, (2) – AII4b, (3) – MI1a in synthetic medium depending on the nutritive agent type and (B) level of biomass in these cultures

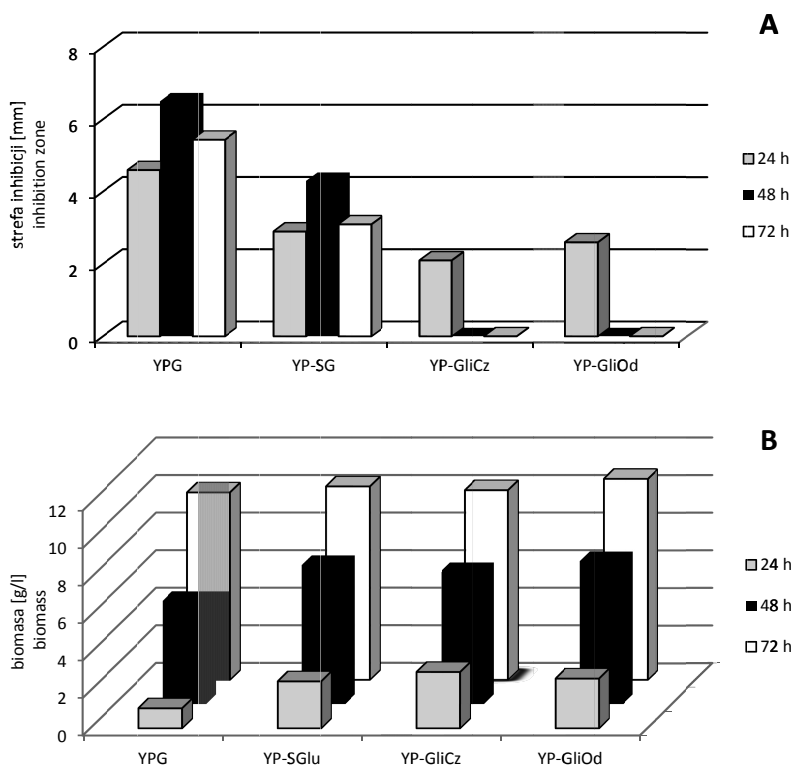
Zastąpienie ekstraktu drożdżowego biotyną wpłynęło jednak niekorzystnie na biosyntezę toksyn killerowych przez badane drożdże. Wielkość stref inhibicji wzrostu w przypadku podłoża z czystą witaminą była o 15–25% niższa w porównaniu z pożywką zawierającą YE. Największą aktywność toksyn killerowych stwierdzano w 2. dobie hodowli. Należy zaznaczyć, że aktywność toksyn killerowych produkowanych w podłożu SM-PepP2%-YE była jednak (o ok. 1,5 mm) niższa niż we wzorcowym podłożu YPG zawierającym dziesięciokrotnie większe stężenie ekstraktu drożdżowego. W dalszych badaniach do produkcji tych metabolitów stosowano więc bulion YPG. Następnie w pożywce oceniano wpływ różnych źródeł węgla na produkcję toksyn. Glukozę (YPG) zastępowano syropem glukozowym (YP-SG), czystym glicerolem (YP-GliCz) lub glicerolem odpadowym (YPGliOd).

Spośród analizowanych źródeł węgla najlepsze efekty biosyntezy białek killerowych obserwowano w pożywce z glukozą. Aktywność toksyn w płynie pohodowlanym najwyższa była w 48. godz. hodowli i wynosiła od 6,2 do 7 mm, w zależności od szczepu *D. hansenii* (rys. 6A, 7A, 8A). Mniejsze strefy, na poziomie 4–5 mm, stwierdzano w przypadku hodowli z syropem glukozowym.

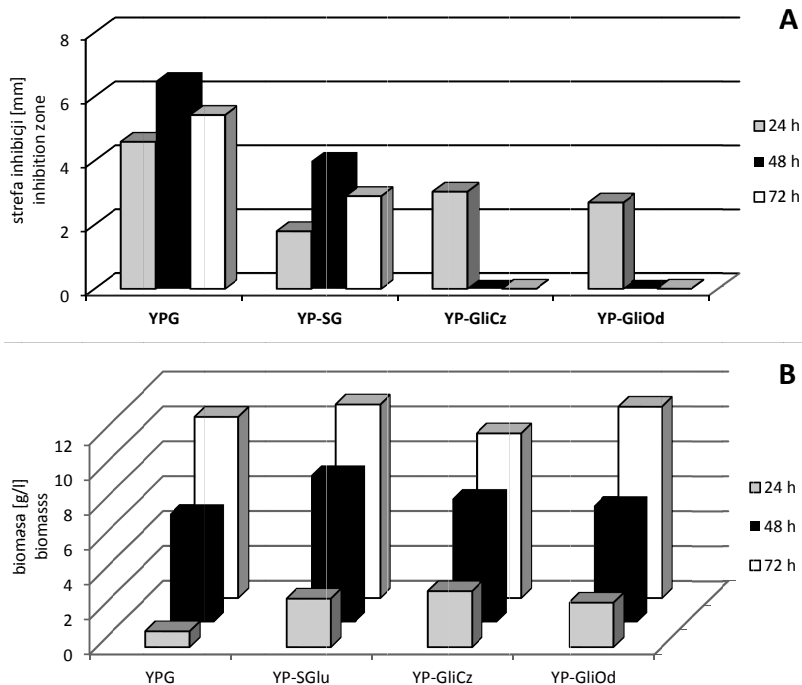
Wielkość stref inhibicji wzrostu *Y. lipolytica* PII6a w hodowli z glicerolem czystym oraz z glicerolem odpadowym najwyższa była w 24. godz. hodowli szczepu KI2a, nie przekraczała jednak 4 mm. Próbkę płynu pohodowlanego pochodzące z 48. i 72. godz. hodowli nie wykazywały aktywności killerowej. Warto zaznaczyć, że badane szczepy *D. hansenii* najlepiej rosły w podłożu z syropem glukozowym, osiągając poziom biomasy około 11–12 g/l (rys. 6B, 7B, 8B).



Rys. 6. (A) Aktywność killerowa supernatantów z hodowli szczepu *D. hansenii* KI2a w podłożu YPG zawierającym różne źródła węgla oraz (B) poziom biomasy w tych hodowlach
 Fig. 6. (A) Killer activity of supernatants from the cultures of *D. hansenii* KI2a strain in YPG medium containing various carbon sources and (B) level of biomass in these cultures

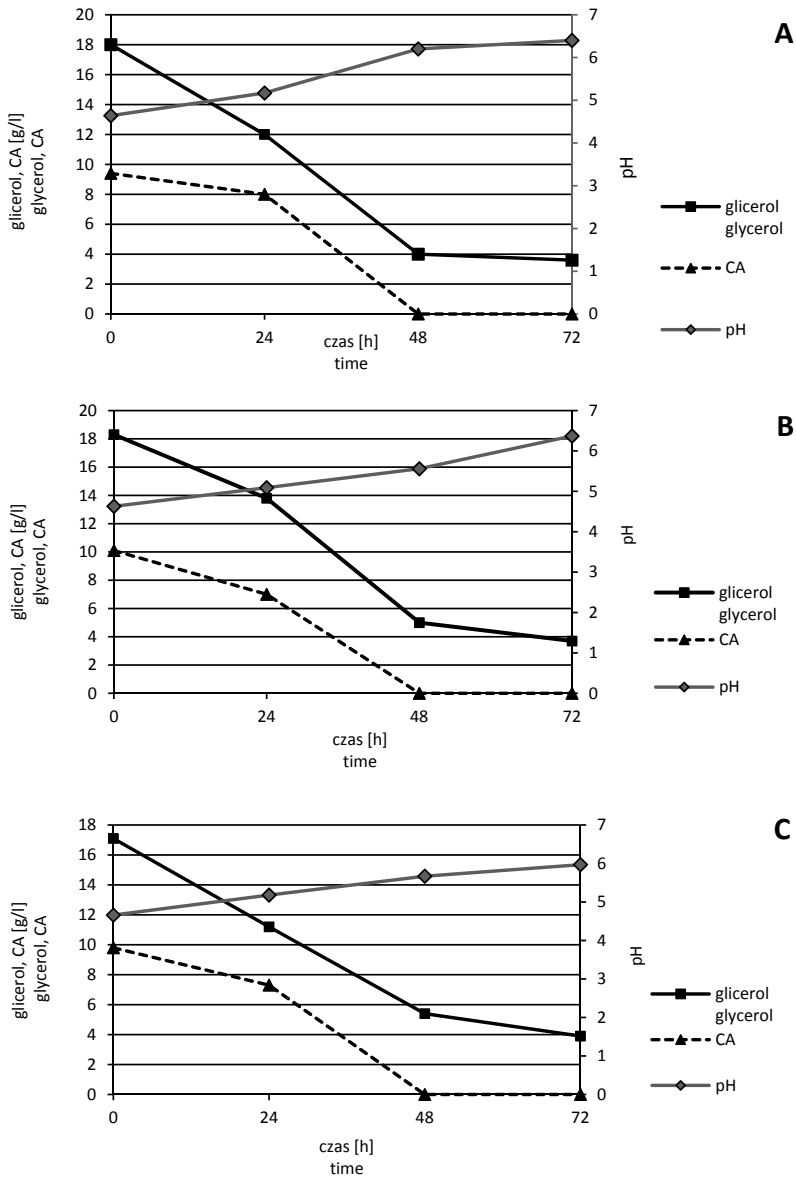


Rys. 7. (A) Aktywność killerowa supernatantów z hodowli szczepu *D. hansenii* AII4b w podłożu YPG zawierającym różne źródła węgla oraz (B) poziom biomasy w tych hodowlach
 Fig. 7. (A) Killer activity of supernatants from the cultures of *D. hansenii* AII4b strain in YPG medium containing various carbon sources and (B) level of biomass in these cultures



Rys. 8. (A) Aktywność killerowa supernatantów z hodowli szczepu *D. hansenii* M11a w podłożu YPG zawierającym różne źródła węgla oraz (B) poziom biomasy w tych hodowlach
 Fig. 8. (A) Killer activity of supernatants from the cultures of *D. hansenii* M11a strain in YPG medium containing various carbon sources and (B) level of biomass in these cultures

Analizując przyczyny braku aktywnych białek w podłożu YP-GliCz po 24 godz. hodowli zbadano jej odczyn oraz zużycie glicerolu stanowiącego źródło węgla, a także kwasu cytrynowego, będącego składnikiem buforu użytego do stabilizacji pH podłoża. Stwierdzono wzrost pH środowiska hodowlanego, od około 5,0–5,5 w 24. godz. do około 6,0–6,5 w 72. godz. hodowli (rys. 9).

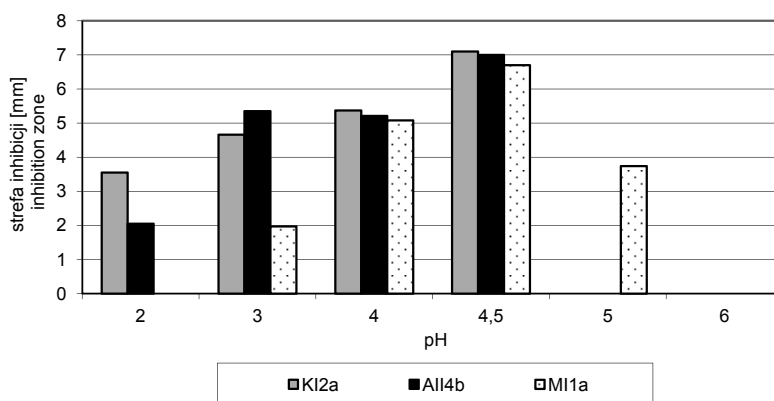


Rys. 9. Zmiany wartości pH oraz stężenia glicerolu (linia ciągła) i kwasu cytrynowego (linia przerywana) w hodowlach trzech szczepów *D. hansenii*: A) KI2a, B) AII4b i C) MI1a, w pożywce YPG z czystym glicerolem

Fig. 9. Changes of pH value and glycerol concentration (continuous line) and citric acid (dashed line) in culture of three *D. hansenii* strains: A) KI2a, B) AII4b and C) MI1a, in YPG medium with pure glycerol

Fakt ten może tłumaczyć utratę aktywności bójczej płynów pochodzących, gdyż powszechnie wiadomo, że większość białek killerowych jest produkowanych oraz zachowuje stabilność w środowisku o kwaśnym pH. Na podstawie analizy zmian stężenia glicerolu i kwasu cytrynowego wykazano, że badane drożdże równolegle wykorzystywały obydwa składniki. Ze względu na początkowo niższą ilość kwasu cytrynowego, w 48. godz. procesu nie stwierdzano już obecności tego składnika w podłożu, co spowodowało wzrost pH.

Zdolność badanych drożdży do produkcji białek killerowych w warunkach zróżnicowanego pH była cechą szczepową. Najwyższą aktywność toksyn obserwowano w hodowli o pH 4,5; strefy zahamowania wzrostu wrażliwego szczepu *Y. lipolytica*, równe były 6,8, 6,5 i 6,3 mm, odpowiednio w przypadku toksyn szczepów KI2a, AII4b i MI1a. Płyny pochodzące o niższych wartościach pH cechowały się słabszą aktywnością bójczą. Warto zwrócić uwagę, że szczep KI2a jako jedyny produkował białko killerowe w bulionie YPG o pH 5,0 i nie tworzył toksyny w podłożu o pH równym 2,0. Na rysunku 10 przedstawiono wpływ PH podłoża na biosyntezę toksyn killerowych w hodowlach drożdży *D. hansenii*.



Rys. 10. Aktywność killerowa supernatantów z hodowli 3 szczepów *D. hansenii*: KI2a, AII4b i MI1a w bulionie YPG, w zależności od pH (poziom aktywności killerowej w 48. godz. hodowli)

Fig. 10. Killer activity of supernatants from three *D. hansenii* strains: KI2a, AII4b and MI1a in YPG broth depending on medium pH (killer activity level in a 48-h culture)

Podsumowując, najwyższą aktywność toksyn killerowych uzyskano w bulionie YPG o pH 4,5. Podłożem naturalnym, które mogłoby znaleźć zastosowanie do biosyntezy toksyn killerowych przez drożdże *D. hansenii*, jest także serwatka kwasowa. Drożdże nie produkowały białek killerowych w podłożu syntetycznym zawierającym jako źródło azotu siarczan amonu lub mocznik. Do biosyntezy tych metabolitów wymagana była obecność w podłożu produkcyjnym białkowych form azotu (peptonu). Zastosowanie biotyny zamiast ekstraktu drożdżowego w charakterze czynnika wzrostowego u drożdży wpłynęło niekorzystnie na aktywność tworzonych toksyn.

4.2. Izolacja i oczyszczanie białek killerowych

Przed przystąpieniem do oczyszczania toksyn killerowych przeprowadzono badania mające na celu ich stabilizację. Oceniano wpływ inhibitorów proteaz w postaci różnych stę-

żeń fluorku fenylometylosulfonowego – PMSF (0,1–2 mM) i 10 mM kwasu etylenodiaminotetraoctowego – EDTA na aktywność bójczą toksyn killerowych, po ich inkubacji w temperaturze 5°C przez 20 godz. i 22°C przez 2 godz.

Czynnikiem stabilizującym toksyny killerowe, zarówno w niskiej temperaturze, jak i podczas krótkiego przechowywania w temperaturze pokojowej, okazał się PMSF w stężeniu 1 mM; strefa inhibicji wrażliwego szczepu *Y. lipolytica* PII6a wywołana toksyną zawierającą ten inhibitor była porównywalna z wielkością strefy wywoływanej płynem pochodowlanym, bezpośrednio po jego zagęszczeniu (dane niepublikowane). W dalszych badaniach płyny pochodowlane uzupełniano 1 mM PMSF.

Drugą metodą stabilizacji toksyn killerowych była liofilizacja. Aktywność bójczą utrwalonych tą metodą białek oceniano w trakcie ich 3-miesięcznego przechowywania i wyrażano w jednostkach aktywności (aU/ml). Bezpośrednio po liofilizacji toksyny killerowe wykazywały aktywność killerową zbliżoną do tej przed utrwalaniem. Co więcej, wysoką aktywność zachowywały również w czasie 3-miesięcznego przechowywania (tab. 1).

Tabela 1

Table 1

Aktywność killerowa liofilizowanych toksyn *D. hansenii* [aU/ml] w czasie ich przechowywania
Killer activity of *D. hansenii* freeze-dried toxins [aU/ml] during storage

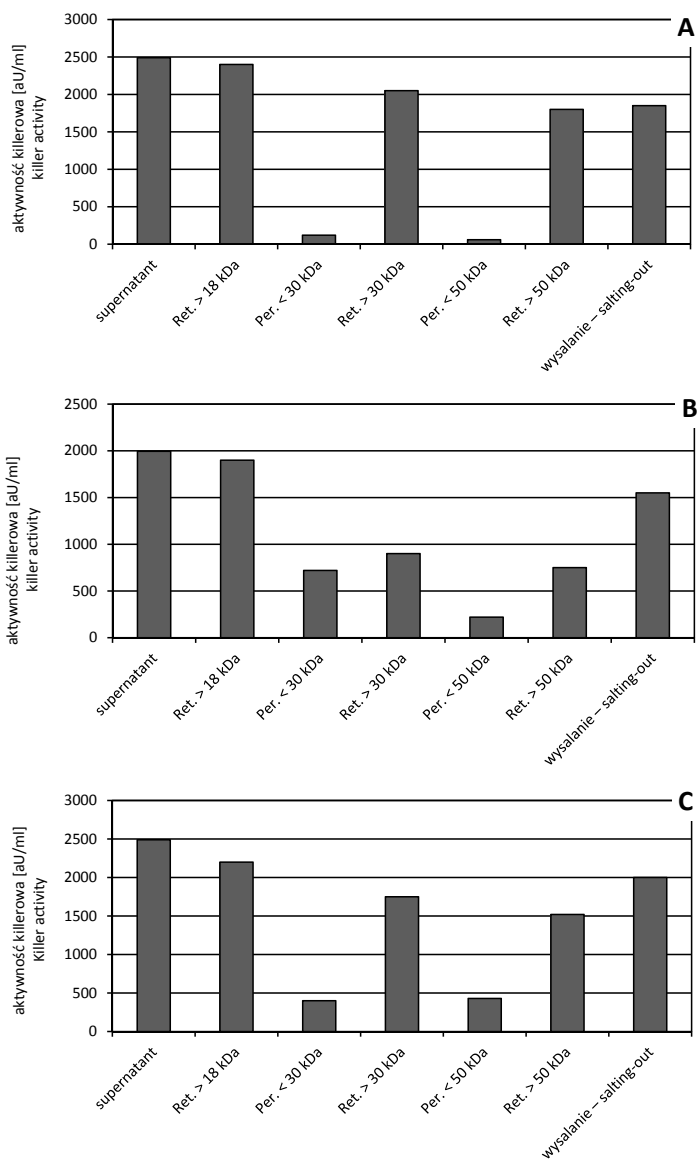
Toksyna Toxin	Przed liofilizacją Before freeze-drying	Czas przechowywania liofilizowanych toksyn Storage time of freeze-dried toxins			
		0 tygodni 0 weeks	2 tygodnie 2 weeks	1 miesiąc 1 months	3 miesiące 3 months
KI2a	6,2 x 10 ³	6 x 10 ³	5,8 x 10 ³	5,9 x 10 ³	5,8 x 10 ³
AII4b	5,8 x 10 ³	5,6 x 10 ³	5,4 x 10 ³	5,5 x 10 ³	5,5 x 10 ³
MI1a	5,3 x 10 ³	5,2 x 10 ³	5,0 x 10 ³	5,1 x 10 ³	5,1 x 10 ³

4.2.1 Ultrafiltracja i wysalanie

Podczas wstępnego oczyszczania toksyn killerowych drożdży *D. hansenii* oceniano efektywność ultrafiltracji przy użyciu membran o punkcie odcięcia 18, 30 i 50 kDa i wysalania siarczanem amonu jako metod zagęszczania i izolacji tych białek z cieczy pochodowlanej (supernatanu). Uzyskane wyniki przedstawiono na rysunku 11 oraz w tabeli 2.

Proces ultrafiltracji na membranie o punkcie odcięcia 18 kDa okazał się skuteczną metodą zagęszczania białek killerowych badanych szczepów. Aktywności killerowej nie obserwowano w permeatach poniżej 18 kDa, a straty aktywności bójczej w retentatach nie przekraczały 10%. W przypadku szczepu AII4b kolejne etapy zagęszczania na membranach o większych średnicach porów spowodowały znaczne obniżenie aktywności bójczej białek killerowych w otrzymanych retentatach (frakcje > 30kDa i > 50kDa), przy jednoczesnej, stosunkowo wysokiej aktywności w permeatach (< 30kDa i < 50kDa). W przypadku szczepów MI1a i KI2a zastosowanie membran o punkcie odcięcia 30 i 50kDa nie spowodowało znacznego ubytku aktywności białka (straty aktywności na poziomie 10–20% w stosunku do poprzedniego etapu).

Wysalanie siarczanem amonu również było efektywnym procesem zagęszczania supernatantu. Najmniejsze straty aktywności killerowej (około 20%) zanotowano u toksyny szczepu MI1a. Niewiele większy ubytek aktywności killerowej stwierdzono w wysolonych preparatach dwóch pozostałych szczepów AII4b i KI2a, odpowiednio 23 i 27,5%.



Rys. 11. Efektywność różnych metod zagęszczania i izolacji toksyn killerowych badanych szczepów *D. hansenii*: A) KI2a, B) AII4b, C) MI1a
 Fig. 11. Effectiveness of various methods of killer toxins concentration and isolation in *D. hansenii* tested strains: A) KI2a, B) AII4b, C) MI1a

Wydajność zastosowanego procesu wysalania, na poziomie 73–80%, była niższa niż procesu zagęszczania na drodze ultrafiltracji, jednakże metoda ta pozwoliła na uzyskanie małych objętości wysoko skoncentrowanych preparatów toksyn.

Zdecydowanie częściej stosowana do izolacji toksyn metoda wytrącania za pomocą wymrożonego etanolu czy acetonu nie przyniosła oczekiwanych rezultatów w przypadku badanych białek. Aktywnych toksyn nie stwierdzano zarówno w wytrąconych osadach, jak i supernatantach (dane niepublikowane).

Tabela 2

Table 2

Wydajność procesów zagęszczania toksyn killerowych szczepów *D. hansenii* AII4b, MI1a i KI2a
The recovery of killer toxin concentration processes of *D. hansenii* strains AII4b, MI1a and KI2a

Etap oczyszczania Purification stage	AII4b		MI1a		KI2a	
	Wydajność całkowita* [%] Total recovery*	Wydajność** [%] Recovery**	Wydajność całkowita* [%] Total recovery*	Wydajność** [%] Recovery**	Wydajność całkowita* [%] Total recovery*	Wydajność** [%] Recovery**
Supernatant	100	100	100	100	100	100
Retentat > 18 kDa Retentate > 18 kDa	95	95	91	91	95	95
Permeat < 30 kDa Permeate < 30 kDa	35	37	15	16	6	6
Retentat > 30 kDa Retentate > 30 kDa	46	48	71	78	86	90
Permeat < 50 kDa Permeate < 50 kDa	13	28	15	21	4	5
Retentat > 50 kDa Retentate > 50 kDa	38	83	63	89	73	85
Wysolenie Salting-out	77	77	82	82	73	73

* wydajność całkowita – wydajność w stosunku do supernatantu

* total recovery – recovery in relation to supernatant

** wydajność – wydajność w stosunku do poprzedniego etapu oczyszczania

** recovery – recovery in relation to previous purification stage

4.2.2. Chromatografia jonowymienna i powinowactwa

W trakcie dalszego oczyszczania białek killerowych drożdży *D. hansenii* zastosowano chromatografię jonowymienną oraz chromatografię powinowactwa.

Zagęszczony płyni pochodowlane nanoszono na kolumnę wypełnioną złożem CM-Sepharcyl (kationit) lub DECE-Sepharcyl (anionit). Niezaadsorbowane białka wymywano buforem startowym. Białka zaadsorbowane eluowano w gradiencie NaCl w buforze cytrynianowo-fosforanowym. Aktywność killerową wykazywały frakcje nanoszone na kolumny oraz materiał niezwiązany przez złoża. Aktywności bójczej nie stwierdzano w materiale zaadsorbowanym na kolumnach (dane niepublikowane).

Uwzględniając fakt, że większość produkowanych przez drożdże toksyn killerowych zaliczana jest do glikoprotein, podjęto również próbę zastosowania metody powinowactwa z konkanawaliną A do oczyszczania białek killerowych. Metodę wykorzystano do oczyszczania toksyn dwóch szczepów *D. hansenii* AII4b i KI2a. Aktywność killerową uzyskanych frakcji wyrażano zarówno jako wielkość strefy (mm) zahamowania wzrostu wrażliwego szczepu *Y. lipolytica* PII6a, jak i w jednostkach aktywności (aU/ml). Wyniki przedstawiono w tabelach 3 i 4.

Aktywność bójczą, na poziomie 30–65%, stwierdzano we frakcjach niezwiązanych ze złożem. Frakcje eluowane za pomocą α -D-metylo-glukopiranozydu nie wykazywały aktywności biologicznej wobec szczepu wzorcowego. Brak aktywności we frakcjach eluowanych wskazuje, że toksyny killerowe nie związały się z konkanawaliną i sugeruje, iż badane białka nie są glikoproteinami. Utrata tak dużej części aktywności (25% w przypadku białek killerowych szczepu KI2 i 70% w przypadku toksyn szczepu AII4b) nasuwa przypuszczenie, że w warunkach metody toksyny te mogą mieć zdolność do stosunkowo silnego wiązania z agarozową matrycą złoża.

Tabela 3
Table 3

Aktywność killerowa frakcji uzyskanych w wyniku rozdziału toksyny killerowej szczepu *D. hansenii* KI2a na ConA-Sepharose
Killer activity of fractions obtained as a result of *D. hansenii* KI2a strain killer toxin separation on ConA-Sepharose

Próbka Sample	Objętość [ml] Volume	Strefa inhibicji [mm] Inhibition zone	Aktywność killerowa [aU/ml] Killer activity	Całkowita aktywność killerowa [aU] Total killer activity
Próba nanoszona na ConA-Sepharose Sample applied to ConA-Sepharose	14	6,2	54	756
Frakcja niezwiązana I Unbound fraction I	14	4,9	31	434
Frakcja niezwiązana II Unbound fraction II	5	4,4	24	120
Frakcje eluowane 1–10 Eluted fraction 1–10	10 x 1	0	0	0

Tabela 4
Table 4

Aktywność killerowa frakcji uzyskanych w wyniku rozdziału toksyny killerowej szczepu *D. hansenii* AII4b na ConA-Sepharose
Killer activity of fractions obtained as a result of *D. hansenii* AII4b strain killer toxin separation on ConA-Sepharose

Próbka Sample	Objętość [ml] Volume	Strefa inhibicji [mm] Inhibition zone	Aktywność killerowa [aU/ml] Killer activity	Całkowita aktywność killerowa [aU] Total killer activity
Próbka rozdzielana (po odsoleniu na PD-10) Separation sample (after desalting on PD-10)	14	6,2	157	2198
Frakcja niezwiązana I Unbound fraction I	15	3,9	36	540
Frakcja niezwiązana II Unbound fraction II	3	3,4	27	81
Frakcja niezwiązana III Unbound fraction III	2	0	0	0
Frakcje eluowane 1–5 Eluted fraction 1–5	5 x 1	0	0	0

Ponieważ receptorem wiążącym toksyny killerowe szczepów *D. hansenii* w ścianach komórek wrażliwych jest β -D-glukan, co przedstawiono w dalszej części niniejszego opracowania (p. 4.5), postanowiono wykorzystać ten składnik do oczyszczania badanych białek. W metodzie zastosowano zarówno czysty β -D-glukan, jak i fragmenty ścian komórkowych wrażliwego szczepu *Y. lipolytica* PII6a oraz drożdży *S. cerevisiae*, u których zawartość tego polisacharydu sięga aż 50–60% [Cabib i in. 2001, Klis i in. 2002].

W tabeli 5 przedstawiono wyniki dotyczące oczyszczania białka killerowego szczepu KI2a. Toksyna nie ulegała związaniu przez fragmenty ścian komórkowych drożdży *Y. lipolytica* i *S. cerevisiae*; aktywność killerowa płynów znad osadów była zbliżona do aktywności toksyny stanowiącej kontrolę. Nieznaczne obniżenie się aktywności killerowej (około 70 aU/ml) stwierdzono tylko w preparacie poddanym działaniu β -glukanu.

Tabela 5
Table 5

Aktywność killerowa roztworów uzyskanych w trakcie oczyszczania toksyny killerowej szczepu *D. hansenii* KI2a przy użyciu β -D-glukanu i fragmentów ścian komórkowych drożdży *Y. lipolytica* PII6a i *S. cerevisiae*

Killer activity of solutions obtained during *D. hansenii* KI2a strain killer toxin purification using β -D-glucan as well as *Y. lipolytica* PII6a and *S. cerevisiae* scraps of cell walls

Próba Sample	β -D-glukan β -D-glucan		<i>Y. lipolytica</i> PII6a		<i>S. cerevisiae</i>	
	Strefa inhibicji [mm] Inhibition zone	Aktywność killerowa [aU/ml] Killer activity	Strefa inhibicji [mm] Inhibition zone	Aktywność killerowa [aU/ml] Killer activity	Strefa inhibicji [mm] Inhibition zone	Aktywność killerowa [aU/ml] Killer activity
Toksyna killerowa – kontrola Killer toxin – control	9,8	268	9,8	268	9,8	268
Odwirowanie – Centrifugation						
Supernatant – toksyna niezwiązana Supernatant – unbound toxin	9,1	196	9,6	245	9,5	235
Przemywanie – Washing						
Roztwór uzyskany po przemyciu osadu Solution obtained after washing the precipitate	3,4	16	3,1	14	2,8	12
Zwalnianie – Release						
Roztwór glukozy po procesie zwalniania toksyny Glucose solution after toxins releasing	1,9	8	0	0	0	0
Bufor (pH 3,0) po procesie zwalniania toksyny Buffer (pH 3.0) after toxins release	2,1	9	0	0	0	0

Próby zwolnienia związanych toksyn przeprowadzono za pomocą roztworu glukozy oraz buforu o zmienionym pH w stosunku do buforu, w którym następowało wiązanie. Białka tego nie udało się jednak uwolnić zarówno roztworem glukozy, jak i buforem o pH 3,0.

Metodę zastosowano również do oczyszczenia białek killerowych wszystkich badanych szczepów, prowadząc wiązanie z β -glukanem w pH 3,0, natomiast zwalnianie toksyn w buforze pH 4,6.

Białka killerowe szczepów AII4b i MI1a związały się z polisacharydem, co przejawiało się zdecydowanie słabszą aktywnością killerową płynu pozostającego po odwirowaniu β -glukanu, w stosunku do aktywności wyjściowej toksyn (tab. 6).

Tabela 6

Table 6

Aktywność killerowa roztworów uzyskanych w trakcie oczyszczania toksyn killerowych trzech szczepów *D. hansenii* KI2a, AII4b i MI1a przy użyciu β -glukanu
 Killer activity of solutions obtained after purification
 of killer toxins form *D. hansenii* KI2a, AII4b i MI1a strains using β -D-glucan

Próba Sample	KI2a		AII4b		MI1a	
	Strefa inhibicji [mm] Inhibition zone	Aktywność killerowa [aU/ml] Killer activity	Strefa inhibicji [mm] Inhibition zone	Aktywność killerowa [aU/ml] Killer activity	Strefa inhibicji [mm] Inhibition zone	Aktywność killerowa [aU/ml] Killer activity
Toksyna killerowa – kontrola Killer toxin – control	9,3	214	7,2	267	6,7	242
Odwirowanie – Centrifugation						
Supernatant – toksyna niezwiązana Supernatant – unbound toxin	8,9	180	6,3	167	4,1	43
Przemywanie – Washing						
Roztwór uzyskany po przemyciu osadu Solution obtained after washing the precipitate	8,7	165	3,4	26	2,8	18
Zwalnianie – Release						
Bufor (pH 3,0) po procesie zwalniania toksyny Buffer (pH 3.0) after toxin release	0	0	1,1	6	0,7	5

Niestety, białek tych nie udało się zwolnić, stosując bufor o pH 4,6. Natomiast białko killerowe szczepu KI2a nie wiązało się z zastosowanym polisacharydem.

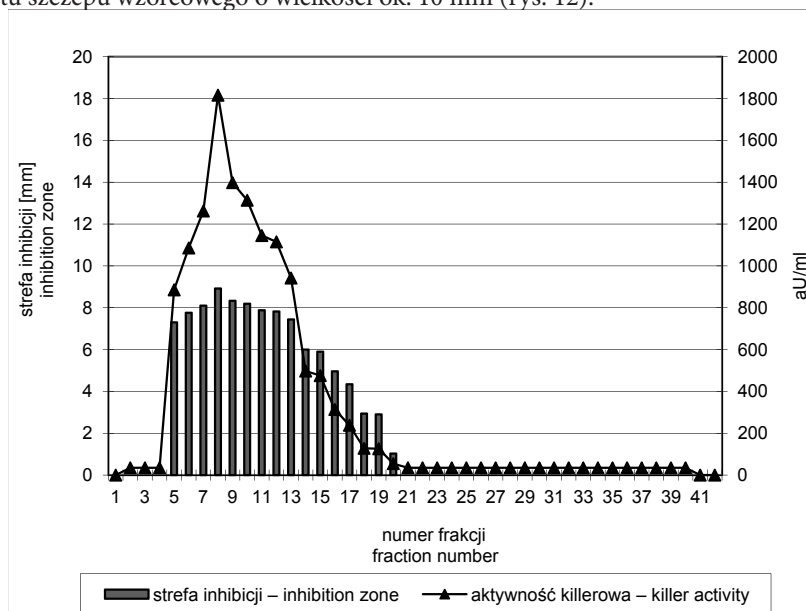
4.2.3. Sączenie molekularne

Uwzględniając niepowodzenia przedstawionych wcześniej metod oczyszczania, na kolejnym etapie zastosowano rozdział badanych białek na sitach molekularnych.

Toksyna killerowa *D. hansenii* KI2a

Bazując na doniesieniach literaturowych, na podstawie których większość białek killerowych ma stosunkowo niewielką masę cząsteczkową, w zakresie od około 20 kDa do około 85 kDa, do rozdziału toksyny szczepu *D. hansenii* KI2a w pierwszej kolejności zastosowano złożo dzielące białka w zakresie od 70 do 3 kDa.

Spośród 42 zebranych frakcji aktywność killerową stwierdzano we frakcjach od 5 do 20. Najwyższą aktywnością bójczą cechowała się frakcja 10, wywołująca strefę inhibicji wzrostu szczepu wzorcowego o wielkości ok. 10 mm (rys. 12).

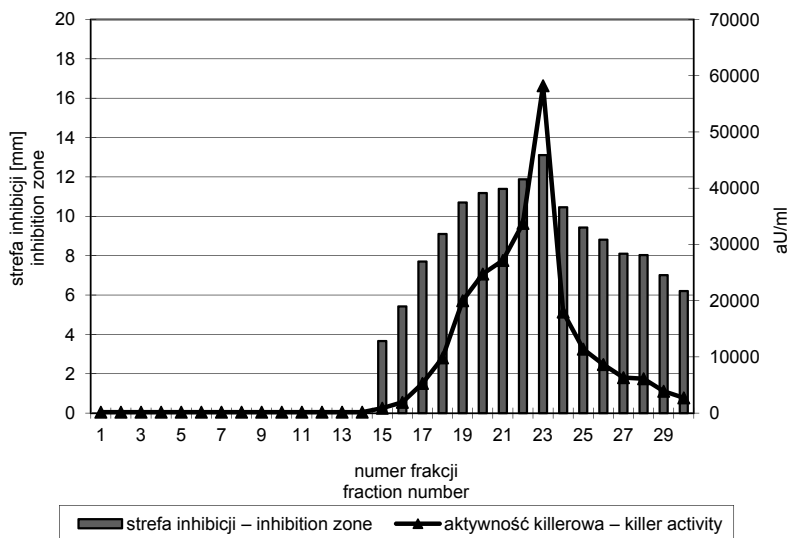


Rys. 12. Aktywność killerowa poszczególnych frakcji toksyny killerowej szczepu *D. hansenii* KI2a, zebranych podczas sączenia molekularnego na złożu Superdex 75
Fig. 12. Killer activity of individual fractions of *D. hansenii* KI2a killer toxin collected during molecular filtration on Superdex 75

Wyrażenie aktywności killerowej w umownych jednostkach pokazało, że zakres frakcji zawierający znaczące ilości toksyny killerowej nie jest zbyt szeroki; w przedziale od 6 do 12 frakcji. Oznacza to, że aktywność killerowa obserwowana jest we frakcjach wypływających z kolumny w objętości bardzo bliskiej do tzw. pustej objętości ($V_e/V_0 = 1,03$). Szacowana wielkość tego białka jest więc poza zakresem rozdziału złoża, czyli powyżej 70 kDa.

Do kolejnego rozdziału zastosowano zatem złożo dzielące białka w zakresie od 600 do 10 kDa. Frakcja 23 o najwyższej aktywności bójczej, uzyskana podczas tego rozdziału, wskazuje, że szacunkowa masa cząsteczkowa badanej toksyny nie przekracza 25 kDa (rys. 13).

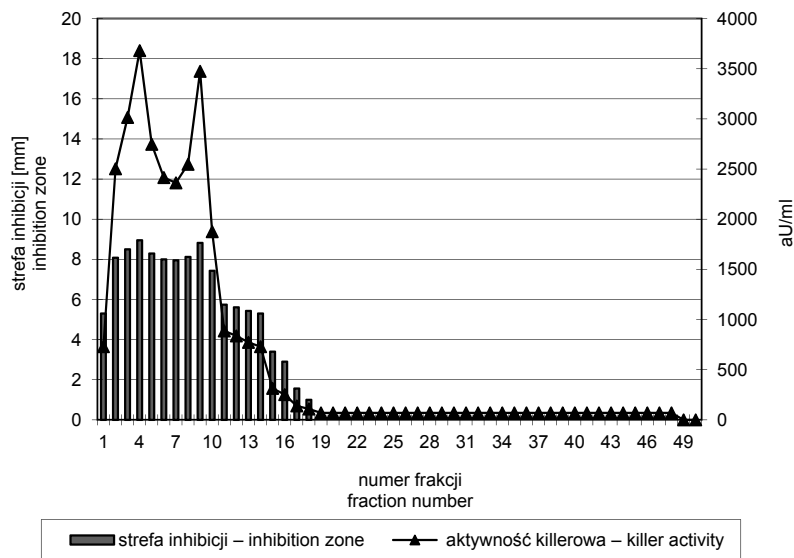
Mimo wykalibrowania obydwu kolumn szacowane na podstawie tych rozdziałów masy białek, obecnych we frakcjach o najwyższej aktywności, pozostawały ze sobą w sprzeczności. Biorąc pod uwagę zarówno powyższe rezultaty, jak i wyniki uzyskane z zastosowaniem chromatografii powinowactwa z konkanawaliną A, można przypuszczać, że dochodzi do niespecyficznego oddziaływań pomiędzy toksynami a matrycą tych złożeń – agarozą i/lub dekstranem, szczególnie złoża Superdex 200.



Rys. 13. Aktywność killerowa poszczególnych frakcji toksyny killerowej szczepu *D. hansenii* KI2a, zebranych podczas sączenia molekularnego na złożu Superdex 200 HR 10/30

Fig. 13. Killer activity of individual fractions of *D. hansenii* KI2a killer toxin collected during molecular filtration on Superdex 200 HR 10/30

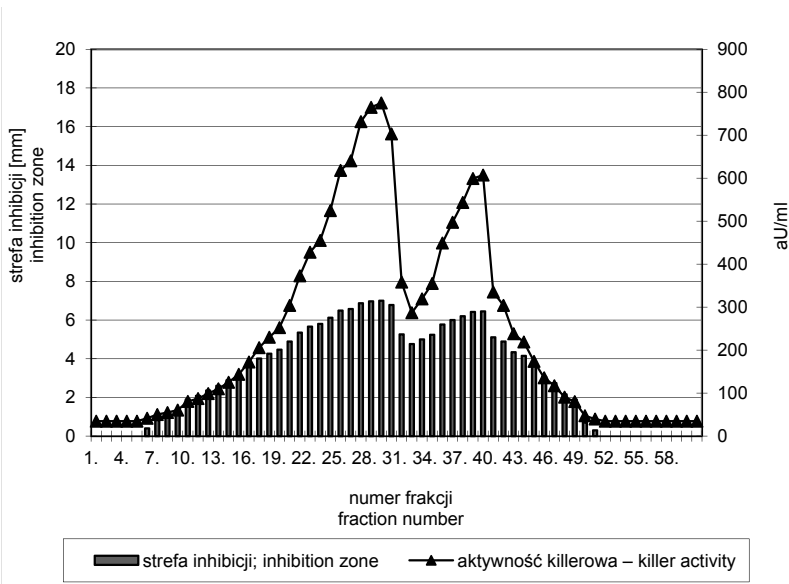
W celu wyeliminowania niespecyficznego adsorpcji toksyn killerowych z agarozą na kolejnym etapie badań zastosowano syntetyczne złożo poliakrylamidowe BioGel P-150. Jest to polimer z grupy poliakrylanów (Polyacrylamide-co-methylene-bis-acrylamide) dzielący białka w zakresie ich mas cząsteczkowych, w przedziale od 70 do 3 kDa. W profilu aktywności killerowej wyrażonej w umownych jednostkach aU, uzyskanym w wyniku tego rozdziału, ujawniały się dwa piki o najwyższej aktywności bójczej, frakcje 4 i 9. Wyznaczona na podstawie objętości elucyjnej masa białka obecnego we frakcji 4 wynosiła powyżej 60–70 kDa, a we frakcji 9 około 45 kDa (rys. 14).



Rys. 14. Aktywność killerowa poszczególnych frakcji toksyn killerowych szczepu *D. hansenii* KI2a, zebranych podczas sączenia molekularnego na złożu BioGel P-150
 Fig. 14. Killer activity of individual fractions of *D. hansenii* KI2a killer toxin collected during molecular filtration on BioGel P-150

Rozdział tego białka na złożu Biogel P-200, dzielącym białka w szerszym zakresie mas cząsteczkowych (200–30 kDa), potwierdził obecność 2 aktywnych frakcji białkowych; ich szacunkowa masa wynosi ok 78 kDa (frakcje 28–30) i 46 kDa (frakcje 35–38) (rys. 15).

W celu wykazania ewentualnych różnic pomiędzy białkami obecnymi w obu pikach sprawdzano aktywność bójczą każdego z preparatów wobec trzech różnych szczepów: *Y. lipolytica* PII6a, *Y. lipolytica* ATCC 20460 i *S. occidentalis* ATCC 44442 na agarze YPB-MB. Każdy z preparatów wykazywał taką samą aktywność bójczą wobec odpowiedniego szczepu wrażliwego, a strefy zahamowania wzrostu wynosiły 6,6, 4,4 i 6,1 mm, odpowiednio w przypadku szczepu *Y. lipolytica* PII6a, *Y. lipolytica* ATCC 20460 i *S. occidentalis* ATCC 44442 (dane niepublikowane).



Rys. 15. Aktywność killerowa poszczególnych frakcji toksyn killerowych szczepu *D. hansenii* KI2a, zebranych podczas sączenia molekularnego na złożu BioGel P-200

Fig. 15. Killer activity of individual fractions of *D. hansenii* KI2a killer toxin collected during molecular filtration on BioGel P-200

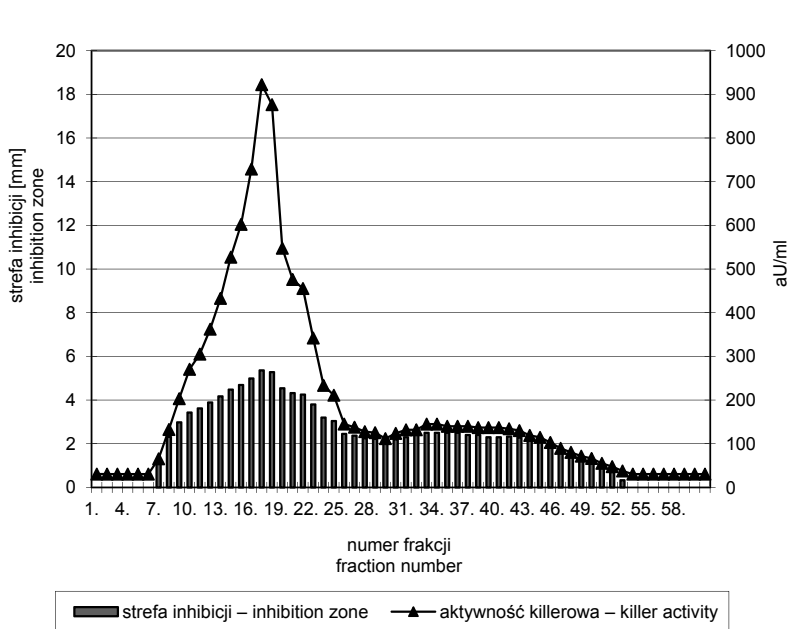
Toksyna killerowa *D. hansenii* AII4b

Toksynę killerową szczepu *D. hansenii* AII4b oczyszczano na złożach Superdex 200, BioGel P-150 i BioGel P-200. W wyniku rozdziału na pierwszym z wymienionych złożów aktywność bójczą wykazywało tylko kilka ostatnich frakcji, co sugeruje, że toksyna jest białkiem o masie cząsteczkowej poniżej 25 kDa.

Wyniki uzyskane w trakcie rozdziału toksyny tego szczepu na kolumnie wypełnionej złożem BioGel P-150, podobnie jak w przypadku toksyny KI2A, były sprzeczne z uzyskanymi podczas sączenia na Superdex 200. Aktywne frakcje wypłynęły tuż za tzw. pustą objętością, co wskazuje, że badane białko ma wielkość przekraczającą zakres podziału złoża, czyli powyżej 70 kDa (dane niepublikowane).

W dalszej części zastosowano więc złożę dzielące białka w zakresie większych mas cząsteczkowych BioGel P-200. Natywne białka obecnych we frakcjach 17–18 wykazujących najwyższą aktywność killerową wynosi powyżej 232 kDa (rys. 16).

Otrzymane wyniki są zaskakujące, gdyż żadna z poznanych dotychczas toksyn nie cechuje się tak dużą masą cząsteczkową. Wyniki te pozostają również w sprzeczności z uzyskanymi w wyniku zagęszczania płynu pochodzącego szczepu AII4b na membranach o różnym punkcie odcięcia sugerujących, że masa białka tego szczepu nie przekracza 50 kDa.

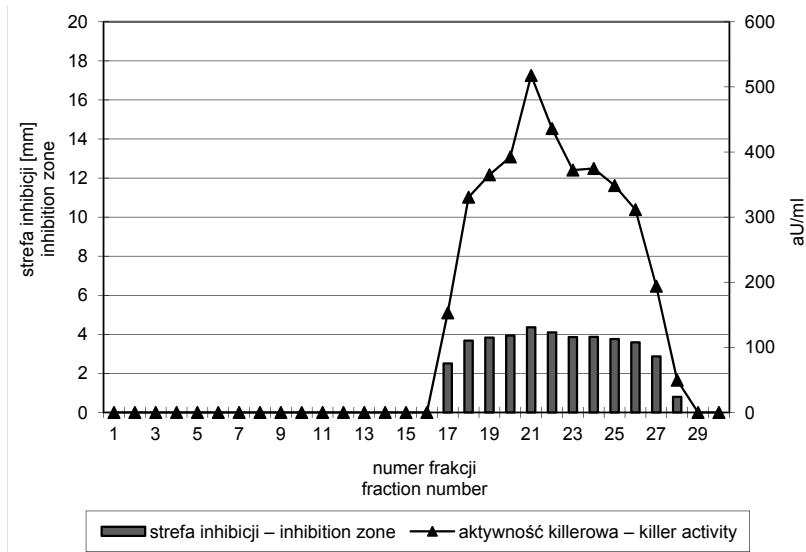


Rys. 16. Aktywność killerowa poszczególnych frakcji toksyn killerowych szczepu *D. hansenii* AII4b, zebranych podczas sączenia molekularnego na złożu BioGel P-200
 Fig. 16. Killer activity of individual fractions of *D. hansenii* AII4b killer toxin collected during molecular filtration on BioGel P-200

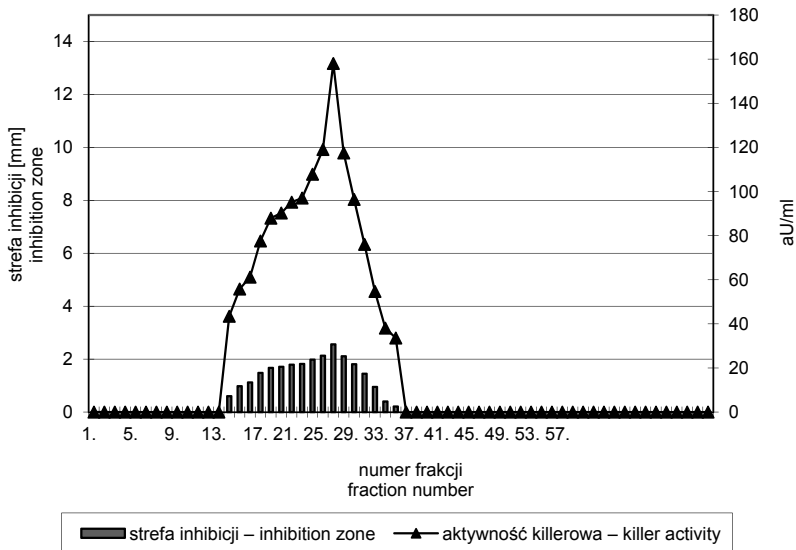
Toksyna killerowa *D. hansenii* MI1a

Oczyszczanie toksyny killerowej szczepu MI1a przeprowadzono analogicznie do toksyny szczepu AII4b. Uzyskana – podczas rozdziału na złożu Superdex 200 – najwyższa aktywność bójcza we frakcjach od 19 do 24 pozwala sądzić, że masa cząsteczkowa tego białka mieści się w zakresie 25–45 kDa (rys. 17).

Biorąc jednak pod uwagę możliwość wiązania białka killerowego do matrycy złoża-agarozy i zakłócenia w ich prawidłowym rozdziale, następnie przeprowadzono sączenie na syntetycznym złożu BioGel P-200, dzielącym w zakresie mas cząsteczkowych 200–30 kDa. Podczas rozdziału na kolumnie wypełnionej tym złożem najwyższą aktywność killerową odnotowano we frakcjach 23–25, co świadczy o tym, że masa cząsteczkowa zawartego w nich białka wynosi ok. 152 kDa (rys. 18).

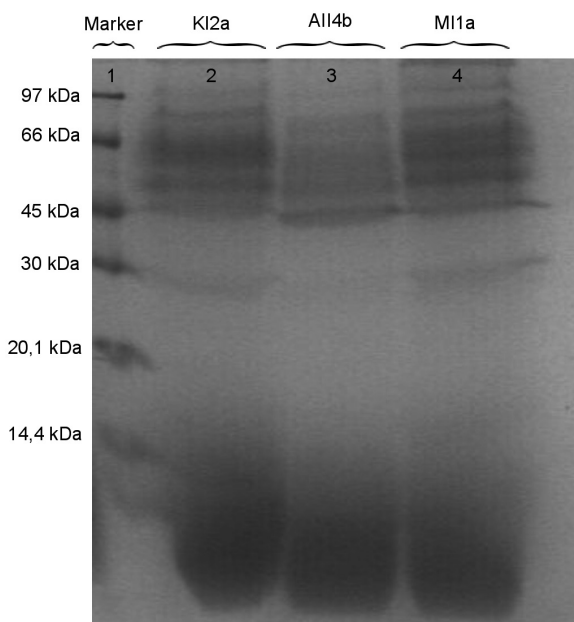


Rys. 17. Aktywność killerowa poszczególnych frakcji toksyny killerowej szczepu *D. hansenii* MI1a, zebranych podczas sączenia molekularnego na złożu Superdex 200 HR 10/30
 Fig. 17. Killer activity of individual fractions of *D. hansenii* MI1a killer toxin collected during molecular filtration on Superdex 200 HR 10/30



Rys. 18. Aktywność killerowa poszczególnych frakcji toksyn killerowych szczepu *D. hansenii* MI1a zebranych podczas sączenia molekularnego na złożu BioGel P-200
 Fig. 18. Killer activity of individual fractions of *D. hansenii* MI1a killer toxin collected during molecular filtration on BioGel P-200

W celu określenia skuteczności oczyszczania na sitach molekularnych wykonano elektroforezę białkową SDS-PAGE zarówno zagęszczonych prób przed ich rozdziałem, jak i aktywnych frakcji z rozdziałów na Super-dex 75, Super-dex 200 oraz BioGel P-150.



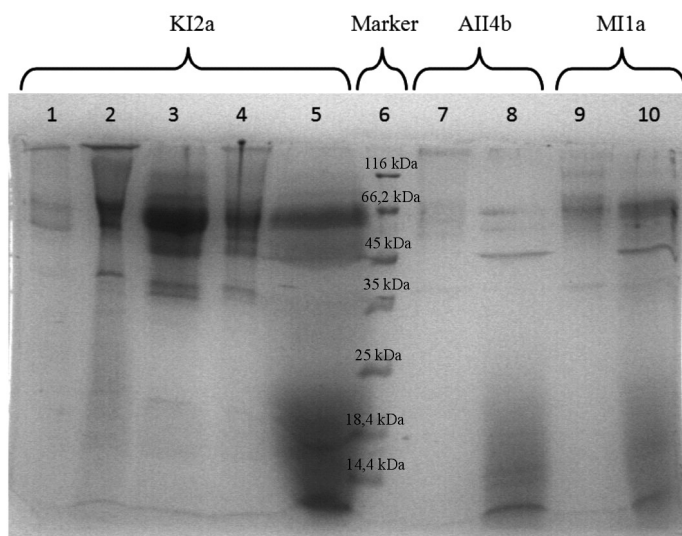
Rys. 19. Elektroforeza białkowa SDS-PAGE toksyn killerowych badanych szczepów *D. hansenii* przed rozdziałem metodą sączenia molekularnego. Żel wybarwiony roztworem koloidalnego Coomassie (EZBlue™ Gel Staining Reagent (SIGMA))

Fig. 19. SDS-PAGE of tested *D. hansenii* strains of killer toxins before separation using molecular filtration method. Gel was coloured with colloidal Coomassie dye (EZBlue™ Gel Staining Reagent (SIGMA))

Zawartość poszczególnych ścieżek:

1. Marker Unstained Protein Molecular Weight Marker (Pharmacia);
2. białko killerowe szczepu KI2a;
3. białko killerowe szczepu AII4b;
4. białko killerowe szczepu MI1a.

W próbkach nieoczyszczonych obserwowano obecność siedmiu prążków o wielkości od 30 do 66 kDa (rys. 19). Prążki te widoczne były również po procesie sączenia molekularnego na wyżej wymienionych złożach (rys. 20). W żadnej aktywnej frakcji, uzyskanej w wyniku rozdziału, nie otrzymano jednak czystego białka. Widoczne na rysunku 19 ciemno wybarwione obszary w zakresie mas cząsteczkowych 14,4–20 kDa były wynikiem obecności związków barwnych pochodzących ze składników podłoża, które w przypadku białka killerowego szczepu KI2a zostały usunięte w trakcie sączenia molekularnego na Superdex 75 i BioGel P-150.



Rys. 20. Elektroforeza białkowa SDS-PAGE toksyn killerowych badanych szczepów *D. hansenii* poddanych rozdzielni na sitach molekularnych. Żel wybarwiony roztworem koloidalnego Coomassie (EZBlue™ Gel Staining Reagent (SIGMA))

Fig. 20. SDS-PAGE of tested *D. hansenii* strains of killer toxins after separation using molecular filtration method. Gel was coloured with colloidal Coomassie dye (EZBlue™ Gel Staining Reagent (SIGMA))

Zawartość poszczególnych ścieżek:

1. Frakcje nieaktywne z rozdziału na złożu BioGel P-150 (KI2a);
- 2-3. Aktywne frakcje z rozdziału na złożu BioGel P-150 (KI2a): 2 – szczyt I; 3 – szczyt II;
4. Aktywne frakcje z rozdziału na złożu Superdex 75 (KI2a);
5. Aktywne frakcje po rozdziale na złożu Superdex 200 (KI2a);
6. Marker Unstained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas);
7. Aktywne frakcje po rozdziale na złożu BioGel P-150 (AII4b);
8. Aktywne frakcje po rozdziale na złożu Superdex 200 (AII4b);
9. Aktywne frakcje po rozdziale na złożu BioGel P-150 (MI1a);
10. Aktywne frakcje po rozdziale na złożu Superdex 200 (MI1a);

Podsumowując, oczyszczanie toksyn killerowych drożdży *D. hansenii* okazało się procesem żmudnym i stwarzającym ogromne trudności. Najlepszą metodą wstępnego oczyszczania toksyn było wysalanie siarczanem amonu i zagęszczanie supernatantu na membranę o punkcie odcięcia 18 kDa. Oczekiwanych efektów nie przyniosło oczyszczanie białek metodą chromatografii powinowactwa z konkanawaliną A i β -glukanem oraz chromatografia jonowymienna. W wyniku sączenia molekularnego badanych toksyn uzyskano różne obrazy rozdzielów. Toksyna szczepu *D. hansenii* KI2a cechowała się obecnością dwóch aktywnych białek o masach 46 i 78 kDa. W preparatach toksyn dwóch pozostałych szczepów (AII4b i MI1a) stwierdzano pojedyncze białka o masie cząsteczkowej odpowiednio powyżej 232 i około 152 kDa. W obrazie elektroforetycznym uzyskano kilka prążków wielkości od 30 do 66 kDa, trudno jest jednak oszacować natywną masę cząsteczkową toksyn killerowych.

4.3. Charakterystyka toksyn killerowych *D. hansenii*

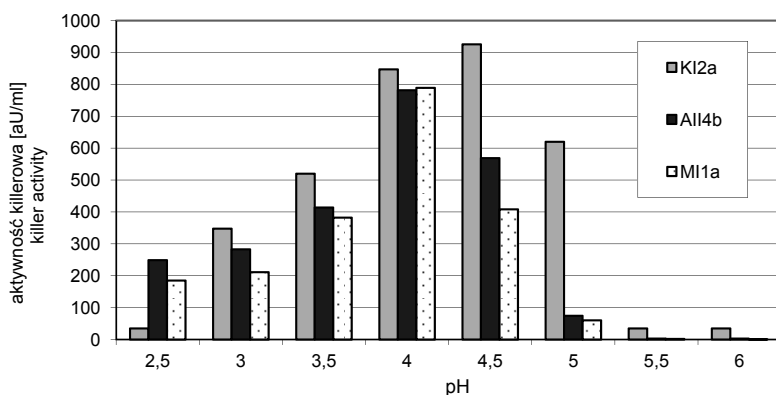
Oceniano wpływ pH, temperatury, enzymów proteolitycznych i β -merkaptotetanolu na aktywność i stabilność toksyn killerowych. Badania przeprowadzono z wykorzystaniem surowych preparatów toksyn, otrzymanych po 20-krotnym zagęszczeniu cieczy pochowlanej pozbawionej komórek drożdży *D. hansenii*.

4.3.1. Aktywność i stabilność toksyn w różnym zakresie pH i temperatury

Aktywność bójczą toksyn killerowych *D. hansenii* wobec wzorcowego szczepu *Y. lipolytica* badano metodą dyfuzyjną, w agarze YPG-MB o różnym pH, w zakresie od 2,5 do 6,0.

Toksyny szczepów: AII4b i MI1a wykazywały aktywność w podłożu o pH, w zakresie 2,5–4,5. Najwyższą aktywnością, na poziomie około 800 aU/ml, cechowały się w pH 4,0. W środowisku o pH wyższym od tej wartości zdolność toksyn do inhibicji wzrostu komórek wrażliwych była zdecydowanie słabsza. W pH 4,5 aktywność bójcza była zachowywana w 50–75% (w stosunku do wartości maksymalnych), a w pH 5,0 była ona znikoma.

Aktywność toksyny KI2a przedstawiała się nieco inaczej. Była ona aktywna w zakresie pH 3,5–5,0. Najwyższą aktywność killerową, na poziomie 930 aU/ml, białko tego szczepu wykazywało w środowisku o pH 4,5. Warto zaznaczyć, że również w podłożu o pH 5,0 wykazywało ono stosunkowo silną aktywność killerową, na poziomie 620 aU/ml (rys. 21).

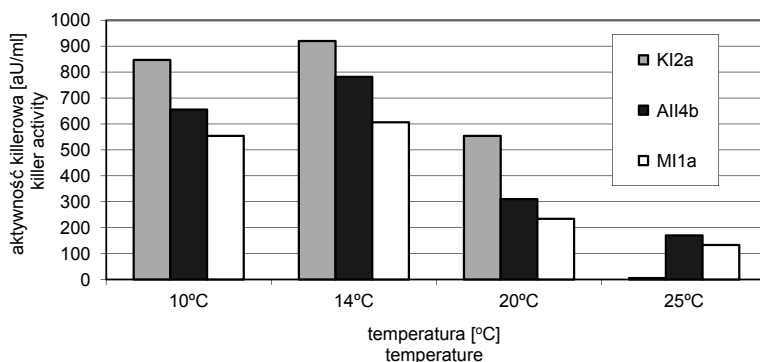


Rys. 21. Wpływ pH testowego podłoża YPG-MB na wyrażaną aktywność killerową badanych toksyn *D. hansenii*

Fig. 21. Effect of tested YPG-MB medium pH on the expressed killer activity of tested *D. hansenii* strains

Aktywność bójczą toksyn badano w zakresie temperatur 10–25°C. Zaobserwowano, że białka najwyższą aktywność wykazywały w temperaturze 10 i 14°C (rys. 22). W temperaturze 20°C aktywność bójcza była na poziomie 60% (w stosunku do wartości maksymalnej, przejawiającej się w temperaturze 14°C) w przypadku toksyny szczepu KI2a oraz około 40% dla toksyn AII4b i MI1a. W najwyższej z badanych temperatur (25°C) aktywność killerową wyrażały tylko białka szczepów AII4b i MI1a, była ona jednak bardzo niska, odpowiednio 140 i 180 aU/ml. Warto zaznaczyć, że w tej temperaturze toksyna

szczepu KI2a, cechująca się najwyższą aktywnością w niższych temperaturach, praktycznie nie wykazywała aktywności killerowej.

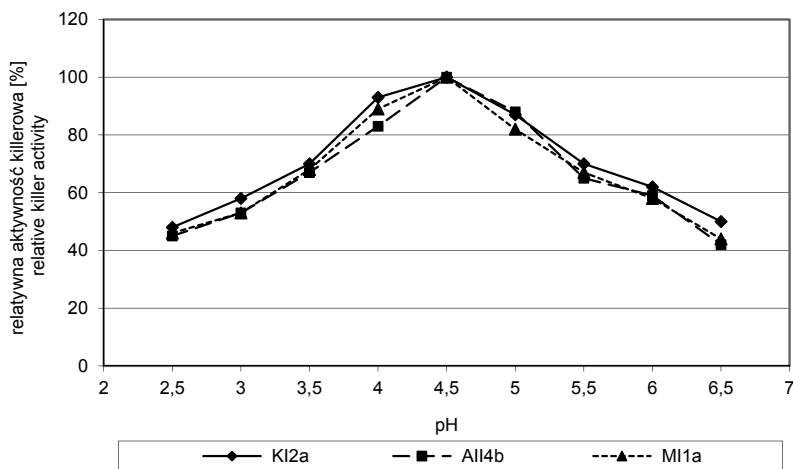


Rys. 22. Wpływ temperatury inkubacji płytek na wyrażaną aktywność killerową badanych toksyn *D. hansenii*

Fig. 22. Effect of Petri dish incubation temperature on the expressed killer activity of tested *D. hansenii* strains

Stabilność toksyn w różnym pH oceniano po ich inkubacji w buforze cytrynianowo-fosforanowym o pH 2,5–6,5.

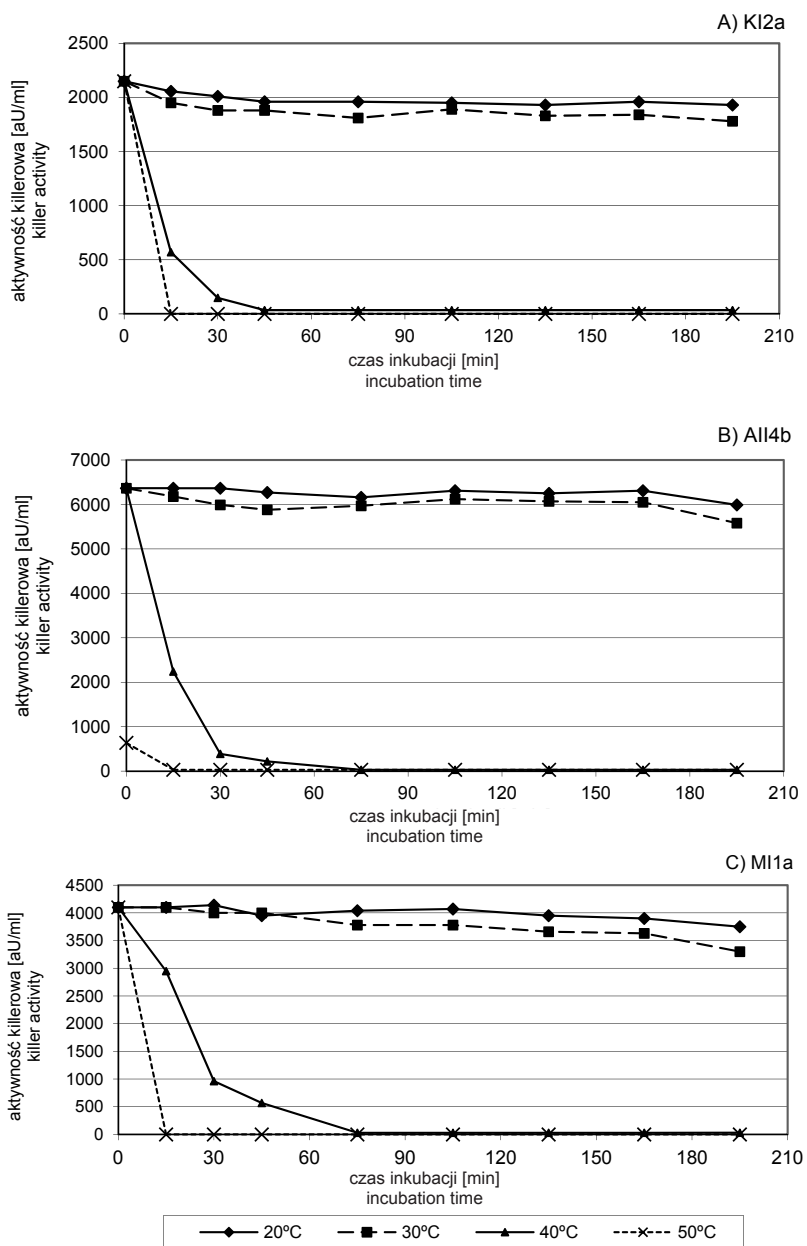
Białka killerowe drożdży *D. hansenii* zachowywały 80–100% swojej aktywności (w stosunku do kontroli), po 24-godz. inkubacji w zakresie pH 4–5. Inkubacja toksyn w środowisku o wyższym odczynie skutkowałą stopniową utratą ich aktywności killerowej, która w pH 6,5 stanowiła już tylko 40–45% wartości wyjściowej (rys. 23).



Rys. 23. Stabilność toksyn killerowych badanych szczepów drożdży *D. hansenii* w różnym zakresie pH

Fig. 23. Stability of *D. hansenii* killer toxins in a wide range of pH values

Stabilność toksyn drożdży *D. hansenii* oceniano również podczas ich inkubacji w temperaturze 20–50°C (rys. 24). Toksyny killerowe były stabilne w temperaturze 20 i 30°C. W czasie 160 min inkubacji ich aktywność utrzymywała się na stałym poziomie równym około 2×10^3 aU/ml w przypadku białka szczepu KI2a, 6×10^3 aU/mL dla białka szczepu AII4b i około 4×10^3 aU/ml w przypadku toksyny szczepu MI1a. W trakcie inkubacji w temp. 40°C badane białka killerowe szybko traciły aktywność biologiczną i po 45 min toksyny szczepów *D. hansenii* KI2a i AII4b nie były zdolne do inhibicji wzrostu szczepu wrażliwego. Białko killerowe szczepu MI1a cechowało się lepszą stabilnością w tej temperaturze; swoją aktywność całkowicie traciło po 75-minutowym termostatowaniu. W temperaturze 50°C wszystkie toksyny traciły aktywność killerową już w pierwszych minutach inkubacji.



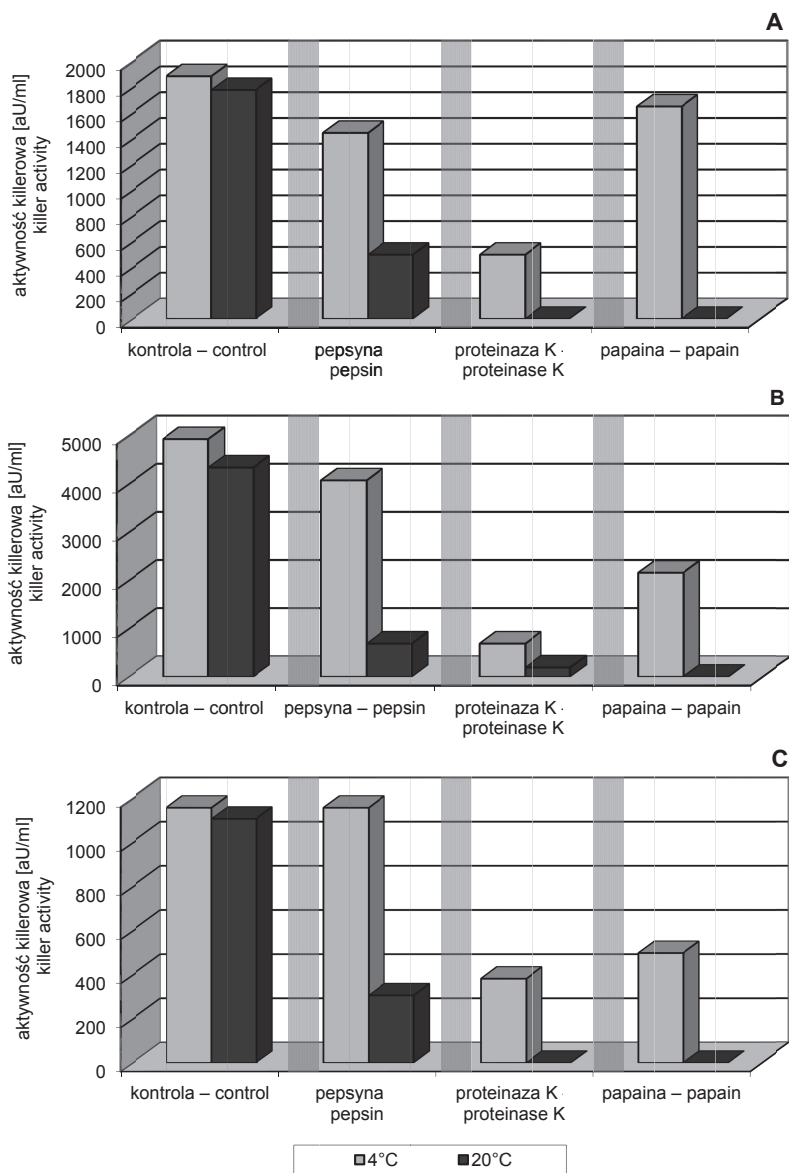
Rys. 24. Stabilność toksyn killerowych badanych szczepów drożdży *D. hansenii*:
 A) KI2a, B) AII4b, C) MI1a podczas inkubacji w różnej temperaturze
 Fig. 24. Killer toxins stability of tested *D. hansenii* strains:
 A) KI2a, B) AII4b, C) MI1a during incubation at various temperatures

4.3.2. Podatność toksyn killerowych na enzymy proteolityczne

Na rysunku 25 przedstawiono aktywność killerową toksyn inkubowanych przez 24 godz. w temperaturze 4 i 20°C i obecności różnych enzymów proteolitycznych. Do badań wybrano enzymy wykazujące aktywność w pH 4,6, optymalnym w przypadku aktywności bójczej badanych toksyn, czyli proteinazę K, papainę oraz pepsynę.

Wpływ badanych enzymów na aktywność killerową toksyn uzależniony był głównie od temperatury. Wyższą dezaktywację toksyn obserwowano po inkubacji w temp. 20°C. W tych warunkach proteinaza K i papaina całkowicie deaktywowały białka killerowe badanych szczepów *D. hansenii*. Toksyny okazały się nieco bardziej odporne na działanie pepsyny; po inkubacji w temp. 20°C aktywność bójcza była zachowywana w 15–30%.

Białkowy charakter toksyn killerowych badanych drożdży *D. hansenii* potwierdzono również na podstawie termicznej denaturacji w temp. 100°C przez 5 min. Zagotowanie toksyn powodowało, że nie były one zdolne do hamowania wzrostu wrażliwego szczepu *Y. lipolytica* (dane niepublikowane).



Rys. 25. Aktywność toksyn killerowych szczepów *D. hansenii* A) KI2a, B) AII4b, C) MI1a po inkubacji w temperaturze 4 i 20°C, w obecności wybranych enzymów proteolitycznych
 Fig. 25. Killer toxins activity of tested *D. hansenii* strains: A) KI2a, B) AII4b, C) MI1a during incubation at temperatures 4 and 20°C in the presence of selected proteolytic enzymes

4.3.3. Wpływ β -merkaptoetanolu na aktywność killerową toksyn

β -merkaptoetanol jest substancją, która może powodować zmianę konformacji białek oraz rozluźnienie mostków disiarczkowych pomiędzy ewentualnymi segmentami białkowymi. Toksyny killerowe poddano więc 24-godzinnemu działaniu β -merkaptoetanolu w temperaturze pokojowej, a następnie oceniano ich zdolność do hamowania wzrostu wrażliwego szczepu *Y. lipolytica*. Wyniki doświadczenia zamieszczono w tabeli 8.

W przeciwieństwie do kontroli dających strefy inhibicji szczepu wrażliwego o wielkości 7,2–8,8 mm toksyny inkubowane poddane obecności β -merkaptoetanolu nie hamowały wzrostu tego szczepu.

Tabela 8

Table 8

Wpływ działania β -merkaptoetanolu na aktywność bójczą toksyn killerowych drożdży *D. hansenii*
Effect of β -mercaptoethanol on the killer activity of *D. hansenii* killer toxins

Toksyna Toxin	Strefa inhibicji wzrostu szczepu wrażliwego [mm] Inhibition zone of sensitive strain	
	kontrola control	toksyna + β -merkaptoetanol toxin + β -mercaptoethanol
<i>D. hansenii</i> KI2a	8,8	0
<i>D. hansenii</i> AII4b	7,6	0
<i>D. hansenii</i> MI1a	7,2	0

Podsumowując, toksyny killerowe drożdży *D. hansenii* były aktywne w podłożu o pH 3,5–4,5, w temp. 10 i 14°C. Zachowywały dobrze swoją aktywność w pH 4–5 oraz w temp. 20 i 30°C. Enzymy proteolityczne, takie jak proteinaza K i papaina, całkowicie dezaktywowały białka killerowe szczepów *D. hansenii* w temp. 20°C. Badane toksyny okazały się nieco bardziej odporne na działanie pepsyny; po inkubacji w 20°C aktywność bójcza była zachowywana w 15–30%. β -merkaptoetanol powodował utratę aktywności bójczej badanych toksyn.

4.4. Aktywność bójcza drożdży *D. hansenii* i ich toksyn wobec różnych drobnoustrojów

Oceniano aktywność killerową drożdży *D. hansenii* wobec 21 szczepów drożdży, 19 szczepów bakterii oraz 22 szczepów grzybów strzępkowych.

Badane drożdże *D. hansenii* wykazywały aktywność bójczą wobec 9 spośród testowanych kultur drożdży. Zaobserwowano różnice pomiędzy aktywnością szczepów *D. hansenii* rosnących jednocześnie ze szczepem wrażliwym a preparatami wcześniej wyprodukowanych toksyn. Szczepy killerowe hamowały wzrost wszystkich kultur wrażliwych, podczas gdy preparaty toksyn nie oddziaływały na szczepy z rodzaju *Candida*: *C. albicans* KL-1 i *C. zeylanoides* KL-1 (tab. 9). Warto zaznaczyć, że wszystkie spośród testowanych kultur *Y. lipolytica* wykazywały wrażliwość zarówno na szczepy *D. hansenii*, jak i na ich wcześniej wytworzone toksyny.

Tabela 9

Table 9

Wpływ trzech szczepów *D. hansenii* i ich toksyn na wzrost drożdży będących przedstawicielami rodzaju *Candida*, *Schwanniomyces* i *Yarrowia*

The impact of three *D. hansenii* strains and their toxins on growth of representatives of *Candida*, *Schwanniomyces* and *Yarrowia* yeast genera

Badane drożdże Tested yeast	KI2a		AII4b		MI1a	
	Szczep Strain	Toksyna Toxin	Szczep Strain	Toksyna Toxin	Szczep Strain	Toksyna Toxin
<i>Candida albicans</i> KL-1	+	-	+	-	+	-
<i>Candida zeylanoides</i> KL-1	+	-	+	-	+	-
<i>Schwanniomyces occidentalis</i> ATCC 44442	+	+	+	+	+	+
<i>Yarrowia lipolytica</i> ATCC 8661	+	+	+	+	+	+
<i>Yarrowia lipolytica</i> ATCC 20320	+	+	+	+	+	+
<i>Yarrowia lipolytica</i> ATCC 20460	+	+	+	+	+	+
<i>Yarrowia lipolytica</i> ATCC 20461	+	+	+	+	+	+
<i>Yarrowia lipolytica</i> A-101	+	+	+	+	+	+
<i>Yarrowia lipolytica</i> A-101-1.31	+	+	+	+	+	+

+ zahamowanie wzrostu – growth inhibition

- brak zahamowania wzrostu – lack of growth inhibition

Białka killerowe *D. hansenii* nie oddziaływały na wzrost 12 szczepów drożdży: *C. inconspicua* KL-1, *Candida tropicalis* C-7, *Geotrichum candidum* ISS32B1, *Geotrichum penicillatum* C1, *Hansenula anomala* C-3, *Kloeckera apiculata* C-3, *Pichia membranifaciens* C-4, *Pichia ohmeri* A-9-1-20, *Rhodotrula rubra* C-9, *Saccharomyces cerevisiae* SV30 i *Schizosaccharomyces pombe* C-1 (dane niepublikowane).

W tabeli 10 przedstawiono wyniki aktywności killerowej drożdży *D. hansenii* i ich toksyn wobec grzybów strzępkowych. Badane drożdże killerowe i ich toksyny oddziaływały bójczo na 11 spośród 22 testowanych kultur grzybów. Podobnie jak w przypadku drożdży killerowe drożdże *D. hansenii* rosące jednocześnie z wrażliwymi szczepami grzybów, częściej powodowały ich inhibicję niż wyprodukowane wcześniej toksyny. Szczep AII4b hamował wzrost wszystkich wrażliwych kultur pleśni, podczas gdy KI2a i MI1a nie wpływały na wzrost szczepów *A. niger* 270, *T. hamatum* C1 i *T. resei* 7-1.

Wpływ trzech szczepów *D. hansenii* i ich toksyn na wzrost grzybów strzępkowych z rodzaju:
Absidia, Aspergillus, Botrytis i *Trichodema*
 The impact of three *D. hansenii* strains and their toxins on growth
 of representatives of filamentous fungi genera: *Absidia, Aspergillus, Botrytis* and *Trichodema*

Badane grzyby Tested filamentous fungi	KI2a		AII4b		MI1a	
	Szczep Strain	Toksyna Toxin	Szczep Strain	Toksyna Toxin	Szczep Strain	Toksyna Toxin
<i>Absidia glanca</i> 148	+	-	+	-	+	-
<i>Aspergillus niger</i> XP	+	-	+	+	+	+
<i>Aspergillus niger</i> 270	-	-	+	-	-	-
<i>Aspergillus cervinus</i> 219	+	-	+	-	+	-
<i>Botrytis cinerea</i> 409	+	+	+	+	+	+
<i>Botrytis cinerea</i> 617	+	+	+	+	+	+
<i>T. hamatum</i> C1	-	-	+	-	-	-
<i>T. hamatum</i> T2	+	+	+	+	+	+
<i>T. harzianum</i> T33	+	-	+	-	-	-
<i>T. reesei</i> 7-1	-	-	+	-	-	-
<i>T. viride</i> 1345/6	+	-	+	-	+	-

+ zahamowanie wzrostu – growth inhibition

- brak zahamowania wzrostu – lack of growth inhibition

Preparaty wcześniej wyprodukowanych toksyn wykazywały aktywność killerową tylko wobec fitopatogennych szczepów *B. cinerea* 409 i *B. cinerea* 617 oraz kultur *T. hamatum* C2 i *A. niger* XP, przy czym wzrost tego ostatniego szczepu nie był hamowany przez toksynę KI2a.

Nie stwierdzono aktywności killerowej drożdży *D. hansenii* i ich toksyn wobec następujących szczepów grzybów strzępkowych: *Alternaria* sp., *Chaetomium* sp., *Fusarium graminearum* 109, *F. sambucinum* 42, *F. oxysporum* 184, *Mucor hiemalis*, *Penicillium* sp., *T. reesei* QM9414, *T. hamatum* 458, *T. koningi* 62-102/3, *Rhizopus* sp.

Drożdże *D. hansenii* ani ich toksyny killerowe nie hamowały wzrostu żadnego spośród 19 szczepów bakterii: *Bacillus cereus* C3, *B. cereus* B5Cl5, *B. subtilis* B5, *B. subtilis* B3, *B. polymyxa* Serratia marcescens, *Escherichia coli* C1, *E. coli* pcm 2560 INCTC 10538, *Micrococcus flavus* C1, *Pseudomonas fluorescens* C2, *Flavobacterium multivorum* C1, *Sarcina lutea* C1, *Lactobacillus casei* C1, *Lb. Acidophilus* C2, *Lb. plantarum* C2, *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* 1380, *Streptococcus cremoris* C2, *Str. salivarius* ssp. *termophilus* C2, *Str. lactis* ssp. *diacetilactis* C2 (dane niepublikowane).

Podsumowując, aktywność bójcza toksyn *D. hansenii* była skierowana wobec drożdży i grzybów strzępkowych reprezentujących rodzaje: *Candida*, *Schwanniomyces*, *Yarrowia*, *Absidia*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Rhizopus* i *Trichodema*. Toksyny te nie oddziaływały natomiast na wzrost bakterii będących reprezentantami rodzajów takich jak: *Bacillus*, *Escherichia*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Sarcina*, *Serratia* i *Streptococcus*.

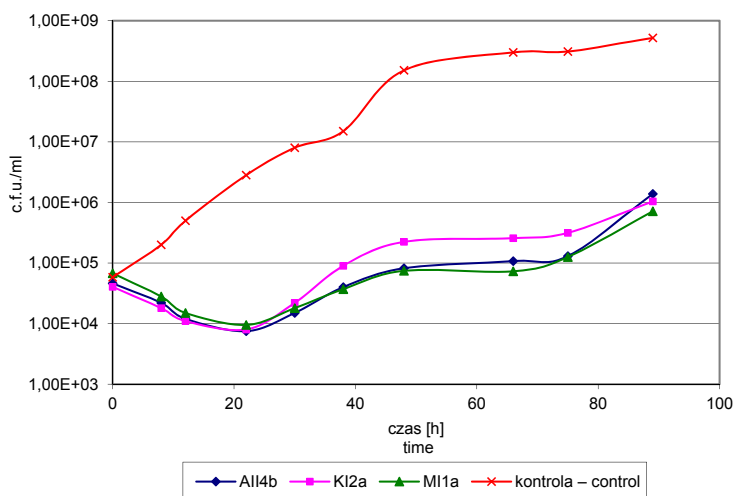
4.5. Badanie mechanizmu działania toksyn killerowych

Badanie mechanizmu działania toksyn killerowych *D. hansenii* obejmowało ocenę kinetyki wymierania komórek wrażliwego szczepu *Y. lipolytica* PII6a pod wpływem badanych toksyn killerowych, identyfikację receptorów toksyn w komórkach szczepu wrażliwego, określenie ich działania na protoplasty szczepu wrażliwego oraz ocenę zmian zachodzących w komórkach szczepu wrażliwego na toksyny.

Kinetykę wymierania komórek wrażliwego szczepu *Y. lipolytica* PII6a pod wpływem działania toksyn killerowych badano w podłożu YPG z dodatkiem 4% NaCl i bez soli.

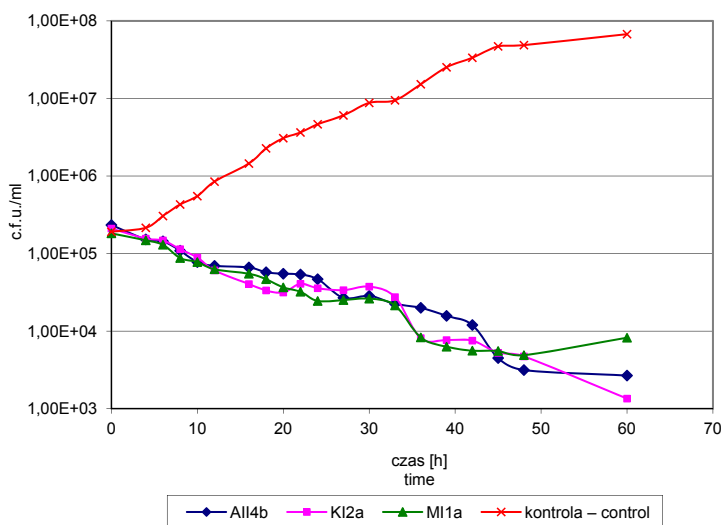
W pożywce bez soli (rys. 26), w czasie pierwszych 20 godz. obserwowano zmniejszenie liczby żywych komórek szczepu wrażliwego o jeden rząd logarytmiczny; z poziomu około 1×10^5 kom/ml do około 1×10^4 kom/ml. Po tym czasie obserwowano stopniowy wzrost drożdży; w 90 godz. procesu liczebność populacji wynosiła około 1×10^6 kom/ml. Był to jednak poziom niższy od obserwowanego w hodowli kontrolnej (bez toksyn) o około 3 rzędy logarytmiczne.

W podłożu zawierającym NaCl (rys. 27) szybkość wymierania komórek wzorcowego szczepu PII6a w czasie pierwszej doby była podobna do obserwowanej w podłożu bez soli. W późniejszych godzinach procesu zanotowano dalsze obniżanie się liczby żywych komórek, która w 60. godz. była o około dwa rzędy logarytmiczne niższa w stosunku do wyjściowej liczebności populacji.



Rys. 26. Kinetyka wymierania komórek wrażliwego szczepu *Y. lipolytica* PII6a pod wpływem działania toksyn killerowych szczepów drożdży *D. hansenii* AII4b, KI2a i MI1a w podłożu YPG bez dodatku NaCl

Fig. 26. Cell dying kinetics of a sensitive *Y. lipolytica* PII6a strain as a result of killer toxin activity of *D. hansenii* strains: AII4b, KI2a and MI1a in saltless YPG medium

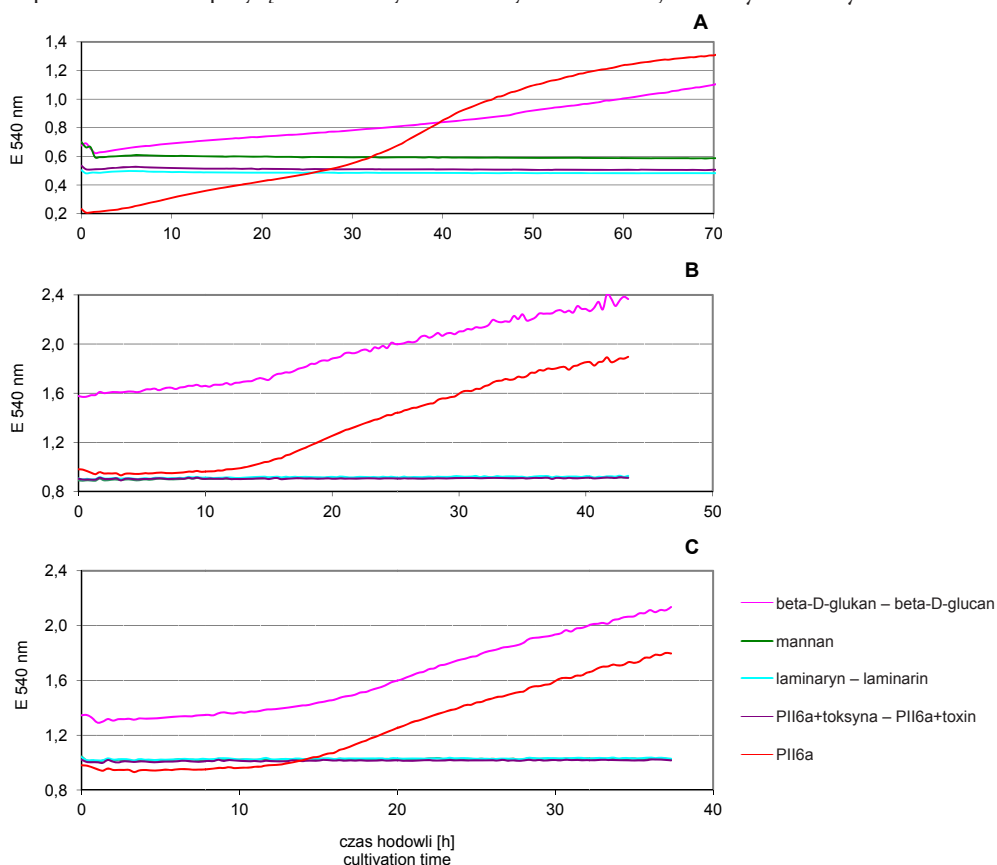


Rys. 27. Kinetyka wymierania komórek wrażliwego szczepu *Y. lipolytica* PII6a pod wpływem działania toksyn killerowych szczepów drożdży *D. hansenii* AII4b, KI2a i MI1a w podłożu YPG z 4% dodatkiem NaCl

Fig. 27. Cell dying kinetics of a sensitive *Y. lipolytica* PII6a strain as a result of killer toxin activity of *D. hansenii* strains: AII4b, KI2a and MI1a in YPG medium with 4% NaCl addition

Następnym krokiem w badaniach mechanizmu działania badanych toksyn killerowych była próba identyfikacji receptorów wiążących je do komórek szczepów wrażliwych. W tym celu przeprowadzono hodowle wrażliwego szczepu *Y. lipolytica* PII6a w podłożu YPG zawierającym 4% NaCl, w obecności toksyn oraz wybranych składników ścian komórkowych drożdży: mannanu, β -D-glukanu, a także cząsteczek β -(1,3)-glukanu, których źródłem był laminaryn. Uzyskane krzywe wzrostu przedstawiono na rysunku 28.

Poza hodowlą kontrolną wzrost drożdży obserwowano tylko w podłożu zawierającym dodatek β -D-glukanu. Uzyskane wyniki dowodzą więc, że receptorem wiążącym toksyny do komórek szczepu wrażliwego jest właśnie ten składnik ścian komórkowych. Ponadto fakt, że dodatek laminarynu zawierającego głównie reszty β -(1,3)-glukanu nie wpływał na poprawę wzrostu szczepu wzorcowego, wskazuje, że to wiązania β -(1,6) mogą być odpowiedzialne za przyłączanie toksyn do ściany komórkowej drożdży wrażliwych.

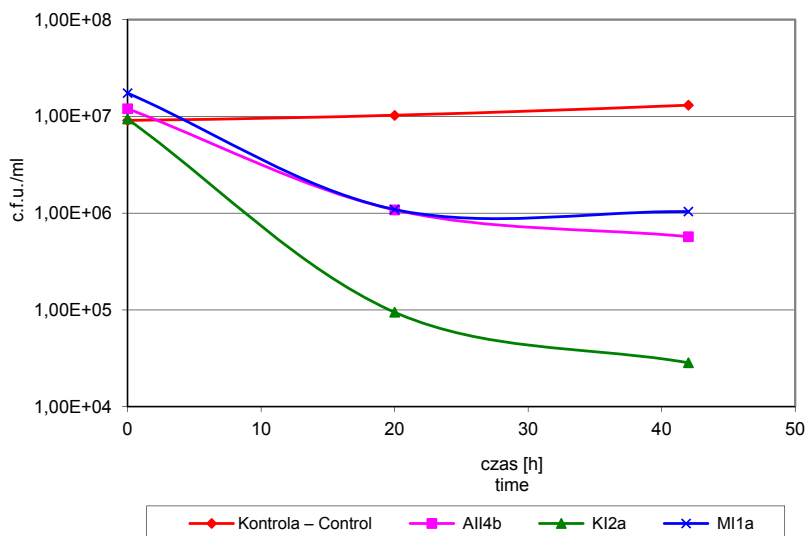


Rys. 28. Wpływ β -D-glukanu, mannanu i laminarynu na wzrost szczepu *Y. lipolytica* PII6a w obecności toksyn killerowych szczepów *D. hansenii*: (A) KI2a, (B) AII4b, (C) MI1a

Fig. 28. Effect of β -D-glucan, mannan and laminarin on *Y. lipolytica* PII6a growth in the presence of killer toxins of *D. hansenii* strains: (A) KI2a, (B) AII4b, (C) MI1a

Kolejnym krokiem było zbadanie oddziaływania toksyn killerowych z protoplastami wrażliwego szczepu *Y. lipolytica* PII6a. Kinetykę ich wymierania w obecności toksyn, w stabilizowanym osmotycznie podłożu YPG, przedstawiono na rysunku 29.

Liczba protoplastów szczepu wrażliwego poddanych działaniu toksyn killerowych stopniowo obniżała się, podczas gdy liczebność komórek w próbie kontrolnej nie ulegała zmianie. Warto zaznaczyć, że najwyższą aktywność killerową wobec protoplastów szczepu wrażliwego wykazywała toksyna szczepu *D. hansenii* KI2a, która w czasie około 20 godz. spowodowała zmniejszenie się liczby protoplastów zdolnych do regeneracji ścian komórkowych i podjęcia wzrostu o ponad 2 rzędy logarytmiczne.

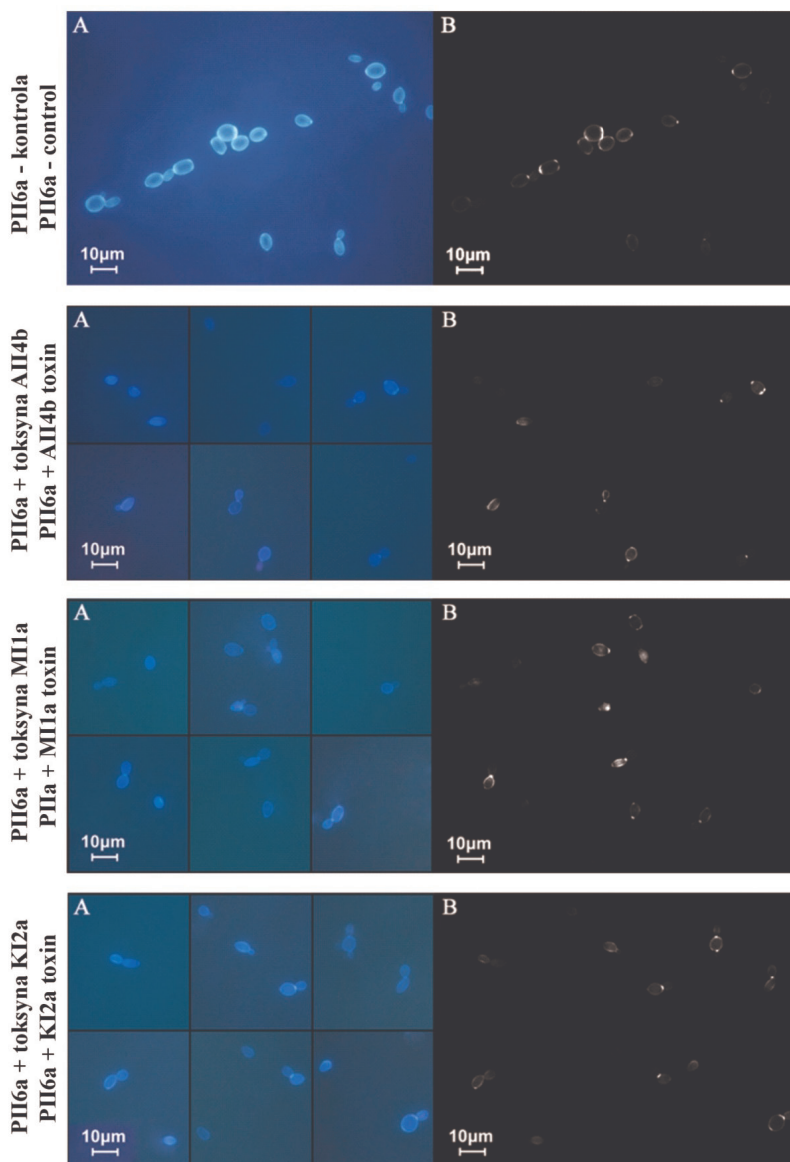


Rys. 29. Kinetyka wymierania protoplastów wrażliwego szczepu *Y. lipolytica* PII6a pod działaniem toksyn killerowych szczepów *D. hansenii* KI2a, AII4b i MI1a w stabilizowanym osmotycznie (0,6 M KCl) podłożu YPG

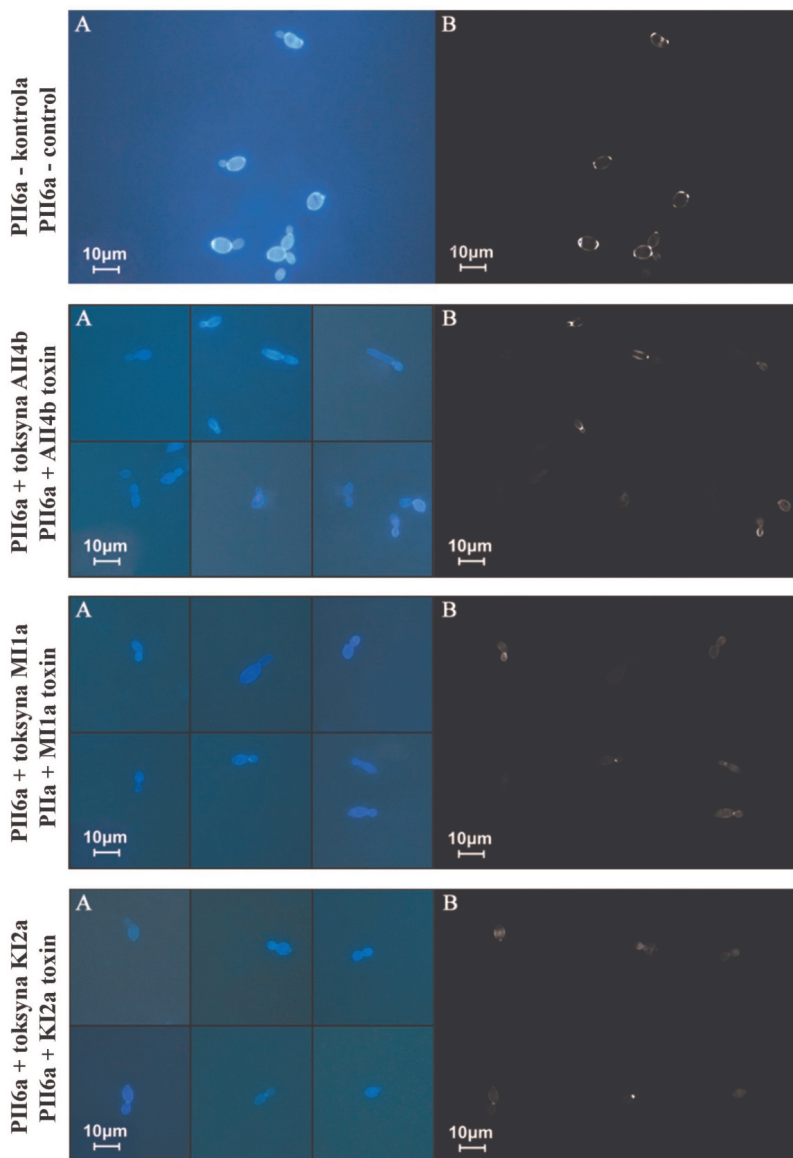
Fig. 29. Kinetics of protoplasts dying of a sensitive *Y. lipolytica* strain as a result of killer toxin activity of *D. hansenii* strains: KI2a, AII4b and MI1a in osmotically stabilized (0,6 M KCl) YPG medium

Zmiany zachodzące w komórkach szczepu wrażliwego *Y. lipolytica* PII6a pod wpływem badanych toksyn killerowych uwidoczniono przy zastosowaniu technik mikroskopii fluorescencyjnej z wykorzystaniem barwników: Calcofluor white, bromek etydyny oraz DAPI.

Zdolność komórek do tworzenia pączków w obecności toksyn killerowych badano przy użyciu barwnika fluorescencyjnego Calcofluor white, który wiąże się z chityną znajdującą się m.in. w ścianach komórkowych drożdży [Elorza i in. 1983]. Umożliwia to lokalizację chitynowych blizn po tworzeniu pączków u drożdży, a tym samym pozwala określić ilość podziałów komórkowych, jakim uległa pojedyncza komórka.

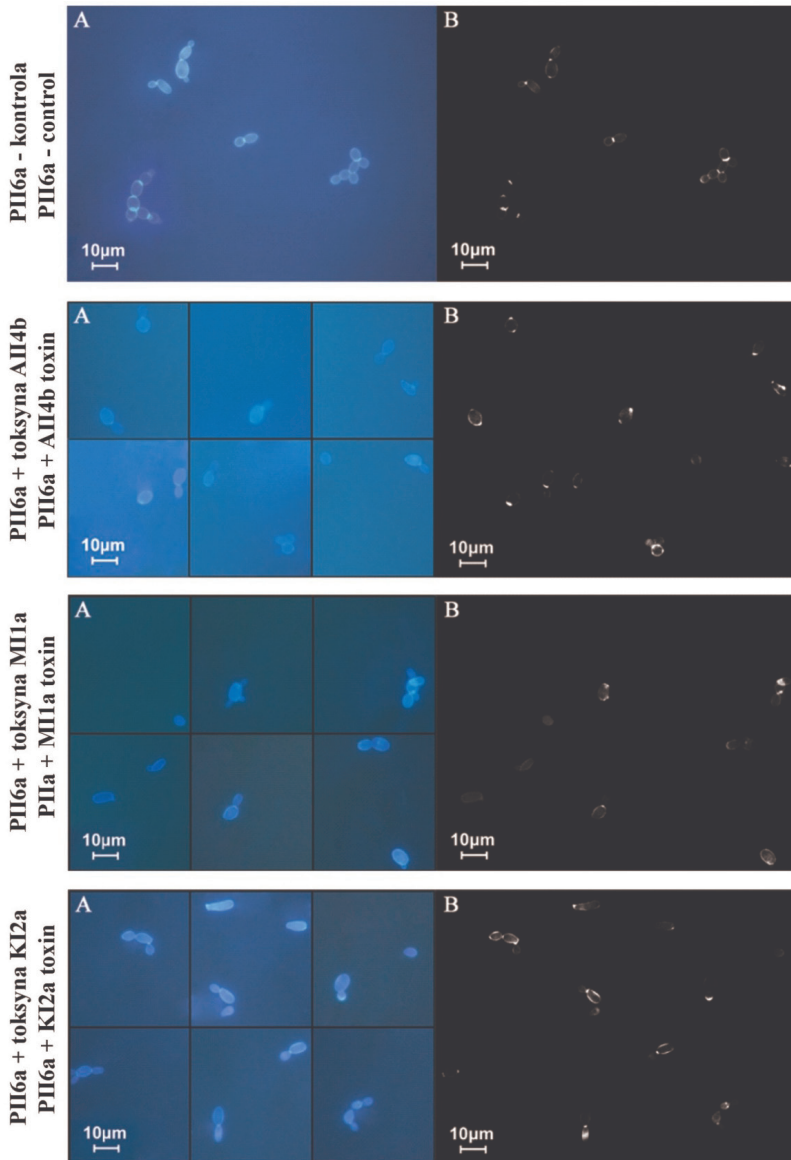


Fot. 1. Komórki wrażliwego szczepu *Y. lipolytica* PII6a poddane 24-godzinnemu działaniu toksyn killerowych *D. hansenii* w podłożu bez soli; A – wybarwione Calcofluor white, B – ten sam obraz przekształcony w celu uwidocznienia miejsc pączkowania. Pow. 1000 x
 Photo 1. Cells of a sensitive *Y. lipolytica* strain subjected to 24-h activity of *D. hansenii* killer toxins in saltless medium; A – dyed with Calcofluor white, B – the same image transformed to visualize budding spots. Magnified 1000 x

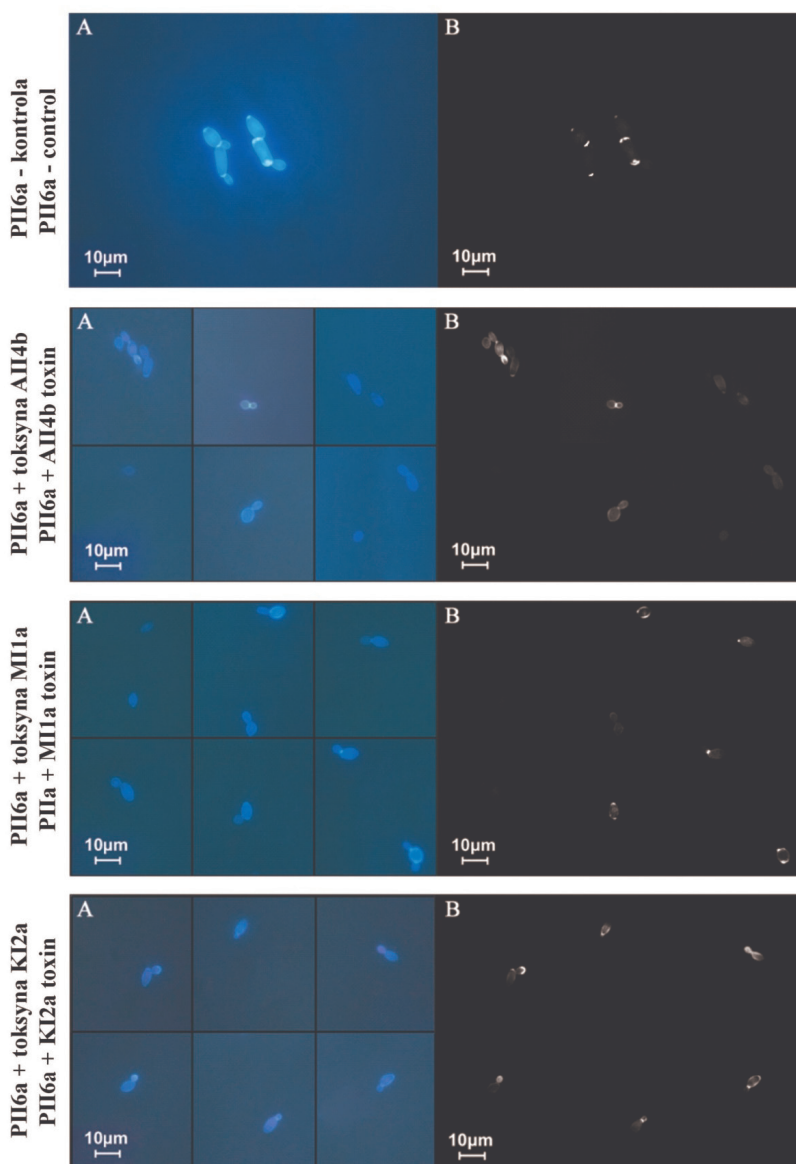


Fot. 2. Komórki wrażliwego szczepu *Y. lipolytica* PII6a poddane 24-godzinnejmu działaniu toksyn killerowych *D. hansenii* w podłożu z solą; A – wybarwione Calcofluor white, B – ten sam obraz przekształcony w celu uwidocznienia miejsc pączkowania. Pow. 1000 x

Photo 2. Cells of a sensitive *Y. lipolytica* PII6a strain Photo 5. Cells of a sensitive *Y. lipolytica* strain subjected to 24-h activity of *D. hansenii* killer toxins in saltless medium; A – dyed with Calcofluor white, B – the same image transformed to visualize budding spots. Magnified 1000 x



Fot. 3. Komórki wrażliwego szczepu *Y. lipolytica* PII6a poddane 48-godzinnemu działaniu toksyn killerowych *D. hansenii* w podłożu bez soli; A – wybarwione Calcofluor white, B – ten sam obraz przekształcony w celu uwidocznienia miejsc pączkowania. Pow. 1000 x
 Photo 3. Cells of a sensitive *Y. lipolytica* PII6a strain subjected to 48-h activity of *D. hansenii* killer toxins in saltless medium; A – dyed with Calcofluor white, B – the same image transformed to visualize budding spots. Magnified 1000 x



Fot. 4. Komórki wrażliwego szczepu *Y. lipolytica* PII6a poddane 48-godzinnemu działaniu toksyn killerowych *D. hansenii* w podłożu z solą; A – wybarwione Calcofluor white, B – ten sam obraz przekształcony w celu uwidocznienia miejsc pączkowania. Pow. 1000 x

Photo 4. Cells of a sensitive *Y. lipolytica* PII6a strain subjected to 48-h activity of *D. hansenii* killer toxins in medium with salt addition; A – dyed with Calcofluor white, B – the same image transformed to visualize budding spots. Magnified 1000 x

Wrażliwe na toksyny komórki drożdży znacznie częściej pączkowały w podłożu bez dodatku soli niż w pożywce zawierającej NaCl. Widoczne były zarówno przegrody między pączkiem a komórką macierzystą, jak również wyraźne blizny po pączkach, z reguły usytuowane biegunowo w stosunku do istniejących już pączków. Różnice te nasilały się wraz z czasem hodowli. W obecności NaCl komórki mateczne cechowały się pojedynczymi pączkami o średnicy od $\frac{1}{3}$ do $\frac{2}{3}$ komórki macierzystej. Chitynowa przegroda między komórkami była z reguły słabo widoczna. Rzadko też występowała blizna po drugim pączku (fot. 1, 2, 3, 4).

Stopień uszkodzenia błony cytoplazmatycznej komórek szczepu wrażliwego poddanych działaniu toksyn killerowych drożdży *D. hansenii* badano przy użyciu bromku etyldyny. Barwnik ten może integrować tylko z mitochondrialnym DNA nieuszkodzonych komórek, powodując bardzo słabo widoczną, czerwono-pomarańczową fluorescencję mitochondriów (genomowy materiał genetyczny nie wybarwia się). Uszkodzone komórki akumulują natomiast znacznie większe ilości barwnika, co uwidacznia się w postaci intensywnego zabarwienia ich cytoplazmy i jądrowego DNA [Puchkov 2006].

Bromek etyldyny wnikał jedynie do komórek *Y. lipolytica* poddanych działaniu toksyn *D. hansenii*; procentowo wybarwiało się nieznacznie więcej komórek z podłoża zawierającego sól. Nie zaobserwowano żadnych wybarwionych komórek w próbie kontrolnej, gdzie komórki nie były poddane działaniu toksyn (fot. 5 i 6). Wykonano również kontrolę pozytywną, w której błony komórkowe celowo uszkodzono, poddając drożdże działaniu stężonego etanolu. W próbie tej barwieniu uległy praktycznie wszystkie komórki (fot. 7).

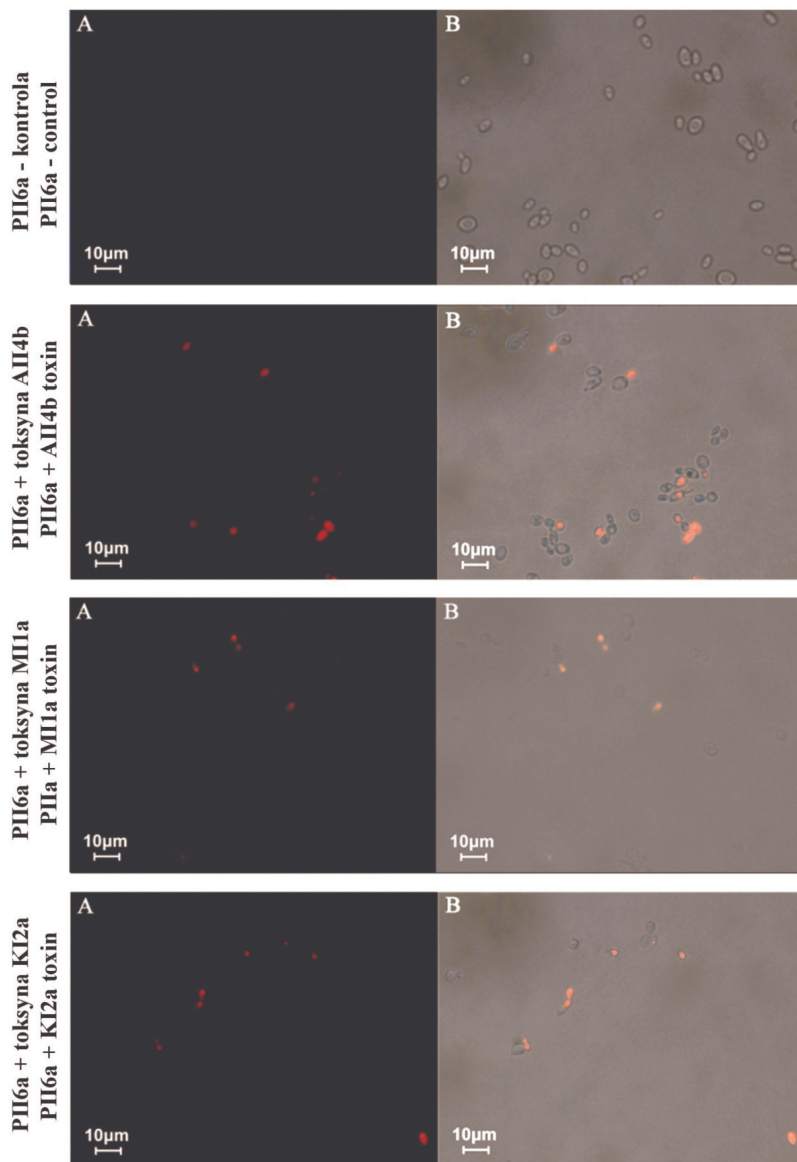
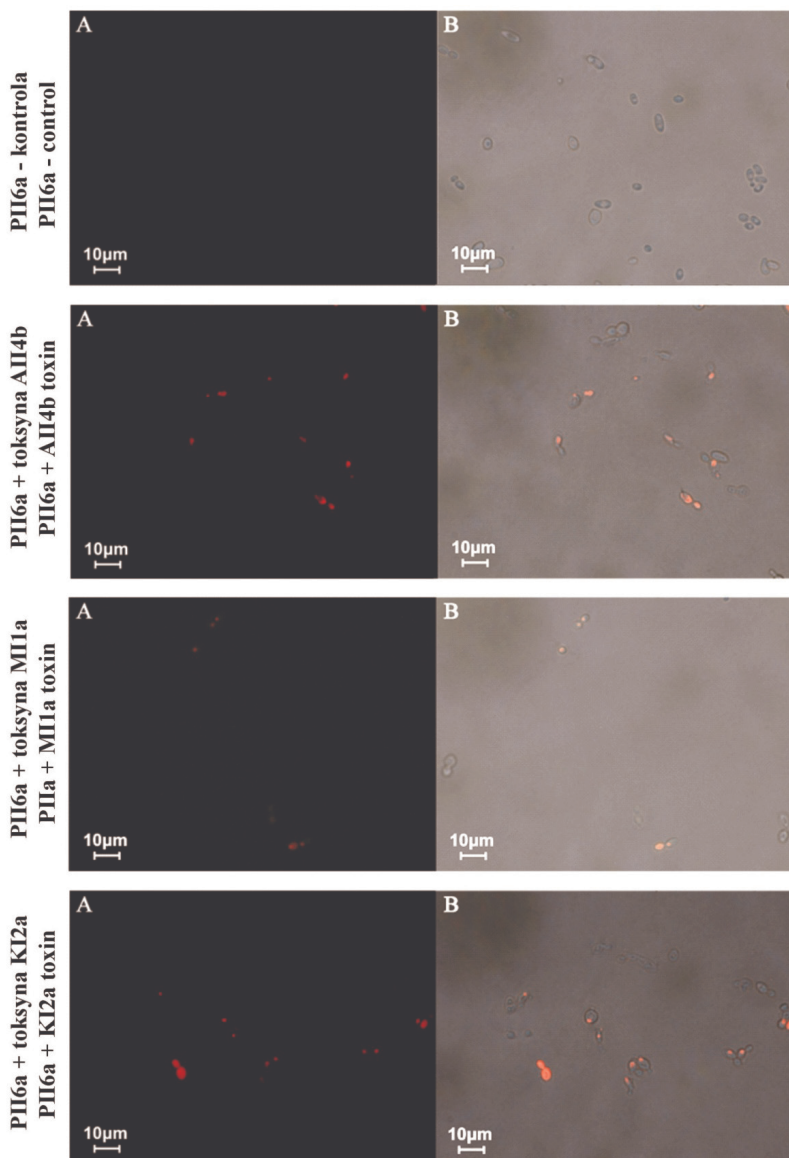


Fig. 5. Komórki wrażliwego szczepu *Yarrowia lipolytica* PII6a w podłożu bez soli poddane 48-godzinnemu działaniu toksyn killerowych drożdży *D. hansenii* (pow. 1000 x).

A – wybarwione bromkiem etydyny; B – ten sam obraz przekształcony w celu uwidocznienia komórek

Photo 5. Cells of a sensitive *Yarrowia lipolytica* PII6a strain subjected to 48-h activity of *D. hansenii* killer toxins in saltless medium (magnified 1000 x).

A – dyed with ethidium bromide; B – the same image transformed to show the cells

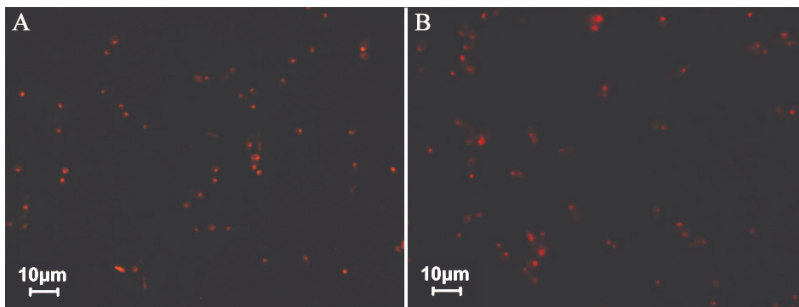


Fot. 6. Komórki wrażliwego szczepu *Yarrowia lipolytica* PII6a w podłożu z NaCl, poddane 48-godzinnejmu działaniu toksyn killerowych drożdży *D. hansenii* (pow. 1000 x).

A – wybarwione bromkiem etydyny; B – ten sam obraz przekształcony w celu uwidocznienia komórek

Photo 6. Cells of a sensitive *Yarrowia lipolytica* PII6a strain subjected to 48-h activity of *D. hansenii* killer toxins in medium with salt addition (magnified 1000 x).

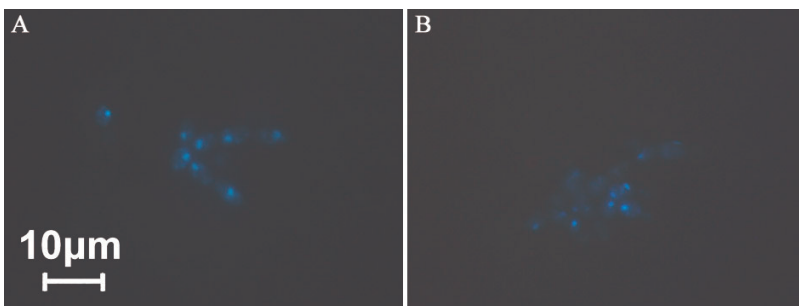
A – dyed with ethidium bromide; B – the same image transformed to show the cells



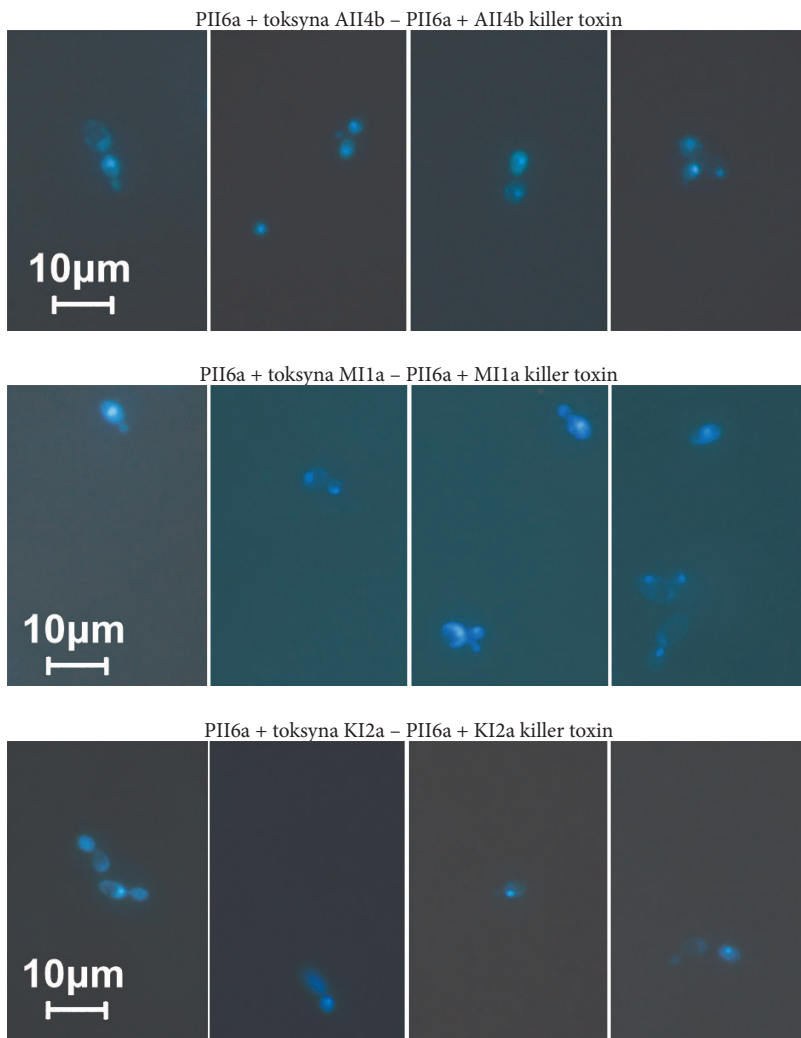
Fot. 7. Komórki wrażliwego szczepu *Yarrowia lipolytica* PII6a wybarwione bromkiem etydyny – kontrola pozytywna. A – w podłożu bez dodatku soli; B – w podłożu zawierającym NaCl
 Photo 7. Cells of a sensitive *Yarrowia lipolytica* PII6a strain dyed with ethidium bromide – positive control. A – in saltless medium; B – in medium with salt addition

Wpływ toksyn killerowych szczepów badanych *D. hansenii* na procesy pączkowania komórkowych szczepu wrażliwego badano, wykorzystując barwnik DAPI, który w nieuszkodzonych komórkach wiąże się z DNA zarówno mitochondrialnym, jak i jądrowym. Właściwość tę wykorzystano w celu wizualizacji umiejscowienia jąder komórkowych w komórkach *Y. lipolytica* PII6a poddanych działaniu toksyn killerowych. Na tej podstawie podjęto próbę określenia, czy badane białka killerowe hamują syntezę DNA.

Porównanie obrazów komórek poddanych działaniu toksyn killerowych z próbą kontrolną (fot. 8) wskazało, iż w większości przypadków wzrost komórek zatrzymany zostaje na etapie wytworzenia pojedynczego pączka, o różnej wielkości. Jądro komórkowe widoczne było zarówno w komórce macierzystej, jak i w komórce potomnej. Wyjątek stanowiły komórki *Y. lipolytica* poddane działaniu toksyny szczepu MIIa, u których w obecności soli jądra komórkowe obserwowano prawie wyłącznie w komórkach macierzystych (fot. 9 i 10).

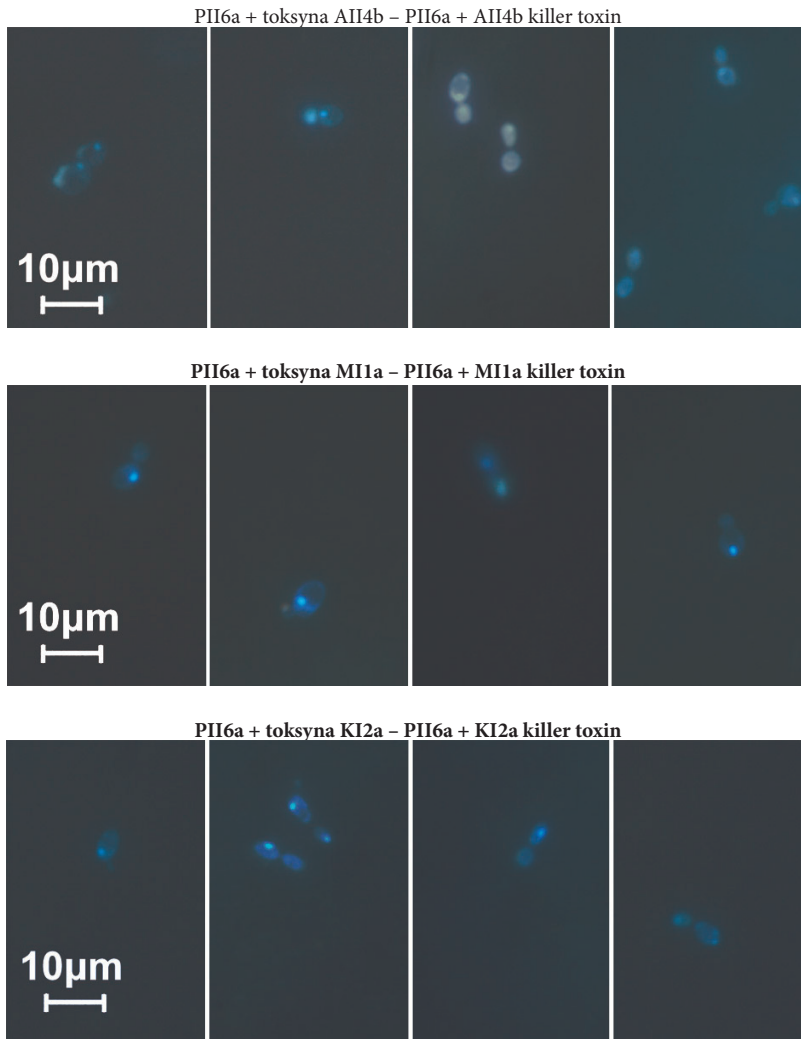


Fot 8. *Yarrowia lipolytica* PII6a – kontrola. Jądra komórkowe wybarwione barwnikiem fluorescencyjnym DAPI. A – podłożu bez soli; B – podłożu z dodatkiem NaCl
 Photo 8. *Yarrowia lipolytica* PII6a – control. Cellular nuclei dyed with fluorescent DAPI.
 A – saltless medium; B – medium with salt addition



Fot. 9. Komórki wrażliwego szczepu *Yarrowia lipolytica* PII6a w podłożu bez dodatku NaCl, poddane działaniu toksyn killerowych wybranych szczepów *D. hansenii* (pow. 1000 x) i wybarwione barwnikiem DAPI celem uwidocznienia umiejscowienia jąder komórkowych

Photo 9. Cells of a sensitive *Yarrowia lipolytica* PII6a strain in saltless medium subjected to killer toxin activity of selected *D. hansenii* strains (magnified 1000 x) and dyed with DAPI to visualize the position of cellular nuclei



Fot. 10. Komórki wrażliwego szczepu *Yarrowia lipolytica* PII6a w podłożu z NaCl, poddane działaniu toksyn killerowych wybranych szczepów *D. hansenii* (pow. 1000 x) i wybarwione barwnikiem DAPI celem uwidocznienia umiejscowienia jąder komórkowych
 Photo 10. Cells of a sensitive *Yarrowia lipolytica* PII6a strain in medium with salt addition subjected to killer toxin activity of selected *D. hansenii* strains (magnified 1000 x) and dyed with DAPI to visualize the position of cellular nuclei

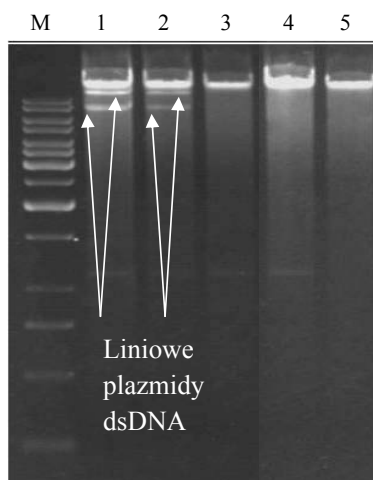
Podsumowując, prawdopodobny mechanizm działania toksyn killerowych drożdży *D. hansenii* obejmuje wiązanie się tych białek z β -glukanem ściany komórkowej drożdży wrażliwych, następnie z kolejnym, niezidentyfikowanym receptorem obecnym w błonie cytoplazmatycznej oraz hamowanie podziałów komórkowych prowadzące do śmierci komórek.

4.6. Genetyczne uwarunkowania zjawiska killerowego u drożdży *D. hansenii*

W pracy podjęto próbę ustalenia lokalizacji genów kodujących toksyny killerowe u badanych drożdży *D. hansenii*. W pierwszej kolejności zbadano możliwość kodowania toksyn na liniowych plazmidach dsDNA, które mogą występować u niektórych szczepów drożdży *Debaryomyces hansenii*, a których funkcja jak dotąd nie została poznana. W tym celu przeprowadzono izolację ewentualnych liniowych plazmidów z komórek badanych szczepów drożdży oraz ocenę ich aktywności killerowej, zarówno przed, jak i po hodowli w warunkach niekorzystnych do utrzymania plazmidów, czyli tzw. leczeniu. Jako kontrolę efektywności izolacji plazmidów zastosowano dwa szczepy referencyjne: szczep *D. hansenii* CBS 7848 wykazujący obecność trzech liniowych plazmidów oraz szczep *D. robertsiae* CBS 6693, u którego toksyna killerowa kodowana jest na liniowych plazmidach [Klassen, Meinhardt 2002].

Na rysunku 30 przedstawiono obraz elektroforetyczny będący wynikiem izolacji plazmidów metodą Gunge i Yamane [1984] z drożdży referencyjnych i badanych szczepów drożdży *D. hansenii* KI2a, AII4b i MI1a.

Plazmidy o wielkościach 8.4 kbp, 9.2 kb oraz 15 kbp wyizolowano tylko z komórek szczepów referencyjnych. Badane drożdże *D. hansenii* KI2a, AII4b i MI1a nie miały plazmidów.

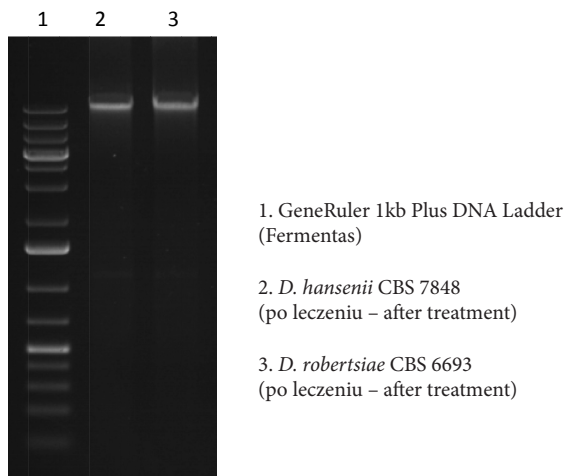


M – marker Gene Ruler 1kb DNA Ladder (Fermentas); 1. *D. hansenii* CBS 7848; 2. *D. robertsiae* CBS 6693; 3. *D. hansenii* AII4b; 4. *D. hansenii* KI2a; 5. *D. hansenii* MI1a

Rys. 30. Elektroforeza sprawdzająca obecność plazmidów w badanych szczepach *D. hansenii*
Fig. 30. Electrophoresis investigating the presence of plasmids in tested *D. hansenii* strains

Hodowla drożdży w temperaturze 30°C prowadzi zarówno do gubienia plazmidów, jak i ewentualnych cząstek VLP, które w przypadku wielu killerowych drożdży odpowiadają za zdolność do tworzenia toksyn i jest nazywana leczeniem. Przeprowadzone w niniejszej pracy leczenie doprowadziło do utraty plazmidów w komórkach referencyjnych szczepów *D. hansenii* CBS 7848 oraz *D. robertsiae* CBS 6693 (rys. 31). W tabeli 11 przedstawiono aktywność killerową poddanych leczeniu badanych szczepów. Przeprowadzony proces spowodował utratę aktywności killerowej tylko w przypadku szczepu *D. robertsiae* CBS 6693.

Żaden z badanych szczepów *D. hansenii* AII4b, MI1a i KI2a nie utracił aktywności bójczej, co sugeruje, że toksyny killerowe wytwarzane przez te szczepy kodowane są w obrębie DNA genomowego.



Rys. 31. Elektroforeza sprawdzająca obecność plazmidów u poddanych leczeniu drożdży *D. hansenii* i *D. robertsiae*
 Fig. 31. Electrophoresis investigating the presence of plasmids in *D. hansenii* and *D. robertsiae* strains after treatment

Tabela 11
 Table 11

Wpływ szczepów *D. robertsiae* CBS 6693 i *D. hansenii* KI2a, AII4b i MI1a, przed i po ich leczeniu, na wzrost wzorcowego szczepu *Y. lipolytica* PII6a
 Effect of *D. robertsiae* CBS 6693 and *D. hansenii* KI2a, AII4b i MI1a strains before and after treatment on growth of model *Y. lipolytica* PII6a strain

Szczep Strain	Przed leczeniem Before treatment	Po leczeniu After treatment
<i>D. hansenii</i> CBS 7848	+	+
<i>D. robertsiae</i> CBS 6693	+	-
<i>D. hansenii</i> KI2a	+	+
<i>D. hansenii</i> AII4b	+	+
<i>D. hansenii</i> MI1a	+	+

+ zahamowanie wzrostu – growth inhibition
 – brak zahamowania wzrostu – lack of growth inhibition

Brak preparatów czystych toksyn uniemożliwił zsekwencjonowanie tych białek, a w konsekwencji odnalezienie kodujących je genów. Postanowiono więc sprawdzić, czy w obrębie genomowego DNA, referencyjnego w przypadku gatunku *D. hansenii* szczepu CBS767 (którego genom został w 100% zsekwencjonowany), nie występują sekwencje homologiczne do znanych sekwencji toksyn killerowych wytwarzanych przez inne gatunki drożdży. W tym celu wykonano analizę *in silico*, korzystając z programu BLAST, w opcji megablast (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Spośród znanych toksyn killerowych kodowanych na genomowym DNA dostępna jest jedynie sekwencja toksyny KHS drożdży *S. cerevisiae*. W obrębie genomowego DNA drożdży *D. hansenii* nie odnaleziono jednak istotnych podobieństw z sekwencją tej toksyny. Przeszukano więc genom *D. hansenii* w celu odnalezienia sekwencji podobnych do dostępnych sekwencji toksyn killerowych kodowanych na liniowych plazmidach dsDNA: pGKL1 z *Kluyveromyces lactis*, pPac1-2 z *Pichia acaciae*, pPE1A z *Pichia etchellsii*, pPin1-3 z *Pichia inositovora* i pWR1 z *Debaryomyces (Wingea) robertsiae* (tab. 12).

Nie zauważono istotnych podobieństw do sekwencji najlepiej poznanej toksyny drożdży *K. lactis* – zymozyny. Podobnie, nie zaobserwowano homologii do sekwencji kodujących toksynę drożdży *P. inositovora*, która tak jak zymocyna wykazuje działanie rybonukleazy. Odnotowano natomiast pewne homologie z sekwencjami kodującymi podjednostki białek killerowych drożdży *P. acaciae*, *P. etchellsii* i *D. robertsiae*, które są odpowiedzialne za wiązanie toksyn z chityną ściany komórkowej drożdży wrażliwych, jednakże ich lokalizacja w obrębie genomu była za każdym razem różna. Przeprowadzona analiza porównawcza pozwoliła na ustalenie hipotetycznych lokalizacji genów kodujących te toksyny w obrębie chromosomów B i F *D. hansenii*.

Tabela 12

Table 12

Homologia sekwencji killerowych plazmidów dsDNA z genomem *Debaryomyces hansenii* CBS 767
The homology of killer dsDNA plasmids sequences with *Debaryomyces hansenii* CBS 767 genome

Chromosomy <i>Debaryomyces hansenii</i> Chromosomes of <i>Debaryomyces hansenii</i>	Liniowy plazmid Linear plasmid				
	pGKL1	pPac1-2	pPE1A	pPin1-3	pWR1A
A	-	-	-	-	-
B	-	+	+	-	-
C	-	-	-	-	-
D	-	-	-	-	-
E	-	-	-	-	-
F	-	-	-	-	+
G	-	-	-	-	-

Chromosomy *D. hansenii* CBS 767 – Chromosomes of *D. hansenii* CBS 767: A – NC_006043; B – NC_006044; C – NC_006045; D – NC_006046; E – NC_006047; F – NC_006048; G – NC_006049

+ homologia powyżej 28 bp – homology over 28 bp

- brak homologii – lack of homology

Podsumowując, w żadnym z trzech badanych szczepów *D. hansenii* KI2a, AII4b i MIIa nie wykryto obecności liniowych plazmidów. Zachowana aktywność bójcza po leczeniu sugeruje, że białka killerowe wytwarzane przez badane szczepy są kodowane w obrębie DNA genomowego. Analiza *in silico* nie wykazała podobieństw pomiędzy genomowym DNA referencyjnego szczepu *D. hansenii* CBS 767 a sekwencją toksyny KHS drożdży

S. cerevisiae, zymozyny *K. lactis* i toksyny drożdży *P. inositovora*. Zaobserwowano natomiast homologię z sekwencjami kodującymi toksyny drożdży *P. acaciae*, *P. etchellsii* i *D. robertsiae*, co wskazuje na lokalizację genów kodujących toksyny w obrębie chromosomów B i F *D. hansenii*.

5. Dyskusja nad wynikami

Drożdże *D. hansenii* występują naturalnie w różnorodnych środowiskach, m.in. w wodach morskich, roślinach, na owocach i skórze ssaków [Breuer, Harms 2006]. Ich obecność stwierdza się także w różnych produktach żywnościowych, takich jak lody, jogurty, sosy, dipy [Almagro i in. 2000, Barnett i in. 2000, Dalton i in. 1984, Fleet 1992]. Od wielu lat znane jest również zaangażowanie szczepów tego gatunku w procesy fermentacji mięsa (kiełbasy typu salami, szynki dojrzewające, suche, fermentowane kiełbaski) [Rankine 1964]. Drożdże te, stosowane jako kultury starterowe, hamując działanie peroksydaz niszczących czerwony barwnik mięsa, nadają wędlinom właściwy kolor. Biorą również udział w tworzeniu związków lotnych nadających fermentowanym produktom swoisty zapach oraz zmieniają ich profil smakowy [Dura i in. 2004, Flores i in. 2004, Martin i in. 2004, Olesen, Stahnke 2000]

Głównym źródłem izolacji drożdży *D. hansenii* są jednak sery dojrzewające, w których często stanowią one mikroflorę dominującą [Bockelmann i in. 2005, Capece, Romano 2009, Deak, Beuchat 1996, Deak i in. 1998, De Freitas i in. 2009, Eliskases-Lechner 1996, Fleet 1990, 1992, Nielsen i in. 1998, Roostita, Fleet 1996]. Dzięki swoim uzdolnieniom proteolitycznym i lipolitycznym, zdolności do wzrostu w niskiej temperaturze oraz dużej tolerancji na zasolenia środowiska szczepy należące do tego gatunku mogą stanowić potencjalne kultury starterowe do produkcji serów [Beresford i in. 2001, Bockelmann, Hoppe-Seyler 2001, Ferreira, Viljoen 2003, Guerzoni i in. 1996, Leclercq-Perlat i in. 1999, Tempel, Jakobsen 2000, Wyder, Puhan 1999]. Badania zmierzające do wyselekcjonowania, spośród izolatów drożdży z polskich serów pleśniowych Rokpol, szczepów mogących stanowić wieloskładnikowe kultury starterowe w serowarstwie, pozwoliły na wytypowanie do tego celu, poza szczepami *D. hansenii*, również kultur *Y. lipolytica* [Juszczak i in. 2005]. Ocena interakcji pomiędzy tymi gatunkami dowiodła jednak, że drożdże *D. hansenii* wykazują aktywność bójącą wobec szczepów *Y. lipolytica* [Wojtatowicz i in. 2002, Żarowska i in. 2004]. Zdolność tych halotolerancyjnych drożdży do produkcji białek killerowych jest zjawiskiem znanym. Była ona stwierdzana wśród szczepów *D. hansenii* izolowanych z oliwek [Hernández i in. 2008], solanek oliwkowych [Marquina i in. 1992], sosu sojowego, solonych warzyw [Suzuki i in. 1989]. Obecność killerowych drożdży tego gatunku stwierdzano również w solankach serowarskich [Aguiar, Lucas 2000, Kolak i in. 1999, Suzuki, Nikkuni 1989]. Środowiska serów są jednak bardzo słabo rozpoznane pod kątem aktywności killerowej. W tematycznym piśmiennictwie odnotowano również bardzo mało informacji na temat toksyn killerowych drożdży *Debaryomyces hansenii*. Z uwagi

na ten fakt oraz znaczącą rolę drożdży tego gatunku w wielu produktach żywnościowych, a zwłaszcza w fermentowanych wędlinach i wszelkiego rodzaju serach, podjęto próbę dokładniejszego zbadania tego zjawiska.

Przedmiotem niniejszych badań były trzy killerowe szczepy *D. hansenii* KI2a, MI1a i AII4b, wyizolowane z polskich serów pleśniowych Rokpol. Z tego samego środowiska pochodził szczep *Y. lipolytica* PII6a, który został wykorzystany w charakterze wzorcowego szczepu wrażliwego. Cechował się on najwyższą wrażliwością na toksyny killerowe *D. hansenii* spośród 5 izolatów *Y. lipolytica* z serów [Juszczak i in. 2005, Wojtatowicz i in. 2002, Żarowska i in. 2004] oraz 26 szczepów tego gatunku, pochodzących z innych środowisk (dane niepublikowane). Ponieważ we wcześniej przeprowadzonych pracach stwierdzono, że aktywność bójcza szczepów *D. hansenii* najsilniej przejawiała się w temperaturze 14°C [Wojtatowicz i in. 2002, Żarowska i in. 2004], w rozprawie tej zarówno proces produkcji toksyn killerowych, jak i ocenę ich aktywności bójczej prowadzono właśnie w tej temperaturze.

Wielu badaczy zajmujących się zjawiskiem killerowym u drożdży dowodzi, że aktywność bójcza tych mikroorganizmów najsilniej przejawia się w temperaturze 20–26°C, czego przykładem mogą być m. in. drożdże *Williopsis saturnus* var. *Mrakii*, produkujące toksyny killerowe w 26°C [Guyard i in. 2002] czy *S. cerevisiae* i *Candida tropicalis*, które produkują te białka w 22°C [Flegelova i in. 2002, Izgü i in. 1997]. Również szczep *D. hansenii* CYC 1021, który dotychczas jako jedyny przedstawiciel tego gatunku był badany pod kątem biosyntezy toksyn killerowych, produkował je w temperaturze 20°C [Marquina i in. 2001]. Jednak jak wspomniano powyżej, aktywność killerowa użytych w niniejszej pracy drożdży *D. hansenii* najsilniej przejawiała się w temperaturze 14°C. Z jednej strony może to świadczyć o tym, że produkowane przez nie białka killerowe są nowymi, dotychczas nieopisanymi toksynami killerowymi. Z drugiej strony natomiast, tak niska jak na drożdże killerowe temperatura może być związana z pochodzeniem drożdży *D. hansenii* z serów dojrzewających w temperaturze 10–15°C. Podobne spostrzeżenia mieli Wang i in. [2007a, 2007b], którzy izolując killerowe drożdże *Pichia anomala* ze środowiska morskiego (z jelit żachw *Ascidia*), ich najwyższą aktywność bójczą wobec patogennych dla krabów (*Portunus trituberculatus*) drożdży *Metchnikowia bicuspidate* obserwowali w równie niskiej temperaturze (15°C).

Aktywność killerową drożdży standardowo ocenia się za pomocą płytkowych testów dyfuzyjnych w podłożu YPG-MB [Bussey i in. 1988, Coutinho, Paula 1998, Janderova i in. 1986, Michalčáková i in. 1993, Pérez-Nevado i in. 2006, Quchi i in. 1978, Santos i in. 2009, Yoshiuchi i in. 2000]. W niniejszej pracy poziom tworzonych toksyn i ich aktywność bójczą oceniano w podłożu YPG-MB uzupełnionym NaCl w stężeniu 4%. Było to związane z wcześniejszymi obserwacjami, które dowiodły, że w przypadku szczepów *D. hansenii* uzupełnienie tego podłoża solą poprawiało czułość testu i pozwalało na wykrycie nawet nieznacznych ilości białek killerowych; aktywność killerowa badanych drożdży silniej przejawiała się w obecności soli w podłożu testowym, a w temperaturze 25°C obserwowana była tylko w obecności NaCl [Żarowska i in. 2004].

Wielu autorów zajmujących się zjawiskiem killerowym [Hernandez i in. 2008, Llorente i in. 1997, Marquina i in. 2001, Santos i in. 2000, Suzuki, Nikkuni 1994] również zaobserwowało, że sól silnie wzmacnia aktywność bójczą drożdży, a czasem jest wręcz niezbędna do

jej ujawnienia. Hernandez i in. [2008] analizując aktywność bójczą drożdży wyizolowanych z zielonych oliwek (*Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia anomala*, *Pichia guilliermondii* i *Saccharomyces cerevisiae*), większe strefy inhibicji wzrostu szczepów stanowiących skażenia produktu, z rodzaju *Candida* i *Cryptococcus*, zanotowali w podłożach zawierających wyższe stężenia soli (do 8%). Podobnie Llorente i in. [1997] testując aktywność killerową drożdży *Saccharomyces cerevisiae* w obecności 0, 3 oraz 6% soli, stwierdzili, iż ze wzrostem stężenia NaCl wzrasta ich aktywność bójcza. Aktywność killerowa drożdży *Metschnikowia pulcherrima*, *Wickerhamomyces anomala* i *Torulaspora delbrueckii*, izolowanych z powierzchni winogron lub moszczy fermentacyjnych wobec skażających środowiska fermentacyjne, szczepów z rodzaju *Pichia* również była wyższa w obecności 3% NaCl niż w podłożu bez soli [Lopes, Sangorrín 2010].

Należy podkreślić, że warunki, w których badane drożdże *D. hansenii* wyrażają najwyższą aktywność killerową, odpowiadają warunkom dojrzewania serów. Mikroorganizmy te i ich toksyny mogą więc stanowić czynnik biokontroli ograniczający liczebność drożdży *Y. lipolytica*, a tym samym niekorzystne zmiany serów wywołane ich silną aktywnością proteolityczną i lipolityczną.

Przed przystąpieniem do procedury oczyszczania toksyn killerowych i ich charakterystyki biochemicznej konieczne było wyznaczenie jednostki aktywności killerowej, gdyż nie zaobserwowano liniowej zależności pomiędzy wielkością strefy inhibicji wzrostu szczepu wrażliwego a stężeniem toksyny w preparacie. Jednostkę tę wyznaczono na podstawie testu, w którym zbadano zależność między objętością preparatu toksyn a wielkością utworzonej przez niego strefy zahamowania wzrostu wzorcowego szczepu *Y. lipolytica* PII6a. U każdej z badanych toksyn stwierdzono liniową zależność (o współczynniku korelacji mieszczącym się w zakresie 0,9604–0,9922) pomiędzy logarytmem naturalnym objętości stężenia toksyny a wielkością strefy inhibicji wzrostu szczepu wrażliwego. Podobnie liniową zależność między tymi wartościami obserwowali da Silva i in. [2008]. Za jednostkę aktywności przyjęto więc aktywność toksyny, dającą strefę zahamowania wzrostu szczepu wzorcowego o wielkości 2 mm. Jest to wartość umowna, która w różny sposób definiowana jest w literaturze. Często za jednostkę aktywności killerowej przyjmuje się taką ilość białka, które powoduje strefę zahamowania wzrostu szczepu wzorcowego o średnicy równej 1 mm [Chen i in. 2000, Peng i in. 2009, Santos i in. 2000] lub 10 mm [Izgü, Altınbay 2004, Izgü i in. 2006, Weiler, Schmitt 2003]. Comitini i in. [2004a] za jednostkę przyjęli ilość toksyny zawartą w 70 µl supernatantu, wywołującą 3-mm strefę zahamowania wzrostu szczepu wrażliwego, z kolei Buzzini i in. [2004] zdefiniowali ją jako ilość toksyny sprawiaczą, że powierzchnia inhibicji wzrostu wynosi 10 mm².

Podłożem najczęściej stosowanym do produkcji toksyn killerowych jest bulion YPG o kwaśnym pH 4,5–4,6 [Chen i in. 2000, Da Silva i in. 2008, Marquina i in. 2001, Santos i in. 2009, Schmitt, Radler 1987, Wang i in. 2007a,b]. Właściwie nie spotyka się informacji dotyczących wykorzystania w tej biosyntezie podłoży naturalnych, takich jak brzczełka słodowa czy serwatka. Ten ostatni surowiec produkowany jest w dużych ilościach w przemyśle mleczarskim. Szacuje się, że obecnie przetwarzane jest zaledwie 15–18% serwatki [Jakubowski 2006], a zasadniczym sposobem zagospodarowania tego surowca jest sprzedaż na cele paszowe [Gonzales Siso 1996]. Wykazana w niniejszej pracy zdolność bada-

nych drożdży *D. hansenii* do biosyntezy tych metabolitów w pożywce serwatkowej, może być jednym z dodatkowych sposobów wykorzystania serwatki.

Biosynteza toksyn killerowych w bogatych w białka podłożach kompleksowych stwarza trudności w procesie ich wydzielania i oczyszczania, gdyż tradycyjne metody izolacji białek killerowych skutkują wydzielaniem także niewykorzystanych przez drożdże białkowych składników podłoża. W tematycznym piśmiennictwie istnieją przykłady stosowania w tej biosyntezie pożywek syntetycznych lub minimalnych, ułatwiających proces oczyszczania białek killerowych [Hodgson i in. 1995, Santos i in. 2004].

Badane drożdże *D. hansenii* nie produkowały jednak białek killerowych w podłożu syntetycznym, zawierającym jako źródło azotu siarczan amonu lub mocznik. Do biosyntezy tych metabolitów wymagana była obecność w podłożu produkcyjnym białkowych form azotu (peptonu). Brak aktywnych toksyn drożdży *Debaryomyces hansenii* w płynach uzyskanych po ich hodowli w podłożu minimalnym już wcześniej stwierdzali Marquina i in. [2001]. Prowadzili oni hodowle z udziałem szczepu CYC 1021 zarówno w pożywce minimalnej YNB (Yeast Nitrogen Base) z glukozą, jak i w zmodyfikowanym podłożu YM, uzyskując białka killerowe tylko w kompleksowej pożywce YM, mimo tego że oba podłoża umożliwiały dobry wzrost drożdży. Jak wspomniano powyżej, pożywki ułatwiające proces oczyszczania toksyn killerowych z powodzeniem stosowane były do biosyntezy białek killerowych przez inne rodzaje drożdży. Szczepy *Saccharomyces cerevisiae* wytwarzały toksyny killerowe w pożywce minimalnej zawierającej glukozę, siarczan amonu, fosforan potasu, siarczan magnezu oraz, w charakterze czynników wzrostowych, niewielką ilość ekstraktu drożdżowego [Alfenore i in. 2003]. W podłożu YNB z glukozą prowadzono również biosyntezę toksyn killerowych z udziałem szczepu *Williopsis mrakii*, przy czym podłoże to zawierało dodatkowo siarczan amonu i siarczan magnezu [Hodgson i in. 1995]. Podłoże YNB z glukozą stosowano także do produkcji toksyn killerowych drożdży *Pichia membranifaciens* [Santos i in. 2004] oraz *Hansenula mrakii* [Yamamoto i in. 1986b]. Radler i in. [1993] toksyny killerowe drożdży *Zygosaccharomyces bailii* produkowali w syntetycznej pożywce B zawierającej glukozę, kwas jabłkowy, cytrynian sodowy oraz inozytol.

Badania przeprowadzone w niniejszej pracy wykazały korzystny wpływ ekstraktu drożdżowego, stosowanego jako źródło czynników wzrostowych na biosyntezę toksyn killerowych drożdży *D. hansenii*. Już wcześniej Middelbeek i in. [1979] dowiedli, że ekstrakt drożdżowy stymulował produkcję toksyn drożdży *Pichia kluyveri*. Również Woods i Bevan [1968] odnotowali korzystny wpływ dodatku YE do podłoża minimalnego na produkcję białek killerowych *S. cerevisiae*. Wpływ stężenia ekstraktu drożdżowego oraz peptonu na aktywność bójczą toksyn, m.in. drożdży *Hansenula anomala*, *Pichia kluyveri* i *Pichia membranifaciens* wobec drożdży *Candida albicans*, badali także Polonelli i in. [1983]. Autorzy nie stwierdzili istotnych różnic w poziomie tworzonych toksyn, wynikających ze zwiększonej zawartości YE w pożywce. Nieco większe strefy inhibicji wzrostu wrażliwego szczepu *C. albicans* obserwowali natomiast wraz ze wzrostem stężenia peptonu z 0,5 do 1,5%.

W dyskutowanej pracy najwyższy poziom toksyn killerowych badanych drożdży *D. hansenii* uzyskano w bulionie YPG. Analiza wpływu odczynu pożywki na ten proces wykazała, że najwięcej tych metabolitów tworzonych było w pH 4,5. Wpływem pH na

syntezę toksyn zainteresowali się Woods i Bevan [1968] już kilka lat po odkryciu fenomenu killerowego. Badając ich biosyntezę przez gatunek *S. cerevisiae*, obecność aktywnych białek stwierdzali tylko w wąskim zakresie pH, między 4,6 a 4,8. Produkcja toksyn killerowych w podłożach o pH od 3,5 do odczynów alkalicznych, dochodzących do wartości 8, z udziałem różnych szczepów, w tym także *D. hansenii*, badana była również przez Hernandez'a i in. [2008]. Autorzy dowiedli, że biosynteza toksyn przez ten gatunek prowadzona jest w podłożach o niskim pH, w granicach 3,5–6,0. W pożywkach o pH 8,5 nie tylko drożdże *D. hansenii* nie wykazywały zdolności do tworzenia białek killerowych, ale również żaden z innych badanych mikroorganizmów killerowych, np. drożdży z rodzaju *Candida*.

W niniejszej rozprawie nie przedstawiono wyników badania kinetyki wzrostu drożdży *D. hansenii* i syntezy toksyn. W hodowlach produkcyjnych oceniano jedynie poziom biomasy i aktywność killerową w 24., 38. i 72. godz., stwierdzając, że najwyższy poziom toksyn drożdże tworzyły w 48. godzinie procesu. W kolejnej dobie ich ilość znacząco się obniżała, mimo że w hodowlach nie stwierdzano obecności enzymów proteolitycznych zarówno zewnątrz-, jak i wewnątrzkomórkowych (dane niepublikowane). Marquina i in. [2001] obserwując podobne zjawisko, tłumaczą je wrażliwością toksyn killerowych na wstrząsanie mechaniczne. Po zakończeniu logarytmicznej fazy wzrostu w bulionie YM odnotowali oni, w odniesieniu do fazy eksponencjalnej, spadek aktywności toksyny o 17%.

Szczegółowa analiza kinetyki wzrostu i syntezy toksyn killerowych badanych drożdży *D. hansenii* w podłożu YPG została zamieszczona w opublikowanej wcześniej pracy [Żarowska i in. 2009]. Warto podkreślić, że mimo stosunkowo niskiej temperatury hodowli (14°C) wszystkie szczepy rosły z wysoką maksymalną szybkością właściwą μ_{\max} , w zakresie 0,22–0,27 h⁻¹. Biosynteza toksyn killerowych z udziałem szczepów AII4b i MIIa przebiegała w trofofazie, natomiast w hodowli szczepu KI2a biosyntezę toksyn obserwowano również w idiofazie. W hodowlach wszystkich szczepów białka killerowe najintensywniej tworzone były przez komórki w fazie logarytmicznej. Maksymalną produkcję toksyn killerowych w logarytmicznej fazie wzrostu stwierdzano również w hodowlach szczepów *Pichia anomala* i *Pichia kluyveri* [Cominiti i in. 2004a, Pintar, Starmer 2003].

Oczyszczanie białek killerowych drożdży *D. hansenii* okazało się procesem trudnym. Na pierwszym etapie przeprowadzono zagęszczanie toksyn na drodze wysalania siarczanem amonu i ultrafiltracji. Wysalanie okazało się efektywnym sposobem zagęszczania badanych toksyn. Jest to metoda, którą również z powodzeniem stosowali m.in. de la Peña i in. [1981], Kawamoto i in. [1990] oraz McCracken i in. [1994], odpowiednio do izolacji toksyn killerowych drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* i *Pichia acaciae*. Zdecydowanie częściej wykorzystywana przez wielu badaczy metoda wytrącania białek killerowych różnych drożdży (*Pichia kluyveri*, *Kluyveromyces phaffii*, *Debaryomyces hansenii* czy *Pichia membranifaciens*) za pomocą wymrożonego etanolu czy acetonu [Buzzini i in. 2004, Ciani, Fatichenti 2001, Marquina i in. 2001, Middelbeek i in. 1979, Raddler i in. 1990, Santos i in. 2009, Santos i in. 2011] nie przyniosła oczekiwanych rezultatów w przypadku badanych toksyn *D. hansenii* (dane niepublikowane).

Jak wynika z tematycznego piśmiennictwa, w celu zagęszczenia białek killerowych na drodze ultrafiltracji stosuje się standardowo jedną membranę o określonym punkcie od-

cięcia. Toksyny drożdży *Schwanniomyces occidentalis* i *Ustilago maydis* zagęszczano za pomocą membrany 3 kDa [Chen i in. 2000, Santos i in. 2011], *Pichia anomala* i *Hansenula mrakii*, stosując membranę 5 kDa [Wang i in. 2007a, Yamamoto i in. 1988], a białka killerowe szczepów *Pichia membranifaciens* i *Saccaromyces cerevisiae* z wykorzystaniem membrany o punkcie odcięcia 10 kDa [Santos i in. 2009, Palfree, Bussey 1979] lub 30 kDa w przypadku toksyn drożdży *Pichia anomala* [İzgü, Altinbay 2004]. Zastosowanie w tym procesie membran o różnych punktach odcięcia (18, 30 i 50 kDa) powinno umożliwić określenie w przybliżeniu masy cząsteczkowej badanych białek. Niestety, użyte w dyskutowanej pracy membrany nie pozwoliły na uzyskanie jednoznacznych wyników. Aktywność killerowa w retentatach uzyskanych po zastosowaniu membrany 18 kDa, przy jednoczesnym braku aktywnych białek w permeatach, dowodzi, że masa cząsteczkowa badanych toksyn *D. hansenii* jest większa od tej wartości. Straty toksyn szczepów MI1a i KI2a w permeatach zawierających białka < 30 i < 50 kDa, nieprzekraczające 20%, sugerują ponadto, że masa cząsteczkowa tych białek jest większa od 50 kDa. Na podstawie wyższych strat toksyny killerowej szczepu AII4b zaobserwowanych w tych samych permeatach można przypuszczać, że drożdże te produkują toksynę o masie cząsteczkowej mniejszej niż 50 kDa.

Wynikom tym przeczą jednak rezultaty sączenia molekularnego (filtracji żelowej) z zastosowaniem różnych żelów (Superdex 75, Superdex 200, BioGel P-150 i BioGel P-200). Na ich podstawie stwierdzono, że toksyna szczepu *D. hansenii* KI2a cechowała się obecnością dwóch aktywnych białek o masach 46 i 78 kDa. W preparatach toksyn pozostałych szczepów (AII4b i MI1a) stwierdzono pojedyncze białka o masie cząsteczkowej odpowiednio powyżej 232 i około 152 kDa. Uzyskane wyniki są zaskakujące, ponieważ żaden z dotychczas poznanych killerowych szczepów drożdży nie produkuje dwóch białek killerowych różniących się masą cząsteczkową. Obecność dwóch aktywnych frakcji podczas rozdziła toksyny killerowej KI2a jest więc trudna do wytłumaczenia. Przyczyną takiego rozdziła mogło być zastosowanie eluentu o stosunkowo niskiej sile jonowej. W takich warunkach białka mogą wypływać w formie agregatów (pierwszy szczyt) oraz pojedynczych cząsteczek (drugi szczyt). Również duża masa cząsteczkowa toksyn szczepów AII4b i MI1a może wskazywać na zdolność tych białek do agregacji między sobą lub z innymi białkami obecnymi w płynie pochodowym, gdyż większość opisanych w literaturze białek killerowych ma stosunkowo niewielką masę cząsteczkową, w zakresie od około 20 do 85 kDa [Buzzini i in. 2004, Goto i in. 1990, İzgü, Altinbai 2004, Guyard i in. 2002, Santos i in. 2000, Wang i in. 2007b] i jak dotychczas nie poznano toksyny o masie przekraczającej 200 kDa.

Inną, zastosowaną do oczyszczania badanych toksyn *D. hansenii* metodą była chromatografia powinowactwa z β -D-glukanem oraz konkanawaliną A. Mimo że techniki te są często z powodzeniem wykorzystywane do oczyszczania białek killerowych innych drożdży [Santos i in. 2002, McCracen i in. 1994, Weiler, Schmitt 2003, Klassen, Meinhardt 2002, Santos, Marquina 2004], w przypadku toksyn *D. hansenii* nie przyniosły oczekiwanych rezultatów. Chromatografia powinowactwa z konkanawaliną A, pozwalająca na frakcjonowanie cząsteczek białkowych i lipoprotein, które mają związane reszty oligosacharydowe, sugeruje ponadto, że badane białka nie są glikoproteinami. W metodzie tej, w zależności od liczby i umiejscowienia grup cukrowych, zawierające je cząsteczki różnią

się pod względem powinowactwa w oddziaływaniu z immobilizowaną konkanawaliną A. Zastosowanie eluentów, które w różnym stopniu współzawodniczą o miejsca wiążące na konkanawalinie A, pozwala na kontrolowane wymywanie przyłączonych do złoża cząsteczek. We frakcjach eluowanych nie wykryto jednak aktywnych toksyn *D. hansenii*, co wskazuje, że toksyny killerowe nie związały się z konkanawaliną. W buforze, w którym przeprowadzono rozdział, wymywanie niezwiązanych frakcji i zwalnianie toksyn, zawarte były sole NaCl, CaCl₂ i MnCl₂. Zastosowane w eluencji jony nie mogły spowodować utraty aktywności, gdyż w teście sprawdzającym ich wpływ na tę aktywność nie stwierdzano inaktywacji toksyn (dane niepublikowane). Ubytek tak dużej części aktywności (30–65%) nasuwa przypuszczenie, że mimo obecności w buforze eluującym NaCl, którego funkcją jest zapobieganie niespecyficznemu wiązaniu białek do lektyny, badane toksyny uległy wiązaniu z agarozową matrycą złoża.

Również wyniki sączenia molekularnego wskazują, że dochodzi do niespecyficznego oddziaływań pomiędzy toksynami *D. hansenii* a matrycą tych złoż Superdex – agarozą i/lub dekstranem. Mimo że agarozą stanowi matrycę różnych złoż z powodzeniem stosowanych do rozdziału toksyn killerowych wielu gatunków drożdży [Comitini i in. 2004 b, Hodgson i in. 1995, Weiler, Schmitt 2003], to o podobnych oddziaływaniach pomiędzy toksynami killerowymi drożdży *S. cerevisiae* a tym polisacharydem już wcześniej wzmiankowali Woods i Bevan [1968].

Pomimo zastosowania różnych metod oczyszczania nie udało się uzyskać czystych białek killerowych *D. hansenii*. Warto podkreślić, że publikowane w literaturze wyniki oczyszczania toksyn killerowych oraz ich szczegółowa charakterystyka dotyczą często białek produkowanych w podłożach syntetycznych, pozbawionych białkowych form azotu, np. w podłożu YNB-D, w którym prowadzono biosyntezę toksyn szczepów *Pichia membranifaciens* i *Williopsis mrakii* [Hodgson i in. 1995, Santos, Marquina 2004, Yamamoto i in. 1986b] czy w pożywce B, zawierającej glukozę, kwas jabłkowy, cytrynian sodowy oraz inozytol, w której produkowano toksynę K28 *Saccharomyces cerevisiae* i zygocynę drożdży *Zygosaccharomyces bailii* [Pfeiffer, Radler 1982, Radler i in. 1993]. Taka biosynteza toksyn umożliwia stosunkowo proste wyizolowanie białek z podłoża, a także ich oczyszczenie. Łatwa jest również analiza stężenia białka na poszczególnych etapach oczyszczania, a co za tym idzie – obliczenie stopnia oczyszczenia toksyn killerowych. Stosując metodę ultrafiltracji Peng i in. [2009], uzyskali stosunkowo niski stopień oczyszczenia (1,4 x) toksyn killerowych szczepu *Williopsis saturnus* WC91-2 przy porównywalnej wydajności (81%). Zdecydowanie wyższy natomiast (6,5 x) stopień oczyszczenia tą metodą toksyn *Hanseniospora uvarum* 470 stwierdzali Radler i in. [1990] przy wydajności zaledwie 44%. Ci ostatni na kolejnym etapie oczyszczania zastosowali strącanie białek za pomocą etanolu, uzyskując 9-krotnie oczyszczone białko z wydajnością 32%. Zacytowane wartości wydajności są zdecydowanie niższe od uzyskanych w niniejszej pracy, przy zastosowaniu wysalania jako wstępnego procesu oczyszczania.

Przeprowadzenie szczegółowej analizy stężenia białka w dyskutowanej pracy stwarzało duże trudności. Bezpośrednie oznaczenie jego zawartości w płynach pochodzących *D. hansenii* nie było możliwe ze względu na obecność substancji absorbujących w zakresie światła ultrafioletowego oraz substancji barwnych, zakłócających oznaczenia kolorymetryczne. Różnice pomiędzy oznaczeniem spektrofotometrycznym [Whitaker, Granum

1980] i oznaczeniem metodą BCA [Smith i in. 1985], wskazującymi na wysokie (rzędu kilku miligramów/ml) stężenie białka a wartością uzyskaną w oznaczeniu zmodyfikowaną metodą Bradford [1976] (rzędu kilkunastu mikrogramów/ml) sięgają trzech rzędów wielkości. Oznaczenie stężenia białka dające wyniki korelujące z rzędem czułości metod barwiących białka w żelu po rozdiale elektroforetycznym uzyskano zmodyfikowaną metodą Bradford, po ok. 50-krotnym zagęszczeniu płynu pochodowlanego. Na tej podstawie można wnioskować, że całkowite stężenie białka w płynie pochodowlanym jest na poziomie 1 µg/ml. Ze względu na te trudności zrezygnowano z oznaczania stężenia białka na poszczególnych etapach oczyszczania.

Charakterystykę toksyn killerowych *D. hansenii*, obejmującą ocenę wpływu pH, temperatury, enzymów proteolitycznych i β-merkaptetanolu na aktywność i stabilność toksyn killerowych, przeprowadzono z wykorzystaniem surowych preparatów toksyn, otrzymanych po 20-krotnym zagęszczeniu pozbawionej komórek cieczy pochodowlanej. W literaturze często można znaleźć informacje na temat charakterystyki surowych białek killerowych, np. drożdży *Candida nodaensis*, *Metschnikowia bicuspidate*, *Pichia membranifaciens* [Da Silva i in. 2008, Santos i Marquina 2004, Wang i in. 2007a,b], uzyskanych po ultrafiltracji, wysoleniu lub wytrąceniu.

Białka killerowe *D. hansenii* wykazywały aktywność w podłożu o pH 4–4,5. W takim zakresie pH, a nawet niższym – równym 3,5, aktywność bójczą wykazuje większość poznanych toksyn killerowych, wśród nich m.in. toksyny drożdży *Pichia anomala*, *Pichia membranifaciens*, *Candida nodaensis*, *Schwanniomyces occidentalis* [Chen i in. 2000, Izgü, Altınbay 2004, Pfeiffer, Radler 1984, Santos, Marquina 2004, Wang i in. 2007a]. W pH powyżej 5,0 aktywność białek killerowych produkowanych przez różne gatunki drożdży, w tym np. *Schwanniomyces occidentalis* czy *Pichia anomala*, drastycznie się obniżała, a w pH 6,0 zazwyczaj w ogóle nie wykazywały one aktywności bójczej [Izgü i in. 2006, Chen i in. 2000], co potwierdzają również wyniki uzyskane w przypadku badanych toksyn *D. hansenii*.

Badane toksyny najwyższą aktywność wykazywały w temperaturze 10 i 14°C. W takich samych temperaturach aktywność wykazywała również toksyna killerowa drożdży *Metschnikowia bicuspidate* izolowanych ze środowiska morskiego [Wang i in. 2007a,b]. Większość poznanych dotychczas białek killerowych, w tym białka drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia membranifaciens* czy *Williopsis saturnus*, przejawia aktywność w nieco szerszym zakresie temperatury 5–20°C [Buzzini i in. 2004, Magliani i in. 1997, Santos, Marquina 2004, Santos i in. 2009]. W temperaturze aż do 30°C aktywna jest natomiast toksyna K5 produkowana przez *Pichia anomala* [Izgü, Altınbay 2004] oraz CnKT wytwarzana przez *Candida nodaensis* [Da Silva i in. 2008].

Stabilność białek stanowi jedną z najistotniejszych cech substancji aktywnych o znaczeniu praktycznym. Uzyskane w niniejszej pracy wyniki świadczą o tym, że toksyny badanych szczepów *D. hansenii* były stabilne w pH. 3,5–5. Podobne rezultaty dla toksyny innego szczepu *D. hansenii* CYC 1021 wyizolowanego z solanki oliwkowej otrzymali Marquina i in. [2001]. Inkubacja badanych w niniejszej pracy białek killerowych, w środowisku o pH powyżej wartości 5,0, powodowała nieodwracalną utratę aktywności, co stwierdzano również w przypadku większości opisanych w literaturze toksyn, w tym m.in. *Cryptococcus humicola*, *Saccharomyces cerevisia* czy *Pichia farinosa* [Golubev, Shabalin 1994, Pfeiffer,

Radler 1982, Suzuki, Nikkuni 1994, Suzuki i in. 1997]. Wyjątek stanowią białka drożdży *Hansenula mrakii* i *H. saturnus*, których toksyny są stabilne w zakresie pH od 2,0 do 11,0 [Ashida i in. 1983, Ohta i in. 1984].

Badane białka killerowe *D. hansenii* były stabilne podczas inkubacji w temperaturze 20 i 30°C. Po 45–75-minutowej inkubacji w temperaturze 40°C nie były one zdolne do inhi-bicji wzrostu szczepu wrażliwego, a w temperaturze 50°C traciły aktywność już w pierw-szych minutach inkubacji. Uzyskane wyniki potwierdzają rezultaty Marquina i in. [2001], którzy dodatkowo wykazali, że temperatura 15°C utrzymywała aktywność toksyny szcze-pu *D. hansenii* CYC 1021 na jej maksymalnym poziomie przez okres jednego tygodnia. Odporność toksyn killerowych na wysokie temperatury jest zjawiskiem bardzo rzadkim. Spośród poznanych dotychczas tylko białko killerowe drożdży *Pichia kluyverii* zachowy-wało aktywność w temperaturze 40°C oraz toksyna *Hansenula mrakii*, która była odporna na 10-minutową inkubację w temperaturze 100°C [Yamamoto i in. 1988].

Proteinaza K i papaina całkowicie dezaktywowały toksyny killerowe szczepów *D. han-senii* KI2a, AII4b i MIIa w temperaturze 20°C, co potwierdza ich białkowy charakter. Ba-dane toksyny okazały się nieco bardziej odporne na działanie pepsyny, w przypadku której aktywność bójcza była zachowywana w 15–30%. Słaby efekt działania pepsyny może być spowodowany jej częściową inaktywacją w pH 4,6, gdyż enzym ten, przejawiający mak-symalną aktywność w pH 1,5–2,0, całkowicie denaturuje w środowisku o pH już powy-żej 5,0.

Wrażliwe na enzymy proteolityczne białka killerowe *D. hansenii* mogą być hydrolizo-wane przez obecne w serach proteazy bakteryjne i drożdżowe. Spośród izolowanych z se-rów mikroorganizmów najwyższymi aktywnościami proteolitycznymi cechują się kultury *Yarrowia lipolytica* [Juszczak i in. 2005, Lopez-Diaz i in. 1995, Sinigaglia i in. 1994, Temp-el, Jakobsen 1998, 2000, Wojtatowicz i in. 2001]. Liczebność szczepów tego gatunku w se-rach jest jednak znacznie niższa niż drożdży *D. hansenii* (*Candida famata*) [De Boer, Kuik 1987, Eliskases-Lechner 1996, Roostita, Fleet 1996, Tempel, Jakobsen 1998], czego jed-nym z powodów jest ich wrażliwość na toksyny killerowe *D. hansenii* [Wojtatowicz i in. 2002, Żarowska i in. 2004].

Wpływ enzymów proteolitycznych takich jak: pepsyna, papaina, proteinaza K i pro-naza na aktywność bójczą drożdżowych toksyn killerowych analizowało wielu badaczy [Buzzini i in. 2004, Comitini i in. 2004a, Santos, Marquina 2004, Woods, Bevan 1968, Young, Yagiu 1978]. Powyższe enzymy w różny sposób oddziaływały na toksyny killero-we. Young i Yagiu [1978] wykazali, że pronaza, pepsyna i papaina skutecznie dezaktywo-wały toksynę szczepu *S. cerevisiae*. Aktywność bójcza toksyny killerowej szczepu *Pichia membrainifaciens* była hamowana przez pronazę i papainę, na białko to nie wpływała na-tomiast pepsyna [Santos, Marquina 2004]. Comitini i in. [2004a] poza pepsyną i papa-iną analizowali również wpływ innych enzymów proteolitycznych (trypsyny, protezy XIV, protezy XVIII) na aktywność bójczą toksyn killerowych szczepów *Pichia anomala* oraz *Kluyveromyces wickerhamii*. Do całkowitej dezaktywacji obydwu białek prowadziła tylko proteza XIV – najbardziej niespecyficzny spośród użytych enzymów.

Większość poznanych dotychczas białek killerowych ma budowę dimeryczną [Maglia-ni i in. 1997]. Zanik aktywności bójczej badanych toksyn pod wpływem β -merkapto-etanolu może sugerować podobną budowę toksyn killerowych drożdży *D. hansenii*.

β -merkaptoetanol jest substancją mogącą powodować zmianę konformacji białek oraz rozluźnienie mostków disiarczkowych pomiędzy ewentualnymi segmentami białkowymi. Aby potwierdzić dimeryczną budowę toksyny, niezbędna jest porównawcza analiza elektroforetyczna czystej toksyny oraz białka poddanego działaniu β -merkaptoetanolu. Dzięki tej metodzie Chen i in. [2000] potwierdzili dimeryczną budowę toksyny killerowej szczepu *Schwanniomyces occidentalis*.

Jednym z etapów badań przeprowadzonych w dyskutowanej pracy było określenie spektrum aktywności bójczej toksyn *D. hansenii* wobec różnych mikroorganizmów. Pod kątem wrażliwości na toksyny killerowe oceniano m.in. mikroorganizmy będące przyczyną zepsuć żywności, w tym drobnoustroje wykazujące aktywność proteolityczną lub lipolityczną (np. z rodzaju *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Micrococcus* czy *Yarrowia*), bakterie mlekowe powodujące kwaśnienie wielu produktów spożywczych, drożdże stanowiące mikroflorę skażającą w przemyśle fermentacyjnym (np. *Hansenula*, *Pichia*, *Kloeckera*) oraz wiele grzybów strzępkowych, w tym szczepy fitopatogenne (np. *Absidia*, *Botrytis*, *Mucor*) i toksynotwórcze (np. *Fusarium*). Toksyczne oddziaływanie białek killerowych oceniano również wobec drożdży z rodzaju *Candida* mogących powodować grzybicę u ludzi.

Drożdże *D. hansenii* i ich toksyny hamowały wzrost drożdży należących do gatunków *Schwanniomyces occidentalis*, *Yarrowia lipolytica*, *Candida zeylanoides* i *Candida albicans*. Szczególnie ważna może okazać się aktywność bójcza wobec ostatniego z wymienianych gatunków, gdyż jego przedstawiciele należą do mikroorganizmów patogennych dla ludzi, wywołujących u osób z obniżoną odpornością grzybicę, zwaną kandydozą. Oczyszczone toksyny *D. hansenii* mogą więc być brane pod uwagę jako zewnętrzne preparaty grzybobójcze. Obiecujące wyniki w tym zakresie uzyskali Weiler i Schmitt [2003], którzy badając toksynę killerową drożdży *Zygosachcharomyces bailii* (hamujące wzrost m.in. patogennych szczepów *C. albicans* i *C. krusei*), porównywali ich oddziaływanie z aktywnością znanych, handlowych preparatów przeciwgrzybiczych, takich jak clotrimazol i miconazol. Stwierdzili oni, że 6 pmoli zygotocyny wywołuje taką samą strefę zahamowania wzrostu wrażliwego szczepu *S. cerevisiae* 192.2d, jak 29 000 pmoli clotrimazolu i 209 pmoli miconazolu.

W piśmiennictwie można znaleźć informacje na temat hamującego wpływu drożdży i ich toksyn na wzrost patogennych grzybów strzępkowych [Arras 1996, Payne, Bruce 2001, Santos i in. 2004], co może być ważnym kierunkiem potencjalnych aplikacji drożdży killerowych do biologicznej ochrony płodów rolnych, głównie owoców i warzyw, przed zepsuciami powodowanymi grzybami podczas magazynowania. Interesujące więc wydawało się podjęcie badań również w tym zakresie. Udowodniły one, że badane drożdże killerowe i ich toksyny wykazywały aktywność bójczą wobec grzybów z rodzaju *Absidia*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Trichodema* i *Botrytis*.

Grzyby *Botrytis cinerea*, określane jako gronowiec szary lub szara pleśń, atakują rośliny w poszczególnych fazach rozwojowych i różne ich części, od nasion po owoce. Powodują one choroby m.in. wielu roślin ogrodowych, takich jak pomidory, sałata, fasola, maliny, porzeczki czy winorośla. Często atakują owoce truskawek, gdzie mogą obniżyć plony o 30–60%. Aktywność killerowa drożdży *D. hansenii* wobec grzybów może być więc wykorzystana do biologicznej ochrony płodów rolnych przed chorobami wywoływanymi

przez te mikroorganizmy. W piśmiennictwie również można znaleźć informacje o hamującym wpływie innych drożdży i ich toksyn na wzrost grzybów *B. cinerea*. Santos i Marquina [2004] wykazali, że zarówno drożdże *Pichia membranifaciens* CYC1106, jak i ich oczyszczona toksyna, aplikowane w miejscu porażenia winorośli *Vitis vinifera*, skutecznie hamowały rozwój grzyba *B. cinerea* odpowiedzialnego za gnicie tych owoców.

Badane drożdże oraz ich toksyny nie wpływały na wzrost żadnego z testowanych szczepów bakterii. Otrzymane wyniki pozostają więc w sprzeczności w stosunku do uzyskanych przez Izgü i Altinbay [1997], którzy wykazali, że drożdże *Hansenula anamola*, *Hansenula mrakii*, *Candida tropicalis*, *Kluyveromyces drosophilorum* i *Kluyveromyces lactis* wykazywały aktywność bójczą wobec bakterii G(+), należących do gatunku *Bacillus subtilis*, *Sarcina lutea*, *Streptococcus pyogenes* i *Staphylococcus aureus*. Brak aktywności bójczej drożdży *D. hansenii* i ich toksyn wobec bakterii mlekowych jest informacją pomyślną, gdyż nie wyklucza ich wykorzystania jako kultur starterowych w serowarstwie.

Wykazany w niniejszej pracy prawdopodobny mechanizm działania toksyn killerowych drożdży *D. hansenii* obejmuje wiązanie się tych białek z β -(1,6)-glukanem ściany komórkowej drożdży wrażliwych, następnie z kolejnym, niezidentyfikowanym receptorem obecnym w błonie cytoplazmatycznej oraz hamowanie podziałów komórkowych prowadzące do śmierci komórek.

Wśród głównych komponentów ścian komórkowych drożdży najczęściej wymienia się (1-3)- β -D-glukan i mannan, w mniejszych ilościach występują także chityna oraz (1-6)- β -D-glukan i jak wynika z wielu badań, wykorzystujących m.in. analizę ścian komórkowych opornych mutantów drożdży wrażliwych (*kre* mutantów), receptorami toksyn killerowych może być każdy z tych polisacharydów [Schmitt, Compain 1995]. Jak wspomniano powyżej, receptorem badanych toksyn *D. hansenii* w komórkach wrażliwych drożdży *Y. lipolytica* jest najprawdopodobniej β -1,6-glukan. Jak dotąd, polisacharyd ten najczęściej wskazuje się jako składnik wiążący toksyny killerowe różnych drożdży. Jest on receptorem m.in. dla toksyny innego, badanego wcześniej szczepu *D. hansenii* CYC, drożdży *S. cerevisiae* (K_1 i K_2), *Hanseniaspora uvarum* oraz przypuszczalnie dla białek killerowych *Hansenula mrakii* i *Pichia membrenefaciens* [Bussey i in. 1979, Hutchins, Bussey 1983, Kasahara i in. 1994, Santos i in. 2000]. Mannan wiąże z kolei toksyny *Zygosaccharomyces bailii*, *Schwanniomyces occidentalis* i *S. cerevisiae* K_{28} [Weiler, Schmitt 2003, Chen i in. 2000, Schmitt, Radler 1987, 1988], natomiast chityna jest receptorem toksyny killerowej szczepów *Kluyveromyces lactis* [Takita, Castihlo-Valavicius 1993].

O obecności dodatkowego receptora w błonie cytoplazmatycznej badanych toksyn *D. hansenii* może świadczyć udowodniona w niniejszej pracy wrażliwość na te toksyny protoplastów wzorcowego szczepu *Y. lipolytica*. Podobny wniosek wysnuli Schmitt i Radler [1988] badając mutanty *S. cerevisiae* odporne na działanie toksyny killerowej K_{28} . Mutanty te, po usunięciu ścian komórkowych, wymierały pod wpływem toksyny w takim samym stopniu co szczep wrażliwy.

Na podstawie danych literaturowych, w których toksyny tworzące kanały jonowe w błonach cytoplazmatycznych powodowały bardzo szybkie wymieranie (do 1 godziny) całej populacji komórek wrażliwych [Weiler, Schmitt 2003], powolne wymieranie komórek *Y. lipolytica* PII6a sugeruje, że mechanizm działania toksyn badanych szczepów *Debaryomyces hansenii* jest inny.

Komórki wrażliwego szczepu *Yarrowia lipolytica* PII6a, poddane działaniu toksyn, pączkowały rzadziej niż w hodowli kontrolnej. Słabo widoczna chitynowa przegroda między komórkami oraz sporadycznie występująca druga blizna po wcześniejszym oddzieleniu się dojrzałego pączka sugerują, iż podziały komórkowe są zatrzymywane. Zastosowanie barwnika DAPI pozwoliło potwierdzić blokadę syntezy jądrowego DNA tylko w przypadku toksyny MIIa w obecności soli. W poddanych jej działaniu komórkach wrażliwego szczepu *Y. lipolytica* PII6a jądra widoczne były tylko w komórkach macierzystych. Zmiany te zostały w ten sposób zinterpretowane przez Schmitt i in. [1996], którzy wskazali, że działanie toksyny K28, polegające na blokadzie syntezy DNA, powoduje zatrzymanie podziału komórki na etapie wytworzenia niewielkiego pączka, bez obecnego w nim jądra.

Jak już wspomniano, martwe komórki, barwione bromkiem etydy, akumulują znacznie większe ilości barwnika, co uwidacznia się w postaci intensywnego zabarwienia ich cytoplazmy i jądrowego DNA [Puchkov 2006]. Na tej podstawie stwierdzono, iż poddane działaniu toksyn komórki *Yarrowia lipolytica* PII6a, ulegają wymarcu. Porównanie kontroli pozytywnej (komórki z uszkodzoną pod wpływem etanolu błoną komórkową) z próbami właściwymi i komórkami niepoddanymi działaniu toksyn sugeruje, że śmierć związana jest z uszkodzeniem błon cytoplazmatycznych, które niekoniecznie spowodowane jest powstaniem w nich kanałów jonowych.

Mimo całkowitego zsekwencjonowania genomu drożdży *D. hansenii* lokalizacja genów kodujących produkcję toksyn killerowych oraz oporności na nie nadal jest nieznaną. Funkcja liniowych plazmidów, które mogą występować u drożdży *D. hansenii*, również nie została dotąd określona. Wiadomo natomiast, że u drożdży *Kluyveromyces lactis*, *Pichia acaciae*, *Pichia inositovora* czy *Wingea robertsiae* kodują one zdolność do tworzenia białek killerowych [Magliani i in. 1997, Marquina i in. 2002]. W dyskutowanej pracy podjęto próbę sprawdzenia, czy aktywność killerowej tych drożdży związana jest z obecnością liniowych plazmidów. Badane szczepy *D. hansenii* KI2a, AII4b i MIIa nie miały jednak takich plazmidów. Liniowe plazmidy nie występują u drożdży *D. hansenii* z wysoką częstotliwością; dotychczas poznano jedynie 4 szczepy tego gatunku, u których stwierdzono obecność dsDNA: TK (CBS 7848), CBS 770, CBS 1780 i CBS 4890 [Cong i in. 1994, Fukuda i in. 2004, Fukuhara 1995, Gunge i in. 1993]. Zdolność badanych szczepów do tworzenia toksyn killerowych mimo braku plazmidów sugeruje, że cecha ta kodowana jest w obrębie DNA genomowego. Na taką lokalizację wskazują również badania Fukuda i in. [1997] oraz Santos i in. [2002].

Jak dotąd nie wykluczono możliwości kodowania toksyn killerowych u *D. hansenii* na wirusopodobnych cząstkach dsRNA (VLP), jednakże dotychczas nie wyizolowano ich z komórek tych drożdży. Z literatury wiadomo, że cząstki VLP, podobnie jak plazmidy, usuwane są z komórek w trakcie tzw. leczenia, czyli utraty zdolności do produkcji białek killerowych, która zachodzi w określonych warunkach lub pod wpływem swojego czynnika [Zorg i in. 1988]. Wśród tych czynników wymienia się m. in. hodowlę drożdży w temperaturze wyższej niż optymalna do tworzenia toksyn (około 30°C), naświetlanie promieniami UV lub obecność w podłożu hodowlanym letalnej dawki cykloheksymidu [Gotowczyc i in. 1992, Young, Yagiu 1978]. W przypadku halofilnych szczepów *D. hansenii* do utraty plazmidów prowadzi również hodowla w podłożu bez NaCl [Fukuda i in. 2004, Gunge i in. 1993].

Przeprowadzona w niniejszej pracy hodowla w warunkach niesprzyjających utrzymaniu plazmidów i dsRNA spowodowała utratę aktywności killerowej tylko w przypadku referencyjnego szczepu *D. robertsiae* CBS 6693, u którego cecha ta, jak wiadomo, kodowana jest na liniowych plazmidach [Klassen, Meinhardt 2002]. Żaden z badanych szczepów *D. hansenii* nie utracił aktywności bójczej, co potwierdza tezę, że toksyny killerowe u tych drożdży kodowane są w obrębie DNA genomowego. Postanowiono więc sprawdzić, czy w obrębie genomowego DNA (wzorcowego dla gatunku) szczepu *D. hansenii* CBS 767 nie występują sekwencje homologiczne do znanych sekwencji toksyn killerowych wytwarzanych przez inne gatunki drożdży.

Przeprowadzona analiza *in silico* nie wykazała jednak podobieństw pomiędzy genomowym DNA *D. hansenii* CBS 767 a sekwencją jedynej, kodowanej na genomowym DNA, toksyny KHS drożdży *S. cerevisiae*. Przeszukano więc genom *D. hansenii* w celu odnalezienia sekwencji podobnych do znanych sekwencji toksyn killerowych, kodowanych na liniowych plazmidach dsDNA. Nie znaleziono istotnych podobieństw do sekwencji najlepiej poznanej w tej grupie toksyn – zymozyny drożdży *K. lactis*. Toksyna ta kodowana jest przez dwa geny (ORF) na plazmidzie pGKL1 [Gunge 1986, Stark, Boyd 1986, Stark i in. 1990]. Pierwszy z nich koduje podjednostkę α o aktywności chitynazy oraz β – odpowiedzialną za transport aktywnej podjednostki do wnętrza komórki. Drugi gen koduje aktywną podjednostkę (γ), wykazującą aktywność nukleazową [Lu i in. 2005, 2008]. Nie zaobserwowano również homologii do sekwencji kodujących toksynę drożdży *P. inositolovora*, która podobnie jak zymocyna wykazuje działanie rybonukleazy. Odnotowano natomiast pewne podobieństwo z sekwencjami kodującymi podjednostki białek killerowych drożdży *P. acaciae*, *P. etchellsii* i *D. robertsiae*, które są odpowiedzialne za wiązanie toksyn z chityną ściany komórkowej drożdży wrażliwych, jednakże ich lokalizacja w obrębie genomu była za każdym razem różna. W żadnym z analizowanych przypadków nie zaobserwowano homologii do sekwencji aktywnych podjednostek toksyn killerowych. Analizy porównawcze toksyn między sobą wykazały jednak, że nawet te o podobnym działaniu – rybonukleazy *K. lactis*, *P. acaciae* i *P. inositolovora* – charakteryzują się maksymalnie kilkuprocentową homologią sekwencji w obrębie aktywnej podjednostki.

Dalsze badania będą zmierzały do oczyszczenia toksyn killerowych badanych drożdży z wykorzystaniem innych technik, np. ogniskowania izoelektrycznego oraz chromatografii powinowactwa z β -(1,6)-glukanem związanym z epoksy-aktywowaną sepharozą. Użycie czystych białek killerowych *D. hansenii* pozwoli na ich zsekwencjonowanie i jeszcze lepsze poznanie budowy tych substancji.

Podsumowując, przeprowadzone w niniejszej pracy badania dotyczą zagadnień słabo poznanych. Mimo że znane są uzdolnienia killerowe drożdży *D. hansenii* bytujących w różnych środowiskach, to jednak jak dotąd niewiele wiadomo na temat samych toksyn.

Rozprawa habilitacyjna dostarcza więc wielu oryginalnych danych na temat białek cechujących się wysoką aktywnością bójczą. Opisano warunki sprzyjające efektywnej syntezie toksyn, po raz pierwszy wskazując możliwość wykorzystania w tym procesie serwatki. Przedstawiono charakterystykę surowych preparatów toksyn killerowych pod kątem aktywności i stabilności w różnym zakresie pH i temperatury oraz wrażliwości na wybrane enzymy proteolityczne. Uwidoczniono ponadto zmiany zachodzące w komórkach drożdży

dży wrażliwych pod wpływem toksyn, co pozwoliło na wskazanie prawdopodobnego mechanizmu ich działania, który jak dotychczas również nie był badany.

W pracy nie udało się oczyścić i zsekwencjonować toksyn killerowych *D. hansenii*. Napotkane w tym zakresie trudności mogą być przyczyną braku w tematycznym piśmiennictwie danych na temat budowy białek killerowych. Przeprowadzone jednak badania oraz analiza *in silico* pozwoliły na wskazanie lokalizacji genów kodujących toksyny killerowe *D. hansenii* w obrębie genomu tych drożdży.

Ważne zarówno z poznawczego, jak i praktycznego punktu widzenia są wyniki dotyczące spektrum aktywności bójczej toksyn *D. hansenii* w stosunku do różnych mikroorganizmów. Uzupełniają one podstawową wiedzę z zakresu ekologii drobnoustrojów. Z drugiej natomiast strony, wykazana zdolność drożdży *D. hansenii* do inhibicji wzrostu innych drożdży i grzybów strzępkowych, będących przyczyną zepsucia żywności oraz chorób płodów rolnych, nakreśla nowe możliwości ich aplikacji. Mogą być one brane pod uwagę zarówno przy opracowywaniu drożdżowych szczepionek w serowarstwie i przemyśle wędliniarskim, jak i czynników biokontroli przedłużających trwałość surowców roślinnych, głównie owoców. Istotne znaczenie praktyczne może mieć również aktywność bójcza *D. hansenii* wobec patogennych dla ludzi drożdży *Candida albicans*, gdyż oczyszczone toksyny mogą być rozważane jako preparaty grzybobójcze przeznaczone do stosowania zewnętrznego.

Uzyskane wyniki nakreślają zatem nowe kierunki badań.

6. Wnioski

1. Drożdże *D. hansenii* najefektywniej produkowały toksyny killerowe w podłożu syntetycznym zawierającym glukozę (jako źródło węgla) i pepton (jako źródło azotu) przy pH 4,5. Dobrym podłożem do biosyntezy toksyn była również serwatka.
2. Badane szczepy tworzyły różne toksyny killerowe. Częściowo oczyszczona na drodze sączenia molekularnego toksyna szczepu *D. hansenii* KI2a cechowała się obecnością dwóch aktywnych białek o masach 46 i 78 kDa. W preparatach toksyn dwóch pozostałych szczepów (AII4b i MI1a) stwierdzano pojedyncze aktywne białka o masie cząsteczkowej, odpowiednio powyżej 232 i około 152 kDa.
3. Badane toksyny killerowe były wrażliwe na proteinazę K i papainę, co potwierdziło ich białkowy charakter, a utrata przez nie aktywności bójczej pod wpływem β -merkaptopetanolu wskazuje na podjednostkową budowę białek killerowych.
4. Toksyny killerowe drożdży *D. hansenii* były stabilne w zakresie temperatur od 10 do 30°C i wartości pH od 4 do 5. Najwyższą aktywność wykazywały w temperaturze 10 i 14°C oraz pH 3,5–4,5.
5. Toksyny *D. hansenii* wykazywały aktywność bójczą wobec drożdży i grzybów strzępkowych, przedstawicieli rodzajów: *Candida*, *Schwanniomyces*, *Yarrowia*, *Abidia*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Rhizopus* i *Trichodema*. Toksyny te nie oddziaływały natomiast na wzrost bakterii będących reprezentantami rodzajów takich jak: *Bacillus*, *Escherichia*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Sarcina*, *Serratia* i *Streptococcus*.
6. Prawdopodobny mechanizm działania toksyn killerowych drożdży *D. hansenii* obejmuje wiązanie się tych białek z β -glukanem ściany komórkowej drożdży wrażliwych, następnie z kolejnym, niezidentyfikowanym receptorem obecnym w błonie cytoplazmatycznej oraz hamowanie podziałów komórkowych prowadzące do śmierci komórek.
7. Geny kodujące białka killerowe u drożdży *D. hansenii* zlokalizowane są w genomowym DNA, o czym świadczy aktywność killerowa szczepów nieposiadających liniowych plazmidów oraz referencyjnego szczepu killerowego pozbawionego plazmidów i ewentualnych cząstek dsRNA w procesie leczenia.
8. Analiza *in silico* wykazała homologię pomiędzy sekwencjami kodującymi toksyny u drożdży *P. acaciae*, *P. etchellsii* i *D. robertsiae* a sekwencją szczepu *D. hansenii* CBS 767 i wskazała na lokalizację genów kodujących toksyny w obrębie chromosomów B i F.

7. Piśmiennictwo

- Aguiar C., Lucas C., 2000. Yeasts killer/sensitivity phenotypes and halotolerance. *Food Technol. Biotechnol.* 38 (1), 39–46.
- Al-Aidroos K., 1978. Chromosomal mutants of *Saccharomyces cerevisiae* affecting the cell wall binding site for killer factor. *Can. J. Microbiol.* 24, 228–237.
- Alfenore S., Délia M.L., Strehaiano P., 2003. Use of ATP measurements by bioluminescence to quantify yeast's sensitivity against a killer toxin. *Anal. Chim. Acta.* 495 (1–2), 217–224.
- Almagro A., Prista C., Castro S., Quintas C., Madeira-Lopes A., Ramos J., Loureiro-Dias M.C., 2000. Effects of salts on *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomyces cerevisiae* under stress conditions. *Int. J. Food Microbiol.* 56, 191–197.
- Arras G., 1996. Mode of action of an isolate of *Candida famata* in biological control of *Penicillium digitatum* in orange fruits. *Postharv. Biol. Technol.* 8, 191–198.
- Ashida S., Shimazaki T., Kitano K., Hara S., 1983. New killer toxin of *Hansenula mrakii*. *Agr. Biol. Chem.* 47, 2953–2955.
- Barnett J.A., Payne R.W., Yarrow D., 2000. In yeasts: Characteristics and identification, 3rd edn, Barnett J.A., Payne R.W., Yarrow D., (eds). Cambridge University Press, Cambridge.
- Bartunek M., Jelinek O., Vondrejs V., 2001. Susceptibility of individual cells of *Saccharomyces cerevisiae* to the killer toxin K1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 283, 526–530.
- Beresford T.P., Fitzsimons N.A., Brennan N.L., Cogan T.M., 2001. Recent advances in cheese microbiology. *Int. Dairy J.* 11, 259–274.
- Bevan, E.A., Herring A.J., Mitchell D.J., 1973. Preliminary characterization of two species of dsRNA in yeast and their relationship to the "killer" character. *Nature (London)* 245, 81–86.
- Bockelmann W., Hoppe-Seyler T., 2001. The surface flora of bacterial smear-ripened cheeses from cow's and goat's milk. *Int. Dairy J.* 11, 307–314.
- Bockelmann W., Willems K.P., Neve H., Heller K.H., 2005. Cultures for the ripening of smear cheeses. *Int. Dairy J.* 15, 719–732.
- Bradford M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Breinig F., Tipper D.J., Schmitt M.J., 2002. Kre1p, The plasma membrane receptor for the yeast K₁ viral toxin. *Cell*, 108, 3, 395–405.
- Breuer U., Harms H., 2006. *Debaryomyces hansenii* – an extremophilic yeast with biotechnological potential. *Yeast*, 23, 415–437.
- Bussey H., Saville D., Hutchins K., Palfree G.E., 1979. Binding of yeast killer toxin to a cell wall receptor on sensitive *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 140, 888–892.
- Bussey H., Vernet T., Sidicu A.M., 1988. Mutual antagonism among killer yeasts: competition between K1 and K2 killers and a novel cDNA-based K1-K2 killer strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Can. J. Microbiol.* 34, 38–44.

- Butler A.R., O'Donnell R.W., Martin V.J., Gooday G.W., Stark M.J.R., 1991. *Kluyveromyces lactis* toxin has an essential chitinase activity. *Eur. J. Biochem.* 483–488.
- Buzzini P., Corazzi L., Turchetti B., Buratta M., Martini A., 2004. Characterization of the in vitro antimycotic activity of a novel killer protein from *Williopsis saturnus* DBVPG 4561 against emerging pathogenic yeasts. *FEMS Microbiol. Lett.* 238, 359–365.
- Buzzini P., Martini A., 2001. Discrimination between *Candida albicans* and other pathogenic species of the genus *Candida* by their differential sensitivities to toxins of a panel of killer yeasts. *J. Clin. Microbiol.* 39, 9, 3362–3364.
- Cabib E., Dongh-Hyun R., Schmidt M., Crotti L.B., Varma A., 2001. The yeast cell wall and septum as paradigms of cell growth and morphogenesis. *J. Biol. Chem.* 267, 23, 19679–19682.
- Cansado J., Velazquez J. B., Sieiro C., Gacto M., Villa T.G., 1999. Presence of non-suppressive, M2-related dsRNAs molecules in *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from spontaneous fermentations. *Microbiol. Lett.* 181, 211–215.
- Cansado J., Longo E., Calo P., Sieiro C., Velázquez J., Villa T., 1991. Role of killer character in spontaneous fermentations from NW Spain: ecology, distribution and significance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 34, 5, 643–647.
- Capece A., Romano P., 2009. "Pecorino di Filiano" cheese as a selective habitat for the yeast species, *Debaryomyces hansenii*. *Int. J. Food Microbiol.* 132, 180–184.
- Carreiro S.C., Pagnocca F.C., Bacci M., Bueno O.C., Mebling M.J.A., Middelhoven W.J., 2002. Occurrence of killer yeasts in leaf-cutting ant nests. *Folia Microbiol.* 47, 3, 259–262.
- Chen W.B., Han Y.F., Jong S.C., Chang S.C., 2000. Isolation, purification, and characterization of a killer protein from *Schwanniomyces occidentalis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (12), 5348–5352.
- Ciani M., Fatichenti F., 2001. Killer Toxin of *Kluyveromyces phaffii* DBVPG 6076 as biopreservative agent to control apiculate wine yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 7, 3058–3063.
- Comitini F., De Ingeniis J., Pepe L., Mannazzu I., Ciani M., 2004a. *Pichia anomala* and *Kluyveromyces wickerhamii* killer toxins as new tools against *Dekkera/Brettanomyces* spoilage yeast. *FEMS Microbiol. Lett.* 238 (1), 235–240.
- Comitini F., Di Pietro N., Zacchi L., Mannazzu I., Ciani M., 2004b. *Kluyveromyces phaffii* killer toxin active against wine spoilage yeasts purification and characterization, *Microbiol.* 150, 2535–2541.
- Comitini F., Mannazzu I., Ciani M., 2009. *Tetrapisispora phaffii* killer toxin is a high specific beta-glucanase that disrupts the integrity of the yeast cell wall. *Microb. Cell Factor.* 8, 55.
- Cong Y.S., Yarrow D., Li Y.Y., Fukuhara H., 1994. Linear DNA plasmids from *Pichia etchellsii*, *Debaryomyces hansenii* and *Wingea robertsiae*, *Microbiol.* 140, 1327–1335.
- Conti S., Magliani W., Arseni S., Dieci E., Frazzi R., Salati A., Varaldo P.E., Polonelli L., 2000. In vitro activity of monoclonal and recombinant yeast killer toxin-like antibodies against antibiotic-resistant gram-positive cocci. *Mol. Medicine*, 6, 7, 613–619.
- Coutinho S.D., Paula C.R., 1998. Biotyping of *Malassezia pachydermatis* strains using the killer system. *Rev. Iberoam. Micol.* 15, 85–87.
- Da Silva G.A., 1996. The occurrence of killer, sensitive, and neutral yeasts in Brazilian Riesling Italic grape must and the effect of neutral strains on killing behavior. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 46, 112–121.
- Da Silva S., Calado S., Lucas C., Aguiar C., 2008. Unusual properties of the halotolerant yeast *Candida nodans* Killer toxin, *CnKT*, *Microbiol. Res.* 163, 243–251.
- Dalton H.K., Board R.G., Davenport R.R., 1984. The yeasts of British fresh sausage and minced beef. *Antonie Leeuwen.* 50, 227–248.
- De Boer E., Kuik D., 1987. A survey of the microbiological quality of blue-veined cheeses. *Neth. Milk Dairy J.* 41, 227–237.

- De Freitas I., Pinon N., Maubois J.-L., Lortal S., Thierry A., 2009. The addition of a cocktail of yeast species to Cantalet cheese changes bacterial survival and enhances aroma compound formation. *Int. J. Food Microbiol.* 129, 37–42.
- De la Peña P., Barros F., Gascon S., Lazo P.S. Ramos S., 1981. Effect of yeast killer toxin on sensitive cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biological Chem.* 256, 20, 10420–10425.
- Deak T., Beuchat L.R., 1996. Handbook of food spoilage. CP Press, New York.
- Deak T., Beuchat L.R., Guerzoni M.E., Lillie A., Peter G., Rohm H., Schnürer F., Tabajdi P.V., Westphal S., 1998. A collaborative study on media for the enumeration of yeasts in foods. *Int. J. Food Microbiol.* 43, 91–95.
- Druvefors U.A., Schnürer J., 2005. Mold-inhibitory activity of different species during airtight storage of wheat grain. *Yeast Res.* 5, 373–378.
- Dura M.A., Flores M., Toldra F., 2004. Effect of growth phase and dry-cured sausage processing conditions on *Debaryomyces spp.* generation of volatile compounds from branched-chain amino acids. *Food Chem.* 86, 391–399.
- Eisfeld K., Riffer F., Menteges J., Schmitt M.J., 2000. Endocytotic uptake and retrograde transport of a virally encoded killer toxin in yeast. *Mol. Microbiol.* 37, 926–940.
- Eliskases-Lechner F., 1996. Yeasts in selected cheese varieties – occurrence, identity and biochemical characteristics, [in:] Jakobsen M., Narvhus J., Viljoen B.C. (ed.), *Yeasts in the dairy industry: Positive and negative aspects*. Proceedings of IDF Symposium, Copenhagen, Denmark, 88–96, 1998.
- Elorza V., Rico H., Sentandreu R., 1983. Calcofluor white alters the assembly of chitin fibrils in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans* cells. *J. Gen. Microbiol.* 129, 1577–1582.
- Encinas J.P., Lopez-Diaz T.M., Garcia-Lopez M.L., Otero A., Moreno B., 2000. Yeast populations on Spanish fermented sausages. *Meat Sci.* 54, 203–208.
- Fatichenti F., Bergere J.L., Deiana P., Farris G.A., 1983. Antagonistic activity of *Debaryomyces hansenii* towards *Clostridium tyrobutyricum* and *Cl. Butyricum*. *J. Dairy Res.* 50 (4), 449–57.
- Ferreira A.D., Viljoen B.C., 2003. Yeasts as adjunct starters in matured Cheddar cheese, *Int. J. Food Microbiol.* 86, 131–140.
- Fleet G. H., 1990. Yeasts in dairy products. *J. Appl. Bacteriol.* 68, 199–211.
- Fleet G.H., 1992. Spoilage yeasts. *Crit. Rev. Biotechnol.* 12, 1–44.
- Flegelová H., Novotná D., Vojtišková K., Janderová B., 2002. Isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mutants with different degree of resistance to killer toxins K1 and K2. *FEMS Yeast Res.* 2, 73–79.
- Flores M., Dura M.A., Marco A., Toldra F., 2004. Effect of *Debaryomyces spp.* on aroma formation and sensory quality of dry-fermented sausages. *Meat Sci.* 68, 439–446.
- Fukuda K., Jin-Shan C., Kawano M., Sudo K., Gunge N., 2004. Stress Responses of linear plasmids from *Debaryomyces hansenii*. *FEMS Microbiol. Lett.* 237, 243–248.
- Fukuda K., Maebuchi M., Takata, H., Gunge N., 1997. The linear plasmid pDHL1 from *Debaryomyces hansenii* encodes a protein highly homologous to the pGKL1 plasmid DNA-polymerase. *Yeast*, 13, 7, 613–620.
- Fukuhara H., 1995. Linear DNA plasmids of Yeasts, *FEMS Microbiol. Lett.* 131, 1–9.
- Gniewosz M., Raczynska A., Bugajewska A., Duszkiwicz-Reinhard W., 1998. Sensitivity of selective strains of *Saccharomyces cerevisiae* to types K1 and K2 killer toxin. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 7/48, 2.
- Golubev W., 2006. Antagonistic Interactions among yeasts, biodiversity and ecophysiology of yeasts. *The Yeast Handbook*, 197–219.
- Golubev W.I., Shabalin Y., 1994. Microcin production by the yeast *Cryptococcus humicola*. *FEMS Microbiol. Lett.* 119, 105–110.
- Gonzalez Siso M.I., 1996. The biotechnological utilization of cheese whey: A review, *Biores. Technol.* 57, 1–11.

- Goto K., Iwatuki Y., Kitano K., Obata T., Hara S., 1990. Cloning and nucleotide sequence of KHR killer gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Aric. Biol. Chem.* 54, 979–984.
- Gotowczyc M., Oberman H., Drewicz E., 1992. Występowanie czynnika killerowego u drożdży. *Bio-technologia* 2 (17), 36–34.
- Guerzoni M.E., Gobbetti M., Lanciotti R., Vannini L., Chaves López C., 1996. *Yarrowia lipolytica* as potential ripening agent in milk products, [in:] Jakobsen M., Narvhus J., Viljoen B.C. (ed.), *Yeasts in the dairy industry: positive and negative aspects*. Proceedings of IDF Symposium, Copenhagen, Denmark, 23–33.
- Gunge N., 1986. Linear DNA killer plasmids from the yeast *Kluyveromyces*. *Yeast*, 2, 153–162.
- Gunge N., Fukuda K., Morikawa S., Murakami K., Takeda M., Miwa A., 1993. Osmophilic linear plasmids from the salt tolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Curr. Genet.* 23, 443–449.
- Gunge N., Tamaru A., Ozawa F., Sakaguchi K., 1981. Isolation and characterization of linear deoxyribonucleic acid plasmids from *Kluyveromyces lactis* and the plasmid-associated killer character. *J. Bacteriol.* 145, 382–390.
- Gunge N., Yamane C., 1984. Incompatibility of linear DNA killer plasmids pGKL1 and pGKL2 from *Kluyveromyces lactis* with mitochondrial DNA from *Saccharomyces cerevisia*, *Bacteriol.* 3, 4, 533–539.
- Guyard C., Seguy N., Cailliez J., Drobecq H., Polonelli L., Dei-Cas E., Mercenier A., Menozzi F., 2002. Characterization of a *Williopsis saturnus* var. *mrakii* molecular weight secreted killer toxin with broad-spectrum antimicrobial activity. *J. Antimicrob. Chemother.* 49, 961–971.
- Heard G.M., Fleet G.H., 1987. Occurrence and growth of killer yeasts during wine fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 2171–2174.
- Heiligenstein S., Eisfeld K., Sendzik T., Jimenez-Becker M., Breining F., Schmitt M.J., 2006. Retrotranslocation viral A/B toxin from the yeast endoplasmic reticulum is independent of ubiquitination and ERAD. *EMBO*, 25, 4717–4727.
- Hernandez A., Martin A., Cordoba M., Benito M.J., Aranda E., Perez-Nevado F., 2008. Determination of killer activity in yeasts isolated from the elaboration of seasoned green table olives. *Int. J. Food Microbiol.* 121, 178–188.
- Hodgson V.J., Button D., Walker G.M., 1995. Anti-Candida activity of a novel killer toxin from the yeast *Williopsis mrakii*. *Microbiol.* 141, 2003–2012.
- Huan B., Shen Y., Bruenin J.A., 1991. In vivo mapping of a sequence required for interference with the yeast killer virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 1271–1275.
- Hutchins K., Bussey H., 1983. Cell Wall Receptor for Yeast Killer Toxin: Involvement of (1-6)- β -D-Glucan. *J. Bacteriol.* 154, 1, 161–169.
- Icho T., Wicker R.B., 1989. The double-stranded RNA genome of yeast virus L-A encodes its own putative RNA polymerase by fusing two open reading frames. *J. Biol. Chem.* 264, 6716–6723.
- Izgü F., Altınbay D., 1997. Killer toxins certain yeast strains have potential growth inhibitory activity on Gram-positive pathogenic bacteria. *Microb.* 89, 15–22.
- Izgü F., Altınbay D., 2004. Isolation and characterization of K-5 type of yeast killer protein and its homology with exo- β -1,3-glucanase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 68, 685–693.
- Izgü F., Altınbay D., Acun T., 2006. Killer toxin of *Pichia anomala* NCYC 432; purification, characterization and its exo- β -1,3-glucanase activity, *Enz. Microb. Technol.* 39, 669–676.
- Izgü F., Altınbay D., Derinel Y., 2004. Immunization of the industrial fermentation starter culture strain of *Saccharomyces cerevisiae* to a contaminating killer toxin-producing *Candida tropicalis*. *Food Microbiol.* 21, 635–640.
- Izgü F., Altınbay D., Sertkaya A., 2005. Enzymatic activity of the K5-type yeast killer toxin and its characterization. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69, 11, 2200–2206.

- Izgü F., Altınbay D., Türeli E., 2007. In vitro activity of panomycocin, a novel exo- β -1,3 glucanase isolated from *Pichia anomala* NCCY 434, against dermatophytes. *Mycoses*, 50 (1), 31–34.
- Izgü F., Altınbay D., Yucelis A., 1997. Identification and killer activity of a yeast contaminating starter cultures of *Saccharomyces cerevisiae* strains used in the Turkish baking industry. *Food Microbiol.* 14, 125–131.
- Jakubowski T., 2006. Gospodarka odpadami na przykładzie wybranych OSM Małopolski. *Inż. Rol.* 12, 199–207.
- Janderova B., Davaasurengijn T., Bendova O., 1986. Hybrid of Brewer's Yeast Obtained by Protoplast Fusion, *Folia Microbiol.* 31, 339–343.
- Juszczak P., Wojtatowicz M., Żarowska B., Chrzanowska J., Malicki A., 2005. Diversity of physiological and biochemical properties within yeast species occurring in Rokpol cheese. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 14/55, 3, 257–261.
- Kagan B.L., 1983. Mode of action of yeast killer toxin: channel formation in lipid bilayer membranes. *Nature*, 302, 709–711.
- Kapsopoulou K., Barouti E., Makroniti A., Kostaki K., 2008. Occurrence of *Saccharomyces cerevisiae* killer yeasts in wine-producing areas of Greece. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 24, 1967–1971.
- Kasahara S., Inoue S.B., Mio T., Yamada T., Nakajima T., Ichisima E., Furuichi Y., Hamada H., 1994. Involvement of cell wall β -glucan in the action of HM-1 killer toxin. *FEBS Lett.* 348, 27–32.
- Kawamoto S., Arai N., Kobayashi M., Kazumitsu K., Hitoshi I., Chinatsu T., Hatori H., Ohno T., Nakamura T., 1990. Isolation and characterization of mutants resistant to killer toxin of *Kluyveromyces lactis*. *J. Ferment. Bioengineer.* 70, 4, 222–227.
- Kimura T., Kitamoto N., Ohta Y., Kito Y., Iimura Y., 1995. Structural relationship among killer toxins secreted from the killer strains of the genus *Williopsis*. *J. Ferment. Bioeng.* 80, 1, 85–87.
- Kimura T., Kitamoto N., Kito Y., Iimura Y., Shirai T., Komiyama Y., Furuichi Y., Sakka K., Ohmiya K., 1997. A novel gene, *RHK1*, is involved in the synthesis of the cell wall receptor for the HM-1 killer toxin that inhibits β -1,3-glucan synthesis. *Mol. Gen. Genet.* 254, 139–147.
- Kimura T., Komiyama Y., Furuichi Y., Iimura Y., Karita S., Sakka K., Ohmiya K., 1999. N-glycosylation is involved in the sensitivity of *Saccharomyces cerevisiae* to HM-1 killer toxin secreted from *Hansenula mrakii* IF0 0895. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51, 176–184.
- Kitamoto H.K., Hasebe A., Ohmomo S., Suto E.G., Muraki M., Imura Y., 1999. Prevention of aerobic spoilage of maize silage by a genetically modified killer yeast, *Kluyveromyces lactis*, defective in the ability to grow on lactic acid. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 4697–4700.
- Kitamoto H. K., Ohmomo S., Amaha K., Nishikawa T., Iimura Y., 1998. Construction of *Kluyveromyces lactis* killer strains defective in growth on lactic acid as a silage additive. *Biotechnol. Lett.* 20, 8, 725–728.
- Kitamoto H.K., Ohmomo S., 1993. Selection of killer yeasts (*Kluyveromyces lactis*) to prevent aerobic deterioration in silage making. *J. Dairy Sci.* 76, 803–811.
- Klassen R., Meinhardt F., 2002. Linear plasmids pWR1A and pWR1B of the yeast *Wingea robertsiae* are associated with killer phenotype. *Plasmid*, 48, 142–148.
- Klassen R., Meinhardt F., 2003. Structural and functional analysis of the killer element pPin-3 from *Pichia inositolovora*. *Mol. Gen. Genomics*, 290, 190–199.
- Klis F.M., Mol P., Hellingwerf K., Brul S., 2002. Dynamic of cells wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* 26, 3, 239–256.
- Kolak D., Leung T., Fleet G.H., 1999. Interactions between yeasts and bacterial species associated with cheese maturation, 2nd Symposium "Yeasts in the dairy industry", Bologna, Italy.
- Komiyama T., Kimura T., Furuichi Y., 2002. Round shape enlargement of the yeast spheroplast of *Saccharomyces cerevisiae* by HM-1 toxin. *Biol. Pharm. Bull.* 25, 8, 959–965.

- Kurtzman C.P., Fell J.W., 2000. The yeasts. A taxonomy study. Fourth edition, Elsevier Science B. V. Amsterdam, Lausanna, New York, Oxford, Shannon, Singapore, Tokyo.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227, 680–685.
- Larsen M., Meinhardt F., 2000. *Kluyveromyces lactis* killer system: Identification of a new gene encoded by pGKL2. *Curr. Genet*, 38, 271–275.
- Leclercq-Perlat M.N., Oumer A., Bergere J.L., Spinnler H.E., Corrieu G., 1999. Growth of *Debaryomyces hansenii* on a bacterial surface-ripened soft cheese. *J. Dairy Res.* 66, 271–281.
- Liu S-Q., Tsao M., 2009. Biocontrol of dairy moulds by antagonistic dairy yeast *Debaryomyces hansenii* in yoghurt and cheese at elevated temperatures. *Food Control*, 20, 852–855.
- Llorente P., Marquina D., Santos A., Peinado J.M. Spencer-Martins I., 1997. Effect of salt on the killer phenotype of yeasts from olive brines. *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (3), 1165–1167.
- Lopes C.A., Sangorrin M.P., 2010. Optimization of killer assays for yeast selection protocols. *Revista Argentina de Microbiología*, 42, 298–306.
- Lopez-Diaz T.M., Santos J.A., Prieto M., Garcia-Lopez M.L., Otero A., 1995. Mycoflora of a traditional Spanish blue cheese. *Neth. Milk Dairy J.* 49, 191–199.
- Lowes K.F., Shearman C.A., Payne J., MacKenzie D., Archer D.B., Meerry R., Gasson M.J., 2000. Prevention of yeast spoilage in feed and food by the yeast mycocin HMK, *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3, 1066–1076.
- Lu J., Esberg A., Huang B., Bystrom A.S., 2008. *Kluyveromyces lactis* c-toxin, a ribonuclease that recognizes the anticodon stem loop of tRNA. *Nucleic Acids Res.* 2008, 36, 4.
- Lu J., Huang B., Wsberg A., Jahansson M.J.H., Bzstron A.S., 2005. The *Kluyveromyces lactis* γ -toxin target tRNA anticodons. *RNA*, 11, 1648–1654.
- Magliani W., Conti S., Gerloni M., Bertolotti D., Polonelli L., 1997. Yeast killer systems. *Clin. Microbiol. Rev.* 10, 3, 369–400.
- Makower M., Bevan, E.A., 1963. The inheritance of the killer character in yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Proceedings of the XI International Congress of Genetics*, 1, 202–203.
- Marquina D., Barroso J., Santos J. Peinado M., 2001. Production and characteristics of *Debaryomyces hansenii* killer toxin. *Microbiol. Res.* 156, 387–391.
- Marquina D., Peres C., Caldas F.V., Marques J.F., Peinado J.M., 1992. Characterization of the yeast population in olive brines. *Lett. Appl. Microbiol.* 14, 279–283.
- Marquina D., Santos A., Peinado J.M., 2002. Biology of killer yeasts. *Inter. Microbiol.* 5, 65–71.
- Martin A., Cordoba J.J., Nunez F., Benito M.J., Asensio M.A., 2004. Contribution of a selected fungal population to proteolysis on dry-cured ham. *Int. J. Food Microbiol.* 94, 55–66.
- Martinac B., Zhu H., Kubalski A., Zhou X.L., Culbertson M., Bussey H., Kung C., 1990. Yeast K1 killer toxin forms ion channels in sensitive yeast spheroplasts and in artificial liposomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 6228–6232.
- McCracken D.A., Martin V.J., Stark M.J. Bolen P.L., 1994. Linear-plasmid-encoded toxin produced by the *Pichia acaciae*: characterization and comparison the toxin of *Kluyveromyces lactis*, *Microbiol.* 140, 425–431.
- Meinhardt F., Klassen R., 2009. Yeast Killer Toxins: Fundamentals and Applications. *The Mycota*, Chapter 6, Sprinige, Berlin.
- Michalčakova S., Sulo P., Slavikova E., 1993. Killer yeasts of *Kluyveromyces* and *Hansenula* genera with potential application in fermentation and therapy. *Acta Biotechnol.* 13 (4), 341–350.
- Middelbeek E.J., Hermans M., Stumm C., 1979. Production, purification and properties of *Pichia kluyveri* killer toxin. *Antoine Leeuwen.* 45, 437–450.
- Mitchell D.J., Bevan E.A., 1987. dsRNA killer system in yeast, [in:] Berry D.R., Russel I., Stewatr G.G. *Yeast Biotechnology*, Allen & UNWIN, London, 104–145.

- Nielsen M.S., Frisvad J.C., Nielsen P.V., 1998. Protection by fungal starters against growth and secondary metabolite production of fungal spoilers of cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 42, 91–99.
- Novotná D., Flegelova H., Janderova B., 2004. Different action of killer toxins K1 and K2 on the plasma membrane and the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 4, 803–813.
- Ohta Y., Tsukada Y., Sugimori T., 1984. Production, purification and characterization of HYI, an anti-yeast substance, produced by *Hansenula saturnus*. *Agric. Biol. Chem.* 42, 1–5.
- Olesten P.T., Stahnke L.H., 2000. The influence of *Debaryomyces hansenii* and *Candida utilis* on the aroma formation in garlic spices fermented sausages and model minces. *Meat Sci.* 56, 357–368.
- Palfree G.E., Bussey H., 1979. Yeast killer-toxin. Purification and characterization of the protein toxin from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 93, 497–493.
- Palpacelli V., Ciani M., Rosini G., 1991. Activity of different killer yeast on strains of yeasts species undesirable in the food industry. *Microbiol. Lett.* 84, 75–78.
- Payne Ch., Bruce A., 2001. The Yeast *Debaryomyces hansenii* as a short-term biological control agent against fungal spoilage of sawn *Pinus sylvestris* timber. *Biol. Control*, 22, 22–28.
- Peng Y., Chi Z-M., Wang X-H., 2009. Purification and molecular characterization of exo- β -1,3-glucanases from the marine yeast *Williopsis saturnus* WC91-2, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85, 1, 85–94.
- Pérez-Nevado F., Albergaria H., Hogg T., Girio F., 2006. Cellular death of two non-*Saccharomyces* wine-related yeasts during mixed fermentations with *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Food Microbiol.* 108, 336–345.
- Pfeiffer P., Radler F., 1982. Purification and characterization of extracellular and intracellular killer toxin of *Saccharomyces cerevisiae* strain 28. *J. Gen. Microbiol.* 128, 2699–2706.
- Pfeiffer P., Radler F., 1984. Comparison of the killer toxin of several yeasts and the purification of a toxin of type K₂. *Arch. Microbiol.* 137(4), 357–361.
- Pintar J., Starmer T., 2003. The cost and benefits of killer toxin production by the yeast *Pichia kluyveri*. *Antonie Leeuwen.* 83, 89–98.
- Polonelli L., Archibusacci C., Sestito M., Morace G., 1983. Killer system: a simple method for differentiating *Candida albicans* strains. *J. Clin. Microbiol.* 17, 774–780.
- Provost F., Polonelli L., Conti S., Fisiacaro P., Gerloni M., Boiron P., 1995. Use of yeast killer system to identify species of the *Nocardia asteroides* complex. *J. Clin. Microbiol.* 33, 1, 8–10.
- Puchkov E. O., 2006. The viability assessment of ethanol-producing yeast by computer-aided fluorescence microscopy. *Microbiol.* 25, 2, 154–160.
- Quchi K., Kawase N., Nakano S., Akiyama H., 1978. Stabilization of yeast killer factor by glycerol. *Agric. Biol. Chem.* 42, 1–5.
- Radler F., Herzberger S., Schönig I., Schwarz P., 1993. Investigation of a killer strain of *Zygosaccharomyces bali*. *J. Gen. Microbiol.* 139, 495–500.
- Radler F., Schmit M.J., Meyer B., 1990. Killer toxin of *Hanseniaspora uvarum*. *Arch. Microbiol.* 154, 175–178.
- Rankine B.C., 1964. Hydrogen sulphite production by yeast, *J. Sci. Food Agric.*, 15, 872–877.
- Riffer F., Eisfeld K., Breining F., Schmitt M.J., 2002. Mutational analysis of K28 preprotoxin processing in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol.* 148, 1317–1328.
- Roostita R., Fleet G.H., 1996. The occurrence and growth of yeasts in Camembert and Blue-veined cheeses. *Int. J. Food Microbiol.* 28, 393–404.
- Santos A., Marquina D., Barroso J., Peinado J.M., 2002. (1-6)-Beta-D-glucan as the cell wall binding site for *Debaryomyces hansenii* killer toxin. *Lett. Appl. Microbiol.* 34 (2), 95–99.
- Santos A. Sánchez A., Marquina D., 2004. Yeasts as biological agents to control *Botrytis cinerea*. *Microbiol. Res.* 259, 331–338.

- Santos A., Marquina D., 2004. Killer toxin of *Pichia membranifaciens* and its possible use as a bio-control agent against grey mould disease of grapevine. *Microbiol.* 150, 2527–2534.
- Santos A., Marquina D., Leal J., Peinado J., 2000. (1-6)- β -D-Glucan as cell wall receptor for *Pichia membranifaciens* killer toxin. *Appl. Environ. Microbiol.* 1809–1813.
- Santos A., Navascués E., Bravo E., Marquina D., 2011. *Ustiligo maydis* killer toxin as a new tool for the biocontrol of the wine spoilage yeast *Brettanomyces bruxellensis*. *Int. J. Food Microbiol.* 145, 147–154.
- Santos A., San Marco M., Bravo E., Marquina D., 2009. PMKT2, a new killer toxin from *Pichia membranifaciens*, and its promising biotechnological properties for control of the spoilage yeast *Brettanomyces bruxellensis*. *Microbiol.* 155, 624–634.
- Schaffrath R., Meinhardt F., 2005. *Kluveromyces lactis* zymocin and other plasmid-encoded yeast killer toxins, [in:] *Microbial protein toxins*, Schmitt M.J., Schaffrath R., Springer-Verlag, 33–155.
- Schaffrath R., Stark M.J.R., Gunge N., Meinhardt F., 1992. *Kluveromyces lactis* killer system: ORF1 of pGKL2 has no function in immunity expression and is dispensable for killer plasmid replication and maintenance. *Curr. Genet.* 21, 357–363.
- Schickel J., Helming C., Meinhardt F., Meacock P.A., 1996. *Kluveromyces lactis* killer system: analysis of cytoplasmic promoters of the linear plasmids. *Nucleic Acids Res.* 24, 1879–1886.
- Schmitt M.J., Breinig F., 2002. The viral killer system in yeast: from molecular biology to application. *FEMS Microbiol. Rev.* 26, 257–276.
- Schmitt M.J., Breinig F., 2006. Yeast viral killer toxins: lethality and self-protection. *Nature Rev. Microbiol.* 4, 213–221.
- Schmitt M.J., Compain P., 1995. Killer toxin-resistant kre 12 mutants of *Saccharomyces cerevisiae*: genetic and biochemical evidence for a secondary K₁ membrane receptor. *Arch. Microbiol.* 164, 435–443.
- Schmitt M.J., Klavehn P., Wang J., Schonong I., Tipper D.J., 1996. Cell cycle studies on the mode of action of yeast K28 killer toxin. *Microbiol.* 142, 2655–2662.
- Schmitt M.J., Radler F., 1988. Molecular structure of the cell wall receptor for killer toxin K28 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 170, 2192–2196.
- Schmitt M.J., Radler F., 1987. Mannoprotein of the yeast cell wall as primary receptor for the killer toxin of *Saccharomyces cerevisiae* strain 28. *J. Gen. Microbiol.* 28, 3346–3354.
- Schmitt M.J., Tipper D.J., 1990. K28, a unique double-stranded RNA killer virus of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 10, 4807–4815.
- Seguy N., Cailliez J.C., Polonelli L., Dei-Cas E., Camus D., 1996. Inhibitory effect of a *Pichia anomala* killer toxin on *Pneumocystis carini* infectivity to the acid mouse. *Parasitol. Reas.* 82, 114–6.
- Seguy N., Polonelli L., Dei-Cas E., Cailliez J.C., 1998. Effect of a killer toxin of *Pichia anomala* to *Pneumocystis*. Perspectives in the control of pneumocystosis. *Immunol. Medical Microbiol.* 22, 145–149.
- Selvakumar D., Miyamoto M., Furuichi Y., Komiyama T., 2006. Inhibition of fungal β -1,3-glucan synthase and cell growth by HM-1 killer toxin single-chain anti-idiotypic antibodies. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 9, 3090–3097.
- Sinigaglia M., Lanciotti R., Guerzoni M.E., 1994. Biochemical and physiological characteristic of *Yarrowia lipolytica* strains in relation to isolation source. *Can. J. Microbiol.* 40, 54–59.
- Slaninová I., Šesták S., Svoboda A., Farkaš V., 2000. Cell wall and cytoskeleton reorganization as the response to hyperosmotic shock in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* 173, 245–252.
- Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T., Mallia A.K., Gartner F.H., Provenzano M.D., Fujimoto E.K., Goeke N.M., Olson B.J., Klenk D.C., 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150, 76–85.

- Sor F., Fukuhara H., 1985. Structure of linear plasmid of the *Kluyveromyces lactis*: compact organization of the killer genome. *Curr. Genet.* 9, 147–155.
- Spencer J.F.T., Spencer D.M., 1981. The use of mitochondrial mutants in hybridisation of industrial yeast. *Curr. Genet.* 4, 177–180.
- Stark M.J.R., Boyd A., 1986. The killer toxin of *Kluyveromyces lactis*: characterization of the subunits and identification of the genes which encode them. *EMBO*, 5, 1995–2002.
- Stark M.J.R., Boyd A., Mileham A.J., Romnos M.A., 1990. The plasmid-encoded killer system of *Kluyveromyces lactis*: a review. *Yeast*, 6, 1–29.
- Stobińska H., Drewicz E., Kręgiel D., Oberman H., 1997. Próby transformacji cechy killerowej drożdży *Saccharomyces cerevisiae* do amylolicznego szczepu *Schwanniomyces occidentalis*. *Biotechnol.* 1, 36, 159–166.
- Stramer W.T., Ganter P.F., Aberdeen V., Lachance M., A., Phaff H.J., 1987. The ecological role of killer yeasts in natural communities of yeasts. *Can. J. Microbiol.* 33, 783–585.
- Stumm C., Hermans J.M.H., Croes A.F., De Vries J.M.L., 1977. Killer sensitive relationships in yeasts from natural habitats. *Antoine Leeuwen.* 43, 125–128.
- Suzuki Ch., Kashiwagi T., Tschiya F., Kunishima N., Morikawa K., Nikkuni S., Arata Y., 1997. Circular dichroism analysis of the interaction between α and β subunits in a killer toxin by a halotolerant yeast, *Pichia farinose*. *Protein Enginer.* 10, 2, 99–101.
- Suzuki Ch., Nikkuni S., 1989. Purification and properties of the killer toxin produced by a halotolerant yeast *Pichia farinose*. *Agr. Biol. Chem.* 53, 2599–2604.
- Suzuki Ch., Nikkuni S., 1994. The primary and subunit structure of a novel type killer toxin produced by a halotolerant yeast. *Pichia farinose*. *J. Biol. Chem.* 269 (4), 3041–3046.
- Suzuki Ch., Yamada K., Okada N., Nikkuni S., 1989. Isolation and characterization of halotolerant killer yeast from fermented foods. *Agr. Biol. Chem.* 53, 10, 2593–2597.
- Takasuka T., Komiyama T., Furuichi Y., Watanabe T., 1995. Cell wall synthesis specific cytotoxic effect of *Hansenula mrakii* toxin-1 on *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell. Mol. Biol. Res.* 41, 575–581.
- Takita M.A., Castihlo-Valavicius B., 1993. Absence of cell wall chitin in *Saccharomyces cerevisiae* leads to resistance to *Kluyveromyces lactis* killer toxin. *Yeast*, 9, 589–598.
- Tempel T., Jakobsen M., 2000. The technological characteristics of *Debaryomyces hansenii* and *Yarrowia lipolytica* and their potential as starter cultures for production of Danablu. *Int. Dairy J.* 10, 4, 263–270.
- Tempel T., Jakobsen M., 1998. Yeasts associated with Danablu. *Int. Dairy J.* 8, 25–31.
- Vadasz A.S., Jagganath D.B., Pretorius I.S., Gupthar A.S., 2000. Electron microscopy of the K_2 killer effect of *Saccharomyces cerevisiae* T206 on a mesophilic wine yeast. *Antoine Leeuwen.* 78, 117–122.
- Vadkertiová R., Sláviková E., 1995. Killer activity of yeasts isolated from the water environment. *Can. J. Microbiol.* 41, 759–766.
- Walker G.M., McLeod A.H., Hodgson V.J., 1995. Interactions between killer yeast and pathogenic fungi. *FEMS Microbiol. Lett.* 127, 213–222.
- Wang X., Chi Z., Yue L., Li J., Li M., Wu L., 2007a. A marine killer yeast against the pathogenic yeast strain in crab (*Portunus trituberculatus*) and an optimization of the toxin production. *Microbiol. Res.* 162 (1), 77–85.
- Wang X., Chi Z., Yue L., Li J., Li M., Wu L., 2007b. Purification and characterization of killer toxin from a marine killer yeast *Pichia anomala* YF07b against the pathogenic yeast strain in crab. *Curr. Microbiol.* 55, 396–401.
- Weiler F., Schmitt M.J., 2003. Zygocin, a secreted antifungal toxin of the yeast *Zygosaccharomyces bailii*, and its effect on sensitive fungal cells. *FEMS Yeast Res.* 3 (1), 69–76.
- Whitaker J.R., Granum P.E., 1980. An absolute method for protein determination based on difference in absorbance at 235 and 280 nm. *Anal Biochem.* 109, 156–159.

- Wickner R.B., 1993. Double-stranded RNA virus replication and packing. *J. Biol. Chem.* 268, 6, 3797–3800.
- Wickner R.B., 1996. Prions and RNA viruses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Genet.* 30, 109–139.
- Wojtatowicz M., Chrzanowska J., Juszczyk P., Skiba A., Gdula A., 2001. Identification and biochemical characteristics of yeast microflora of Rokpol cheese. *Int. J. Food Microbiol.* 69, 135–140.
- Wojtatowicz M., Żarowska B., Kieźel X., Chrzanowska J., 2002. Aktywność killerowa izolatów drożdży z serów pleśniowych. *ACTA Sci. Pol. Biotechnol.* 1 (1–2), 89–98.
- Woods D.R., Bevan E.A., 1968. Studies on the nature of the killer factor produced by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* 51, 115–126.
- Worsham P.L., Bolen P.L., 1990. Killer toxin production in *Pichia acaciae* is associated with linear DNA plasmids. *Curr. Genet.* 18 (1), 77–80.
- Wyder M.T., Puhani Z., 1999. Role of selected yeasts in cheese ripening: an evaluation in aseptic cheese curd slurries. *Int. Dairy J.* 9, 117–124.
- Yamamoto T., Hiratani T., Hirata H., Imai M., Yamaguchi H., 1986a. Killer toxin from *Hansenula mrakii* selectively inhibits cell wall synthesis in a sensitive yeast. *FEBS Lett.* 197 (1–2), 50–54.
- Yamamoto T., Imai M., Tachibana K., Mayumi M., 1986b. Application of monoclonal antibodies to the isolation and characterization of a killer toxin secreted by *Hansenula mrakii*. *FEBS Lett* 195(1–2), 253–257.
- Yamamoto T., Uchida K., Hiratani T., 1988. In vitro activity of the killer toxin from yeast *Hansenula mrakii* against yeasts and molds. *J. Antibiotics.* XLI, 3, 338–402.
- Yoshiuchi K., Watanabe M., Nishimura A., 2000. Breeding of a non-urea producing sake yeast with killer character using a *kar1-1* mutant as a killer donor. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 24, 203–209.
- Young T.W., Yagiu M.A., 1978. A comparison of the killer character in different yeasts and its classification. *Antoine Leeuwen.* 44, 59–77.
- Zagorc T., Maráz A., Cadez N., Povhe Jemec K., Péter G., Resnik M., Nemani J., Raspor P., 2001. Indigenous wine killer yeasts and their application as a starter culture in wine fermentation. *Food Microbiol.* 18 (4), 441–451.
- Zhu H., Bussey H., 1989. The K1 Toxin of *Saccharomyces cerevisiae* kills spheroplasts of many yeast species. *Appl. Environ. Microbiol.* 55 (8): 2105–2107.
- Zhu H., Bussey H., 1991. Mutational analysis of the functional domains of yeast K1 killer toxin. *Mol. Cell. Biol.* 11, 175–181.
- Zorg J., Kilian S., Radler F., 1988. Killer toxin producing strains of the yeasts *Hanseniaspora uvarum* and *Pichia kluyveri*. *Arch. Microbiol.* 149, 261–267.
- Żarowska B., Wojtatowicz M., Połomska X., 2009. Kinetyka procesu biosyntezy toksyn killerowych przez drożdże *Debaryomyces Hansenie*. *Inż. i Aparat. Chem.* 3/2009, 127–129.
- Żarowska B., Wojtatowicz M., Połomska X., Juszczyk P., Chrzanowska J., 2004. Factors affecting killer activity of some yeast species occurring in Rokpol cheese. *Folia Microbiol.* 49 (6), 713–717.

Biosynthesis and characteristics of *Debaryomyces hansenii* killer toxin

Summary

The aim of the study was to assess of the environmental and genetic conditions of killer toxins biosynthesis by *Debaryomyces hansenii* yeast strains and to determine the structure, properties and biological activity spectrum of those toxins.

The subjects of the evaluation were three *D. hansenii* yeast strains: AII4b, MI1a and KI2a, isolated from mould cheese Rokpol. Those strains are deposited in the Department of Biotechnology and Food Microbiology Culture Collection at Wrocław University of Environmental and Life Sciences.

The survey comprised the establishment of conditions for effective killer toxin biosynthesis by *D. hansenii* yeasts and their separation from yeast cultures and purification, the determination of their biochemical characteristics and the activity spectrum against various microorganisms. There was also made an attempt to elucidate the mode of action of killer toxins as well as location of genes coding them.

Debaryomyces hansenii yeasts produced killer toxins most effectively in synthetic medium containing glucose as carbon source and peptone as nitrogen source, at pH = 4.5. Whey was also appropriate medium for production of killer toxins.

Each of tested yeast strains biosynthesized different killer toxin. The toxin of *D. hansenii* KI2a was composed of two active proteins of molecular weight 46 and 78 kDa. In the toxin preparations from two others strains (AII4b and MI1a) single proteins were observed of molecular weight of 232 and 152 kDa, respectively. Loss of killer proteins activity in the presence of b-mercaptoethanol suggests their multi-subunit structure. Killer toxins of *D. hansenii* were stable within temperature range from 10 to 30°C and pH value from 3.5 to 5.0. The highest activity was detected at temperature 10°C and pH 3.0–4.5.

The action of *D. hansenii* toxins was directed against yeasts and filamentous fungi of following genera: *Candida*, *Schwanniomyces*, *Yarrowia*, *Absidia*, *Aspergillus*, *Botritis*, *Rhizopus* and *Trichodema*. Toxins did not affect the growth of bacteria belonging to genera: *Bacillus*, *Escherichia*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Sarcina*, *Serratia* and *Streptococcus*.

The killer toxins mode of action lies probably in their binding to β -(1,6)-glucan in cell wall of sensitive cells and subsequently to another, unspecified receptor in cell membrane and suppression of cell division what results in cell death.

Genes encoding killer toxin proteins in *D. hansenii* are located in genomic DNA, as implied by the fact of killer activity found in strains deficient in linear plasmids, as well as the reference killer strain with no plasmids and potential dsRNA particles in the process of recovery. *In silico* analysis revealed homology between encoding sequences of toxins from *P. acaciae*, *P. etchellsii* and *D. robertsiae* and the sequence in *D. hansenii* CBS 767, indicating possible position of toxin encoding sequences within the area of chromosomes B and F of *D. hansenii*.

Key words: *Debaryomyces hansenii*, killer toxins, killer activity, mode of action

Biosynteza i charakterystyka toksyn killerowych drożdży *Debaryomyces hansenii*

Streszczenie

Celem pracy było określenie środowiskowych i genetycznych uwarunkowań biosyntezy toksyn killerowych przez drożdże *Debaryomyces hansenii* oraz poznanie budowy, właściwości i spektrum biologicznej aktywności tych toksyn.

Przedmiotem badań były trzy killerowe szczepy *D. hansenii* AII4b, MI1a i AII4b wyizolowane z serów pleśniowych Rokpoł, pochodzące z kolekcji własnej Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu.

Badania obejmowały ustalenie warunków dla efektywnej syntezy toksyn killerowych przez drożdże *D. hansenii*, wydzielenie białek killerowych z hodowli drożdży i ich oczyszczanie, biochemiczną charakterystykę białek killerowych, określenie spektrum ich aktywności bójczej wobec różnych mikroorganizmów, wyjaśnienie mechanizmu działania toksyn killerowych oraz określenie lokalizacji genów odpowiedzialnych za aktywność killerową u drożdży *D.hansenii*.

Drożdże *D. hansenii* najefektywniej produkowały toksyny killerowe w podłożu syntetycznym zawierającym glukozę jako źródło węgla i pepton jako źródło azotu, przy pH 4,5. Dobrym podłożem do biosyntezy toksyn była również serwatka.

Badane szczepy tworzyły różne toksyny killerowe. Toksyna szczepu *D. hansenii* KI2a cechowała się obecnością dwóch aktywnych białek o masach 46 kDa i 78 kDa. W preparatach toksyn dwóch pozostałych szczepów (AII4b i MI1a) stwierdzano pojedyncze białka o masie cząsteczkowej odpowiednio powyżej 232 i około 152 kDa. Utrata aktywności bójczej białek killerowych pod wpływem β -merkaptetanolu wskazuje na ich podjednostkową budowę. Toksyny killerowe drożdży *D. hansenii* były stabilne w zakresie temperatur od 10 do 30°C i wartości pH od 3,5 do 5. Najwyższą aktywność wykazywały w temperaturze 10 i 14°C oraz pH 3,0–4,5.

Aktywność bójcza toksyn *D. hansenii* była skierowana wobec drożdży i grzybów strzępkowych, przedstawicieli rodzajów: *Candida*, *Schwanniomyces*, *Yarrowia*, *Absidia*, *Aspergillus*, *Botritis*, *Rhizopus* i *Trichodema*. Toksyny te nie oddziaływały natomiast na wzrost bak-

terii będących reprezentantami rodzajów, takich jak: *Bacillus*, *Escherichia*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Sarcina*, *Serratia* i *Streptococcus*.

Prawdopodobny mechanizm działania toksyn killerowych drożdży *D. hansenii* obejmuje wiązanie się tych białek z β -(1,6)-glukanem ściany komórkowej drożdży wrażliwych, następnie z kolejnym, niezidentyfikowanym receptorem obecnym w błonie cytoplazmatycznej oraz hamowanie podziałów komórkowych prowadzące do śmierci komórek.

Geny kodujące białka killerowe u drożdży *D. hansenii* zlokalizowane są w genomowym DNA, o czym świadczy aktywność killerowa szczepów nieposiadających liniowych plazmidów oraz referencyjnego szczepu killerowego pozbawionego plazmidów i ewentualnych cząstek dsRNA w procesie leczenia. Analiza „*in silico*” wykazała homologię pomiędzy sekwencjami kodującymi toksyny u drożdży *P. acaciae*, *P. etchellsii* i *D. robertsiae* a sekwencją szczepu *D. hansenii* CBS 767 i wskazała na lokalizację genów kodujących toksyny w obrębie chromosomów B i F.

Słowa kluczowe: *Debaryomyces hansenii*, toksyny killerowe, aktywność bójcza, mechanizm działania