

STRESZCZENIE

Zjawisko killerowe u drożdży związane jest z wytwarzaniem toksyn (białek) killerowych, które działają bójczo na wrażliwe szczepy innych drożdży, grzybów strzępkowych i bakterii. Aktywność killerowa jest cechą szeroko rozpowszechnioną wśród szczepów izolowanych z naturalnych środowisk. Potencjalne zastosowanie drożdży killerowych i produkowanych przez nie toksyn obejmuje różne gałęzie przemysłu. W browarnictwie, winiarstwie, serowarstwie drożdże killerowe mogą być wykorzystywane jako kultury starterowe, zabezpieczające przed zakażeniami i rozwojem drożdży niepożądanych. Ponadto szczepy killerowe dzięki aktywności bójczej przeciwko patogennym grzybom mogą stanowić ciekawą alternatywę dla chemicznych środków ochrony roślin, zabezpieczając i przedłużając trwałość upraw i plonów. Celem pracy była charakterystyka i otrzymywanie toksyn killerowych wydzielanych przez nowo wyizolowane szczepy drożdży i grzybów drożdżopodobnych. W pierwszym etapie badań wśród 165 uzyskanych izolatów pozytywną aktywność killerową obserwowano u 39 (23,63%) izolatów, natomiast 12 (7,27%) wykazywało słabą aktywność killerową. Na podstawie ilości szczepów wrażliwych i wielkości obserwowanych stref zahamowania ich wzrostu wybrano 10 izolatów, które genetycznie sklasyfikowano do 5 gatunków, w tym 2 gatunków grzybów drożdżopodobnych *Aureobasidium pullulans* i *A. melanogenum* oraz 3 gatunków drożdży *Metschnikowia pulcherrima*, *M. zizyphicola* i *Schwanniomyces vanrijiae*. Do dalszych badań wybrano *A. pullulans*-32a, z hodowli którego uzyskano preparaty białkowe o najwyższej aktywności killerowej. Optymalnymi warunkami zarówno do biosyntezy jak i działania toksyny killerowej *A. pullulans* okazała się temperatura 22°C i podłoże o pH 4,5, z dodatkiem 10 g/l NaCl. Do efektywnego oczyszczania toksyny killerowej *A. pullulans* wykorzystano chromatografię oddziaływań hydrofobowych, a następnie sączenie molekularne, określono również masę cząsteczkową aktywnego białka *A. pullulans* na poziomie 12 kDa. Na podstawie analizy składu aminokwasowego białko *A. pullulans*-32a wykazało najwyższą homologię na poziomie 36 % z hipotetical protein M438DRAFT_350283 *Aureobasidium pullulans* EXF-150. Toksyna killerowa *A. pullulans* wykazywała szerokie spektrum działania zarówno wobec drożdży z rodzaju *Candida*, *Dekkera*, *Hansenula*, *Rhodotorula*, jak i grzybów strzępkowych z rodzaju *Aspergillus*, dzięki temu może być wykorzystana do ochrony procesów fermentacyjnych przed zakażeniami wywołanymi obecnością mikroflory niepożądaną i w biologicznej ochronie płodów rolnych, głównie owoców, jako alternatywa dla chemicznych fungicydów.

ABSTRACT

The killer phenomenon in yeast is associated with the production of killer toxins (proteins) that act lethally on sensitive strains of other yeasts, filamentous fungi and bacteria. Killer activity is a widespread feature among strains isolated from natural environments. The potential use of killer yeasts and the toxins they produce covers various industries. In brewing, winemaking and cheesemaking, killer yeast can be used as starter cultures to protect products against infections and the growth of unwanted yeasts. Furthermore, killer strains, thanks to their lethal properties against pathogenic fungi can be an interesting alternative to chemical plant protection products, securing and extending the durability of crops. The aim of the study was to characterize and obtain killer toxins secreted by newly isolated strains of yeasts and yeast-like fungi. In the first stage of the study, among 165 isolates obtained, positive killer activity was observed in 39 (23.63%) isolates, while 12 (7.27%) showed weak killer activity. Based on the number of sensitive strains and the size of the growth inhibition zones, 10 isolates were selected, which were genetically classified into 5 species, including 2 species of yeast-like fungi *Aureobasidium pullulans* and *A. melanogenum*, and 3 yeast species *Metschnikowia pulcherrima*, *M. zizyphicola* and *Schwanniomyces vanrijiae*. *A. pullulans*-32a was selected for further research, from which the protein preparations with the highest killer activity were obtained. The temperature of 22°C and a medium at pH 4.5, supplemented with 10 g/l NaCl have proved to be optimum conditions both for the biosynthesis and action killer toxin *A. pullulans*. For effective purification of *A. pullulans* killer toxin, chromatography of hydrophobic interactions was used followed by molecular filtration. The molecular weight of *A. pullulans* active protein was determined as 12 kDa. Based on the analysis of the amino acid composition, *A. pullulans*-32a showed the highest homology at the level of 36% from hypothetical protein M438DRAFT_350283 *Aureobasidium pullulans* EXF-150. *A. pullulans* killer toxin showed a broad spectrum of activity against both yeasts of the genus *Candida*, *Dekker*, *Hansenula*, *Rhodotorula* and filamentous fungi of the genus *Aspergillus*, thanks to these properties, it can be used to protect fermentation processes against infections caused by the presence of unwanted microflora and may find application in the biological protection of yields, especially fruits, as alternatives to chemical fungicides.