



---

(54) **Sposób otrzymywania preparatu zawierającego toksyny killerowe  
oraz preparat przeciwgrzybiczy**

---

(43) Zgłoszenie ogłoszono:  
**19.12.2016 BUP 26/16**

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:  
**28.09.2018 WUP 09/18**

(73) Uprawniony z patentu:  
**SKOTAN SPÓŁKA AKCYJNA, Chorzów, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:  
**BARBARA ŻAROWSKA, Wrocław, PL**  
**XYMENA POŁOMSKA, Sobótka, PL**  
**MONIKA GRZEGORCZYK, Wrocław, PL**  
**PIOTR REGIEC, Oława, PL**  
**EWELINA GUDAROWSKA, Wilkszyn, PL**  
**MARTA CZAPLICKA-PĘDZICH, Pilchowice, PL**  
**IRENEUSZ SOSNA, Wrocław, PL**  
**ADAM FIGIEL, Wrocław, PL**  
**MARTA PASŁAWSKA, PL**  
**MAŁGORZTA SEROWIK, Wrocław, PL**  
**MARIUSZ NEJMAN, Wrocław, PL**  
**JERZY BARŁÓG, Chrzęstawa Mała, PL**  
**MAREK SZOŁTYSIK, Pruszwice, PL**

(74) Pełnomocnik:  
**rzecz. pat. Rafał Witek**

---

## Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania preparatu zawierającego toksyny killerowe przy udziale drożdży należących do gatunku *Debaryomyces hansenii* (znanych również pod nazwą *Candida famata*), który może znaleźć zastosowanie do ochrony roślin sadowniczych, płodów rolnych oraz roślin użytkowych przed rozwojem fitopatogennych grzybów oraz preparat przeciwgrzybiczy, zwłaszcza do ochrony roślin sadowniczych, płodów rolnych oraz roślin użytkowych, który w korzystnej realizacji może być otrzymany tym sposobem.

Znane jest antagonistyczne działanie komórek drożdży, w tym również drożdży killerowych, względem grzybów będących patogenami roślin [Walker et al. 1995, McGuire 1994, Wiśniewski et al. 1991].

Znane jest antagonistyczne działanie komórek drożdży innych gatunków niż *Debaryomyces hansenii*, w tym również produkowanych przez niektóre z nich toksyn killerowych, względem grzybów porażających owoce. Wykazano ochronę jabłek i gruszek przeciwko *Botrytis cinerea* i *Penicillium expansum* [Nunes et al. 2002, Vinas et al. 1998, Santos i wsp., 2004], grejpfrutów i pomarańczy przeciwko *Penicillium digitatum* [Droby et al. 1989, McGuire R.G. 1994 Platania i wsp., 2012] oraz winogron przeciwko *Botrytis cinerea* [Santos i Marquina, 2004].

Znane jest również działanie innych gatunków drożdży niż *Debaryomyces hansenii* przeciwko *Botrytis cinerea* na krzewach winorośli [Masih et al. 2001].

Znane jest antagonistyczne działanie komórek drożdży *Debaryomyces hansenii* względem grzybów *Penicillium digitatum* skażających grejpfruty i pomarańcze [Droby et al. 1989, Arras 1996].

Znany jest sposób produkcji toksyn killerowych przez różne gatunki drożdży w podłożu zawierającym glukozę (10 g/l), pepton proteozowy (5 g/l) i ekstrakt drożdżowy (3 g/l), ekstrakt słodowy (3 g/l) zbuforowanym 0,2M buforem fosforanowo-cytrynianowym o pH 4,0 [Santos i wsp., 2004. Marquina et al. 2001].

Znany jest sposób produkcji toksyn killerowych przez różne gatunki drożdży w tym należące do gatunku *Debaryomyces hansenii* w podłożu zawierającym glukozę (20 g/l), pepton bakteriologiczny (20 g/l) i ekstrakt drożdżowy (10 g/l), sporządzonym w buforze fosforanowo-cytrynianowym o pH 4,5-4,6 [Da Silva i wsp., 2008; Schmitt i Radler, 1987; Wang i wsp., 2007a, b, Żarowska et al. 2009]. Jednak preparaty otrzymywane tym sposobem wykazują względnie niską aktywność.

Znane jest zagęszczanie preparatów toksyn killerowych drożdży *Debaryomyces hansenii* poprzez ultrafiltrację na membranie o punkcie 18 kDa i odparowanie pod próżnią [Żarowska et al., 2014].

Znane jest utrwalanie preparatów toksyn killerowych drożdży *Debaryomyces hansenii* poprzez liofilizację i suszenie rozpyłowe (w warunkach laboratoryjnych) w temperaturze na wlocie do suszarki 100°C, przy czym opisana metoda nie zapewnia dostatecznej wydajności pozyskania preparatu w formie sproszkowanej oraz pożądanego poziomu aktywności preparatu [Żarowska et al., 2014].

Ujawniono również, że drożdże *Debaryomyces hansenii* szczepu A114b wytwarzają toksyny killerowe [Żarowska Barbara, 2012]. W tej samej publikacji opisano również wyniki badań mających na celu ustalenie warunków hodowli zapewniających najwyższą wydajność produkcji toksyn killerowych i zasugerowano, że do uzyskania produkcji toksyn killerowych podczas hodowli *Debaryomyces hansenii* w podłożu syntetycznym wymagane jest stosowanie w podłożu produkcyjnym białkowych form azotu (peptonu). Jednocześnie ujawniono, że najlepsze efekty uzyskuje się podczas hodowli w bulionie YPG o pH 4,5, które jest pełnym podłożem hodowlanym zawierającym ekstrakt drożdżowy, pepton, glukozę i bufor cytrynianowo-fosforanowy.

Ponadto ujawniono [Żarowska B., Wojtatowicz M., Połomska X., 2009], że hodowla *Debaryomyces hansenii* na pełnym podłożu hodowlanym pozwalała uzyskać preparat toksyn killerowych o aktywności w zakresie 60–70 U/ml.

Ponadto, Sarlin i Philip (2013) optymalizując w swojej pracy skład podłoża hodowlanego opartego na melasie stwierdzili, że „melasa (zawartość ogólna cukrów 9 mg/ml) uzupełniona peptonem (0,75%), ekstraktem drożdżowym (0,5%) i MgSO<sub>4</sub> (0,25%) sprzyja maksymalizacji wzrostu czterech badanych szczepów” (w tym 2 szczepów *D. hansenii*).

Celem wynalazku jest dostarczenie preparatu cechującego się wysoką aktywnością biologiczną i nadającego się do ochrony roślin sadowniczych, płodów rolnych oraz roślin użytkowych przed rozwojem fitopatogennych grzybów. Kolejnym celem wynalazku jest dostarczenie przemysłowego sposobu otrzymywania takiego preparatu, przy czym sposób ten nie powinien wymagać stosowania laboratoryjnych podłoży hodowlanych zawierających pepton, ekstrakt drożdżowy i/lub glukozę.

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania preparatu zawierającego toksyny killerowe charakteryzujący się tym, że drożdże *Debaryomyces hansenii*, zdeponowane w kolekcji kultur komórkowych Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) w Utrechcie pod numerem dostępu CBS 140023, hoduje się w roztworze wodnym o wartości pH od 3 do 5 zawierającym od 2 do 6% wag. melasy buraczanej oraz od 0,5 do 3% wag. namoku kukurydzianego, korzystnie w temperaturze od 10 do 20°C, do uzyskania przez drożdże *D. hansenii* fazy stacjonarnej wzrostu, następnie oddziela się biomasę, korzystnie przez wirowanie, a pozostały supernatant zagęszcza metodą nanofiltracji, a uzyskany w ten sposób zagęszczony płyn utrwała się na cele przechowalnicze, zwłaszcza metodą suszenia rozpyłowego. Równie korzystnie, zagęszczony płyn utrwała się na cele przechowalnicze poprzez mrożenie w temp. w zakresie od -15 do -22°C.

W alternatywnej korzystnej realizacji wynalazku, biomasę uzyskaną po procesie wirowania, a następnie mrożoną w temp. w zakresie od -15 do -22°C, zawiesza się w wodzie wodociągowej. Równie korzystnie, biomasę uzyskaną po procesie wirowania, suszy się metodą suszenia rozpyłowego.

Kolejnym przedmiotem wynalazku jest preparat przeciwgrzybiczy, zwłaszcza do ochrony roślin sadowniczych, płodów rolnych oraz roślin użytkowych charakteryzujący się tym, że zawiera toksyny killerowe wytwarzane przez drożdże *Debaryomyces hansenii* zdeponowane w kolekcji kultur komórkowych Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) w Utrechcie pod numerem dostępu CBS 140023, przy czym aktywność preparatu wynosi co najmniej 750 U/ml.

Preparat może być otrzymany opisanym powyżej sposobem z zagęszczonego płynu pochodzącego.

Nieoczekiwanie okazało się, że możliwe jest wykorzystanie preparatów zawierających toksyny killerowe drożdży *Debaryomyces hansenii* do ochrony roślin sadowniczych, płodów rolnych oraz roślin użytkowych przed rozwojem fitopatogennych grzybów.

Nieoczekiwanie, przedmiotowy wynalazek dostarcza sposób produkcji gotowego preparatu zawierającego toksyny killerowe drożdży *Debaryomyces hansenii* wykorzystujący produkty uboczne przemysłu spożywczego takie jak melasa buraczana i namok kukurydziany, zagęszczonego poprzez nanofiltrację i utrwalanego przez mrożenie lub suszenie rozpyłowe w temperaturze na wlocie do komory suszenia 140–200°C, umożliwiające uzyskanie preparatów o wysokiej aktywności biologicznej.

W korzystnej realizacji: do stabilizacji pH w podłożu hodowlanym stosowany jest kwas nieorganiczny, prędkość podawania surowca do komory suszenia zapewnia uzyskanie temperatury mierzonej na wyjściu z komory od 70 do 90°C, warunki rozpylania zapewniają uzyskanie kropelek o wielkości od 12 µm do 17 µm, i/lub strumień powietrza przepływającego przez komorę zapewnia prawidłowy proces odbioru wilgoci i umożliwia uzyskanie sproszkowanego preparatu o aktywności wody w przedziale 0,142–0,165.

Zaletą wynalazku jest możliwość produkcji preparatu zawierającego toksyny killerowe *Debaryomyces hansenii*, działającego hamująco względem fitopatogennych grzybów, z wykorzystaniem materiałów ubocznych pochodzących z przemysłu spożywczego: melasy buraczanej i namoku kukurydzianego. Takie rozwiązanie umożliwia nieporównywalnie tańszą produkcję preparatu, niż w znanych dotychczas podłożach. Dodatkowo otrzymuje się od 15 do 25 g/l suchej masy drożdży, która również może znaleźć zastosowanie przeciwko fitopatogennym grzybom.

Przedmiot wynalazku przedstawiono na przykładach:

#### P r z y k ł a d 1

Do podłoża produkcyjnego zawierającego w 1 l wody wodociągowej 20 g melasy oraz 10 g namoku kukurydzianego wprowadza się inokulum drożdży *Debaryomyces hansenii* All4b, korzystnie w ilości 10% objętości roboczej.

Szczep *Debaryomyces hansenii* i All4b został zdeponowany dnia 19 maja 2015 roku zgodnie z traktatem budapesztańskim w Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) w Utrechcie, Holandia pod numerem depozytowym CBS 140023.

Inokulum przygotowuje się w tym samym podłożu, na wstrząsarce przy szybkości 150–200 obr/min., w temperaturze 22°C przez 3 dni. pH podłoża ustala się na poziomie 4,0 i kontroluje za pomocą roztworu HCl. Hodowlę właściwą prowadzi się w temp. 14°C, przy szybkości obrotowej mieszadła 400 obr/min i szybkości napowietrzania 200–600 ml/min do osiągnięcia przez drożdże fazy stacjonarnej wzrostu. Po hodowli biomasę oddziela się od płynu pochodzącego poprzez wirowanie. Supernatant zawierający toksyny killerowe zagęszcza się siedmiokrotnie metodą nanofiltracji, po czym suszy w przeciwprądowej suszarce rozpyłowej, w warunkach: temperatura surowca 8°C, temperatura na wlocie 165°C, prędkość podawania surowca 4750 ml/h, ciśnienie powietrza w dyszy 0,27 MPa.

Uzyskuje się preparat o aktywności 800–900 U/ml przy biomacie drożdży w ilości 15 g/l.

Aktywność killerową oznacza się za pomocą dyfuzyjnego testu płytkowego. W tym celu agarowe podłoże YPG o pH 4,6 zawierające 0,03% błękitu metylenowego zaszczenia się kulturą szczepu wrażliwego do końcowej gęstości  $5 \times 10^5$  kom/ml. W tak przygotowanych płytkach wycina się korkoborem studzienki o średnicy 6 mm, do których wprowadza się 100  $\mu$ l preparatu zawierającego toksyny killerowe. Płytki pozostawia się na około 8 godz. w temp. 4°C celem dyfuzji toksyny do podłoża, po czym inkubuje w temp 14°C przez 48 godz. Powstałe wokół studzienek strefy zahamowania wzrostu mierzy się suwmiarką.

Za jednostkę aktywności przyjmuje się takie stężenie białka killerowego, które powoduje strefę zahamowania wzrostu szczepu wrażliwego (promień pomniejszony o promień studzienki) o wielkości 2 mm.

Zaobserwowano liniową zależność pomiędzy logarytmem naturalnym objętości preparatu toksyny (y), a wielkością strefy inhibicji (x) wzorcowego wrażliwego szczepu *Y. lipolytica* P116a. Dla toksyny otrzymywanej z użyciem szczepu *D. hansenii* A114b zależność ta przedstawia się następująco:

$$- \text{A114b: } y = 1,5735 \ln(x) + 1,8645; \text{ wsp. korelacji } R^2 = 0,9791$$

Preparat toksyny, uzyskany opisanym powyżej sposobem, po rozpuszczeniu w wodzie do stężenia roboczego wynoszącego około 8% i zastosowaniu w postaci oprysków w trakcie okresu wegetacji roślin, wykazuje aktywność zarówno na liściach jak i owocach, szczególnie przeciwko parchowi jabłoni (*Venturia inaequalis*) oraz szarej pleśni (*Botrytis cinerea*) truskawek i winorośli. Opryski stosuje się w okresie infekcji pierwotnych.

#### Przykład 2

Postępuje się jak w przykładzie 1, z tym, że supernatant zagęszczony metodą nanofiltracji mrozi się w temp. -20°C. Preparat charakteryzuje się tą samą aktywnością, co preparat z przykładu 1.

#### Przykład 3

Postępuje się jak w przykładzie 1, z tym, że podłoże produkcyjne zawiera 60 g/l melasy buraczanej i 10 g/l namoku kukurydzianego. Otrzymany preparat cechuje się aktywnością na poziomie 750–800 U/ml przy biomacie drożdży w ilości 23 g/l. Preparat charakteryzuje się tą samą aktywnością, co preparat z przykładu 1.

#### Przykład 4

Postępuje się jak w przykładzie 1, z tym, że biomasę drożdży pozyskaną po wirowaniu mrozi się w temp. -20°C, następnie zawiesza w wodzie wodociągowej do zawartości 20 g/l suchej masy komórek i stosuje w postaci oprysków w trakcie okresu wegetacji roślin. Preparat wykazuje aktywność zarówno na liściach jak i owocach szczególnie przeciwko parchowi jabłoni (*Venturia inaequalis*) oraz szarej pleśni (*Botrytis cinerea*) truskawek i winorośli.

#### Przykład 5

Postępuje się jak w przykładzie 4, z tym, że biomasę drożdży pozyskaną po wirowaniu suszy w przeciwną stronę suszarce rozpyłowej, w warunkach: temperatura surowca 8°C, temperatura na wlocie 165°C, prędkość podawania surowca 4750 ml/h, ciśnienie powietrza w dyszy 0,27 MPa, następnie zawiesza w wodzie wodociągowej do zawartości 20 g/l suchej masy komórek i stosuje w postaci oprysków w trakcie okresu wegetacji roślin. Preparat charakteryzuje się tą samą aktywnością, co preparat z przykładu 4.

#### Literatura

1. 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
2. Da Silva S., Calado S., Lucas C., Aguiar C., 2008, Unusual properties of the halotolerant yeast *Candida nodaensis* Killer toxin, CnKT, Microbiol. Res., 163, 243–251
3. Droby S., Chalutz E., Wilson C.L., Wisniewski M.E., 1989, Characterisation of the biological control activity of *Debaryomyces hansenii* in the control of *Penicillium digitatum* on grapefruit. Can. J. Microbiol., 35, 794–800.
4. Masih E.I., Slezack-Deschaumes S., Marmaras I., Ait Barka E., Vernet G., Charpentier C., Adholeya A., Paul B. 2001. Characterization of the yeast *Pichia membranifaciens* and its possible use in the biological control of *Botrytis cinerea*, causing the grey mould disease of grapevines. FEMSMicrobiol. Lett. 202,227–232.
5. McGuire R.G. 1994. Application of *Candida guilliermondii* in commercial citrus coatings for biological control of *Penicillium digitatum* on grapefruits. Biol. Control, 4, 1-7.

6. Nunes C., Usall J., Teixidó N., Fons E., Viñas I, 2002. Postharvest biological control by *Pan-toea agglomerans* (CPA-2) on golden delicious apples. *Journal of Applied Microbiology*. 92: 247–255.
7. Pathissery J. Sarlin i wsp. „Amolasses Based Fermentation Medium for Marine Yeast Bio-mass Production”, *International Journal of Research in Marine Science*. 2013; (2), 39–44.
8. 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.
9. Platania C, Restuccia C, Muccilli S, Cirvilleri G., 2012, Efficacy of killer yeasts in the biological control of *Penicillium digitatum* on Tarocco orange fruits (*Citrus sinensis*), *Food Microbiol.*, 30(1), 219–25.
10. Santos A. Sánchez A., Marquina D., 2004, Yeasts as biological agents to control *Botrytis cinerea*, *Microbiol. Res.*, 159, 331–338.
11. Santos A., Marquina D., 2004, Killer toxin of *Pichia membranifaciens* and its possible use as a biocontrol agent against grey mould disease of grapevine, *Microbiol.*, 150, 2527–2534.
12. 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.
13. Vinas, I., Usall, J., Teixido', N., Sanchis, V., 1998. Biological control of major postharvest pathogens on apple with *Candida sake*. *Int. J. Food Microbiol.* 40, 9–16.
14. Walker G.M., McLeod A.H., Hodgson V.J. 1995. Interactions between killer yeasts and pathogenic fungi. *FEMS Microbiol. Lett.* 127, 213–222.
15. 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.
16. 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.
17. Wisniewski M.E., Biles C.L., Droby S., McLaughlin R.J., Wilson C.L., Chalutz E. 1991. Mode of action of the post harvest biocontrol yeast *Pichia guillermondii*. Characterization of attachment to *Botrytis cinerea*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 39, 245–248.
18. Żarowska B., Bobak Ł, Regiec P., Figiel A., Grzegorzczak M., Szołtyś M., Wojtatowicz M., Połomska X., 2014, Selection of preservation conditions for *Debaryomyces hansenii* yeasts killer toxins, *New Biotechnology*, 31, 218.
19. Żarowska B., Wojtatowicz M., Połomska X. 2009. Kinetyka procesu biosyntezy toksyn killero-wych przez drożdże *Debaryomyces hansenii*. *Inżynieria i aparatura chemiczna*, 3, 127–129.
20. Żarowska B. „Biosynteza i charakterystyka toksyn kilerowych drożdży *Debaryomyces hanse-nii*”, *Monografie CXLVI*, Wyd. Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, Wrocław 2012.

### Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób otrzymywania preparatu zawierającego toksyny killerowe, **znamienny tym**, że drożdże *Debaryomyces hansenii*, zdeponowane w kolekcji kultur komórkowych Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) w Utrechcie pod numerem dostępu CBS 140023, hoduje się w roztworze wodnym o wartości pH od 3 do 5 zawierającym od 2 do 6% wag. melasy buraczanej oraz od 0,5 do 3% wag. namoku kukurydzianego, korzystnie w temperaturze od 10 do 20°C, do uzyskania przez drożdże *D. hansenii* fazy stacjonarnej wzrostu, następnie oddziela się biomasę, korzystnie przez wirowanie, a pozostały supernatant zagęszcza metodą nanofiltracji, a uzyskany w ten sposób zagęszczony płyn utrwala się na cele przechowalnicze, zwłaszcza metodą suszenia rozpyłowego.
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że zagęszczony płyn utrwala się na cele przechowalnicze poprzez mrożenie w temp. w zakresie od -15 do -22°C.
3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że biomasę uzyskaną po procesie wirowania, a następnie mrożoną w temp. w zakresie od -15 do -22°C, zawieszają w wodzie wodociągowej.
4. Sposób według zastrz. 3, **znamienny tym**, że biomasę uzyskaną po procesie wirowania, suszy się metodą suszenia rozpyłowego.

5. Preparat przeciwgrzybiczy, zwłaszcza do ochrony roślin sadowniczych, płodów rolnych oraz roślin użytkowych, **znamienny tym**, że zawiera toksyny killerowe wytwarzane przez drożdże *Debaryomyces hansenii* zdeponowane w kolekcji kultur komórkowych Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) w Utrechcie pod numerem dostępu CBS 140023, przy czym aktywność preparatu wynosi co najmniej 750 U/ml.