

ANTAGONISTIC PROPERTIES OF YEAST KILLER TOXINS: BIOSYNTHESIS AND PRACTICAL APPLICATIONS

M. Krasko, Y. Reznichenko, V. Krasinko

National University of Food Technologies

Key words:

Killer toxins
Biosynthesis
Antimicrobial activity
Pathogenic
microorganisms

Article history:

Received 12.09.2024
Received in revised form
27.09.2024
Accepted 09.10.2024

Corresponding author:

Y. Reznichenko

E-mail:

reznichenkos@ukr.net

Citation: Красько М. О., Резніченко Ю. М., Крассінко В. О. (2024). Антагоністичні властивості дріжджових кілер-токсинів: біосинтез та практичне застосування. *Наукові праці НУХТ*, 30(5), 34—57. DOI: 10.24263/2225-2924-2024-30-5-5

ABSTRACT

Interest in yeast killer toxins — protein exometabolites synthesized by certain yeast species — is driven by their antagonistic properties against microorganisms, particularly pathogens. Yeast killer toxins were first identified in the 1950s in *Saccharomyces* yeast, and later described in *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Candida*, and some other yeasts. The mechanisms of action of killer toxins include disrupting the integrity of the cell wall or membrane of the target cell and destructive effects on the DNA of sensitive cells.

Yeast killer toxins have potential applications in various fields, including agriculture, food industry, and medicine. In agriculture, they can be used for biological control of phytopathogenic fungi. In the food industry, killer toxins serve as safe bio-preservatives that prevent the growth of undesirable microorganisms in raw materials, semi-finished products, and finished goods. Their most extensive use is observed in winemaking.

In medicine, killer toxins may serve as an alternative to traditional antibiotics, particularly for the treatment of candidiasis, due to their selective action against pathogenic *Candida* strains, minimal impact on beneficial microflora, low likelihood of resistance development, and natural origin, which reduces the risk of toxicity.

Generalized data on the structure and biosynthesis of killer toxins, their mechanisms of action, qualitative and quantitative determination methods, and prospects for their practical production are presented in the article.

АНТАГОНІСТИЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ДРІЖДЖОВИХ КІЛЕР-ТОКСИНІВ: БІОСИНТЕЗ ТА ПРАКТИЧНЕ ЗАСТОСУВАННЯ

М. О. Красько, Ю. М. Резніченко, В. О. Красінько

Національний університет харчових технологій

Інтерес до дріжджових кілер-токсинів — білкових екзометаболітів, які синтезуються деякими видами дріжджів, зумовлений їхніми антагоністичними властивостями проти мікроорганізмів, зокрема хвороботворних. Вперше дріжджові кілер-токсини виявили у 1950-х роках у дріжджах роду *Saccharomyces*, а пізніше описали у дріжджів *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Candida* та деяких інших. Досліджені механізми впливу кілер-токсинів включають порушення цілісності клітинної стінки або мембрани клітини-мішені, а також руйнівний вплив на ДНК чутливих клітин.

Дріжджові кілер-токсини мають потенціал для використання у різних сферах, зокрема в сільському господарстві, харчовій промисловості та медицині. У сільському господарстві вони можуть використовуватися для біологічного контролю фітопатогенних грибів. У харчовій промисловості кілер-токсини є безпечними біопресервантами, що запобігають росту небажаних мікроорганізмів у сировині, напівпродуктах, готовій продукції. Найширше їх застосування спостерігається в сучасному виноробстві. У медицині дріжджові кілер-токсини мають значні перспективи використання для лікування інфекцій, викликаних чутливими мікроорганізмами, тобто потенційно мають розглядатися як альтернатива традиційним антибіотикам. Дріжджові кілер-токсини можуть ефективно використовуватися для лікування кандидозів, зважаючи на такі їхні переваги: вибіркова дія на патогенні штами дріжджів роду *Candida*, мінімальний вплив на корисну мікрофлору організму людини, низька ймовірність розвитку резистентності та природне походження, що знижує ризик токсичності для організму людини. У представленій статті розглядаються узагальнені дані щодо особливостей будови та біосинтезу, механізмів дії, методик якісного та кількісного визначення, а також перспектив практичного одержання дріжджових кілер-токсинів.

Ключові слова: кілер-токсини, біосинтез, антимікробна активність, патогенні мікроорганізми.

Постановка проблеми. Наразі триває активний пошук нових препаратів проти кандидозів, викликаних різними патогенними штамами дріжджів роду *Candida*. Це спричинено рядом факторів, зокрема тим, що найпоширеніший збудник кандидозу, *C. albicans*, поступово розвиває резистентність до протигрибкових препаратів, які використовуються для лікування кандидозу. Це означає, що ці препарати стають менш ефективними і лікування кандидозу стає більш складним і тривалим. Крім того, в останні роки були виявлені нові види дріжджів роду *Candida*, які можуть викликати кандидоз. Ці види *Candida* часто мають більш високу резистентність до існуючих препаратів на відміну від *C. albicans*. До того ж

протигрибкові препарати можуть викликати ряд побічних ефектів, таких як нудота, блювання, діарея, головний біль, шкірні висипання. У деяких випадках ці побічні ефекти можуть бути серйозними і вимагати припинення лікування (Bhattacharya, Sae-Tia, & Fries, 2020).

Отже, причини, які змушують залучати значні ресурси для розроблення нових аналогів протигрибкових препаратів для лікування кандидозів, такі:

- зростаюча резистентність патогенних видів *Candida* до існуючих препаратів;
- поява нових видів *Candida*, які викликають кандидоз;
- небажані побічні ефекти існуючих протигрибкових препаратів.

Пошук аналогів протигрибкових препаратів проти кандидозу спрямований на вирішення цих проблем. Аналогічні препарати можуть бути більш ефективними проти резистентних штамів *Candida*, ефективними проти нових видів *Candida* і мати меншу кількість побічних ефектів. Дослідження аналогів протигрибкових препаратів проти кандидозу проводяться в різних напрямках. У цьому контексті дріжджові кілер-токсини, які є білковими екзометаболітами, синтезованими певними видами дріжджів, представляють собою перспективний напрямок у пошуку альтернативних терапевтичних засобів. Їхня здатність вибірково діяти на патогенні штами *Candida* дає змогу припустити, що ці токсини можуть стати ефективними засобами для лікування кандидозів. Вони не лише здатні боротися з небажаними мікроорганізмами, але й мають потенціал зменшити негативний вплив на корисну мікрофлору організму. Всебічне вивчення дріжджових кілер-токсинів не лише дасть змогу знайти нові підходи до лікування кандидозів, а й сприятиме розвитку нових методів боротьби з резистентними формами мікроорганізмів.

Мета статті: узагальнення літературних даних щодо характеристики дріжджових кілер-токсинів, механізмів їхньої антимікробної дії, а також особливостей одержання та визначення активності кілер-токсинів щодо патогенних мікроорганізмів.

Матеріали і методи. Матеріалами дослідження стали наукові публікації зарубіжних учених у провідних періодичних і спеціалізованих світових виданнях, що стосуються визначення основних властивостей кілер-токсинів. Для пошуку наукових публікацій використовували наукометричні бази даних Pub-Med, Google Scholar.

Викладення основних результатів дослідження. *Механізм антимікробної дії кілер-токсинів.* Деякі дріжджі мають потенційну здатність синтезувати білки або глікопротеїни, що є смертельними для чутливих штамів дріжджів, а також деяких грибів і бактерій. Такі речовини білкового походження отримали назву кілер-токсинів або мікоцинів. На сьогодні відомо, що кілерний фенотип широко поширений серед багатьох дріжджів, зокрема вбивчу активність здатні проявляти понад 100 видів дріжджів, що належать до більш ніж сорока родів (El-Banna, Malak, & Shehata, 2011; Giovati, Ciociola, De Simone, Conti, & Magliani, 2021).

Кілер-системи дріжджів були відкриті відносно недавно, порівняно з антагоністичними системами бактерій та інших грибів, а тому значну частину інформації, яка стосується синтезу кілер-токсинів та механізмів їх дії ще необхідно розкрити та деталізувати на молекулярному рівні (Bajaj, & Singh, 2017). Проте в ході вже проведених досліджень було встановлено, що виділені кілер-токсини відрізняються між собою не лише фізико-хімічними властивостями, але й механізмами

розпізнавання та знищення чутливих клітин (Magliani, Conti, Travassos, & Polonelli, 2008).

Так, вбивча дія кілер-токсинів щодо чутливих мікроорганізмів характеризується двоетапним механізмом, опосередкованим рецепторами. Під час першого етапу кілер-токсин розпізнає та зв'язується з первинним рецептором на клітинній стінці чутливої мішені (Magliani, Conti, Travassos, & Polonelli, 2008; Mannazzu, 2019). Такими первинними рецепторами можуть виступати: β -1,6-глюкан для кілер-токсинів K1 та K2 дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* (Liu та ін., 2015); β -1,3-глюкан, який діє як первинний рецептор для токсину дріжджів *Wickerhamomyces anomalus* ATCC 96603 (Polonelli, Magliani, Ciociola, Giovati, & Conti, 2011); монопротеїн є рецептором для кілера K28 *S. cerevisiae* і токсину *Pichia membranifaciens* CYC1086 та хітин, який слугує рецептором для токсину *Debaryomyces robertsiae* CBS6693, специфічним рецептором для дріжджів *Kluyveromyces lactis* є зимоцин. Етап розпізнавання не потребує витрат енергії, а отже, є енергонезалежним (Santos, San Mauro, Bravo, & Marquina, 2009; Цапко, Красінько, 2021).

Другий, енергозалежний етап полягає в переміщенні токсину на цитоплазматичну мембрану чутливого мікроорганізму для подальшої взаємодії з вторинними рецепторами. Цей етап менш охарактеризований, а тому вторинні рецептори відомі або припущені для досить небагатьох кілер-токсинів (Mannazzu, 2019). Так, на сьогодні точно ідентифіковано лише мембранний рецептор для токсину K1 *S. cerevisiae* — Krel, О-глікозилований поверхневий білок дріжджової клітини, який прикріплений до плазматичної мембрани через глікозилфосфатидилінозитоловий (GPI) якір і бере участь у синтезі β -1,6-глюкану. Також існують припущення, що вторинним рецептором для токсину K28 сахароміцетів може бути HDEL Erd2p, який у низькій кількості копій локалізується на цитоплазматичній мембрані. Також було виявлено, що білок плазматичної мембрани Cwp2p з молекулярною масою 11,7 кДа та його GPI-закріплений попередник можуть виступати як первинні рецептори для токсину РМКТ, синтезованого дріжджами *Pichia membranifaciens*. Варто додати, що взаємодія між кілер-токсинами та плазматичною мембраною чутливої мішені може безпосередньо залежати від їх заряду. Зазвичай, кілер-токсини мають позитивний заряд, тоді як плазматична мембрана чутливих клітин заряджена негативно, завдяки цьому токсини можуть мати певну спорідненість зі вторинними рецепторами, що сприятиме їх адсорбції на цільовій мембрані чутливих клітин. З цього можна зробити висновок, що мікроорганізми з більш негативно зарядженою мембраною будуть більш сприйнятливі до дії кілер-токсинів. Таким же чином токсини, що матимуть більш позитивно заряджені амінокислотні залишки, проявлятимуть сильнішу вбивчу дію проти чутливих клітин. Такого ефекту можна досягти завдяки мутаціям клонованого гену кілер-токсинів (Liu, 2015; Schmitt, & Breinig, 2006).

Після зв'язування з вторинними рецепторами кілер-токсини потрапляють у чутливі клітини та знищують їх за допомогою різних механізмів. До них відносять пошкодження цитоплазматичної мембрани: після досягнення мембрани деякі токсини чинять летальний ефект шляхом утворення іонних каналів з подальшим порушенням цілісності і функцій мембрани, при цьому спостерігається вивільнення калій йодиду, АТФ та інших метаболітів; пригнічення синтезу ДНК та блокування клітинного циклу. Відомо, що токсин K28 проникає в чутливу дріжджову

клітину шляхом ендоцитозу та проходить шлях секреції у зворотному напрямку, після чого потрапляє в цитозоль і передає свій токсичний сигнал у ядро дріжджової клітини, в результаті спостерігається пригнічення реплікації ДНК, яке спричиняє зупинку клітинного циклу на ранній S-фазі; атака тРНК: кілер-токсин *Pichia inositolovora*, націлений на тРНК, спричиняє блокування трансляції та зупинку клітинного циклу на фазі G1. Крім того, у деяких випадках токсини, в тому числі й кілер-токсин НМ-1 *Hansenula mrakii*, проявляють β -глюканазну активність і можуть перешкоджати синтезу клітинної стінки шляхом інгібування β -1,3-глюкансинтази або гідролізу основних компонентів клітинної стінки чутливих клітин, що призводить до лізису клітини (Mannazzu, 2019; Liu, 2015).

Незважаючи на одноклітинний спосіб життя дріжджів, відомо, що деякі з них піддаються програмованій клітинній смерті за різних умов, включаючи вплив екзогенних та ендогенних стресів (Carmona-Gutierrez, 2010). Одним з механізмів дії кілер-токсинів є здатність індукувати програмовану клітинну смерть у чутливих штамів клітин, що проявляється типовими цитологічними маркерами апоптозу, такими як фрагментація ДНК, конденсація хроматину, вплив фосфатидилсерину на зовнішню поверхню плазматичної мембрани, накопичення активних форм кисню (АФК) та фенотипічні зміни. При цьому важливим є те, що апоптотична загибель клітин була викликана низькими дозами кілер-токсинів, тоді як високі концентрації токсинів запобігають апоптозу та викликають некротичну загибель клітин за допомогою різних токсичних стратегій, розглянутих вище. Ґрунтуючись на всіх цих спостереженнях, можна зробити висновок, що в природному середовищі існування дріжджів, де концентрація токсину, зазвичай, низька, індукція апоптозу відіграє вирішальну роль в ефективному токсин-опосередкованому знищенні клітин (Schmitt, & Breinig, 2006; Klassen, Schaffrath, Buzzini, & Ganter, 2017).

Характеристика кілер-токсинів. Кілер-токсини *Saccharomyces cerevisiae*. Вперше кілерний фенотип був досліджений у дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* у 1963 р. Беваном та Маковером. На конференції в Нідерландах були описані антагоністичні взаємодії між штамми *S. cerevisiae* і потенційними конкурентами на основі виділених токсинів (Klassen, Schaffrath, Buzzini, & Ganter, 2017). Саме тому на сьогодні найбільш вивченими вважаються кілер-токсини, продуцентами яких є дріжджі *S. cerevisiae*.

Ґрунтуючись на деяких кілерних характеристиках, таких як молекулярна структура та механізм знищення чутливих клітин, токсини *S. cerevisiae* були розділені на чотири типи: K1, K2, K28 та Klus (Rodríguez-Cousiño, 2011). Після проведення початкових досліджень феномена кілера в деяких родів дріжджів було встановлено, що за експресію фенотипу кілера можуть відповідати позахромосомні вірусоподібні дволанцюгові РНК (дцРНК), також фенотип-кілер може кодуватись хромосомними генами чи лінійними плазмідами дволанцюгових ДНК (Becker, & Schmitt, 2017). Відомо, що кілерний фенотип у *S. cerevisiae* викликають два окремо інкапсульовані віруси дцРНК сімейства *Totiviridae*, такі як LA та його сателітний вірус M, які постійно присутні в цитоплазмі інфікованих дріжджових клітин у вигляді вірусоподібних часток (Orentaite, Poranen, Oksanen, Daugelavicius, & Bamford, 2016; Gier, Schmitt, & Breinig, 2017). LA являє собою хелперний вірус довжиною 4,6 кб. Лінійний геном LA має дві відкритих рамки зчитування на кодуєчому ланцюзі, ORF1 та ORF2. Основний капсидний білок Gag масою 76 кДа

кодується ORF1 та необхідний для правильної інкапсуляції дцРНК і утворення необхідної структури вірусоподібних часток. ORF2 кодує РНК-залежну-РНК-полімеразу (Pol), яка транслюється як сумісний білок Gag-Pol з молекулярною масою 180 кДа, який забезпечує транскрипцію та реплікацію вірусу (Becker, & Schmitt, 2017). Отже, вірус М є неавтономним і як класичний сателіт потребує присутності хелперного вірусу LA для стабільної підтримки та реплікації в цитоплазмі клітини-господаря (Gier та ін., 2020).

Залежно від типу токсину, що кодується, віруси М поділяються на М1, М2, М28 і Мlus розміром 1,6, 1,5, 1,8 та 2,2 кб відповідно. Відомо, що чотири геноми М, які кодують відповідний специфічний токсин, не зустрічаються в одній клітині одночасно, виключаючи один одного за допомогою невідомого механізму (Gier, Schmitt, & Breinig, 2017). Тільки один ланцюг (позитивний) М-вірусу володіє кодуючою здатністю і містить єдину відкриту рамку зчитування (ORF), яка кодує препротоксин. Також вважається, що цей вірус бере участь у забезпеченні імунітету клітини-продуцента до власного токсину, проте ця теорія ще не підтверджена (Becker, & Schmitt, 2017).

Отже, первинним генним продуктом дцРНК є препротоксин — білок, який є непроцесованим попередником зрілого токсину та має пройти певний секреторний шлях для подальшого процесингу з метою отримання необхідного кілера. Серед кодованих вірусом токсинів-кілерів *S. cerevisiae*, білки K1 та K28 є найбільш вивченими. Хоча обидва токсини значно відрізняються за своїм амінокислотним складом і молекулярним способом дії, проте вони є досить подібними за механізмами їх синтезу, процесингу та секреції, а тому і будова їх препротоксинів дуже подібна (Giesselmann, Becker, & Schmitt, 2017). Так, попередник складається з N-кінцевої сигнальної послідовності, необхідної для імпорту білка в просвіт ендоплазматичного ретикулума, за яким розташовані дві субодиниці зрілого токсину — альфа і бета. Ці субодиниці відокремлені між собою за допомогою N-глікозилюваної гама-послідовності, яка, ймовірно, сприяє правильній укладці попередника й утворенню дисульфідних зв'язків між альфа- та бета ділянками. Після проникнення в ендоплазматичний ретикулум, сигнальний пептид видаляється шляхом розщеплення сигнальною пептидазою, далі відбувається N-глікозилювання гама-послідовності з утворенням одинарного дисульфідного зв'язку для токсину K28 та потрійного — для білку K1. В подальшому попередник транспортується до апарату Гольджі, де піддається додатковим стадіям процесингу за участю пептидаз Kex1p та Kex2p. У результаті отриманий зрілий токсин, що складається з альфа та бета субодиниць, з'єднаних ковалентним зв'язком, секретується в позаклітинний простір (Rodríguez-Cousiño, 2011; Becker, & Schmitt, 2017; Gier, 2019). Токсин K2 не був охарактеризований так широко, як два попередні, проте вважається, що його попередник не містить N-глікозилюваної гама-послідовності, оскільки припущено, що зрілий токсин складається лише з однієї субодиниці (Comitini, Mannazzu, & Ciani, 2009).

Зі структурної точки зору всі відомі нині токсини-кілери можна згрупувати у три класи: невеликі білки з однією субодиницею, гетеродимерні білки та мультидимерні білкові комплекси. Так, зрілий токсин K1 є гетеродимерним білком і складається з двох субодиниць: α з молекулярною масою 9,5 кДа та β з молекулярною масою 9 кДа. Токсин K2 являє собою білок з молекулярною масою

21,5 кДа. Білок K28, що виділяється дріжджами *S. cerevisiae*, має дві субодиниці — α (10,5 кДа) та β (11 кДа) (Klassen, Schaffrath, Buzzini, & Ganter, 2017).

Незважаючи на те, що будова препротоксину екзометаолітів K1 та K28 подібна, механізм їх дії значно відрізняється. Так, токсин K1 першочергово зв'язується з β -1,6-глюканом на клітинній стінці рН-залежним чином, після цього K1 взаємодіє з рецепторним білком Krel на плазматичній мембрані, викликаючи утворення іонних каналів або альтернативно активує калієві канали Tok1. Ця стадія є енергозалежною і приводить до неконтрольованого витоку K^+ , H^+ та АТФ з цитоплазми, що інгібує транспорт амінокислот і порушує електрохімічні іонні градієнти через плазматичну мембрану. Подібний механізм дії передбачається й для токсину K2 (Orentaite, Poranen, Oksanen, Daugelavicius, & Bamford, 2016). Натомість кілер-токсин K28 зв'язується з α -1,3-манопротеїном як первинний рецептор, після цього відбувається його взаємодія з мембранним рецептором Erd2p з подальшим проникненням у клітину шляхом ендоцитозу, там токсин паразитує на ретроградному секреторному шляху. Після транслокації кілер-токсина з ендоплазматичного ретикулулу в цитозоль, β -субодиниця піддається протеасомній деградації, тоді як α -субодиниця проникає в ядро і викликає зупинку клітинного циклу та блокування синтезу ДНК (Gier, Schmitt, & Breinig, 2017; Giesselmann, Becker, & Schmitt, 2017). Кілер-токсин Klus було ідентифіковано нещодавно, тому механізм його дії ще достеменно не вивчено (Orentaite, Poranen, Oksanen, Daugelavicius, & Bamford, 2016).

Активність більшості токсинів *S. cerevisiae* є стабільною у вузькому діапазоні рН (3,5—5,0) та температури (18—28 °C) та значно знижується з підвищенням зазначених показників (Rodríguez-Cousiño, 2011; Soares, & Sato, 2000). Узагальнені дані щодо характеристики відомих типів кілер-токсинів *Saccharomyces cerevisiae* наведені в табл. 1.

Таблиця 1. Характеристика кілер-токсинів *S. cerevisiae*

Тип токсину	Молекулярна структура	Первинні рецептори	Вторинні рецептори	Механізм знищення чутливих клітин
K1	Гетеродимерний білок, що складається з двох субодиниць: α (9,5 кДа) та β (9 кДа)	β -1,6-глюкан	Мембранний рецептор Krel	Мембранна пермеабілізація
K2	Білок, представлений однією субодиницею молекулярною масою 21 кДа	β -1,6-глюкан	Не досліджено	Мембранна пермеабілізація
K28	Гетеродимерний білок, що складається з двох субодиниць: α (10,5 кДа) та β (11 кДа)	α -1,6-манопротеїн	Мембранний рецептор Erd2p	Пригнічення синтезу ДНК і блокування клітинного циклу
Klus	Не досліджено			

Як уже зазначалось, відносно нещодавно було ідентифіковано кілер-токсин Klus, який було виділено вперше з винних дріжджів винограду в Іспанії. Було встановлено, що продуценти цього токсину здатні спричиняти загибель інших дріжджів *S. cerevisiae*, які секретують токсини типу K1, K2 та K28. Такі дані були поштовхом до пошуку нових кілерних токсинів дріжджів *S. cerevisiae*, і не тільки,

які володіють раніше не описаними властивостями. З цією метою з різноманітних ягід і фруктів було виділено нові штами *S. cerevisiae* Кх, здатні синтезувати, на думку науковців, раніше невідомий кілер-токсин. Така думка склалась тому, що виділений токсин у незначних концентраціях здатен пригнічувати штами-продуценти токсинів К1, К2 та К28, крім того, спостерігалось, що форма зон лізису була спотворена, а дія токсинів К1, К2 і К28 — пригнічена. Це підтверджує, що штам Кх, який володіє слабкими кілерними властивостями, пригнічує стандартну дифузію токсинів *S. cerevisiae* в середовище та їх вбивчу здатність. У випадку стандартних взаємодій токсинів-кілерів таке явище ніколи не спостерігалось. Також з клітин було виділено дцРНК, яка за будовою була подібна до таких в інших штамів, проте розмір вірусу М складав 2,5 кб, що й свідчило про відмінність кодованого токсину. Проте такі відкриття потребують подальших, більш детальних досліджень (Melvydas, Bružauskaitė, Gedminienė, & Šiekštelė, 2016; Melvydas, Serviene, Cernishova, & Petkuniene, 2007).

Кілер-токсини, синтезовані іншими видами дріжджів. Незважаючи на те, що кілер-токсини *S. cerevisiae* вважаються найбільш вивченими, з моменту першого відкриття кілерного фенотипу у дріжджів відмінних видів і родів було проведено ряд досліджень з метою виділення та характеристики їхніх токсинів-екзометаболітів, які відрізняються за молекулярною масою, механізмами дій та умовами, за яких проявляють максимальну активність і стабільність.

Так, здатність синтезувати кілер-токсини була виявлена у дріжджів *Schwanniomycetes occidentalis*. Основною метою дослідження (Chen, Han, Jong, & Chang, 2000) було проведення ідентифікації отриманого токсину та встановлення оптимальних умов його активності та стабільності. Результати показали, що отриманий токсин є гетеродимерною молекулою та складається з двох субодиниць з молекулярною масою 7,4 та 4,9 кДа. Кілерна активність токсину повністю втрачалась після інкубування його з папаїном і пепсином, що підтверджувало білкову природу синтезованого екзометаболіту. Найвища активність токсину спостерігалась при рН 4,2—4,8. Білок-кілер був стабільним у діапазоні рН від 2,0 до 5,0 протягом щонайменше 8 годин. 50% активності втрачалось протягом 8 год при рН 5,0 та температурі 24 °С. Повна втрата активності спостерігалась при рН 6,0. Також білок залишався стабільним при 20 та 30 °С протягом 8 год, натомість при 40 °С повністю інактивувався впродовж 1 години. Також було визначено, що фенотип кілера в цього продуцента є хромосомно закодованим, а первинним рецептором на клітинній стінці чутливих клітин може виступати манан.

Кілер-токсин *Pichia kudriavzevii* RY55 складається з однієї субодиниці, молекулярна маса якої складає 39,8 кДа. Очищений токсин виявляв максимальну активність при температурі 30 °С та рН 5,0, однак значну активність спостерігали також при 20, 25 і 37 °С та рН 4,6 і 7. Аналіз температурної стабільності екзометаболіту показав, що токсин є абсолютно стабільним за температури 4 °С протягом 60 днів. Понад 90% активності зберігалось при 20 °С протягом 24—48 годин. Хороша стабільність спостерігалась при 30 °С, проте досить короткі періоди часу (15—30 хв). За температури вище 50 °С активність токсину не була виявлена. Аналіз рН стабільності продемонстрував, що токсин є стабільним у широкому діапазоні рН (2—6), але протягом початкових 15—30 хв інкубації. Також було проаналізовано вплив різних добавок на активність очищеного токсину. Так, Mn^{2+} ,

Fe^{2+} і Zn^{2+} викликали значне зниження активності, тоді як ЕДТА та SDS повністю інгібують вбивчу активність кілера (Bajaj, Raina, & Singh, 2013).

Також були проведені дослідження, щоб охарактеризувати кілер-токсин K-500, продуцентом якого є дріжджі *Williopsis mrakii* NCYC 500. Аналіз показав, що молекулярна маса токсину коливається в межах 1,8—5 кДа, що значно менше, ніж для будь-якого іншого токсину, про який повідомлялося раніше. Встановлено, що отриманий токсин залишався стабільним при температурі 4 °C протягом 24 год, натомість стабільність знижувалась при підвищенні температури інкубації і повністю втрачалась протягом 7—24 год за температури 37 °C. Інактивація токсину спостерігалась за температури вище 50 °C та pH вище 4,0, проте токсин залишався стабільним протягом 18 год у діапазоні pH 2,4—4,0. Точний механізм дії кілер-токсину K-500 щодо чутливих клітин ще невивчений, проте існують деякі припущення, що токсин утворює канали, сприяючи втраті іонів, що зрештою призводить до загибелі чутливих мікроорганізмів. Аналіз пошкодження мембрани в дослідженні (Hodgson, Button, & Walker, 1995) продемонстрував, що екзометаболіт K-500 дійсно порушує проникність мембрани чутливих дріжджів, викликаючи вивільнення радіоактивної міченої амінокислоти. А отже, це може свідчити, що його механізм подібний до такого у токсину K1.

У дослідженні (Buzzini, Corazzi, Turchetti, Buratta, & Martini, 2004) зазначається, що кілер-токсин KT4561, який синтезується дріжджами *Williopsis saturnus* DBVPG 4561, має молекулярну масу близько 62 кДа. Виявлено, що очищений токсин, на відміну від інших, є активним у межах широкого діапазону температур (5—45 °C) та pH (4,5—8,0). Крім того, після теплового шоку при 100 °C протягом 10 хв активність токсину лише незначно знизилась. Такі дані зацікавили науковців, адже це один з небагатьох токсинів, який є активним при фізіологічних для людського тіла значеннях pH та температури, тому подальші дослідження були присвячені вивченню його антимікробних властивостей.

Визначено, що деякі штами морських дріжджів також здатні синтезувати кілер-токсини, винятком не є і дріжджі *Williopsis saturnus* WC91-2 морського походження, у яких кілерний фенотип закодований хромосомними генами. Молекулярна маса очищеного токсину за даними SDS-PAGE оцінювалась в 11 кДа. Після вивчення впливу різних значень температури, pH на активність і стабільність кілер-токсину, було встановлено, що оптимальним для кілерної активності є pH 3,5 та температура 16 °C. При цьому токсин залишався стабільним при pH 3,0—4,0 та температурі нижче 35 °C. Кілерна активність повністю втрачалась за температури 40 °C та pH вище 4,0. Такі дані показують, що цей токсин є досить чутливим до високої температури і холодоактивним (Wang та ін., 2012).

Галотолерантні дріжджі *Debaryomyces hansenii* CYC 1021 та *Debaryomyces hansenii* DSMZ70238 також здатні виділяти кілер-токсини, які кодовані хромосомними генами та належать до низькомолекулярних білків з молекулярною масою близько 23 кДа. Дослідження кілер-токсину *Debaryomyces hansenii* DSMZ70238 були спрямовані переважно на вивчення його антимікробної активності, тоді як кілер-токсини *Debaryomyces hansenii* CYC 1021 були більш широко охарактеризовані щодо умов їх активності та стабільності. Так, при температурі 15 °C і нижче активність токсину залишалась стабільною протягом тижня, тоді як

інкубація за температури 20 °С протягом п'яти днів призводила до значного зниження активності на 25%. За витримування токсину при температурі 30 °С і рН 4,0 протягом 24 год більше половини активності було втрачено. Оптимальними для токсину були кислі значення рН, тобто він залишався стабільним при рН 4,5 та нижче, натомість при рН 5,1 спостерігалась його інактивація. Стосовно механізму дії токсинів *D. hansenii* відомо лише, що первинним рецептором для них виступає β -1,6-глюкан (Al-Qaysi, Al-Haideri, Thabit, Al-Kubaisy, & Ibrahim, 2017; Marquina, Barroso, Santos, & Peinado, 2001).

Високу здатність виробляти кілер-токсини мають дріжджі *Wickerhamomyces anomalus*. Зокрема, штам морського походження *W. anomalus* YF07b, виділений з кишківника асцидії, продукує кілер-токсин з молекулярною масою 67 кДа, для якого оптимальною є температура 16 °С та рН 3,5. Токсин залишався стабільним за температури нижче 40 °С, при її підвищенні активність токсину різко знижувалась до повної втрати при 50 °С. Також кілер-токсин залишався стабільним за рН нижче 6,5. Позитивно на активність екзометаболіту впливала присутність у середовищі NaCl в концентрації 4,0%. При дослідженні механізму дії результати показали, що ламінарин (β -1,3-глюкан), манан і хітин не розщеплюються кілер-токсином, це свідчить, що основним первинним рецептором у клітинній стінці чутливих клітин може виступати β -1,6-глюкан. Також встановлено, що основним механізмом знищення мікроорганізмів цими токсинами є пошкодження плазматичної мембрани чутливих клітин. Це свідчить, що за механізмом дії даний білок є подібним до токсину K1 (Guo, Ma, Xu, Wang, & Chi, 2013).

Також у дослідженні (Tay, Lim, & Tan, 2014) було охарактеризовано мікоцин *W. anomalus* tp12-5 (див. табл. 2).

Дріжджі *Metschnikowia saccharicola* продукують кілер-токсин, який являє собою мономерний білок з молекулярною масою 47 кДа. Властивості токсину стосовно активності та стабільності були подібні до таких у токсинів *W. anomalus* YF07b. Механізм дії цього токсину пов'язаний з первинною дією на рецептори клітинної стінки чутливих мікроорганізмів (Tan та ін., 2018).

Феномен кілера у дріжджів *Pichia membranifaciens* вивчався протягом декількох років. За цей період було описано два токсини РМКТ та РМКТ2, що продукуються штамми *P. membranifaciens* CYC 1106 та *P. membranifaciens* CYC 1086 відповідно. Синтезовані токсини являють собою білки з низькою молекулярною масою — 18 кДа для токсину РМКТ та 30 кДа для токсину РМКТ2. Механізм дії цих токсинів щодо чутливих мікроорганізмів також був детально вивченим. Так, кілер РМКТ першочергово зв'язується з β -1,6-глюканом, розташованим на поверхні клітинних стінок чутливих клітин, при цьому адсорбція токсину на очищених глюканах відбувалась протягом перших двох хвилин контакту, що підтверджує енергонезалежність цього процесу. Вторинним рецептором для дії токсину слугує білок Cwp2p. Нарешті, досягнувши цитоплазматичної мембрани, кілер-токсин спричиняє її руйнування з подальшим утворенням катіонних каналів і порушенням трансмембранних градієнтів, що призводить до загибелі чутливих клітин. Натомість механізм дії токсину РМКТ2 дещо відрізняється, так первинним рецептором для нього слугує манопротейн. На сьогодні досі невідомо, що виступає вторинним рецептором для токсину РМКТ2, а тому дослідження для його встановлення ще продовжуються. Знищення чутливих клітин відбувається шляхом

зупинку їх клітинного циклу у фазі G1/S. Незважаючи на відмінності в молекулярній масі та механізмах дії, обидва кілер-токсини подібні у своїй поведінці при різних значеннях температури та рН. Так, токсин РМКТ був стабільний у діапазоні рН 3,0—4,8 та швидко інактивувався за температури вище 20 °С. РМКТ2 мав фізико-хімічні властивості, подібні з РМКТ, тобто він був активний за кислих значень рН від 2,5 до 4,8 і за температури нижче 20 °С, проте цей токсин є менш лабільним при більш високих температурах і нейтральних значеннях рН протягом коротких періодів часу. Такі, хоч і незначні відмінності вказують на їх біохімічну різноманітність (Belda, Ruiz, Alonso, Marquina, & Santos, 2017).

Узагальнена характеристика всіх представлених кілер-токсинів наведена в табл. 2.

Таблиця 2. Характеристика кілер-токсинів, синтезованих різними видами дріжджів

Продуцент	Молекулярна маса токсину, кДа	Стабільність кілер-токсину		Джерело
		рН	температура, °С	
<i>P. kudriavzevii</i> RY55	38,9	5,0	4 (60 днів)	Bajaj, Raina, & Singh, 2013
<i>S. occidentalis</i> ATCC4425	4,9; 7,4	2,0—5,0	20—30	Chen, Han, Jong, & Chang, 2000
<i>W. mrakii</i> NCYC 500	1,8—5	2,4—4,0	4, вище 50 — інактивується	Hodgson, Button, & Walker, 1995
<i>W. saturnus</i> DBVPG 4561	62	4,5—8	5—45	Buzzini, Corazzi, Turchetti, Buratta, & Martini, 2004
<i>W. saturnus</i> WC91-2	11	3,0—4,0	<35	Wang та ін., 2012
<i>D. hansenii</i> CYC 1021	22	4,0—4,5	15	Marquina, Barroso, Santos, & Peinado, 2001
<i>W. anomalus</i> YF07b	67	<6,5	<40	Guo, Ma, Xu, Wang, & Chi, 2013
<i>W. anomalus</i> tp12-5	45—50	3,0—6,0	4—37	Tay, Lim, & Tan, 2014
<i>P. membranifaciens</i> CYC 1106	18	3,0—4,8	20	Belda, Ruiz, Alonso, Marquina, & Santos, 2017
<i>P. membranifaciens</i> CYC 1086	30	2,5—4,8	<20	Belda, Ruiz, Alonso, Marquina, & Santos, 2017
<i>M. saccharicola</i>	47	4,0—6,5	0—40	(Tan та ін., 2018)

Особливості отримання та визначення активності кілер-токсинів щодо патогенних мікроорганізмів. На сьогодні дріжджові кілер-токсини викликають значний інтерес завдяки тому, що володіють широким спектром активності щодо мікробних патогенів, здатних спричиняти захворювання людей, тварин і рослин. Це, у свою чергу, проковує проведення ряду досліджень з метою встановлення можливості потенційного використання кілер-токсинів у медичній галузі та інших перспективних напрямках, зокрема у фармацевтичній промисловості (Giovati, Ciocciola, De Simone, Conti, & Magliani, 2021; Mannazzu та ін., 2019).

Багато хвороб морських тварин спричиняються морськими бактеріями та вірусами, проте протягом останніх років було встановлено, що й деякі види дріжджів є патогенними для морських тварин. Такі дріжджові захворювання спричиняють великі економічні втрати в морській промисловості, тому необхідним є пошук методів і речовин для боротьби з ними. Було встановлено, що молочну хворобу у краба викликають дріжджі *Metschnikowia bicuspidate*. Спалах цього захворювання призвів до високої смертності краба та великих економічних втрат. При цьому всі використовувані традиційні протидріжджові сполуки — ністатин, бензалконію бромід і екстракт кореня золотухи та часнику були активними щодо патогенних дріжджів, проте виявились токсичними й для самого краба. Виходом з цієї ситуації може слугувати використання кілер-токсинів як альтернативних засобів (Wang, Yue, Chi, & Wang, 2008; Tan та ін., 2018).

Основна мета дослідження (Wang, Yue, Chi, & Wang, 2008) полягала в тому, щоб виявити серед дріжджів морського походження штами, здатні до синтезу кілер-токсину з антимікробною активністю, аби в подальшому використати отримані знання для розробки ефективного засобу, спрямованого на запобігання зараженню краба патогенними дріжджами. В результаті було встановлено, що 17 штамів морських дріжджів, які були виділені з морської води, осадів, солончакового мулу, кишківника морських риб і морських водоростей, здатні синтезувати кілер-токсини, активні проти *M. bicuspidate* WCY. Після висіву досліджених морських дріжджів на середовище, попередньо засіяне патогенним мікроорганізмом, найвищою антимікробною активністю, яка визначалася за відношенням діаметра зони до діаметра колонії та перевищувала значення 1,5, володіли п'ять штамів: *Williopsis saturnus* WC91-2, *Pichia guilliermondii* GZ1, *Pichia anomala* YF07b, *Debaryomyces hansenii* hcx-1, *Aureobasidium pullulans* HN2.3. Такі дані свідчать, що серед усіх штамів, ізольованих з морського середовища, саме п'ять були здатні виробляти відносно більшу кількість кілер-токсину проти патогенних дріжджів *M. bicuspidate* WCY.

Деяких вчених зацікавив штам *Williopsis saturnus* WC91-2, зокрема його здатність синтезувати високий рівень кілер-токсинів. Були визначені оптимальні умови культивування морського штаму, проте основною метою проведеного дослідження було визначення активності отриманих концентратів кілер-токсину. Вбивчу активність екзометаболіту вимірювали за допомогою дифузійного тесту з використанням стерильних оксфордських чашок діаметром 6 мм, які розміщували на середовищі для аналізу, що було засіяне відповідними тест-штамами дріжджів (*M. bicuspidate* WCY, *Cryptococcus aureus*, *Lodderomyces elongisporus*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Yarrowia lipolytica*, *Rhodotorula mucilaginosa*). Після цього в кожену чашку додавали 200 мкл концентрованого або очищеного кілер-токсину та інкубували при 16 °C протягом 72 годин. За міру активності приймали діаметр зони інгібування чутливих штамів. За результатами було встановлено, що кілер-токсин, окрім дії на *M. bicuspidate* WCY, проявляв активність й проти *Cryptococcus aureus*, *Lodderomyces elongisporus*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Yarrowia lipolytica*, що свідчить про досить широкий спектр його активності (Wang та ін., 2012).

Дещо пізніше було встановлено, що ще один штам морських дріжджів, зокрема *Metschnikowia saccharicola* DD21-2, здатен синтезувати кілер-токсин, який володіє антимікробною активністю щодо патогенного для краба штаму *M. Bicuspidate* WCY. Метою проведеного дослідження (Tan та ін., 2018) є оптимізація

процесу ферментації для отримання максимального виходу токсина-кілера. Було використано статистичний підхід для оцінки зв'язку між вимірюваними параметрами — температурою та часом ферментації, значенням рН, концентрацією внесеного інокуляту, які в подальшому впливали на активність синтезованого токсину, що вимірювалась діаметром зони інгібування відносно патогенного *M. Bicuspidate* WCY. Результати показали, що оптимальними були такі умови ферментації: час — 54 год, рН — 5,5, температура — 27,5 °C концентрація інокуляту — 4%. Після визначення активності, середній діаметр зон інгібування за таких умов складав 1,43 см. При цьому зона інгібування лінійно зменшувалась при підвищенні температура та рН вище вказаних значень, що вкотре підтверджує залежність між впливом умов культивування на активність кілер-токсинів. Отримані дані можуть слугувати основою для подальших досліджень з профілактики та боротьби із захворюванням краба.

Sporothrix schenckii, *S. brasiliensis*, *S. globosa*, *S. mexicana* — це комплекс видів дріжджів, що є етіологічними агентами споротрихозу, який може вражати як людей, так і тварин. Хоча для лікування цього захворювання й існують ефективні препарати, проте довга тривалість терапії та їх токсичність зумовлюють необхідність пошуку нових альтернатив для лікування. З цією метою було оцінено дію 18 видів дріжджів, здатних до синтезу кілер-токсинів, на ріст 88 ізолятів комплексу видів *Sporothrix*. Найбільшими зонами інгібування проти 74% ізолятів *Sporothrix*, що складали 19,0 мм, 18,6 мм та 18,5 мм, характеризувались кілер-токсини *Kazachstania unispora* QU49, *Trichosporon faecale* QU100, *T. japonicum* QU139, відповідно. Отже, значна кількість дріжджів *Sporothrix* є чутливою до дії кілер-токсинів, що робить їх потенційно корисними для розробки нових протигрибкових засобів (Stopiglia та ін., 2014).

Останніми роками значно зросла кількість інвазивних опортуністичних грибкових інфекцій, викликаних дріжджами роду *Candida*, зокрема видами *Candida albicans* та деякими не-*albicans* видами *Candida* (*C. glabrata* і *C. krusei*). За звичних умов ці дріжджові гриби є частиною нормальної мікробіоти у людей і тварин, проте за певних порушень захисних механізмів хазяїна, що супроводжуються зниженням імунітету, види *Candida*, набуваючи патогенного характеру, викликають захворювання — кандидемії, починаючи від поверхневих слизових до небезпечних для життя системних інфекцій. Занепокоєння через поширення випадків захворюваності росте в результаті виявлення резистентності деяких видів до протигрибкових засобів, зокрема до азолів. Тому виникла необхідність у пошуку нових сполук, здатних ефективно пригнічувати дріжджі виду *Candida*. До таких було запропоновано віднести кілер-токсини, що володіють широкою антикандидозною активністю, яка досліджувалась протягом тривалого часу (Radhamany, Rao, & Kotigadde, 2019; Banjara, Nickerson, Suhr, & Hallen-Adams, 2016).

Дріжджі *Debaryomyces hansenii* є одними з найпоширеніших видів дріжджів, що виділяються із сирів, завдяки своїй здатності рости у присутності високого вмісту солі. Вважається, що ці дріжджі утворюють монофілетичну групу з патогенними для людини видами *Candida*, окрім *C. glabrata*, проте існують припущення, що *D. hansenii* також здатен пригнічувати умовно-патогенні штами завдяки синтезу антикандидозних кілер-токсинів. Для підтвердження цього з 20 різних сирів було виділено 42 штами *D. hansenii*, активність мікоцину кожного штаму

оцінювали проти людських клінічних ізолятів *C. albicans* та *C. tropicalis* методом дифузії на агарі зі штриховими пластинками. Розвиток чіткої зони інгібування навколо колоній *D. hansenii* вважався позитивним показником активності токسينу. В результаті було відібрано три штами, що володіли кілерною активністю: *D. hansenii* 274, *D. hansenii* 237, *D. hansenii* 65. Активність синтезованих токсинів визначали шляхом внесення мікоцинів у лунки, вирізані в агарі, який попередньо був засіяний чутливими штамами *Candida*. Результати продемонстрували, що чутливість *C. albicans* та *C. tropicalis* значно відрізнялась при різних значеннях pH та температури. *C. tropicalis* був більш чутливий до мікоцинів *D. hansenii* при нижчих температурах, тоді як *C. albicans* виявляла чутливість при більш високих температурах. Такі дані є важливими і мають бути враховані при подальших дослідженнях використання кілер-токсинів як антикандидозних засобів (Banjara, Nickerson, Suhr, & Hallen-Adams, 2016).

За статистикою, вульвовагінальний кандидоз вражає кожную другу жінку у всьому світі у певний момент її життя, спричиняючи значні страждання та економічні втрати. Дріжджі *Candida glabrata* досить часто є збудниками такого захворювання. Використання протигрибкових засобів не завжди полегшує стан за рахунок розвитку в патогенів резистентності до препаратів. Це вимагає досліджень нових терапевтичних засобів, які діють при нормальному кислому pH статевих органів. Як зазначалось вище, дріжджі *C. glabrata* не утворюють монофілетичну групу з *D. hansenii*, оскільки більш тісно пов'язані з дріжджами *S. cerevisiae*, що також здатні синтезувати кілер-токсини, які є оптимально активними в кислих умовах. Саме завдяки подібності в будові клітинних стінок *C. glabrata* та *S. cerevisiae* було припущено, що токсини *S. cerevisiae* здатні ефективно впливати на рецептори клітин *C. glabrata*, приводячи в результаті до їх загибелі. Для підтвердження цього 53 клінічні ізоляти *C. glabrata* були перевірені на чутливість до дев'яти штамів дріжджів, що експресують відповідні кілер-токсини методом лункового аналізу. Дріжджі з кілерним фенотипом K1 та K2 пригнічували ріст *C. glabrata* на 100% та 96% відповідно, тоді як решта дріжджів були здатні інгібувати менше 33% ізолятів *C. glabrata*. Також на активність були протестовані безпосередньо виділені та частково очищені токсини K1 та K2, які здатні були пригнічувати всі ізоляти *C. glabrata* у найвищій протестованій концентрації. Тобто токсини K1 та K2 можуть бути корисними як нові протигрибкові засоби, які порівняно з азолами, є фунгіцидними, оптимально активними при низькому pH і нетоксичними для клітин людини при фізіологічному pH (Fredericks та ін., 2021).

Дослідження (Tan, & Tay, 2011) було спрямоване на вивчення потенційного застосування кілер-токсинів, що були синтезовані дріжджами, виділеними з об'єктів довкілля, для зменшення й усунення біоплівки *C. albicans*. Фільтратами, отриманими після культивування дріжджів з кілерним фенотипом, обробляли біоплівку штаму *C. albicans* ATCC 90028. Після 48 год впливу культурального фільтрату, проводили визначення метаболічної активності біоплівки. Спостерігалось, що зниження її активності на понад 50% відбувалось після впливу культурального фільтрату дев'яти токсинів-кілерів. Найвищий відсоток — 71,9% зниження метаболічної активності біоплівки продемонстрував культуральний фільтрат ізоляту

Pseudozyma. Проведене дослідження дає підстави для подальшої розробки стратегій використання кілер-токсинів з метою обмеження утворення біоплівки *C. albicans* на медичних інструментах.

Дослідження кілер-токсину *W. saturnus* DBVPG 4561 показало, що KT4561 характеризується широкою антимікотичною активністю щодо патогенних видів *Candida non-albicans*, а саме *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, які є нечутливими до азольних і полієнових антибіотиків. Крім того, цей токсин залишається активним за фізіологічних значень pH та температури, що відкриває широкі перспективи до його можливого застосування як антикандидозного агента (Buzzini, Corazzi, Turchetti, Buratta, & Martini, 2004).

Увагу вчених привернули також дріжджі *Whickerhamomyces anomalus* та *Torulaspora delbrueckii*, які здатні продукувати токсини WK та ТК відповідно. Було проведено оцінювання їх протигрибкової активності методом лункового аналізу та визначено ефективність подальшого використання очищених токсинів як альтернативних препаратів проти певних патогенних грибів, зокрема *Candida albicans*, *Aspergillus niger* і *Aspergillus flavus*. Хоч результати й показали, що сполука WK проявляла більш високу інгібуючу дію щодо всіх протестованих ізолятів порівняно з ТК, проте це дослідження повною мірою підтверджує медичну важливість двох кілер-токсинів проти патогенних грибів. Варто зазначити, що в дослідженні також було встановлено значний вплив умов культивування продуцентів на активність очищених токсинів. Тому штами *T. delbrueckii* та *W. anomalus* інкубували в середовищі одного складу (бульйон екстракту дріжджового солоду з 2% натрій додецил сульфатом (SDS)) з різними режимами перемішування мішалки (120, 150, 160, 180, 200) об/хв, значеннями pH (4,5; 5,5; 6,0; 6,5) та температури (15, 20, 25, 30, 37) °C (Abu-Mejdad, Al-Saadoon, Al-Badran, & Minati, 2020).

Наступне дослідження було спрямоване на визначення здатності токсинів WK та ТК інгібувати дріжджі *Candida albicans*, отримані від пацієнта, який страждав на кандидоз шкіри. Для цього суспензію умовно-патогенних дріжджів наносили на поверхню агару та розподіляли шпателем, планшети залишали на 15 хв за кімнатної температури до висихання, після чого робили лунки діаметром 6 мм та вносили в кожну по 100 мкл токсинів-кілерів у концентрації 200 мг/мл та інкубували при 37 °C протягом 24 години. Отримані результати підтвердили високу активність кілеру WK щодо дріжджів *Candida albicans*, адже зона інгібування складала близько 35 мм (Abu-Mejdad, Al-Badran, & Al-Saadoon, 2020).

Штам морського походження *Wickerhamomyces anomalus* YF07b, виділений з кишківника асцидії, також має високу здатність виробляти кілер-токсини. Отриманий екзометаболіт очищали та проводили визначення його антимікробної активності за допомогою дифузійного тесту з використанням стерильних оксфордських чашок. Під час дослідження (Guo, Ma, Xu, Wang, & Chi, 2013) було встановлено, що максимальна антимікробна активність токсину *W. anomalus* YF07b спостерігалася при pH 3,5 та температурі 16 °C щодо таких мікроорганізмів: *Yarrowia lipolytica*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Metschnikowia bicuspidata* WCY, *Candida tropicalis*, *Candida albicans* та *Kluyveromyces aestuarii*. Отже, спектр активності цих токсинів був досить широким, проте не виключав дріжджі роду *Candida*.

Також було проведено дослідження з визначення активності мікоцинів *W. Anomalus* з навколишнього середовища щодо штамів *Candida albicans*, виділених з

крові. Було встановлено, що за концентрації 200 мкг/мл максимальний відсоток чутливих штамів складав лише 70%. Натомість при концентрації 400 мкг/мл екстракти мікоцинів WA40M1, WA45M2, WA92M3 продемонстрували певну активність, відповідно, 96,6%, 96,6% та 90% штамів *C. albicans* виявились чутливими. Крім того, визначено, що виділені мікоцини не є токсичними для клітин людини. Ці властивості свідчать про те, що мікоцини *W. anomalus* є потенційними кандидатами для розробки нових протигрибкових препаратів (Paris, Persel, Serafin, de Cássia Garcia Simão, & Gandra, 2016).

Отже, зважаючи на антимікробну активність токсинів *W. anomalus* щодо патогенних дріжджів *Candida*, їх можна розглядати як альтернативні протигрибкові засоби. З огляду на це було проведено ряд досліджень для виявлення найбільш оптимального продуцента, здатного синтезувати токсин з найвищою антикандидозною активністю.

Як такий продуцент був запропонований штам *W. anomalus* tp2-15, проте отриманий токсин продемонстрував досить вузький спектр активності, націлений тільки на *C. mesorugosa*, тому пошуки продуцента продовжуються далі (Tay, Lim, & Tan, 2014).

Також вчені досліджували кілер-токсин Wa1F1-KT, продуцентом якого є штам *W. anomalus* 1F1. Зокрема, була визначена його антимікробна активність щодо чутливих і стійких до флуконазолу клінічних ізолятів і лабораторних штамів *Candida albicans* та *C. glabrata*. Після культивування продуценту отриманий токсин очищали та визначали його активність методом лункового аналізу, вносячи в кожну лунку, діаметром 8 мм, по 40 мкл неочищеного екстракту. Результати показали, що Wa1F1-KT був активний як до чутливих, так і резистентних до флуконазолу штамів *C. glabrata*, проте справляв інгібувальну дію лише на один, з-поміж усіх досліджуваних, мутантний штам *C. albicans* DSY289, що був стійким до флуконазолу. Отже, Wa1F1-KT може використовуватися як універсальний засіб проти дріжджів *C. glabrata* (Giovati та ін., 2018).

У наступному дослідженні (Fernández de Ullivarri та ін., 2020) було оцінено антикандидозну активність кілер-токсину *W. anomalus* Cf20. У результаті було встановлено, що завдяки синтезу кілер-токсинів з високою активністю дріжджі *Wickerhamomyces anomalus* Cf20, культивування яких проводилося в середовищі з рН 4,5, за температури 25 °C протягом 96 год, та їх безклітинний супернатант пригнічують один колекційний штам *C. glabrata* NCYC 388 та шість клінічних патогенних штамів *Candida* spp., серед яких *C. tropicalis*, *C. krusei* та *C. albicans*. Тож ці сполуки можна використовувати як альтернативу для лікування інфекцій, спричинених дріжджами роду *Candida*.

Крім кандидозів, велику небезпеку сьогодні представляє й таке захворювання, як малярія, що викликається найпростішими паразитами *Plasmodium* та передається комарами *Anopheles*. Була розроблена нова стратегія боротьби з малярією, яка полягала у використанні мікробних симбіонтів для запобігання розвитку паразитів у кишечнику комарів і блокуванні передачі інфекції людині. Як симбіонт було запропоновано дріжджі *Wickerhamomyces anomalus* F17.12, виділені з кишківника комарів роду *Anopheles*, що характеризувалися здатністю до синтезу антимікробного токсину (Carpelli та ін., 2014; Cesarini та ін., 2019).

Метою проведеного дослідження (Valzano та ін., 2016) було визначення можливості токсину *W. anomalous* F17.12 проявляти антиплазмодіальну активність шляхом впливу на спорогонічні стадії малярійного паразита *Plasmodium berghei*. Для отримання кілер-токсинів, дріжджі *W. anomalous* F17.12 культивували в середовищі YPD з pH 4,5, за температури 26 °C, інтенсивності перемішування 70 об/хв протягом 36 годин. Антиплазмодіальну активність очищеного токсину WaF17.12-КТ тестували на культурах спорогонічної стадії *P. berghei* методом біоаналізу з дифузійними лунками, при цьому токсин додавали в чотирьох концентраціях: 25, 60, 75 та 100 мкг/мл. Після інкубування засіяних планшет за температури 19 °C протягом 24 год, проводили оцінювання кілерної активності токсину. Отримані результати свідчать, що за концентрації 100 мкг/мл спостерігалось безперечне інгібування розвитку спорогонічних стадій паразитів до 90%. Тобто це підтверджує, що кілер-токсин здатен впливати на ранні споронгонічні стадії *P. Berghei*, викликаючи пошкодження мембран і загибель паразита.

Такі результати спонукали проведення додаткових досліджень *in vivo* для оцінки антиплазмодіальної активності штаму Wa F17.12 на спорогонічні стадії паразита *P. berghei* у комара *An. stephensi*. Кількість паразитів у середній кишці комарів, які отримували цукровий розчин з додаванням Wa F17.12, оцінювали через 24 год після зараження. Результати показали, що в комарів, колонізованих *W. anomalous* F17.12, розвивалось на 62% менше паразитів, ніж у контрольній групі, яку годували лише цукровим розчином. Проведені дослідження відкривають нові перспективи для можливого використання токсину-кілера з метою запобігання розвитку малярійного паразита у комарів-переносників, що дасть змогу зменшити захворюваність у людей (Cappelli та ін., 2019).

Антиплазмодіальна активність кілер-токсину, секретованого дріжджами *W. anomalous* F17.12 і їх біологічна спорідненість із самицею комара, є ключовими характеристиками в можливій боротьбі з малярією. Проте впровадження такого продукту та його комерціалізація потребує додаткових випробувань, спрямованих на оптимізацію промислового культивування і зберігання отриманого продукту та оцінку токсичності. В дослідженні (Cappelli, Amantini, Maggi, Favia, & Ricci, I., 2021) було оцінено можливість реактивації росту штаму *W. Anomalous* F17.12 і підтримки активності кілер-токсину після ліофільного висушування. Так, швидкість росту культури *W. anomalous* F17.12 оцінювали через 4, 12, 18, 25, 32 і 60 днів зберігання при кімнатній температурі після сушки виморожуванням шляхом інкубування при оптимальних умовах протягом 36 годин. Встановлено, що швидкість росту штаму, який зберігався у ліофілізованому стані, не відрізнялась від звичайного зразка до 32 діб зберігання, уповільнення було виявлено після 60 діб, проте життєдіяльність продуцента навіть після 4—5 тижнів витримування в ліофілізованому стані була непорушною. Для оцінки збереження кілерної активності супернатант було протестовано щодо чутливого штаму: антимікробна активність кілер-токсину після ліофілізація була незмінною. Оцінку токсичності проводили шляхом дослідження впливу *W. anomalous* F17.12 на клітинні лінії кератиноцитів людини, які являють собою первинний бар'єр людського організму. Обробка різними концентраціями *W. anomalous* F17.12 (1000, 5000, 10000 клітин/мл) протягом

24 та 48 год не чинила цитотоксичного впливу на кератиноцити людини і не впливала на життєздатність людських клітин. Проведене дослідження є своєрідним кроком вперед для комерціалізації штаму-продуценту *W. anomalous* F17.12, пов'язаного з комарами-переносниками, як інноваційного інструменту для запобігання поширенню малярії.

Окрім впливу на чутливі дріжджові та паразитичні клітини, була досліджена й антибактеріальна активність деяких кілер-токсинів.

Staphylococcus aureus — це один із бактеріальних патогенів, що здатен викликати харчові отруєння у людей. М'ясо та інші харчові продукти, заражені *S. aureus*, вважаються небезпечними для здоров'я населення, оскільки цей патогенний мікроорганізм володіє стійкістю до деяких протимікробних препаратів. Метою дослідження (Calazans та ін., 2020) було визначення антимікробної активності мікоцинів *W. anomalous* щодо штамів *S. aureus*, виділених з яловичини, свинини та курятини. Для отримання токсинів штаму *W. anomalous* WA45 інкубували за температури 25 °C протягом 5 діб. Культуральну рідину центрифугували при 6000 об/хв протягом 10 хв для отримання супернатанту, який використовували в тестах визначення антимікробної активності. Модифікований метод дифузії у щільне агаризоване середовище базувався на розділенні стерильної чашки на дві частини, в одну вносили одержаний супернатант, інша — слугувала для контролю. Обидві частини засівали патогенними штамми *S. aureus*. Також для визначення активності використовували метод лункового аналізу з інкубуванням чашок протягом 24 год при 36 °C. В обох тестах спостерігалось повне інгібування бактерій у досить низьких концентраціях — 0,02 од/мг. Це дає підстави для використання кілер-токсинів не тільки як антимікробних засобів, а й нових агентів для біоконтролю і біоконсервації м'яса та інших харчових продуктів.

Acinetobacter baumannii — це грамнегативні, мультирезистентні умовно-патогенні бактерії, що викликають занепокоєння через здатність викликати пневмонію, септицемію, шкірні інфекції, ендокардит, менінгіт тощо в ослаблених пацієнтів. Мета дослідження (Junges та ін., 2020) полягала в тому, щоб оцінити чутливість мультирезистентних клінічних штамів *A. baumannii* до мікоцинів *W. anomalous* WA40, WA45, WA92 та перевірити цитотоксичність отриманих токсинів. Умови культивування та визначення антимікробної активності були подібні до таких у попередньому дослідженні (Giovati та ін., 2018). При цьому мікоцини продемонстрували інгібіторну активність щодо п'ятдесяти штамів *A. Baumannii*. Для отримання інформації про цитотоксичність супернатантів з мікоцином було проведено тест на гемоліз еритроцитів і токсичність щодо мікроскопічних ракоподібних *Artemia salina*. Результати показали, що токсини характеризувались низькою гемолітичною дією та відсутністю, на відміну від поліміксину, токсичності щодо *Artemia salina*. Це, у свою чергу, підтверджує перевагу мікоцинів порівняно з деякими антибіотичними речовинами.

Дещо пізніше в дослідженні (Abu-Mejdad, Al-Badran, Al-Saadoon, & Minati, 2020) було встановлено, що, крім протигрибкової, токсини *W. anomalous* та *T. delbrueckii* володіють й антибактеріальною активністю, зокрема щодо бактерій *E. co-*

лі та *Staphylococcus aureus*, при цьому культивування продуцентів і тест на чутливість проводили аналогічно до таких у попередніх дослідженнях (Abu-Mejdad, Al-Badran, & Al-Saadoon, 2020).

Антибактеріальною активність характеризувалися також кілер-токсини, синтезовані дріжджами *P. kudriavzevii* RY55 та *D. hansenii* DSMZ70238. Так, методом лункового аналізу було встановлено, що кілер-токсини *Pichia kudriavzevii* RY55 є активними проти деяких потенційних бактеріальних патогенів, зокрема: *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella* sp., *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. alcaligenes* (Bajaj, Raina, & Singh, 2013). Дріжджі *D. hansenii* DSMZ70238 також синтезували білкові екзометаболіти з високою токсичною активністю щодо бактеріальних патогенів: *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumonia* та *S. pyogenes*, які мають значення для здоров'я людини. Крім того, дослідження (Al-Qaysi, Al-Haideri, Thabit, Al-Kubaisy, & Ibrahim, 2017) було спрямоване й на вдосконалення умов культивування для отримання кілер-токсину з високою активністю. Зокрема, для покращення вироблення токсину штам *D. hansenii* культивували в аеробних умовах при різних значеннях температури (5—30 °C) та pH (від 3,0 до 6,0). Дослідження показали, що оптимальним є інкубування продуценту в середовищі з низьким значенням pH за температури 25 °C.

Умови культивування продуцентів, що забезпечували б оптимальне виробництво і активність кілер-токсинів та їх антимікробна спрямованість, представлені в табл. 3.

Таблиця 3. Особливості біотехнології та антимікробна активність кілер-токсинів

Продуцент	Умови культивування	Склад поживного середовища, г/л	Антимікробна спрямованість кілер-токсинів	Джерело
1	2	3	4	5
<i>Williopsis saturnus</i> WC91-2	22 °C, 180 об/хв, 72 год, pH=4,5	Середовище YPD: дріжджовий екстракт — 10, пептон — 20, глюкоза — 20, з додаванням NaCl — 20 та гліцерину — 15% (об'ємна частка)	<i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>Yarrowia lipolytica</i> , <i>Lodderomyces elongisporus</i> , <i>Metschnikowia bicuspidate</i> WCY	Wang та ін., 2012
<i>Williopsis saturnus</i> DBVPG 4561	25 °C, 140 об/хв, 24 год, pH=4,5	Середовище YEPG: дріжджовий екстракт — 10, пептон — 10, глюкоза — 20	<i>Candida glabrata</i> , <i>Issatchenkia orientalis</i> , <i>Pichia guilliermondii</i>	Buzzini, Corazzi, Turchetti, Buratta, & Martini, 2004
<i>Metschnikowia saccharicola</i> DD21-1	27,5 °C, 140 об/хв, 54 год, pH=5,5	Середовище YPD: дріжджовий екстракт — 10, пептон — 20, глюкоза — 20 з внесенням 15% гліцерину та 2% NaCl за об'ємом	<i>Metschnikowia bicuspidate</i> WCY	Тан та ін., 2018

1	2	3	4	5
<i>Debaryomyces hansenii</i> DSMZ70238	25 °C, 130 об/хв, 72 год, pH=4,5	Середовище YPD: дріжджовий екстракт — 10, пептон — 20, глюкоза — 20	<i>C. albicans</i> , <i>C. neoformans</i> , <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Trichophyton rubrum</i> , <i>T. concentricum</i>	Al-Qaysi, Al-Haideri, Thabit, Al-Kubaisy, & Ibrahim, 2017
<i>T. delbrueckii</i> та <i>W. anomalus</i>	30 °C, 150 об/хв, 72 год, pH=4,5	Середовище YMB: дріжджовий екстракт – 3, солодовий екстракт – 3, пептон – 5, глюкоза – 10 з внесення 2% SDS	<i>Candida albicans</i> , <i>Aspergillus niger</i> i <i>Aspergillus flavus</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i>	Abu-Mejdad, Al-Saadoon, Al-Badran, & Minati, 2020; Abu-Mejdad, Al-Badran, Al-Saadoon, & Minati, 2020
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> YF07b	20 °C, 180 об/хв, 72 год	Середовище YPD: дріжджовий екстракт — 10, пептон — 20, глюкоза — 20	<i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>Y. lipolytica</i> , <i>M. bicuspidate</i> WCY, <i>Kluyveromyces aestuarii</i>	Banjara, Nickerson, Suhr, & Hallen-Adams, 2016
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> 1F1	20 °C, 150 об/хв, 72 год, pH=4,6	Середовище YPD: дріжджовий екстракт — 10, пептон — 20, глюкоза — 20 з внесенням 15% гліцерину (за об'ємом)	<i>C. albicans</i> DSY 289, <i>C. glabrata</i> , <i>C. lusitaniae</i>	Giovati та ін., 2018
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> tp2-15	30 °C, 120 об/хв, 72 год, pH=4,5	Середовище YPD: дріжджовий екстракт — 10, пептон — 20, глюкоза — 20	<i>Candida mesorugosa</i>	Hua, Chi, Liu, Buzdar, & Chi, 2010
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> F17.12	26 °C, 70 об/хв, 36 год, pH=4,5	Середовище YPD: дріжджовий екстракт — 10, пептон — 20, глюкоза — 20	<i>Plasmodium berghei</i>	Valzano та ін., 2016
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> Cf20	20 °C, 96 год, pH=4,5	Середовище YPD: дріжджовий екстракт — 10, пептон — 20, глюкоза — 20	<i>C. albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. krusei</i>	Fernández de Ullivarri та ін., 2020

Висновки

Існує велике різноманіття дріжджових кілер-токсинів (мікоцинів), які відрізняються за молекулярною масою, проте переважна більшість належить до низькомолекулярних білків, що залишаються стабільними за кислих значень рН та значень температур, що не перевищують 40 °С. Механізм дії кілер-токсинів також дещо відрізняється, але невід'ємними етапами для їх активності є зв'язування з первинними та вторинними рецепторами чутливих клітин.

Проаналізовані дослідження підтверджують, що дріжджові кілер-токсини володіють досить широким спектром антимікробної активності щодо патогенних мікроорганізмів: дріжджів, бактерій, грибів й паразитичних організмів, здатних викликати різноманітні захворювання людей. Це дає підґрунтя для формування подальших досліджень з метою розробки нових антимікробних лікарських засобів, таких необхідних в час значного розвитку резистентності у патогенних мікроорганізмів до вже існуючих препаратів.

Література

Цапко, С. О., Красінько, В. О. *Кілерна активність дріжджів, виділених із рослинної сировини*. Збірник матеріалів V Міжнародної науково-практичної конференції «Біотехнологія: досягнення і перспективи розвитку».

Abu-Mejdad, N. M. J. A., Al-Badran, A. I., & Al-Saadoon, A. H. (2020). Purification and characterization of two killer toxins originated from *Torulaspora delbrueckii* (Lindner) and *Wickerhamomyces anomalus* (EC Hansen) Kurtzman, Robnett, and Basehoar-Powers. *Bulletin of the National Research Centre*, 44, 1—8.

Abu-Mejdad, N. M. J. A., Al-Badran, A. I., Al-Saadoon, A. H., & Minati, M. H. (2020). A new report on gene expression of three killer toxin genes with antimicrobial activity of two killer toxins in Iraq. *Bulletin of the National Research Centre*, 44, 1—9.

Abu-Mejdad, N. M. J. A., Al-Saadoon, A. H., Al-Badran, A. I., & Minati, M. H. (2020). Optimum conditions of killer toxins produced by *Torulaspora delbrueckii* and *Wickerhamomyces anomalus* and their action as antifungal agents. *Bulletin of the National Research Centre*, 44, 1—9.

Al-Qaysi, S. A., Al-Haideri, H., Thabit, Z. A., Al-Kubaisy, W. H. A. A. R., & Ibrahim, J. A. A. R. (2017). Production, characterization, and antimicrobial activity of mycocin produced by *Debaryomyces hansenii* DSMZ70238. *International journal of microbiology*, 2017(1), 2605382.

Bajaj, B. K., & Singh, S. (2017). Biology of killer yeast and technological implications. *Yeast Diversity in Human Welfare*, 163-190.

Bajaj, B. K., Raina, S., & Singh, S. (2013). Killer toxin from a novel killer yeast *Pichia kudriavzevii* RY55 with idiosyncratic antibacterial activity. *Journal of basic microbiology*, 53(8), 645—656.

Banjara, N., Nickerson, K. W., Suhr, M. J., & Hallen-Adams, H. E. (2016). Killer toxin from several food-derived *Debaryomyces hansenii* strains effective against pathogenic *Candida* yeasts. *International journal of food microbiology*, 222, 23—29.

Becker, B., & Schmitt, M. J. (2017). Yeast killer toxin K28: biology and unique strategy of host cell intoxication and killing. *Toxins*, 9(10), 333.

Belda, I., Ruiz, J., Alonso, A., Marquina, D., & Santos, A. (2017). The biology of *Pichia membrifaciens* killer toxins. *Toxins*, 9(4), 112.

Bhattacharya, S., Sae-Tia, S., & Fries, B. C. (2020). Candidiasis and mechanisms of antifungal resistance. *Antibiotics*, 9(6), 312.

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 microbiology letters*, 238(2), 359—365.

- Calazans, G. F., Silva, J. C. D., Delabeneta, M. F., Paris, A. P., Yassuda Filho, P., Auler, M. E., ..., & Gandra, R. F. (2020). Antimicrobial activity of *Wickerhamomyces anomalus* mycocins against strains of *Staphylococcus aureus* isolated from meats. *Food Science and Technology*, 41, 388—394.
- Cappelli, A., Amantini, C., Maggi, F., Favia, G., & Ricci, I. (2021). Formulation and Safety Tests of a *Wickerhamomyces anomalus*-Based Product: Potential Use of Killer Toxins of a Mosquito Symbiotic Yeast to Limit Malaria Transmission. *Toxins*, 13(10), 676.
- Cappelli, A., Ulissi, U., Valzano, M., Damiani, C., Epis, S., Gabrielli, M. G., ..., & Ricci, I. (2014). A *Wickerhamomyces anomalus* killer strain in the malaria vector *Anopheles stephensi*. *PloS one*, 9(5), e95988.
- Cappelli, A., Valzano, M., Cecarini, V., Bozic, J., Rossi, P., Mensah, P., ..., & Ricci, I. (2019). Killer yeasts exert anti-plasmodial activities against the malaria parasite *Plasmodium berghei* in the vector mosquito *Anopheles stephensi* and in mice. *Parasites & vectors*, 12, 1—8.
- Carmona-Gutierrez, D., Eisenberg, T., Büttner, S., Meisinger, C., Kroemer, G., & Madeo, F. (2010). Apoptosis in yeast: triggers, pathways, subroutines. *Cell Death & Differentiation*, 17(5), 763—773.
- Cecarini, V., Cuccioloni, M., Bonfili, L., Ricciutelli, M., Valzano, M., Cappelli, A., ..., & Ricci, I. (2019). Identification of a Killer Toxin from *Wickerhamomyces anomalus* with β -Glucanase Activity. *Toxins*, 11(10), 568.
- Chen, W. B., Han, Y. F., Jong, S. C., & Chang, S. C. (2000). Isolation, purification, and characterization of a killer protein from *Schwannomyces occidentalis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(12), 5348—5352.
- Comitini, F., Mannazzu, I., & Ciani, M. (2009). *Tetrapisispora phaffii* killer toxin is a highly specific β -glucanase that disrupts the integrity of the yeast cell wall. *Microbial Cell Factories*, 8, 1—11.
- El-Banna, A. A., Malak, A. E., & Shehata, M. G. (2011). Yeasts producing killer toxins: An overview. *Alexandria Journal of Food Science and Technology*, 8(2), 41—53.
- Fernández de Ullivarri, M., Bulacios, G. A., Navarro, S. A., Lanza, L., Mendoza, L. M., & Chalón, M. C. (2020). The killer yeast *Wickerhamomyces anomalus* Cf20 exerts a broad anti-*Candida* activity through the production of killer toxins and volatile compounds. *Medical Mycology*, 58(8), 1102—1113.
- Fredericks, L. R., Lee, M. D., Eckert, H. R., Li, S., Shipley, M. A., Roslund, C. R., ..., & Rowley, P. A. (2021). Vaginal isolates of *Candida glabrata* are uniquely susceptible to ionophoric killer toxins produced by *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 65(7), 10—1128.
- Gier, S., Schmitt, M. J., & Breinig, F. (2017). Expression of K1 toxin derivatives in *Saccharomyces cerevisiae* mimics treatment with exogenous toxin and provides a useful tool for elucidating K1 mechanisms of action and immunity. *Toxins*, 9(11), 345.
- Gier, S., Simon, M., Gasparoni, G., Khalifa, S., Schulz, M. H., Schmitt, M. J., & Breinig, F. (2020). Yeast viral killer toxin K1 induces specific host cell adaptations via intrinsic selection pressure. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(4), e02446-19.
- Gier, S., Simon, M., Nordström, K., Khalifa, S., Schulz, M. H., Schmitt, M. J., & Breinig, F. (2019). Transcriptome kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* in response to viral killer toxin K1. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1102.
- Giesselmann, E., Becker, B., & Schmitt, M. J. (2017). Production of fluorescent and cytotoxic K28 killer toxin variants through high cell density fermentation of recombinant *Pichia pastoris*. *Microbial cell factories*, 16, 1—9.
- Giovati, L., Ciociola, T., De Simone, T., Conti, S., & Magliani, W. (2021). *Wickerhamomyces* yeast killer toxins' medical applications. *Toxins*, 13(9), 655.
- Giovati, L., Santinoli, C., Ferrari, E., Ciociola, T., Martin, E., Bandi, C., ..., & Conti, S. (2018). Candidacidal activity of a novel killer toxin from *Wickerhamomyces anomalus* against fluconazole-susceptible and-resistant strains. *Toxins*, 10(2), 68.
- Guo, F. J., Ma, Y., Xu, H. M., Wang, X. H., & Chi, Z. M. (2013). A novel killer toxin produced by the marine-derived yeast *Wickerhamomyces anomalus* YF07b. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 103, 737—746.

- Hodgson, V. J., Button, D., & Walker, G. M. (1995). Anti-Candida activity of a novel killer toxin from the yeast *Williopsis mrakii*. *Microbiology*, 141(8), 2003—2012.
- Hua, M. X., Chi, Z., Liu, G. L., Buzdar, M. A., & Chi, Z. M. (2010). Production of a novel and cold-active killer toxin by *Mrakia frigida* 2E00797 isolated from sea sediment in Antarctica. *Extremophiles*, 14, 515—521.
- Junges, D. S., Delabeneta, M. F., Rosseto, L. R. B., Nascimento, B. L., Paris, A. P., Persel, C., ..., & Gandra, R. F. (2020). Antibiotic activity of *Wickerhamomyces anomalus* mycocins on multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Microbial ecology*, 80, 278—285.
- Klassen, R., Schaffrath, R., Buzzini, P., & Ganter, P. F. (2017). Antagonistic interactions and killer yeasts. *Yeasts in natural ecosystems: Ecology*, 229—275.
- Liu, G. L., Chi, Z., Wang, G. Y., Wang, Z. P., Li, Y., & Chi, Z. M. (2015). Yeast killer toxins, molecular mechanisms of their action and their applications. *Critical reviews in biotechnology*, 35(2), 222—234.
- Magliani, W., Conti, S., Travassos, L. R., & Polonelli, L. (2008). From yeast killer toxins to anti-biobodies and beyond. *FEMS Microbiology letters*, 288(1), 1—8.
- Mannazzu, I., Domizio, P., Carboni, G., Zara, S., Zara, G., Comitini, F., ..., & Ciani, M. (2019). Yeast killer toxins: From ecological significance to application. *Critical reviews in biotechnology*, 39(5), 603—617.
- Mannazzu, I., Domizio, P., Carboni, G., Zara, S., Zara, G., Comitini, F., ..., & Ciani, M. (2019). Yeast killer toxins: From ecological significance to application. *Critical reviews in biotechnology*, 39(5), 603—617.
- Marquina, D., Barroso, J., Santos, A., & Peinado, J. M. (2001). Production and characteristics of *Debaryomyces hansenii* killer toxin. *Microbiological research*, 156(4), 387—391.
- Melvlydas, V., Bružauskaitė, I., Gedminienė, G., & Šiekštelė, R. (2016). A novel *Saccharomyces cerevisiae* killer strain secreting the X factor related to killer activity and inhibition of *S. cerevisiae* K1, K2 and K28 killer toxins. *Indian journal of microbiology*, 56, 335—343.
- Melvlydas, V., Serviėne, E., Cernishova, O., & Petkunienė, G. (2007). A novel X factor secreted by yeast inhibits *Saccharomyces cerevisiae* K1, K2 and K28 killer toxins. *Biologija*, 53(2).
- Orentaite, I., Poranen, M. M., Oksanen, H. M., Daugėlavicius, R., & Bamford, D. H. (2016). K2 killer toxin-induced physiological changes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS yeast research*, 16(2), fow003.
- Paris, A. P., Persel, C., Serafin, C. F., de Cássia Garcia Simão, R., & Gandra, R. F. (2016). Susceptibility of *Candida albicans* isolated from blood to *Wickerhamomyces anomalus* mycocins. *Current microbiology*, 73, 878—884.
- Polonelli, L., Magliani, W., Ciociola, T., Giovati, L., & Conti, S. (2011). From *Pichia anomala* killer toxin through killer antibodies to killer peptides for a comprehensive anti-infective strategy. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 99, 35—41.
- Radhamany, D., Rao, S., & Kotigadde, S. (2019). Bioregulatory role of *Wickerhamomyces anomalus* killer toxin against pathogenic members of the genus *Candida*. *Journal of Microbiology and Infectious Diseases*, 9(04), 155—160.
- Rodríguez-Cousiño, N., Maqueda, M., Ambrona, J., Zamora, E., Esteban, R., & Ramírez, M. (2011). A new wine *Saccharomyces cerevisiae* killer toxin (Klus), encoded by a double-stranded RNA virus, with broad antifungal activity is evolutionarily related to a chromosomal host gene. *Applied and environmental microbiology*, 77(5), 1822—1832.
- Santos, A., San Mauro, 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*. *Microbiology*, 155(2), 624—634.
- Schmitt, M. J., & Breinig, F. (2006). Yeast viral killer toxins: lethality and self-protection. *Nature Reviews Microbiology*, 4(3), 212—221.
- Soares, G. A., & Sato, H. H. (2000). Caracterização da toxina "killer" da linhagem de *Saccharomyces cerevisiae* Y500-4L. *Brazilian Journal of Microbiology*, 31, 291—297.

Stopiglia, C. D. O., Heidrich, D., Sorrentino, J. M., Vieira, F. J., Landell, M. F., Valente, P., & Scrofermeker, M. L. (2014). Susceptibility of species within the *Sporothrix schenckii* complex to a panel of killer yeasts. *Journal of Basic Microbiology*, 54(6), 578—584.

Tan, C., Wang, L., Xue, Y., Lin, S., Yu, G., & Yang, S. (2018). Purification and molecular characterization of a *Metschnikowia saccharicola* killer toxin lethal to a crab pathogenic yeast. *FEMS microbiology letters*, 365(10), fny038.

Tan, C., Wang, L., Xue, Y., Lin, S., Yu, G., & Yang, S. (2018). Purification and molecular characterization of a *Metschnikowia saccharicola* killer toxin lethal to a crab pathogenic yeast. *FEMS microbiology letters*, 365(10), fny038.

Tan, C., Wang, L., Xue, Y., Yu, G., Yang, S., & Lin, S. (2018). Marine killer yeast *Metschnikowia saccharicola* active against pathogenic yeast in crab and an optimization of the toxin production. *African Journal of Biotechnology*, 17(21), 668—679.

Tan, H. W., & Tay, S. T. (2011). Anti-*Candida* activity and biofilm inhibitory effects of secreted products of tropical environmental yeasts.

Tay, S. T., Lim, S. L., & Tan, H. W. (2014). Growth inhibition of *Candida* species by *Wickerhamomyces anomalus* mycocin and a lactone compound of *Aureobasidium pullulans*. *BMC complementary and alternative medicine*, 14, 1—11.

Torres, M., Ribeiro, M. A., Oliveira, J. A. S., Meurer, E. C., & Schwan-Estrada, K. R. (2021). Partial chemical characterization of the yeast extracts *Lachancea thermotolerans* CCMA 0763. *African Journal of Microbiology Research*, 15(7), 388—395.

Valzano, M., Cecarini, V., Cappelli, A., Capone, A., Bozic, J., Cuccioloni, M., ..., & Ricci, I. (2016). A yeast strain associated to *Anopheles* mosquitoes produces a toxin able to kill malaria parasites. *Malaria journal*, 15, 1—9.

Wang, L., Yue, L., Chi, Z., & Wang, X. (2008). Marine killer yeasts active against a yeast strain pathogenic to crab *Portunus trituberculatus*. *Diseases of aquatic organisms*, 80(3), 211—218.

Wang, X. X., Chi, Z., Peng, Y., Wang, X. H., Ru, S. G., & Chi, Z. M. (2012). Purification, characterization and gene cloning of the killer toxin produced by the marine-derived yeast *Williopsis saturnus* WC91-2. *Microbiological Research*, 167(9), 558—563.