

УДК 664.764:663.14.038.3

Киллерные токсины аскомицетовых дрожжей, подавляющие фитопатогенные грибы *Botrytis cinerea*

В. А. Шагалова¹, М. М. Вустин², Н. Г. Машенцева¹¹ Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)² Биоресурсный центр Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов Национально-исследовательского центра «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика, Москва, Россия**КОРРЕСПОНДЕНЦИЯ:****Шагалова Валерия Алексеевна**

E-mail: shagalovalira@gmail.com

ЗАЯВЛЕНИЕ О ДОСТУПНОСТИ ДАННЫХ:

данные текущего исследования доступны по запросу у корреспондирующего автора.

для ЦИТИРОВАНИЯ:Шагалова, В.А., Вустин, М.М., & Машенцева, Н.Г. (2023). Киллерные токсины аскомицетовых дрожжей, подавляющие фитопатогенные грибы *Botrytis cinerea*. *Хранение и переработка сельхозсырья*, (2), 146-162. <https://doi.org/10.36107/spfp.2023.440>**ПОСТУПИЛА:** 05.06.2023**ПРИНЯТА:** 27.07.2023**ОПУБЛИКОВАНА:** 30.07.2023**КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ:**

авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке государства в лице Министерства образования и науки Российской Федерации, Соглашение № 075-15-2021-1053.

АННОТАЦИЯ**Введение:** Из года в год растет ущерб, причиняемый патогенными микроорганизмами сельскому хозяйству. Использование пестицидов может негативно сказываться на качестве сырья и здоровье потребителей. Односторонний подход в решении данного вопроса не приводит к положительным результатам. Киллерные токсины (КТ) дрожжей представляют значительный интерес для биотехнологии в качестве препаратов, подавляющих активность патогенов.**Целью** данного исследования является проведение скрининга штаммов аскомицетовых дрожжей из коллекции Национального биоресурсного центра Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов НИЦ «Курчатовский институт», проявляющих наибольшую киллерную активность по отношению к фитопатогенным грибам вида *Botrytis cinerea*, а также определение факторов, влияющих на ее эффективность.**Материалы и методы:** Определение активности КТ проводилось на тонком агаре на полной дрожжевой среде YPD с добавлением 0,5 мл/л 88 % раствора молочной кислоты, pH = 4,5. Значение водородного показателя 4,5 выбрано как оптимальное для большинства исследуемых ранее видов дрожжей. Также проведены тесты при различных значениях pH и температуры. Для поддержания различных температур культивирования дрожжей использовался термостат ТС-1/80 (Смоленское СКТБ СПУ, Смоленск, Россия). Контроль уровня pH производился при помощи индикаторных полосок высокой точности Diversey-MN92110 (Macherey-Nagel, Германия). Для подтверждения видовой принадлежности дрожжей методом микроскопирования использовался микроскоп биологический Микромед 2 (2–20 inf.) (ООО «Наблюдательные приборы», Санкт-Петербург, Россия).**Результаты:** Наибольшие зоны подавления роста *Botrytis cinerea* показаны для штаммов *Schwanniomyces occidentalis* Y1-627, Y-1628, Y-1629, Y-1638, Y-1640, Y-1641, *Metschnikowia pulcherrima* Y-3698. Также небольшие зоны подавления наблюдали у штаммов *Cyberlindnera mrakii* Y-1211, *Wickerhamomyces anomalus* Y-201, Y-3836, Y-4562, Y-1182, *Debaryomyces hansenii* Y-1681. При проведении теста на остальных штаммах действие КТ не выявлено.**Выводы:** В настоящем исследовании обнаружены штаммы киллерных дрожжей из коллекции БРЦ ВКПМ, эффективные против *Botrytis cinerea* F-1006, что имеет потенциальное значение для разработки и использования их в качестве средств биоконтроля.**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА**

киллерные токсины дрожжей, фунгицидные свойства дрожжей, фитопатогенные грибы.



Killer Toxins of Ascomycete Yeast Suppressing Phytopathogenic Fungi *Botrytis cinerea*

¹ Russian Biotechnological University (ROSBIOTECH), Moscow, Russia

² Russian State Collection of Industrial Microorganisms National Bio-Resource Center (BRC VKPM), "Kurchatov Institute" – GOSNIIGENETIKA National Research Center, Moscow, Russia

CORRESPONDENCE:

Valeria A. Shagalova
E-mail: shagalovalira@gmail.com

FOR CITATIONS:

Shagalova, V.A., Vustin, M.M., & Mashentseva, N.G. (2023). Killer Toxins of Ascomycete Yeast Suppressing Phytopathogenic Fungi *Botrytis cinerea*. *Storage and Processing of Farm Products*, (2), 146-162. <https://doi.org/10.36107/spfp.2023.440>

RECEIVED: 05.06.2023

ACCEPTED: 27.07.2023

PUBLISHED: 30.07.2023

DECLARATION OF COMPETING

INTEREST: none declared.

FUNDING

The work was carried out with the financial support of the state represented by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation, Agreement No. 075-15-2021-1053.

Valeria A. Shagalova¹, Mikhail M. Vustin², Natalia G. Mashentseva¹

ABSTRACT

Background: The problem of contamination of agricultural crops and plant raw materials by spoilage microorganisms is urgent – the damage caused by them to agriculture is growing from year to year. The use of pesticides can negatively affect the quality of raw materials and the health of consumers. A unilateral approach to solving this issue does not lead to positive results. Yeast killer toxins (KT) are of considerable interest for biotechnology as drugs that suppress the activity of pathogens.

Purpose: The purpose of this study is to screen ascomycete yeast strains from the collection of the National Bioresource Center of the All-Russian Collection of Industrial Microorganisms of the Kurchatov Institute Research Center, which exhibit the greatest killer activity in relation to phytopathogenic fungi of the *Botrytis cinerea* species, as well as to determine the factors affecting its effectiveness.

Materials and Methods: KT activity was determined on a thin agar on a full yeast medium YPD with the addition of 0,5 ml / l of 88% lactic acid solution, pH = 4,5. The value of the hydrogen index 4,5 was chosen as optimal for most of the studied yeast species.

Results: The largest growth suppression zones of *Botrytis cinerea* were given by *Schwanniomyces occidentalis* strains Y1-627, Y-1628, Y-1629, Y-1638, Y-1640, Y-1641, *Metschnikowia pulcherrima* Y-3698. Also small suppression zones were observed in *Cyberlindnera mrakii* Y-1211, *Wickerhamomyces anomalus* Y-201, Y-3836, Y-4562, Y-1182, *Debaryomyces hansenii* Y-1681 strains. During the test on the remaining strains, the effect of CT was not revealed.

Conclusion: In this study, it was found that killer yeasts from the collection of the BRC VKPM are effective against *Botrytis cinerea* F-1006, which gives the potential for their development and use as means of biocontrol.

KEYWORDS

yeast killer toxin, fungicidal properties of killer yeast, phytopathogenic fungi



ВВЕДЕНИЕ

В научной литературе в области микробиологии и медицины все чаще упоминается о киллерной активности дрожжей в отношении патогенных грибов. Дрожжи — это одноклеточные организмы, которые широко используются в пищевой промышленности для производства хлеба, пива и вина. Некоторые виды дрожжей проявляют киллерную активность — способность подавлять родственные виды и другие микроорганизмы, в том числе патогенные грибы и бактерии. Дрожжи-киллеры выделяют так называемые киллер-токсины или микоцины, которые подавляют рост или жизнеспособность близлежащих чувствительных клеток микроорганизмов. Предполагается, что токсины являются инструментами для интерференционной конкуренции в различных дрожжевых сообществах (Boynnton, 2019).

С точки зрения биотехнологии, киллерные дрожжи полезны благодаря своей противогрибковой/антимикробной активности (Sheppard & Dikicioglu, 2019). Они могут быть использованы в качестве консервантов для продуктов питания, так как способны предотвратить рост и размножение нежелательных микроорганизмов. Кроме того, КТ дрожжей могут быть применены в качестве альтернативы традиционным антимикотикам для лечения грибковых инфекций, таких как кандидоз, аспергиллез, криптококкоз и другие.

Виноградарство и виноделие во всем мире несут экономические потери из-за гнили гроздей винограда. В основном за появление гнили на винограде ответственны мицелиальные грибы, наиболее распространенным из которых является *Botrytis cinerea* (серая плесень). Короткие пептиды дрожжей ингибируют развитие чувствительных клеток,

воздействуя на основные компоненты клеточной стенки грибов.

Использование киллерных дрожжей может иметь большое практическое значение для сельского хозяйства, пищевой промышленности и медицины. **Цель исследования** — провести скрининг штаммов аскомицетовых дрожжей, обладающих киллерной активностью, из коллекции Национального биоресурсного центра Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов НИЦ «Курчатовский институт» и отобрать наиболее активные по отношению к фитопатогенным грибам *Botrytis cinerea*.

ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ

Дрожжи-убийцы распространены в окружающей среде повсеместно. Они были обнаружены на всех континентах, включая Антарктиду. Однако природные штаммы изучены слабо по сравнению с лабораторными образцами. Кроме того, КТ могут выполнять функции, выходящие за рамки использования их в конкурентной борьбе (Becker & Schmitt, 2017).

Открытие пивоваренных штаммов *Saccharomyces cerevisiae*, выделяющих токсин, в середине шестидесятых годов прошлого века положило начало интенсивным исследованиям в области вирусологии дрожжей. К настоящему времени идентифицированы четыре различных токсина-убийцы *S. cerevisiae* (K28, K1, K2 и Klus), кодируемые цитоплазматическими двухцепочечными РНК-содержащими вирусами семейства *Totiviridae* (Sheppard & Dikicioglu, 2019). Список известных дрожжей-продуцентов токсинов постоянно пополняется (Таблица 1). С мо-

Таблица 1
Дрожжи, продуцирующие КТ, и некоторые свойства токсинов

Продуцент	Молекулярная масса	Оптимальное значение температуры культивирования	Локализация гена
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	K28 (37,6 кДа), K1 (19 кДа), K2 (38,7 кДа)	60 °С	дцРНК вирусоподобных частиц
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	47,0 кДа	40 °С	Хромосомная ДНК
<i>Pichia farinosa</i>	14,0 кДа	16 °С	Хромосомная ДНК
<i>Pichia membranifaciens</i>	8 кДа	Неизвестно	дцДНК плаزمиды

Окончание Таблицы 1

Продуцент	Молекулярная масса	Оптимальное значение температуры культивирования	Локализация гена
<i>Williopsis saturnus</i>	11,0 кДа	16 °С	Хромосомная ДНК
<i>Kluyveromyces lactis</i>	(99 кДа), (30 кДа) и (27,5 кДа) субъединицы	Неизвестно	Линейная плазида рGKL1
<i>Debaryomyces hansenii</i>	23 кДа	20 °С	Хромосомная ДНК
<i>Hansenula mrakii</i>	10,7 кДа	60 °С	Хромосомная ДНК
<i>Schwanniomyces occidentalis</i>	7,4 и 4,9 кДа	40 °С	Неизвестно

Примечание. Из «Yeast killer toxins, molecular mechanisms of their action and their applications», by G. L. Liu, Z. Chi, G. Y. Wang, Z. P. Wang, Y. Li, Z. M. Chi, 2015, *Critical Reviews in Biotechnology*, 35(2), 222–234 (<https://doi.org/10.3109/07388551.2013.833582>). Copyright 2015 by Informa UK Limited.

мента открытия штаммов *Saccharomyces cerevisiae*, способных секретировать внеклеточные токсины, было получено много информации, существенно расширяющей знания по фундаментальным аспектам клеточной биологии и генетики дрожжей.

Дрожжи могут обладать дополнительной генетической информацией в виде цитоплазматических линейных молекул дцДНК, называемых вирусоподобными элементами. Некоторые из них кодируют токсины-убийцы. Известно о распространенности таких элементов в дрожжах *Debaryomyces hansenii*, депонированных в коллекциях культур, а также в штаммах, выделенных из голубых сыров (Połomska et al., 2021). КТ дрожжей *Metschnikowia pulcherrima* были протестированы против трех широко распространенных микроорганизмов: *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus* и *Candida albicans*. Токсин-убийца проявлял ингибирующую активность только в отношении *M. luteus* (De Lima et al., 2013).

На примере дрожжей *Pichia membranifaciens* были описаны два токсина — РМКТ и РМКТ2. Они представляли собой белки с низкой молекулярной массой, которые связывались с первичными рецепторами, расположенными в структуре клеточной стенки чувствительных штаммов дрожжей — линейными (1 → 6)-β-d-глюканами и маннопротеинами для РМКТ и РМКТ2 соответственно. Было предложено несколько применений для микоцинов *P. membranifaciens*, начиная от биоконтроля патогенов растений до и после сбора урожая и заканчивая применением во время ферментации и выдержки вина (ингибирование *Botrytis cinerea*, *Brettanomyces bruxellensis* и др.) (Büyüksirt & Kuleaşan, 2022). Также Belda с соавторами в 2017 году было проанализировано

в общей сложности 580 штаммов дрожжей, выделенных на бразильского штата Сеара, которые были оценены согласно способности продуцировать КТ. Из них для 29 штаммов установлен положительный результат на фенотип киллера. Пять штаммов дрожжей обеспечили значительное снижение роста мицелия и прорастания конидий *Colletotrichum gloeosporioides in vitro*. Так, дрожжи *Meyerozyma guilliermondii* были способны снижать рост мицелия грибов на твердой среде (картофельно-декстрозный агар, PDA) на 60% и блокировать на 100% прорастание конидий на жидкой среде (картофельно-декстрозный бульон, PDB) (Belda et al., 2017).

Дрожжи *Wickerhamomyces anomalus* способны продуцировать микоцины с высоким содержанием антимикробных веществ, поскольку даже при высоких разведениях они ингибировали *Acinetobacter baumannii*. В твердой среде можно было наблюдать ингибирование *A. baumannii*, вызванное диффузией КТ в агаре. Наконец, супернатанты не были цитотоксичными при тестировании на эритроцитах человека. Согласно полученным данным, микоцины *W. anomalus* оказались эффективными при разработке новых противомикробных веществ (Mazzucco et al., 2019).

Дрожжи *Wickerhamomyces anomalus* играют важную роль в борьбе с патогенными дрожжами и бактериями в пищевой промышленности (Muccilli et al., 2013). Установлен штамм *Wickerhamomyces anomalus* VKM Y-159, продуцирующий два типа токсина, обозначенных как WAKT a и WAKT b, кодируемых хромосомными генами. Токсин WAKT a термостойкий, чувствительный к проназе, активен в ди-

апазоне рН 3–4, действует на несколько дрожжей, включая патогенные виды *Candida*, в то время как токсин WAKT b устойчив к протеазам и термостабилен, действует в диапазоне рН 3–7 на два вида дрожжей, *Candida alai* и *Candida norvegica*. Быстрое уменьшение количества жизнеспособных клеток после обработки токсином демонстрирует, что оба токсина обладают цитолитическим действием (Farkas et al., 2012).

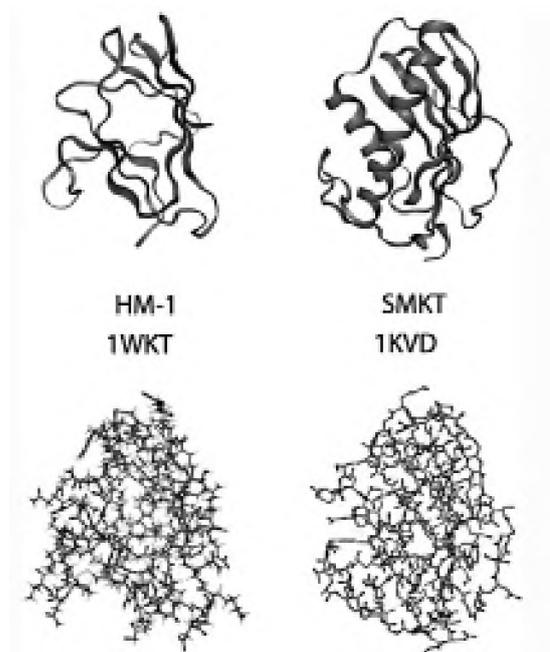
Немалый интерес представляет антагонистическая активность *Williopsis saturnus*. В качестве альтернативного решения для предотвращения роста плесени была разработана противогрибковая пищевая пленка на основе концентрата сывороточного протеина путем включения в нее *Williopsis saturnus* var. *saturnus* (0, 3, 7 и 9 КОЕ/см²). Противогрибковые свойства пленок против *Penicillium expansum* и *Aspergillus niger* были проанализированы с использованием метода дисковой диффузии (Karabulut & Cagri-Mehmetoglu, 2018).

Разнообразие киллерных токсинов дрожжей

КТ дрожжей представляют собой довольно разнородную группу белков. Предполагается, что они неоднократно и независимо возникали в ходе эволюции дрожжей. Со структурной точки зрения токсины-убийцы могут быть сгруппированы в три различных класса: небольшие белки с одной субъединицей, (гетеро-) димерные белки и мультимерные белковые комплексы. Для некоторых КТ были определены трехмерные структуры и наблюдались разнообразные паттерны сворачивания. Например, токсин НМ-1 *Cyberlindnera mrakii* (ранее известный как *Hansenula mrakii*) и SMKT *Millerozyta farinosa* (ранее известный как *Pichia farinosa*) представляли собой небольшие основные белки (<20 кДа), но структурно они, как оказалось, имеют совершенно разные схемы сворачивания. НМ-1 демонстрирует полностью β-складчатую структуру, подобную кристаллинам хрусталика глаза, тогда как SMKT представляет собой белок из двух субъединиц с участками α-спиралей и β-складчатых структур. Общей чертой является наличие большого количества внутримолекулярных дисульфидных связей (Рисунок 1), которые, вероятно, способствуют чрезвычайной термо- и рН-стабильности, характерной для некоторых токсинов, в частности НМ-1 (Klassen et al., 2017).

Рисунок 1

Трехмерные структуры основных токсинов-киллеров НМ-1 и SMKT



Примечание: вверху: модели 1WKT и 1KVD из банка данных белков. Внизу: «проволочное» изображение тех же структур. Изображения были сгенерированы с помощью средства просмотра NGL (WebGL).

Из «Antagonistic Interactions and Killer Yeasts, by R. Klassen, R. Schaffrath, P. Buzzini, P. F. Ganter, 2017, *Yeasts in natural ecosystems: Ecology* (pp. 229–275) (https://doi.org/10.1007/978-3-319-61575-2_9). Copyright 2017 by Springer.

Механизм действия микоцинов и их химическая природа

Существуют первичный и вторичный типы рецепторов к КТ. Первичный обычно располагается на клеточной стенке, а вторичный — на плазматической мембране (Liu et al., 2017).

Первичные рецепторы

Основными компонентами клеточной стенки дрожжей являются (1,3)-β-D-глюкан, (1,6)-β-D-глюкан, маннопротеины и хитин. Известно, что некоторые компоненты клеточных стенок могут быть рецепторами токсина (Liu et al., 2017).

Вторичные рецепторы

После связывания с первичным рецептором в клеточной стенке чувствительных клеток КТ транслоцируется на вторичные рецепторы, локализованные в плазматической мембране, что является энергозависимой стадией. Обычно КТ, например зиготин, имеют катионный суммарный заряд, в то время как плазматическая мембрана чувствительных клеток заряжена отрицательно. В связи с этим КТ могут обладать сродством к вторичным рецепторам, что облегчает адсорбцию токсина на мембране-мишени чувствительных клеток.

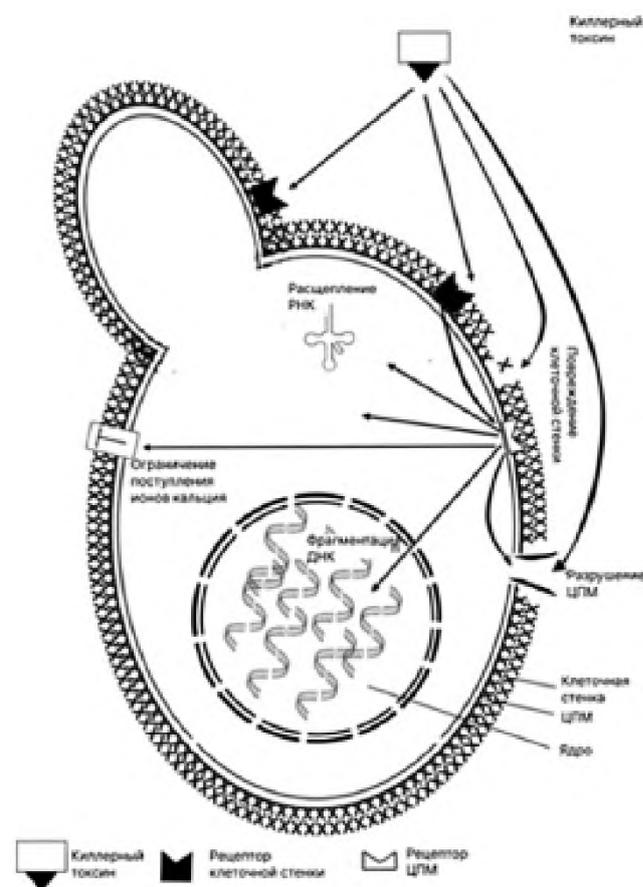
Считается, что КТ убивают чувствительные к ним клетки посредством различных механизмов, таких как ингибирование репликации ДНК, индукция изменений проницаемости мембран, остановка клеточного цикла в фазе G1 и другие (Рисунок 2). Более того, в некоторых случаях токсин может нарушать синтез клеточной стенки путем ингибирования β -1,3-глюкансинтазы или путем гидролиза основных компонентов клеточной стенки в чувствительных клетках (Liu et al., 2015). Так, K28 представляет собой уникальный пример вирусного токсина, продуцируемого инфицированными дрожжами, который проникает в чувствительную клетку путем рецептор-опосредованного эндоцитоза и достигает своей внутриклеточной мишени (мишеней) (Santos et al., 2002; Santos et al., 2007).

Выявлено, что токсин *Debaryomyces hansenii* в основном адсорбируется (1 \rightarrow 6)- β -D-глюканами. Этот низкомолекулярный белок, вероятно, кодируется хромосомными генами. Данное исследование является первым, в котором идентифицировано место связывания промышленно значимого КТ с клеточной стенкой (Santos et al., 2007).

Также показано, что РМКТ (каналообразующий КТ, выделяемый *Pichia membranifaciens*) обладал антимикробной активностью в отношении дрожжей и мицелиальных грибов (Santos & Marquina, 2011; Hicks et al., 2021).

Рисунок 2

Механизм действия киллерных токсинов



Примечание: Из «Yeast killer toxins, molecular mechanisms of their action and their applications», by G. L. Liu, Z. Chi, G. Y. Wang, Z. P. Wang, Y. Li, Z. M. Chi, 2015, *Critical Reviews in Biotechnology*, 35(2), 222–234 (<https://doi.org/10.3109/07388551.2013.833582>). Copyright 2015 by Taylor & Francis.

Влияние pH на активность токсинов

Многие исследования указывают на то, что значительное влияние на результаты тестов оказывает водородный показатель среды. Наибольшая активность продуцируемых дрожжами токсинов наблюдается в узком диапазоне pH (4,5–6 ед.) (Таблица 2).

Опыты проводили в широком диапазоне температур и активной кислотности среды, оказывающих сильное влияние на определение фенотипа киллера. Предварительный скрининг дрожжей проводили на газонах *S. cerevisiae* АН22 (обычно используемых в качестве чувствительного к киллерам штамма) при значении pH 4,6, когда активно боль-

Таблица 2

Активность некоторых киллерных дрожжей при различных значениях pH

Видовое название микроорганизма	Значения pH				
	4,5	5	5,5	6	6,5
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	+	-	-	-	-
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	-	+	-	-	-
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	+	-	-	-	-
<i>Candida valida</i>	+	+	-	-	-
<i>Pichia membranifaciens</i>	+	-	-	-	-
<i>Debaryomyces hansenii</i>	+	-	-	-	-
<i>Schwanniomyces occidentalis</i>	+	-	-	-	-
<i>Kluyveromyces wickerhamii</i>	+	-	-	-	-
<i>Kluyveromyces lactis</i>	+	-	-	-	-
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	+	-	-	-	-
<i>Kluyveromyces drosophilorum</i>	+	-	-	-	-
<i>Cyberlindera mrakii</i>	+	-	-	-	+
<i>Cyberlindera saturnus</i>	+	-	-	-	-

Примечание. «+» – высокая активность токсина, «-» – низкая активность или ее отсутствие.

Из «Yeast killer toxins, molecular mechanisms of their action and their applications», by G. L. Liu, Z. Chi, G. Y. Wang, Z. P. Wang, Y. Li, Z. M. Chi, 2015, *Critical Reviews in Biotechnology*, 35(2), 222–234 (<https://doi.org/10.3109/07388551.2013.833582>). Copyright 2015 by Taylor & Francis; «The oleaginous yeast *Metschnikowia pulcherrima* displays killer activity against avian-derived pathogenic bacteria», by R. H. Hicks, M. Moreno-Beltrán, D. Gore-Lloyd, C. J. Chuck, D. A. Henk, 2021, *Biology*, 10(12), Article 1227 (<https://doi.org/10.3390/biology10121227>). Copyright 2021 by MDPI; «The biology of *Pichia membranifaciens* killer toxins», by I. Belda, J. Ruiz, A. Alonso, D. Marquin, A. Santos, 2017, *Toxins*, 9(4), Article 112 (<https://doi.org/10.3390/toxins9040112>). Copyright 2017 by MDPI; «*Kluyveromyces wickerhamii* killer toxin: Purification and activity towards *brettanomyces/dekkera* yeasts in grape must», by F. Comitini, M. Ciani, 2011, *FEMS Microbiology Letters*, 316(1), 77–82 (<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.02194.x>). Copyright 2011 by MDPI; «Immuno-crossreactivity of an anti-*Pichia anomala* killer toxin monoclonal antibody with a *Williopsis saturnus* var. *mrakii* killer toxin», by C. Guyard, P. Evrard, A. M. Corbisier-Colson, H. Louvart, E. Dei-Cas, F. D. Menozzi, L. Polonelli, J. Cailliez, 2001, *Medical Mycology*, 39(5), 395–400 (<https://doi.org/10.1080/mmy.39.5.395.400>). Copyright 2001 by MDPI; «*Williopsis saturnus* yeast killer toxin does not kill *Streptococcus pneumoniae*», by I. Ochigava, P. J. Collier, G. M. Walker, R. Hakenbeck, 2011, *Antonie van Leeuwenhoek*, 99(3), 559–566 (<https://doi.org/10.1007/s10482-010-9524-3>). Copyright 2011 by MDPI; «Killer toxins of *Candida utilis* 22 and *Kluyveromyces marxianus* and their potential applications as biocontrol agents», by M. A. Sanaa, M. H. Zeineb, M. I. Fatma, S. Z. Sanaa, 2015, *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 25(2), 317–325. Copyright 2015 by MDPI.

шинство зарегистрированных киллерных дрожжей (Banjara et al., 2016; Conti et al., 1998).

Была обнаружена взаимосвязь между чувствительным штаммом и оптимальным pH для проявления киллерной активности. Примером является изолят *Pichia anomala* A5, оптимальный pH которого составлял 4,2 для *Saccharomyces cerevisiae*, 5,0 для *Rhodotorula sloffiae* и 4,2–4,6 для *Candida albicans* (Chen & Chou, 2017; De Ullivarri et al., 2020; Dlamini et al., 2008).

Согласно данным литературы, большинство токсинов стабильны и действуют только при кислых

значениях pH и низких температурах, например, при pH = 4,0. Оптимальная киллерная активность КТ, продуцируемого *Pichia membranifaciens* CYC 1106, наблюдалась при температуре до 20 °C, а киллерная активность была выше в кислой среде. Выше pH 4,5 активность резко снижалась и была едва заметна при pH 6,0. Оба КТ Kwkt из *K. wickerhamii* и Pikt из *W. anomalus* сохраняли свою активность в диапазоне pH, совместимом с условиями производства вина. Более того, Pikt оказался более устойчив при повышенной температуре (35 °C), чем Kwkt. Фунгицидное действие, оказываемое Pikt и Kwkt против *Dekkera bruxellensis* в вине, сохраняется не менее 10 дней. Таким обра-

зом, эти два КТ имеют потенциальное применение при выдержке и хранении вина.

Сообщается, что *Debaryomyces hansenii* продуцирует микоцины, эффективные против других видов дрожжей. Изоляты *D. hansenii* были получены из 22 сыров и оценены на киллерную активность в отношении *Candida albicans* и *Candida tropicalis* в широком диапазоне температур и значений pH. Для 23 штаммов показана киллерная активность как против *C. albicans*, так и *C. tropicalis*, которая зависела от pH и температуры. Ни у одного штамма не наблюдалась киллерная активность при $\text{pH} \geq 6,5$ или температуре $\geq 35^\circ\text{C}$ (физиологические условия в желудочно-кишечном тракте человека) (Banjara et al., 2017).

Однако наиболее стабильными являются КТ *Hansenula trakii* (стабильны при pH 2,0–11,0 и не денатурируют после нагревания при 60°C в течение 1 ч) и *Hansenula saturnus* (устойчивы при pH 3,0–11,0 и сохраняют стабильность на 75% при 80°C в течение 1 ч). КТ *Tilletiopsis albescens* стабилен в интервале активной кислотности от 3,5 до 8,0 ед. pH. Убивающая активность очищенного КТ, продуцируемого *Kluveromyces siamensis* HN12–1, в отношении дрожжей *Metschnikowia bicuspidata* WCY была самой высокой при инкубации при 25°C и pH 4,0 (Liu et al., 2015; Baeza et al., 2008).

Область применения

Киллерный феномен широко распространен среди дрожжей, и на сегодняшний день описано около 100 видов дрожжей с таким фенотипом. В спектр действия вырабатываемых ими КТ часто попадают и патогенные микроорганизмы. Таким образом, они обладают потенциалом в качестве природных противомикробных препаратов в пищевых продуктах и для биологической борьбы с патогенами растений, а также терапевтических средств против инфекций животных и человека. Несмотря на широкий спектр возможных областей применения, их использование на промышленном уровне все еще находится в зачаточном состоянии (Mannazzu et al., 2019).

Порча вина, связанная с *Brettanomyces bruxellensis*, является серьезной проблемой для виноделов. Поэтому чрезвычайно важен эффективный и на-

дежный метод контроля размножения этих дрожжей. Текущее исследование было сосредоточено на выявлении и характеристике токсинов-убийц, которые являются противомикробными соединениями, обладающими потенциалом подавления *B. bruxellensis* в вине. Были идентифицированы и частично охарактеризованы два КТ (CpKT1 и CpKT2), выделенные из винных дрожжей *Candida pyralidae* (Mehlomakulu et al., 2014).

Антагонистические эффекты *Debaryomyces hansenii* K12a, *D. hansenii* M11a и *Wickerhamomyces anomalus* BS91 были протестированы против *Monilinia fructigena* и *Monilinia fructicola* в исследованиях *in vitro* и *in vivo*. Антагонистические штаммы *D. hansenii* и *W. anomalus* могут быть предложены в качестве активных ингредиентов для разработки биофунгицидов против видов *Monilinia*, которые являются причиной значительных экономических потерь косточковых культур (Grzegorzczuk et al., 2016).

КТ, вырабатываемый дрожжами *Metschnikowia pulcherrima*, был очищен и добавлен в готовые к приготовлению мясные полуфабрикаты для повышения их микробиологической безопасности и продления срока годности. Добавление ингибирующего соединения в фарш снижало общее количество аэробных мезофильных бактерий, дрожжей и плесневых грибов, а также молочнокислых бактерий (Büyüksirt & Kuleaşan, 2021).

Рассматриваются возможные последствия применения феномена дрожжевых киллеров в борьбе с инфекционными заболеваниями. Особый упор делается на некоторые токсины-киллеры широкого спектра действия (KTS), продуцируемые *Wickerhamomyces anomalus* и другими родственными видами. Перспектива применения этих КТ в области медицины представлена с учетом:

- (1) прямого использования штаммов-киллеров, в частности, для симбиотической борьбы с болезнями, переносимыми членистоногими;
- (2) прямого использования КТ в качестве экспериментальных терапевтических агентов;
- (3) производство через идиотипическую сеть иммунологических производных КТs и их использование в качестве потенциальных противоиных терапевтических средств.

Также описаны исследования иммунологических производных КТ в контексте разработки вакцины (Giovati et al., 2021).

Помимо прочего штаммы *W. anomalus*, способные продуцировать КТ, называемые «дрожжами-убийцами», обладают высокой конкурентоспособностью в окружающей среде. Разнообразные штаммы *W. anomalus* были выделены из различных местообитаний, в том числе из насекомых. Дрожжи, ассоциированные с комарами, обладают антимикробной активностью, что делает эти дрожжи достойными дальнейших исследований, учитывая их потенциал в качестве средства симбиотической борьбы с малярией (Carrelli et al., 2014).

Kpкт — это токсин-убийца дрожжей, вырабатываемый естественным путем *Tetrapisispora phaffii*, который может найти применение в виноделии благодаря своей антимикробной активности в отношении связанных с вином дрожжей, включая *Kloeckera/Hanseniaspora*, *Saccharomyces* и *Zygosaccharomyces*. Ген, кодирующий Kpкт, был экспрессирован в *Komagataella phaffii* (ранее *Pichia pastoris*), что является основой биореакторного производства рекомбинантного токсина rKpкт. Для получения готового к применению препарата rKpкт бесклеточный супернатант рекомбинантного клона-убийцы *K. phaffii* концентрировали в 80 раз и лиофилизировали. Полученный препарат легко растворялся в стерильной дистиллированной воде и сохранял свою убийственную активность до шести месяцев при температуре 4 °С. При добавлении в виноградное сусло он оказывал летальное действие на дикие винные дрожжи, одновременно являясь совместимым с ферментативной активностью закваски на основе штаммов *Saccharomyces cerevisiae*. Кроме того, препарат оказывал сильное бактерицидное действие на различные виды бактерий, включая молочнокислые бактерии и патогены, значимые для пищевой промышленности. Напротив, он не оказал летального действия на мицелиальные грибы и два вида насекомых (*Ceratitis capitata* и *Musca domestica*), которые могут служить моделью для биомедицинских исследований. Так, производство в биореакторах и лиофилизация представляют собой перспективный вариант использования этого КТ, который может найти применение для борьбы с микробными загрязнениями в винодельческой и пищевой промышленности (Carboni et al., 2020).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты

Исследовались ранее отобранные наиболее активные штаммы различных видов дрожжей-продуцентов КТ из коллекции БРЦ ВКПМ (Таблица 3).

Таблица 3
Киллерные штаммы дрожжей

Видовое название	Номер штамма
<i>Metschnikowia pulcherrima</i>	Y-735, Y-3698
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Y-736, Y-737, Y-738, Y-201, Y-1006
<i>Pichia membranifaciens</i>	Y-835
<i>Debaryomyces hansenii</i>	Y-1682, Y-1683, Y-1681
<i>Schwanniomyces vanrijiae</i>	Y-1170
<i>Schwanniomyces occidentalis</i>	Y-1627, Y-1628, Y-1629, Y-1638, Y-1639, Y-1640, Y-1641
<i>Cyberlindnera mrakii</i>	Y-1209, Y-1211

В качестве тест-культуры для изучения действия КТ дрожжей на фитопатогенные грибы был использован плесневый гриб *Botrytis cinerea* F-1006 — возбудитель «серой гнили» многих сельскохозяйственных культур (Bi et al., 2023).

Материалы

Для культивирования дрожжей при различных температурах использовался термостат ТС-1/80 (Смоленское СКТБ СПУ, Смоленск, Россия). Определение значений pH производился при помощи индикаторных полосок высокой точности Diversey-MN92110 (Macherey-Nagel, Германия). Для подтверждения видовой принадлежности дрожжей методом микроскопирования использовался микроскоп биологический Микромед 2 (2–20 inf.) (ООО «Наблюдательные приборы», Санкт-Петербург, Россия).

Методы

Определение активности КТ проводили на тонком агаре на полной дрожжевой среде YPD (г/1000 см³: пептон — 10,0, глюкоза — 20,0, дрожжевой экстракт — 5,0, агар-агар — 20,0, дистиллированная вода — 1000 см³) с добавлением 88 % раствора молочной кислоты в количестве 2,0 см³ на 1 000 см³, рН = 4,5. Значение водородного показателя 4,5 выбрано как оптимальное для большинства исследуемых видов дрожжей.

В качестве тест-культур при отборе лучших по уровню киллерной активности штаммов использовали сверхчувствительные ко многим КТ культуры дрожжей *Candida nitratophila* ВКПМ Y-2123 и *Candida tenuis* ВКПМ Y-739.

Грибы *Botrytis cinerea* F-1006 перед проведением теста культивировали на среде YPD в течение 120 ч.

Максимальное значение продуцируемого КТ у всех дрожжей наблюдалось в экспоненциальной фазе роста дрожжей и соответствовало возрасту суточной культуры.

Тест на определение оптимального значения рН для продуцирования КТ проводили на среде YPD на основе цитратно-фосфатного буфера. Раствор цитрата с концентрацией 0,1 М и раствор фосфата натрия смешивали в разных отношениях для получения активной кислотности среды, равной 4; 4,4; 5 и 5,5 ед. рН.

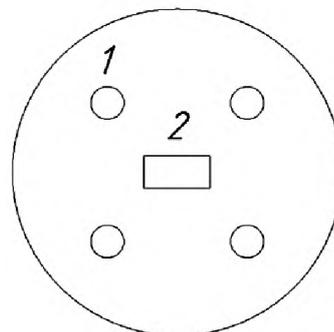
Процедура

На агаризованную полную дрожжевую среду YPD в центре чашки Петри помещали часть биомассы микроскопического гриба, взятой вместе с агаром. После этого бляшками (5 мм) наносили суточную биомассу киллерных дрожжей, равноудаленных от тест-культуры примерно на 2 см. Расположение образцов схематично представлено на Рисунке 3.

Культивирование проводили в течение 120 ч при температуре 30 °С. По окончании культивирования отмечали наличие или отсутствие киллерной активности по появлению или отсутствию зон подавления роста, диаметр которых коррелировал с киллерной активностью исследуемого штамма.

Рисунок 3

Схема распределения образцов на чашке Петри



Примечание: 1 — биомасса дрожжей-продуцентов КТ, 2 — тест-культура

Для выявления благоприятных условий для синтеза КТ были проведены тесты на чувствительность при различных значениях рН (4/4,5/5/5,5) и температуры (15 °С/20 °С/25 °С/30 °С).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

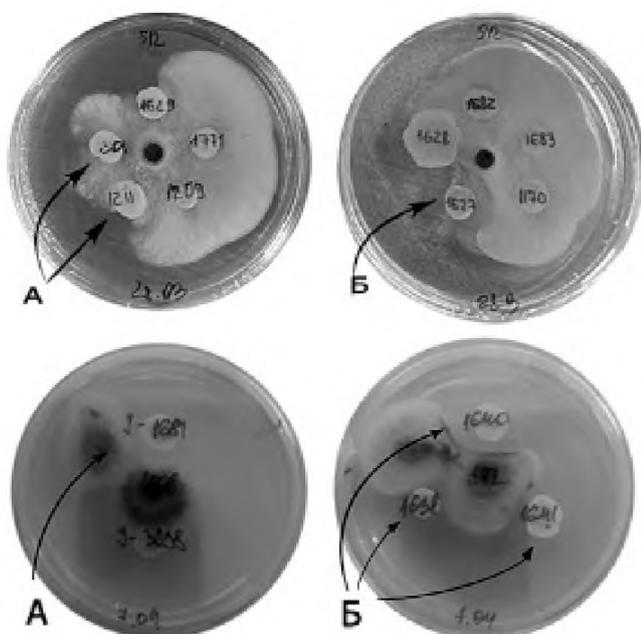
Было обнаружено, что часть штаммов образовывала отчетливые зоны просветления, указывающие на разрушение клеток и цидный эффект. Часть штаммов образовывала вокруг себя зоны неполного подавления роста грибной культуры, что обусловлено статическим эффектом КТ конкретного штамма.

Наибольшие зоны полного подавления роста *Botrytis cinerea* выявлены для штаммов *Schwanniomyces occidentalis* Y-1627, Y-1628, Y-1629, Y-1638, Y-1640, Y-1641 и *Metschnikowia pulcherrima* Y-3698. Небольшие зоны подавления роста наблюдали у *Cyberlindnera mrakii* Y-1211, *Wickerhamomyces anomalus* Y-201, Y-3836, Y-4562, Y-1182 и *Debaryomyces hansenii* Y-1681. При проведении теста на остальных штаммах действие КТ не выявлено (Рисунок 4).

При исследовании влияния рН на продуцирование дрожжами КТ установлено, что значение рН 4,5 является оптимальным для большинства продуцентов КТ (Таблица 4). Данная закономерность наглядно представлена на Рисунке 5.

Рисунок 4

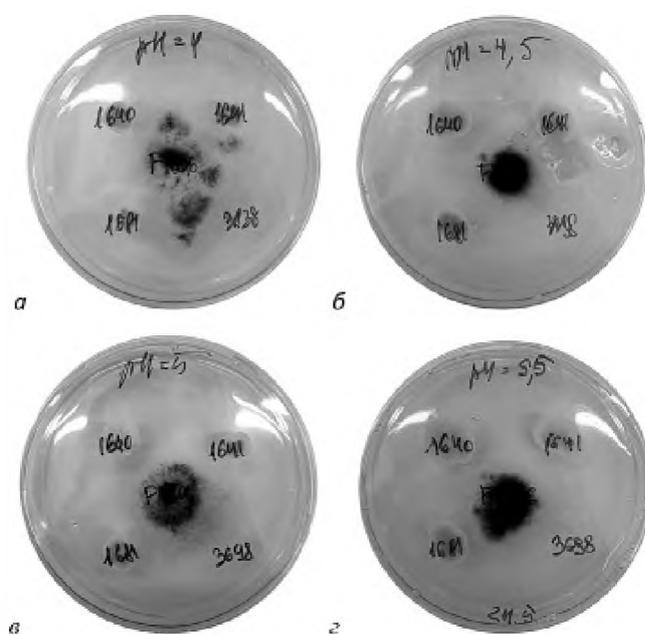
Зоны подавления роста тест-культуры *Botrytis cinerea* F-1006 киллер-токсинами штаммов *Schwanniomyces occidentalis* Y-1627, Y-1628, Y-1629 Y-1638, Y-1640, Y-1641, *Cyberlindnera mrakii* Y-1211, *Wickerhamomyces anomalus* Y-201, Y-3836, Y-4562, Y-1182, *Debaryomyces hansenii* Y-1681



Примечание: А – статическое действие КТ, Б – фунгицидное действие

Рисунок 5

Действие КТ штаммов *Schwanniomyces occidentalis* Y-1638, Y-1640, Y-1641, *Metschnikowia pulcherrima* Y-3698 на тест-культуру *Botrytis cinerea* F-1006 при различных значениях pH



Примечание: а – pH 4; б – pH 4,5; в – pH 5; г – pH 5,5

Таблица 4

Киллерная активность дрожжей при различных значениях pH

№ штамма	Значение pH			
	4	4,5	5	5,5
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> Y-736	+	+	-	-
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> Y-737	+	+	-	-
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> Y-738	+	+	-	-
<i>Schwanniomyces occidentalis</i> Y-1627	-	+	-	-
<i>Schwanniomyces occidentalis</i> Y-1628	-	+	-	-
<i>Schwanniomyces occidentalis</i> Y-1209	+	+	+	-
<i>Cyberlindnera mrakii</i> Y-1211	+	+	-	-
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> Y-201	+	+	+	+
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> Y-483	-	+	-	-
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> Y-1182	-	+	+	-
<i>Schwanniomyces occidentalis</i> Y-1638	+	+	+	+
<i>Schwanniomyces occidentalis</i> Y-1640	+	+	+	+
<i>Schwanniomyces occidentalis</i> Y-1641	+	+	+	+
<i>Debaryomyces hansenii</i> Y-1681	+	+	-	-
<i>Metschnikowia pulcherrima</i> Y-3698	-	-	-	-
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> Y-3896	-	+	-	-
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> Y-4562	-	+	-	-

Примечание: «+» – высокая активность КТ, «-» – низкая активность или ее отсутствие.

Таблица 5

Киллерная активность дрожжей при различной температуре

№ штамма	Температура культивирования, °С		
	15	20	25
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> Y-736	+	+	–
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> Y-737	+	+	–
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> Y-738	+	+	–
<i>Schwanniomyces occidentalis</i> Y-1627	+	+	+
<i>Schwanniomyces occidentalis</i> Y-1628	–	+	+
<i>Schwanniomyces occidentalis</i> Y-1209	–	+	+
<i>Cyberlindnera trakii</i> Y-1211	+	+	–
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> Y-201	+	+	+
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> Y-483	–	+	–
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> Y-1182	–	+	+
<i>Schwanniomyces occidentalis</i> Y-1638	+	+	+
<i>Schwanniomyces occidentalis</i> Y-1640	+	+	+
<i>Schwanniomyces occidentalis</i> Y-1641	+	+	+
<i>Debaryomyces hansenii</i> Y-1681	–	+	+
<i>Metschnikowia pulcherrima</i> Y-3698	–	+	–
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> Y-3896	–	+	+
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> Y-4562	–	+	+

Примечание: «+» – высокая активность КТ, «–» – низкая активность или ее отсутствие.

В ходе проведения теста на продуцирование КТ дрожжами при различных значениях температуры было обнаружено, что при 15–25 °С наблюдается более быстрый и интенсивный рост тест-культуры (Таблица 5). При этом также происходит формирование зон подавления тест-культуры *Botrytis cinerea*.

В большинстве случаев виден статический эффект, за исключением штамма *Schwanniomyces occidentalis* Y-1640, который оказывает фунгицидное действие. Других различий при смене температурного режима не обнаружено (Рисунок 6).

Рисунок 6

Действие КТ штаммов *Schwanniomyces occidentalis* Y-1638, Y-1640, Y-1641, *Metschnikowia pulcherrima* Y-3698 на тест-культуру *Botrytis cinerea* F-1006 при температурах а – 15 °С, б – 20 °С и в – 25 °С



Steel с соавторами в 2013 году сообщили об исследовании дрожжей *Candida oleophila*, *Wickerhamomyces anomalus* и *Pichia kluyveri* как о потенциальных антагонистах различных плесневых грибов, поражающих фрукты (виноград, яблоки, черешню и клубнику) (Steel et al., 2013). Из всех перечисленных аскомицетовых дрожжей-продуцентов КТ, упоминаемых в приведенных исследованиях, явным фунгицидным действием обладают отдельные штаммы видов *Meurozyma guilliermondii*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Williopsis saturnus* var. *saturnus*, *Debaryomyces hansenii*, *Kluyveromyces wickerhamii* (De Lima et al., 2013, Belda et al., 2017, Mazzucco et al., 2019, Karabulut & Cagri-Mehmetoglu, 2019, Büyüksirt & Kuleaşan, 2021, Grzegorzczak et al., 2017).

На тест-культуре *Botrytis cinerea* Maluleke E. и соавторами ранее проведено исследование фунгицидной активности в экспериментах на других видах дрожжей, которое подтверждает полученные результаты. Проявление сильной глюконазой активности антагонистических штаммов обуславливает подавление фитопатогенных грибов, что свидетельствует о наличии фунгицидных свойств (Maluleke et al., 2022).

Дрожжи-антагонисты обладают несколькими механизмами действия, включая конкуренцию за питательные вещества и пространство, а также образование ферментов, разрушающих клеточную стенку чувствительных организмов (Freimoser et al., 2019). Можно предположить, что выявленные нами наиболее активные киллерные штаммы исследуемых дрожжей также обладают β-глюконазой, действующей на глюканы клеточной стенки гриба *Botrytis cinerea*.

ВЫВОДЫ

В соответствии с целью настоящего исследования проведен скрининг штаммов дрожжей из коллекции БРЦ ВКПМ. Обнаружено, что *Schwanniomyces occidentalis* Y-1627, Y-1628, Y-1629, Y-1638, Y-1640, Y-1641, *Metschnikowia pulcherrima* Y-3698, *Cyberlindnera mrakii* Y-1211, *Wickerhamomyces anomalus* Y-201, Y-3836, Y-4562, Y-1182, *Debaryomyces hansenii* Y-1681 эффективны против *Botrytis cinerea* F-1006, что потенциально важно для разработки препаратов на их основе и использования этих

препаратов в качестве средств биоконтроля. Подбор оптимальных условий, таких как pH, температура, обусловил повышение активности киллерных дрожжей. Так, значение pH 4,5 оказалось оптимальным для большинства продуцентов КТ, а при 15–25 °C наблюдался более быстрый и интенсивный рост тест-культуры. Эффективность данных видов дрожжей может быть дополнительно оценена *in vivo* в отношении ряда патогенов растений с учетом различных факторов окружающей среды.

Препараты, полученные на основе выбранных штаммов, могут быть использованы как для обработки растительного сырья, так и при лечении инфекционных заболеваний. Основой эффективности таких препаратов является отсутствие у патогенных организмов резистентности к КТ и устойчивость данных соединений к факторам внешней среды. Стоит отметить специфический механизм действия, при котором гибнут только чувствительные к токсинам клетки, что обеспечивает безопасность их использования.

АВТОРСКИЙ ВКЛАД

Шагалова Валерия Алексеевна: верификация данных, формальный анализ, создание черновика рукописи, визуализация, проведение исследования.

Вустин Михаил Михайлович: руководство исследованием, методология, концептуализация, администрирование проекта.

Машенцева Наталья Геннадьевна: администрирование данных, создание рукописи и её редактирование.

ЛИТЕРАТУРА

- Baeza, M. E., Sanhueza, M. A., & Cifuentes, V. H. (2008). Occurrence of killer yeast strains in industrial and clinical yeast isolates. *Biological Research*, *41*(2), 173–182. <https://doi.org/10.4067/S0716-97602008000200007>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.01.016>
- Becker, B., & Schmitt, M. J. (2017). Yeast killer toxin k28: Biology and unique strategy of host cell intoxication and killing. *Toxins*, *9*(10), Article 333. <https://doi.org/10.3390/toxins9100333>
- Belda, I., Ruiz, J., Alonso, A., Marquin, D., & Santos, A. (2017). The biology of *Pichia membranifaciens* killer toxins. *Toxins*, *9*(4), Article 112. <https://doi.org/10.3390/toxins9040112>
- Bi, K., Liang, Y., Mengiste, T., & Sharon, A. (2023). Killing softly: A roadmap of *Botrytis cinerea* pathogenicity. *Trends in Plant Science*, *28*(2), 211–222. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2022.08.024>
- Boynton, P. J. (2019). The ecology of killer yeasts: Interference competition in natural habitats. *Yeast*, *36*(8), 473–485. <https://doi.org/10.1002/yea.3398>
- Büyüksırt, B. T., & Kuleaşan, H. (2021). A natural approach, the use of killer toxin produced by *Metschnikowia pulcherrima* in fresh ground beef patties for shelf life extension. *International Journal of Food Microbiology*, *345*, Article 109154. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109154>
- Büyüksırt, B. T., & Kuleaşan, H. (2022). Purification and characterization of a *Metschnikowia pulcherrima* killer toxin with antagonistic activity against pathogenic microorganisms. *Archives of Microbiology*, *204*(6), Article 337. <https://doi.org/10.1007/s00203-022-02940-8>
- Cappelli, A., Ulissi, U., Valzano, M., Damiani, C., Epis, S., Gabrielli, M. G., Conti, S., Polonelli, L., Bandi, C., Favia, G., & Ricci, I. (2014). A *Wickerhamomyces anomalus* killer strain in the malaria vector *Anopheles stephensi*. *PLoS One*, *9*(5), Article e95988. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095988>
- Carboni, G., Fancello, F., Zara, G., Zara, S., Ruiu, L., Marova, I., Pinna, G., Budroni, M., Mannazzu, I. (2020). Production of a lyophilized ready-to-use yeast killer toxin with possible applications in the wine and food industries. *International Journal of Food Microbiology*, *335*, Article 108883. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108883>
- Chen, P. H., & Chou, J. Y. (2017). Screening and identification of yeasts antagonistic to pathogenic fungi show a narrow optimal pH range for antagonistic activity. *Polish Journal of Microbiology*, *66*(1), 101–106. <https://doi.org/10.5604/17331331.1234997>
- Comitini, F., & Ciani, M. (2011). *Kluyveromyces wickerhamii* killer toxin: Purification and activity towards *Brettanomyces/dekkera* yeasts in grape must. *FEMS Microbiology Letters*, *316*(1), 77–82. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.02194.x>
- Conti, S., Magliani, W., Gerloni, M., Salati, A., Dieci, E., Arseni, S., Fiscaro, P., & Polonelli, L. (1998). A transphyletic anti-infectious control strategy based on the killer phenomenon. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, *22*(1–2), 151–161. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695x.1998.tb01200.x>
- De Lima, J. R., Gonçalves, L. R., Brandão, L. R., Rosa, C. A., & Viana, F. M. (2013). Isolation, identification, and activity in vitro of killer yeasts against *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from tropical fruits. *Journal of Basic Microbiology*, *53*(7), 590–599. <https://doi.org/10.1002/jobm.201200049>
- De Ullivarri, F. 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*, *258*(8), 1102–1113. <https://doi.org/10.1093/mmy/myaa011>
- Dlamini, N. R., & Dube, S. (2008). Studies on the physico-chemical, nutritional and microbiological changes during the traditional preparation of Marula wine in Gwanda, Zimbabwe. *Nutrition & Food Science*, *38*(1), 61–69. <https://doi.org/10.1108/00346650810848025>
- Farkas, Z., Márki-Zay, J., Kucsera, J., Vágvolgyi, C., Golubev, W. I., & Pfeiffer, I. (2012). Characterization of two different toxins of *Wickerhamomyces anomalus* (*Pichia anomala*) VKM Y-159. *Acta Biologica Hungarica*, *63*(2), 277–287. <https://doi.org/10.1556/abiol.63.2012.2.9>
- Freimoser, F. M., Rueda-Mejia, M. P., Tilocca, B., & Migheli, Q. (2019). Biocontrol yeasts: mechanisms and applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *35*(10), Article 154. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2728-4>
- Giovati, L., Ciociola, T., De Simone, T., Conti, S., & Magliani, W. (2021). *Wickerhamomyces* yeast killer toxins' medical applications. *Toxins*, *13*(9), Article 655. <https://doi.org/10.3390/toxins13090655>
- Grzegorzczak, M., Żarowska, B., Restuccia, C., & Cirvilleri, G. (2017). Postharvest biocontrol ability of killer yeasts against *Monilinia fructigena* and *Monilinia fructicola* on stone fruit. *Food Microbiology*, *61*, 93–101. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.09.005>
- Guyard, C., Evrard, P., Corbisier-Colson, A. M., Louvart, H., De-Cas, E., Menozzi, F. D., Polonelli, L., & Cailliez, J. (2001). Immuno-crossreactivity of an anti-*Pichia anomala* killer toxin monoclonal antibody with a *Williopsis saturnus* var. *mrakii* killer toxin. *Medical Mycology*, *39*(5), 395–400. <https://doi.org/10.1080/mmy.39.5.395.400>
- Hicks, R. H., Moreno-Beltrán, M., Gore-Lloyd, D., Chuck, C. J., & Henk, D. A. (2021). The oleaginous yeast *Metschnikowia pulcherrima* displays killer activity against avian-derived pathogenic bacteria. *Biology*, *10*(12), Article 1227. <https://doi.org/10.3390/biology10121227>
- Karabulut, G., & Cagri-Mehmetoglu, A. (2018). Antifungal, mechanical, and physical properties of edible film

- containing *williopsis saturnus* var. *saturnus* antagonistic yeast. *Journal of Food Science*, 83(3), 763–769. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14062>
- Klassen, R., Schaffrath, R., Buzzini, P., & Ganter, P. F. (2017). Antagonistic interactions and killer yeasts. In P. Buzzini, M.-A. Lachance, A. Yurkov (Eds.). *Yeasts in natural ecosystems: Ecology* (pp. 229–275). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-61575-2_9
- 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. <https://doi.org/10.3109/07388551.2013.833582>
- Maluleke, E., Jolly, N. P., Patterson, H. G., & Setati, M. E. (2022). Antifungal activity of non-conventional yeasts against *Botrytis cinerea* and non-*Botrytis* grape bunch rot fungi. *Frontiers in Microbiology*, 13, Article 986229. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.986229>
- Mannazzu, I., Domizio, P., Carboni, G., Zara, S., Zara, G., Comitini, F., Budroni, M., & Ciani, M. (2019). Yeast killer toxins: From ecological significance to application. *Critical Reviews in Biotechnology*, 39(5), 603–617. <https://doi.org/10.1080/07388551.2019.1601679>
- Mazzucco, M. B., Ganga, M. A., & Sangorrín, M. P. (2019). Production of a novel killer toxin from *Saccharomyces eubayanus* using agro-industrial waste and its application against wine spoilage yeasts. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 112(7), 965–973. <https://doi.org/10.1007/s10482-019-01231-5>
- Mehlomakulu, N. N., Setati, M. E., & Divol, B. (2014). Characterization of novel killer toxins secreted by wine-related non-*Saccharomyces* yeasts and their action on *Brettanomyces* spp. *International Journal of Food Microbiology*, 188, 83–91. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.07.015>
- Muccilli, S., Wemhoff, S., Restuccia, C., & Meinhardt, F. (2013). Exoglucanase-encoding genes from three *Wickerhamomyces anomalus* killer strains isolated from olive brine. *Yeast*, 30(1), 33–43. <https://doi.org/10.1002/yea.2935>
- Ochigava, I., Collier, P. J., Walker, G. M., & Hakenbeck, R. (2011). *Williopsis saturnus* yeast killer toxin does not kill *Streptococcus pneumoniae*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 99(3), 559–566. <https://doi.org/10.1007/s10482-010-9524-3>
- Połomska, X., Neuvéglise, C., Zyzak, J., Żarowska, B., Casaregola, S., & Lazar, Z. (2021). New cytoplasmic virus-like elements (Vles) in the yeast *Debaryomyces hansenii*. *Toxins*, 13(9), Article 615. <https://doi.org/10.3390/toxins13090615>
- Sanaa, M. A., Zeineb, M. H., Fatma, M. I., & Sanaa, S. Z. (2015). Killer toxins of *Candida utilis* 22 and *Kluyveromyces marxianus* and their potential applications as biocontrol agents. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 25(2), 317–325.
- Santos, A., & Marquina, D. (2011). The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to proapoptotic concentrations of *Pichia membranifaciens* killer toxin. *Fungal Genetics and Biology*, 48(10), 979–989. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2011.07.002>
- Santos, A., Marquina, D., Barroso, J., & Peinadom, J. M. (2002). Beta-D-glucan as the cell wall binding site for *Debaryomyces hansenii* killer toxin. *Letters in Applied Microbiology*, 34(2), 95–99. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2002.01053.x>
- Santos, A., San Mauro, M., Abrusci, C., & Marquina, D. (2007). Cwp2p, the plasma membrane receptor for *Pichia membranifaciens* killer toxin. *Molecular Microbiology*, 64(3), 831–843. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05702.x>
- Sheppard, S., & Dikicioglu, D. (2019). Dynamic modelling of the killing mechanism of action by virus-infected yeasts. *Journal of the Royal Society Interface*, 16(152), Article 20190064. <https://doi.org/10.1098/rsif.2019.0064>
- Steel, C. C., Blackman, J. W., Schmidtke L. M. (2013). Grapevine bunch rots: impacts on wine composition, quality, and potential procedures for the removal of wine faults. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(22), 5189–5206. <https://doi.org/10.1021/jf400641r>

REFERENCES

- Occurrence of killer yeast strains in industrial and clinical yeast isolates. *Biological Research*, 41(2), 173–182. <https://doi.org/10.4067/S0716-97602008000200007>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.01.016>
- Becker, B., & Schmitt, M. J. (2017). Yeast killer toxin k28: Biology and unique strategy of host cell intoxication and killing. *Toxins*, 9(10), Article 333. <https://doi.org/10.3390/toxins9100333>
- Belda, I., Ruiz, J., Alonso, A., Marquin, D., & Santos, A. (2017). The biology of *Pichia membranifaciens* killer toxins. *Toxins*, 9(4), Article 112. <https://doi.org/10.3390/toxins9040112>
- Bi, K., Liang, Y., Mengiste, T., & Sharon, A. (2023). Killing softly: A roadmap of *Botrytis cinerea* pathogenicity. *Trends in Plant Science*, 28(2), 211–222. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2022.08.024>
- Boynton, P. J. (2019). The ecology of killer yeasts: Interference competition in natural habitats. *Yeast*, 36(8), 473–485. <https://doi.org/10.1002/yea.3398>
- Büyüksırt, B. T., & Kuleaşan, H. (2021). A natural approach, the use of killer toxin produced by *Metschnikowia pulcherrima* in fresh ground beef patties for shelf life extension. *International Journal of Food Microbiology*, 345, Article 109154. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109154>
- Büyüksırt, B. T., & Kuleaşan, H. (2022). Purification and characterization of a *Metschnikowia pulcherrima* killer toxin with antagonistic activity against pathogenic

- microorganisms. *Archives of Microbiology*, 204(6), Article 337. <https://doi.org/10.1007/s00203-022-02940-8>
- Cappelli, A., Ulissi, U., Valzano, M., Damiani, C., Epis, S., Gabrielli, M. G., Conti, S., Polonelli, L., Bandi, C., Favia, G., & Ricci, I. (2014). A *Wickerhamomyces anomalus* killer strain in the malaria vector *Anopheles stephensi*. *PLoS One*, 9(5), Article e95988. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095988>
- Carboni, G., Fancello, F., Zara, G., Zara, S., Ruiu, L., Marova, I., Pinna, G., Budroni, M., Mannazzu, I. (2020). Production of a lyophilized ready-to-use yeast killer toxin with possible applications in the wine and food industries. *International Journal of Food Microbiology*, 335, Article 108883. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108883>
- Chen, P. H., & Chou, J. Y. (2017). Screening and identification of yeasts antagonistic to pathogenic fungi show a narrow optimal pH range for antagonistic activity. *Polish Journal of Microbiology*, 66(1), 101–106. <https://doi.org/10.5604/17351331.1234997>
- Comitini, F., & Ciani, M. (2011). *Kluyveromyces wickerhamii* killer toxin: Purification and activity towards *Brettanomyces/Dekkera* yeasts in grape must. *FEMS Microbiology Letters*, 316(1), 77–82. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.02194.x>
- Conti, S., Magliani, W., Gerloni, M., Salati, A., Dieci, E., Arseni, S., Fiscaro, P., & Polonelli, L. (1998). A transphyletic anti-infectious control strategy based on the killer phenomenon. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 22(1–2), 151–161. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695x.1998.tb01200.x>
- De Lima, J. R., Gonçalves, L. R., Brandão, L. R., Rosa, C. A., & Viana, F. M. (2013). Isolation, identification, and activity in vitro of killer yeasts against *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from tropical fruits. *Journal of Basic Microbiology*, 53(7), 590–599. <https://doi.org/10.1002/jobm.201200049>
- De Ullivarri, F. 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*, 258(8), 1102–1113. <https://doi.org/10.1093/mmy/myaa011>
- Dlamini, N. R., & Dube, S. (2008). Studies on the physico-chemical, nutritional and microbiological changes during the traditional preparation of Marula wine in Gwanda, Zimbabwe. *Nutrition & Food Science*, 38(1), 61–69. <https://doi.org/10.1108/00346650810848025>
- Farkas, Z., Márki-Zay, J., Kucsera, J., Vágvölgyi, C., Golubev, W. I., & Pfeiffer, I. (2012). Characterization of two different toxins of *Wickerhamomyces anomalus* (*Pichia anomala*) VKM Y-159. *Acta Biologica Hungarica*, 63(2), 277–287. <https://doi.org/10.1556/abiol.63.2012.2.9>
- Freimoser, F. M., Rueda-Mejia, M. P., Tilocca, B., & Migheli, Q. (2019). Biocontrol yeasts: mechanisms and applications. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35(10), Article 154. <https://doi.org/10.1007/s11274-019-2728-4>
- Giovati, L., Ciociola, T., De Simone, T., Conti, S., & Magliani, W. (2021). *Wickerhamomyces* yeast killer toxins' medical applications. *Toxins*, 13(9), Article 655. <https://doi.org/10.3390/toxins13090655>
- Grzegorzczak, M., Żarowska, B., Restuccia, C., & Cirvilleri, G. (2017). Postharvest biocontrol ability of killer yeasts against *Monilinia fructigena* and *Monilinia fructicola* on stone fruit. *Food Microbiology*, 61, 93–101. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.09.005>
- Guyard, C., Evrard, P., Corbisier-Colson, A. M., Louvart, H., De-Cas, E., Menozzi, F. D., Polonelli, L., & Cailliez, J. (2001). Immuno-crossreactivity of an anti-*Pichia anomala* killer toxin monoclonal antibody with a *Williopsis saturnus* var. *mrakii* killer toxin. *Medical Mycology*, 39(5), 395–400. <https://doi.org/10.1080/mmy.39.5.395.400>
- Hicks, R. H., Moreno-Beltrán, M., Gore-Lloyd, D., Chuck, C. J., & Henk, D. A. (2021). The oleaginous yeast *Metschnikowia pulcherrima* displays killer activity against avian-derived pathogenic bacteria. *Biology*, 10(12), Article 1227. <https://doi.org/10.3390/biology10121227>
- Karabulut, G., & Cagri-Mehmetoglu, A. (2018). Antifungal, mechanical, and physical properties of edible film containing *williopsis saturnus* var. *saturnus* antagonistic yeast. *Journal of Food Science*, 83(3), 763–769. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14062>
- Klassen, R., Schaffrath, R., Buzzini, P., & Ganter, P. F. (2017). Antagonistic interactions and killer yeasts. In P. Buzzini, M.-A. Lachance, A. Yurkov (Eds.). *Yeasts in natural ecosystems: Ecology* (pp. 229–275). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-61575-2_9
- 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. <https://doi.org/10.3109/07388551.2013.833582>
- Maluleke, E., Jolly, N. P., Patterton, H. G., & Setati, M. E. (2022). Antifungal activity of non-conventional yeasts against *Botrytis cinerea* and non-*Botrytis* grape bunch rot fungi. *Frontiers in Microbiology*, 13, Article 986229. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.986229>
- Mannazzu, I., Domizio, P., Carboni, G., Zara, S., Zara, G., Comitini, F., Budroni, M., & Ciani, M. (2019). Yeast killer toxins: From ecological significance to application. *Critical Reviews in Biotechnology*, 39(5), 603–617. <https://doi.org/10.1080/07388551.2019.1601679>
- Mazzucco, M. B., Ganga, M. A., & Sangorrín, M. P. (2019). Production of a novel killer toxin from *Saccharomyces eubayanus* using agro-industrial waste and its application against wine spoilage yeasts. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 112(7), 965–973. <https://doi.org/10.1007/s10482-019-01231-5>
- Mehломakulu, N. N., Setati, M. E., & Divol, B. (2014). Characterization of novel killer toxins secreted by wine-related non-*Saccharomyces* yeasts and their action on *Brettanomyces* spp. *International Journal of Food Microbiology*, 188, 85–91. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.07.015>
- Muccilli, S., Wemhoff, S., Restuccia, C., & Meinhardt, F. (2013). Exoglucanase-encoding genes from three *Wickerhamomyces*

- anomalus* killer strains isolated from olive brine. *Yeast*, 30(1), 33–43. <https://doi.org/10.1002/yea.2935>
- Ochigava, I., Collier, P. J., Walker, G. M., & Hakenbeck, R. (2011). *Williopsis saturnus* yeast killer toxin does not kill *Streptococcus pneumoniae*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 99(3), 559–566. <https://doi.org/10.1007/s10482-010-9524-3>
- Połomska, X., Neuvéglise, C., Zyzak, J., Żarowska, B., Casaregola, S., & Lazar, Z. (2021). New cytoplasmic virus-like elements (Vles) in the yeast *Debaryomyces hansenii*. *Toxins*, 13(9), Article 615. <https://doi.org/10.3390/toxins13090615>
- Sanaa, M. A., Zeineb, M. H., Fatma, M. I., & Sanaa, S. Z. (2015). Killer toxins of *Candida utilis* 22 and *Kluyveromyces marxianus* and their potential applications as biocontrol agents. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 25(2), 317–325.
- Santos, A., & Marquina, D. (2011). The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to proapoptotic concentrations of *Pichia membranifaciens* killer toxin. *Fungal Genetics and Biology*, 48(10), 979–989. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2011.07.002>
- Santos, A., Marquina, D., Barroso, J., & Peinado, J. M. (2002). Beta-D-glucan as the cell wall binding site for *Debaryomyces hansenii* killer toxin. *Letters in Applied Microbiology*, 34(2), 95–99. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765x.2002.01053.x>
- Santos, A., San Mauro, M., Abrusci, C., & Marquina, D. (2007). Cwp2p, the plasma membrane receptor for *Pichia membranifaciens* killer toxin. *Molecular Microbiology*, 64(3), 831–843. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05702.x>
- Sheppard, S., & Dikicioglu, D. (2019). Dynamic modelling of the killing mechanism of action by virus-infected yeasts. *Journal of the Royal Society Interface*, 16(152), Article 20190064. <https://doi.org/10.1098/rsif.2019.0064>
- Steel, C. C., Blackman, J. W., Schmidtke L. M. (2013). Grapevine bunch rots: impacts on wine composition, quality, and potential procedures for the removal of wine faults. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(22), 5189–5206. <https://doi.org/10.1021/jf400641r>