

DROŹDŹE KILLEROWE I ICH ZASTOSOWANIE

Urszula Błaszczyk*

Katedra Technologii Fermentacji i Mikrobiologii, Wydział Technologii Żywności,
Uniwersytet Rolniczy im. H. Kołłątaja w Krakowie

Wpłynęło w lipcu, zaakceptowano w październiku 2019 r.

Streszczenie: Fenotyp killerowy, związany z produkcją oraz wydzielaniem toksyn killerowych, jest szeroko rozpowszechniony wśród drożdży i w warunkach konkurencyjnych daje przewagę szczepom drożdży killerowych w stosunku do innych, wrażliwych na te toksyny mikroorganizmów zasiedlających tę samą niszę ekologiczną. Toksyny killerowe to białka, zwykle glikoproteiny, działające bójczo w stosunku do drożdży wrażliwych. Każda toksyna killerowa ma unikatowe właściwości, które różnią się w zależności od produkującego ją szczepu drożdży. Różnice te dotyczą lokalizacji genów, które kodują toksyny, masy cząsteczkowej, jak również mechanizmów działania. Niektóre szczepy drożdży killerowych charakteryzują się szerokim zakresem aktywności antagonistycznej, hamują rozwój szeregu szczepów drożdży, a także grzybów strzępkowych, i od lat badane są pod kątem ich potencjału biotechnologicznego. Drożdże killerowe i ich toksyny mogą znaleźć potencjalne zastosowanie w wielu dziedzinach: w produkcji żywności i napojów, szczególnie podczas fermentacji wina i jego dojrzewania, w biologicznej ochronie roślin, w biotypowaniu drożdży i jako nowe środki przeciwgrzybicze.

1. Wprowadzenie. 2. Biosynteza i budowa toksyn killerowych. 3. Właściwości białek killerowych. 4. Mechanizm działania toksyn killerowych. 5. Zastosowanie drożdży killerowych i ich toksyn. 5.1. Wykorzystanie w winiarstwie. 5.2. Potencjalne zastosowanie w medycynie. 5.3. Zwalczanie chorób grzybowych roślin. 5.4. Transgeniczne rośliny wytwarzające toksyny killerowe. 5.5. Zastosowanie drożdży killerowych w środowisku morskim. 6. Podsumowanie

KILLER YEASTS AND THEIR APPLICATION

Abstract: A killer phenotype, associated with the production and secretion of killer toxins, is widespread among yeasts and in competitive conditions gives an advantage to killer yeast strains in relation to other, sensitive microorganisms colonizing the same ecological niche. Killer toxins are proteins, usually glycoproteins, that are able to kill strains of susceptible yeasts. Each killer toxin has unique properties that vary depending on the strain of yeast that produces it. These differences concern the location of genes that encode toxins, molecular weight, as well as mechanisms of action. Some strains of killer yeast are characterized by a wide range of antagonistic activity, inhibit the development of a number of yeast strains, as well as molds, and have been studied for many years in terms of their biotechnological potential. Killer yeast and its toxins can find potential application in many fields: in the production of food and beverages, especially during wine fermentation and maturation, in biological control of plant pathogens, in yeast biotyping and as new antifungal agents.

1. Introduction. 2. Biosynthesis and structure of killer toxins. 3. Properties of killer proteins. 4. The mechanism of action of killer toxins. 5. Use of killer yeasts and their toxins. 5.1. Application in viticulture. 5.2. Potential application in medicine. 5.3. Combating fungal diseases of plants. 5.4. Transgenic plants producing killer toxins. 5.5. Use of killer yeasts in the marine environment. 6. Summary

Słowa kluczowe: antagonizm, drożdże killerowe, toksyna killerowa

Key words: antagonism, killer yeasts, killer toxin

1. Wprowadzenie

Intensywne badania nad zjawiskiem antagonistycznego oddziaływania pomiędzy populacjami mikroorganizmów doprowadziły do opisanego szeregu substancji przeciwdrobnoustrojowych. W latach dwudziestych ubiegłego wieku odkryto pierwszy antybiotyk i pierwszą bakteriocynę, toksyny produkowane przez drożdże opisano prawie 40 lat później [80]. Fenotyp killerowy po raz pierwszy został scharakteryzowany przez Bevana i Makowera w 1963 roku w odniesieniu do szczepu drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, wyizolowa-

nego jako zanieczyszczenie mikrobiologiczne w browarze [9]. Intensywne badania nad zjawiskiem killerowym potwierdziły jego występowanie wśród drobnoustrojów pochodzących z różnych naturalnych siedlisk, w tym wśród szczepów drożdży wyizolowanych z winogron i innych owoców, szczepów winiarskich, ale i mikroorganizmów pochodzących z laboratoryjnych kolekcji kultur. Obecnie wiadomo, że fenotyp killerowy występuje wśród drożdży z rodzajów: *Pichia*, *Wickerhamomyces*, *Saccharomyces*, *Debaryomyces*, *Williopsis*, *Kluyveromyces*, *Mrakia*, *Zygosaccharomyces*, *Torulopsis*, *Metschnikowia*, *Cryptococcus*, *Candida*, co wskazuje na

* Autor korespondencyjny: dr Urszula Błaszczyk, Katedra Technologii Fermentacji i Mikrobiologii, Wydział Technologii Żywności, Uniwersytet Rolniczy im. H. Kołłątaja w Krakowie, ul. Balicka 122, 30-149 Kraków; tel. 12 662 47 90; e-mail: urszula.blaszczyk@urk.edu.pl

znaczną częstotliwość jego występowania [80, 46]. Zjawisko killerowe może stanowić model biologicznego współzawodnictwa w pewnym stopniu analogiczny do syntezy bakteriocyn przez bakterie.

Toksyny killerowe to cytotoksyczne białka, zwykle glikoproteiny, produkowane przez niektóre drożdże, działające bójczo w stosunku do komórek drożdży wrażliwych. Początkowo przeważał pogląd, że toksyny są aktywne jedynie wobec drożdży należących do tego samego co producent lub spokrewnionego gatunku. Obecnie wiadomo, że niektóre szczepy drożdży wydzielają białka killerowe, które zabijają również komórki drożdży, należące do innych rodzajów, a nawet wykazują aktywność killerową wobec grzybów strzępkowych.

Najlepiej opisane toksyny killerowe: K1, K2 i K28, produkowane przez szczepy należące do gatunku *S. cerevisiae*, wykazują dość wąskie spektrum działania, ograniczone do drożdży z rodzaju *Saccharomyces*, natomiast szeroki zakres aktywności killerowej również w stosunku do mikroorganizmów niespokrewnionych z producentem toksyny, obserwowano u drożdży z rodzajów: *Pichia*, *Wickerhamomyces*, *Williopsis* czy *Kluyveromyces* [17]. Dość szerokie spektrum aktywności bójczej przejawia również najpóźniej opisana toksyna killerowa *S. cerevisiae* – Klus, która działa letalnie nie tylko na drożdże *Saccharomyces*, ale także na *Candida albicans* i *Kluyveromyces lactis* [68].

Drożdże killerowe są odporne na własne toksyny, ale pozostają wrażliwe na toksyny wydzielane przez inne gatunki [80]. W zależności od zdolności do syntezy białek killerowych oraz wrażliwości na nie wyróżnia się trzy fenotypy: killerowy (K), wrażliwy (S) oraz neutralny (N) [55]. W literaturze można znaleźć także odniesienie do dwóch innych fenotypów: „superkillerowego”, związanego z nadprodukcją toksyny, oraz „samobójczego”, w którym obserwuje się uwrażliwienie na własne białko killerowe [98].

2. Biosynteza i budowa toksyn killerowych

Geny kodujące toksyny, których producentami są gatunki: *S. cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii* oraz *Ustilago maydis*, zlokalizowane są w dwuniciowym RNA (dsRNA). Geny toksyn killerowych, wydzielanych przez gatunki: *K. lactis*, *Pichia acaciae*, *P. inositovora* oraz *Debaryomyces robertsiae*, znajdują się w liniowym, plazmidowym dsDNA. Natomiast informacja genetyczna dotycząca kodowania białek killerowych przez gatunki takie jak: *Pichia farinosa*, *P. membranifaciens*, *P. kluyveri*, *Wickerhamomyces anomalus* oraz *Williopsis saturnus* zapisana jest w genomie jądrowym [7, 8].

Najlepiej poznanymi i scharakteryzowanymi toksynami killerowymi są te produkowane przez drożdże *S. cerevisiae* (K1, K2, K28). W przypadku wspomnianego

gatunku drożdży, jak również *Z. bailii* i *U. maydis*, fenotyp killerowy jest determinowany obecnością w cytoplazmie cząstek VLP (Virus Like Particles), często określanymi jako cząstki wirusopodobne. Wirusy te straciły zdolność pozakomórkowej transmisji i ich rozprzestrzenianie zachodzi jedynie na skutek wegetatywnego lub płciowego rozmnażania się drożdży [80, 98]. Produkcja toksyn K1, K2, K28 oraz najpóźniej opisanej toksyny Klus jest związana z obecnością w cytoplazmie satelitarnego M-dsRNA (M1, M2, M28, Mlus), zamkniętego w cząstkach wirusopodobnych (VLP). M-dsRNA (1,5–1,9 kbp) odpowiedzialny jest za syntezę białek killerowych oraz za oporność komórki na własne toksyny [51]. Natomiast replikacja i funkcjonowanie zainfekowanych komórek zależne są od obecności innych wirusów, określanymi pomocniczymi L-A, które należą do rodziny *Totiviridae* [80, 81]. Wirusy pomocnicze są zdolne do samodzielnego powielania się w komórkach gospodarza, bez obecności satelitarnego M-dsRNA. Dojrzała cząstka wirusa L-A zawiera dsRNA o wielkości 4,6 kbp, który powiązany jest z aktywnością odwrotnej transkryptazy. Nić RNA o dodatniej polaryzacji (L-A(+) ssRNA), służąca jako mRNA dla syntezy białek wirusowych, zawiera dwie otwarte ramki odczytu (ORF), które nakładają się na siebie fragmentem o długości 130 nukleotydów. Pierwsza z nich koduje białko kapsydu – Gag (76 kDa), natomiast druga fuzyjne białko Gag-Pol (180 kDa), niezbędne do replikacji zarówno L-A-dsRNA, jak i M-dsRNA. W odróżnieniu od L-A, każdy z trzech genomów M-dsRNA zawiera pojedynczą ramkę odczytu kodującą preprotoksynę (pptox) – prekursor białka killerowego [7].

Najlepiej poznana preprotoksyna K1, kodowana przez M1-dsRNA, jest polipeptydem o masie cząsteczkowej 35 kDa, złożonym z 316 reszt aminokwasowych. Zbudowana jest z N-końcowej sekwencji liderowej, złożonej z 44 reszt aminokwasowych i zawierającej peptyd sygnałowy. W dalszej kolejności można wyróżnić sekwencję podjednostki α , zbudowaną z 103 reszt aminokwasowych (pozycje 45 do 147) oraz podjednostki β , złożonej z 83 reszt aminokwasowych (pozycje 234 do 316), które są oddzielone od siebie fragmentem γ (pozycje 148 do 233). Region γ zawiera trzy potencjalne miejsca N-glikozylacji [51]. Po wnikięciu preprotoksyny do retikulum endoplazmatycznego, dochodzi do rozszczepienia łańcucha polipeptydowego i usunięcia peptydu sygnałowego. Następuje glikozylacja fragmentu γ oraz powstają mostki disiarczkowe [65]. Protoksyna jest następnie transportowana do aparatu Golgiego i ulega przekształcaniu w dojrzałą toksynę K1. Wspomniana transformacja odbywa się poprzez hydrolizę co najmniej trzech wiązań peptydowych [51]. Endopeptydaza Kex2p kodowana przez gen *KEX2* jest odpowiedzialna za fragmentację protoksyny, oddzielenie regionu *pro*, poprzedzającego podjednostkę α

i usunięcie fragmentu γ . Karboksypeptydaza Kex1p, kodowana przez gen *KEX1*, hydrolizuje C-końcowy dipeptyd [51]. Opisane powyżej modyfikacje prowadzą do wydzielenia dojrzałej toksyny K1 – heterodimeru, połączonego trzema mostkami disiarczkowymi. Podjednostka α jest odpowiedzialna za cytotoksyczne działanie toksyny, natomiast podjednostce β przypisuje się istotną rolę podczas wiązania do ściany komórkowej drożdży wrażliwych [7].

W przypadku toksyny K2 prekursor białka ma masę cząsteczkową 38,7 kDa i jest złożony z 362 reszt aminokwasowych. Podczas procesu dojrzewania, peptyd sygnałowy zostaje usunięty, istotną rolę odgrywają również endopeptydaza Kex2p, hydrolizująca wiązania pomiędzy podjednostkami α i β . Najprawdopodobniej w preprotoksynie K2 nie jest obecna domena γ , a łańcuch α (170 reszt aminokwasowych) i β (140 reszt aminokwasowych) są nieco większe niż w toksynie K1. Podjednostka α jest N-glikozylowana w pozycjach 177 i 214 [51].

Prekursor toksyny killerowej K28 (preprotoksyna K28) ma masę cząsteczkową 37,6 kDa i jest polipeptydem zbudowanym z 345 aminokwasów. Zawiera N-końcową sekwencję sygnałową, niezbędną do transportu do retikulum endoplazmatycznego, która poprzedza sekwencje podjednostek α i β (w dojrzałej toksynie mają masy cząsteczkowe odpowiednio 10,5 oraz 11 kDa). Wspomniane podjednostki oddzielone są od siebie fragmentem γ , którego glikozylacja następuje w retikulum endoplazmatycznym. W aparacie Golgiego następuje usunięcie N-glikozylowanej sekwencji γ przez endopeptydazę Kex2p, natomiast karboksypeptydaza Kex1p usuwa C-końcowy dipeptyd, co prowadzi do wydzielenia heterodimerycznej, dojrzałej toksyny K28, zbudowanej z podjednostek α i β , połączonych jednym mostkiem disiarczkowym pomiędzy α -Cys⁵⁶ i β -Cys³⁴⁰ [80, 81].

Biosynteza toksyn killerowych w komórkach *K. lactis* stanowi przykład najlepiej opisanego systemu killerowego opartego na plazmidowym DNA. Fenotyp killerowy drożdży *K. lactis* związany jest z obecnością dwóch liniowych, cytoplazmatycznie dziedziczonych plazmidów DNA – pGKL1 (8,9 kpz) i pGKL2 (13,5 kpz). W mniejszym plazmidzie zlokalizowane są 4 otwarte ramki odczytu (ORF). ORF 2 (3,4 kpz) i ORF 4 (4,8 kpz) kodują prekursor podjednostek toksyny killerowej, ORF 3 (1,3 kpz) nadaje oporność komórce gospodarza, podczas gdy ORF 1 (1,3 kpz) koduje polimerazę DNA [51]. Natomiast większy z plazmidów (pGKL2) zawiera 10 genów i jest niezbędny do replikacji pGKL1. Toksyna killerowa *K. lactis*, zwana zymocyną, zbudowana jest z trzech podjednostek: α (99 kDa), β (30 kDa) i γ (27,5 kDa). ORF 2 koduje prekursor podjednostek α i β , o masie cząsteczkowej 128 kDa, zawierający N-końcowy peptyd sygnałowy. Prekursor kierowany jest do retikulum endoplazmatycznego, gdzie podlega glikozy-

lacji, a następnie jest transportowany do aparatu Golgiego i modyfikowany z udziałem peptydazy. N-końcowy peptyd sygnałowy podlega hydrolizie po stronie karboksylowej Arg²⁹. Oddzielnie kodowany jest prekursor podjednostki γ (ORF 4), zawierający N-końcowy peptyd sygnałowy, odcinany przez peptydazę podczas procesu dojrzewania toksyny [51].

Drożdże należące do gatunku *Williopsis mrakii* są przykładem mikroorganizmów, u których informacja genetyczna niezbędna do ujawnienia fenotypu killerowego zapisana jest w genomie jądrowym. Drożdże *W. mrakii* wytwarzają toksynę HM-1 (oznaczaną również jako HMK). Gen chromosomalny *hmk* koduje prekursor, zbudowany z 125 reszt aminokwasowych, zawierający 37-aminokwasową, N-końcową sekwencję sygnałową, hydrolizowaną przez endopeptydazę Kex2. Dojrzała toksyna jest nieglikozylowanym białkiem o masie cząsteczkowej 10,7 kDa, zbudowanym z 88 reszt aminokwasowych [49].

Mechanizm odporności drożdży na produkowane przez siebie białko killerowe jak dotąd został poznany jedynie dla szczepów drożdży *S. cerevisiae*, wytwarzających toksynę K28. Po internalizacji dojrzałej, aktywnej toksyny do cytozolu tworzy ona kompleks z nieprzetworzonym prekursorem K28, zanim zostanie skierowany do retikulum endoplazmatycznego. W obrębie kompleksu, podjednostka β dojrzałej toksyny oraz ta sama podjednostka jej prekursora podlegają poliubikwitynacji (procesowi przyłączenia cząsteczek ubikwityny w celu oznaczenia białka, które będzie podlegać proteolizie), po której następuje degradacja przez proteasom. Proteasomy to wielcząsteczkowe kompleksy enzymatyczne, odpowiedzialne za proteolityczną degradację niefunkcyjnych, nieprawidłowo zbudowanych lub uszkodzonych białek komórkowych.

Preprotoksyny K28, które pozostały w cytozolu niezwiązane i nie uległy ubikwitynacji, są kierowane do szlaku wydzielniczego w celu dalszej obróbki enzymatycznej, prowadzącej do powstania dojrzałych, biologicznie aktywnych toksyn [7].

3. Właściwości białek killerowych

Występowanie zjawiska killerowego wśród drożdży ma istotny związek z konkurencją szczepów o substancje odżywcze. Toksyny killerowe produkowane są przez rosnące komórki, a także wykazują największą aktywność wobec komórek w tej samej fazie rozwoju, gdy ilość dostępnych składników pokarmowych jest wystarczająca, a pH niskie. Uważa się, że owoce są szczególnie ważnym siedliskiem drożdży killerowych, ponieważ charakteryzują się one niskim pH i wysoką zawartością cukrów. Jedna czwarta szczepów drożdży izolowanych z owoców ma fenotyp killerowy [51].

Każda toksyna killerowa ma unikatowe właściwości, które różnią się w zależności od wytwarzającego ją rodzaju i gatunku drożdży. Różnice te dotyczą lokalizacji genów, które kodują toksyny, mechanizmów działania, jak również masy cząsteczkowej, która w przypadku białek killerowych mieści się w przedziale od kilku do ponad 100 kDa [55].

W większości, toksyny killerowe są stabilne i aktywne jedynie w niskim pH (4–4,6) i w niskich temperaturach. Takie warunki środowiska występują podczas fermentacji winiarskiej. Comitini i wsp. [20] badali zastosowanie dwóch toksyn – Kwkt z *Kluyveromyces wickerhamii* DBVPG 6077 oraz Pikt, wydzielanej przez *W. anomalus* DBVPG 3003, do hamowania wzrostu niepożądanych mikroorganizmów podczas dojrzewania i przechowywania wina. Analizowane toksyny wykazywały maksymalną aktywność przy pH równym 4,4, przy czym białko Pikt było nieco bardziej odporne na podwyższoną temperaturę niż Kwkt. Ograniczenie rozwoju drożdży *Dekkera bruxellensis* w winie po zastosowaniu toksyn Pikt i Kwkt, obserwowano przez okres 10 dni, co wskazuje na utrzymanie aktywności killerowej toksyn w tym przedziale czasowym [20].

Nawet toksyny killerowe produkowane przez drożdże izolowane ze środowiska morskiego działają najlepiej w środowisku kwaśnym. Aktywność bójcza oczyszczonej toksyny produkowanej przez *K. siamensis* HN12-1, przeciwko patogennym drożdżom *Metschnikowia bicuspidata* WCY, była najwyższa w pH 4 [12]. Podobny efekt stwierdzono w przypadku białka killerowego wytwarzanego przez *Mrakia frigida* 2E00797, gdzie antagonizm wobec *M. bicuspidata* WCY był najbardziej wyraźny przy pH 4,5 [35]. Zbliżone rezultaty otrzymano także drożdży killerowych *W. saturnus* WC91-2 izolowanych ze środowiska morskiego; optymalne warunki działania oczyszczonej toksyny przeciwko patogennym drożdżom *M. bicuspidata* WCY to pH 3–3,5 i temperatura 16°C [96].

Niektóre z toksyn killerowych o właściwościach wyjątkowych jak na tego typu białka, pozostają aktywne również w środowisku zasadowym. Jedną z najbardziej stabilnych toksyn killerowych – HM-1, produkowaną przez *W. mrakii* (*Hansenula mrakii*), zachowuje aktywność biologiczną ogrzewana przez 10 min w temperaturze 100°C i jest stabilna w zakresie pH 2–11 [49]. Wyjątkową stabilność HM-1 można wyjaśnić obecnością w jej strukturze 10 reszt cysteinowych, które tworzą mostki disiarczkowe [49]. Do grupy toksyn o wyjątkowych właściwościach zalicza się również białko killerowe wydzielane przez *W. saturnus*, stabilne w szerokim zakresie pH, wynoszącym 3–11 i aktywne po godzinnej inkubacji w temperaturze 80°C [55]. Znaczną stabilnością, wykraczającą poza typowy dla toksyn killerowych zakres pH, charakteryzuje się również białko killerowe produkowane przez *Tilletiopsis*

albescens, które zachowuje aktywność biologiczną przy pH 3,5–8 [55].

Poza kwestią kwasowości środowiska i temperatury, kolejnym istotnym czynnikiem wpływającym na aktywność niektórych toksyn jest obecność NaCl. Aktywność killerowa drożdży halofilnych i halotolerancyjnych może być warunkowana zasoleniem środowiska, w którym te drożdże bytują. U drożdży izolowanych z produktów o wysokim zasoleniu, aktywność killerowa zwykle wzrasta wraz ze zwiększeniem stężenia chlorku sodu w podłożu, a niekiedy obecność NaCl jest czynnikiem niezbędnym do ujawnienia się ich aktywności bójczej [98]. W badaniach szczepów drożdży killerowych, wyizolowanych z solanki po fermentacji oliwek, wykazano, że ich aktywność była wyższa w obecności soli, a spektrum bójczego działania wobec wrażliwych szczepów rosło wraz ze wzrostem stężenia soli [48]. Odnotowano, że dodatek NaCl zwiększał wrażliwość testowanych szczepów na działanie toksyn, nie stwierdzono jednak znaczącego wpływu soli na produkcję toksyn [48]. Fenotyp silnie stymulowany obecnością NaCl opisano także u halotolerancyjnych drożdży killerowych *Candida nodaensis* [26]. Autorzy wysunęli hipotezę, że NaCl zwiększa aktywność toksyny CnKT, produkowanej przez *C. nodaensis*, prawdopodobnie poprzez stabilizację jej struktury. Podobną zależność pomiędzy aktywnością killerową a obecnością NaCl obserwowano dla szczepu halotolerancyjnych drożdży *P. farinosa* KK1, które produkują toksynę SMK, wykazującą maksymalną aktywność przy stężeniu NaCl wynoszącym 2 M [87]. Toksyna ta, zbudowana z dwóch podjednostek (α i β), jest stabilna jedynie w środowisku kwaśnym. W środowisku o odczynie obojętnym i zasadowym łańcuch α ulega precypitacji, dochodzi do dysocjacji podjednostek, co skutkuje utratą aktywności killerowej [87]. Zależność aktywności killerowej od obecności NaCl jest także wyraźnie widoczna u drożdży killerowych izolowanych ze środowiska morskiego. Aktywność toksyny produkowanej przez szczep *M. frigida* 2E00797 wobec patogennych drożdży *M. bicuspidata* WCY była najwyższa w obecności NaCl w stężeniu 3% [35, 47]. Podobne rezultaty otrzymano w przypadku toksyny wytwarzanej przez szczep killerowy *W. saturnus* WC91-2, której aktywność wobec *M. bicuspidata* WCY była najwyższa w środowisku zawierającym 10% NaCl [96].

4. Mechanizm działania toksyn killerowych

Toksyny działają dwuetapowo, pierwszy etap obejmuje szybkie wiązanie białka killerowego z receptorem zlokalizowanym w ścianie komórkowej drożdży wrażliwych, nie wymaga nakładu energii i jest zależny od pH. Dla toksyn wytwarzanych przez *S. cerevisiae*

(K1, K2), *Hanseniaspora uvarum* oraz *P. membranifaciens* receptorem pierwszego rzędu jest β -1,6-D-glukan, dla toksyny K2, produkowanej przez *S. cerevisiae*, a także toksyny wydzielanej przez *Z. bailii* – 1,3-manno-proteina. Receptorem może być również chityna, która wiąże toksyny wytwarzane przez *P. acaciae* oraz *K. lactis* [72]. Drugi etap działania toksyn jest nieodwracalny i zależy od energii i, przebiega w różny sposób w zależności od rodzaju toksyny killerowej i jej stężenia.

W przypadku toksyny K1, dochodzi do jej translokacji do błony cytoplazmatycznej, a następnie interakcji z receptorem drugiego rzędu, którym jest glikoproteina Kre1p [11, 29]. Powstają kanały jonowe, błona komórkowa staje się przepuszczalna dla jonów i cząsteczek ATP, a to prowadzi do śmierci wrażliwej komórki. Badania Bartunek i wsp. [6] wykazały, że efekt cytotoksyczny wywołany działaniem toksyny K1 zależy od fazy cyklu komórkowego, w której znajdują się komórki drożdży wrażliwych. Największą opornością cechują się komórki w fazie M (podziału komórkowego), natomiast najbardziej wrażliwe są te w fazie S (syntezy DNA), cechujące się małymi pączkami [6]. W zbliżony sposób do toksyny K1, działa zygotocyna – toksyna wytwarzana przez osmotolerancyjne drożdże *Z. bailii*. Struktura i mechanizm biologicznej aktywności zygotocyny przypominają właściwości strukturalne i funkcjonalne peptydów przeciwdrobnoustrojowych wyższych eukariontów [97]. Białko killerowe łączy się z receptorem znajdującym się z błonie cytoplazmatycznej, co prowadzi do powstania kanałów oraz zwiększonej przepuszczalności metabolitów [97]. Podobną sekwencję zdarzeń opisano również dla toksyny produkowanej przez drożdże *P. kluyveri* [55, 61] oraz toksyny kFC-1, wytwarzanej przez drożdże *Filobasidium capsuligenum* [40].

Zbliżony mechanizm działania ma toksyna PMKT, wydzielana przez drożdże *P. membranifaciens* CYC 1106. Toksyna ta oddziałuje z błoną cytoplazmatyczną komórki wrażliwej poprzez interakcję z receptorem drugiego rzędu – białkiem Cwp2p [75], co prowadzi to do zaburzenia gradientu elektrochemicznego i homeostazy komórki wrażliwej. Powstają kanały, przez które wypływają jony takie jak: K^+ , Na^+ , protony oraz metabolity o niskiej masie cząsteczkowej (np. glicerol). Te zmiany pH i stężen jonów generują odpowiedź transkrypcyjną przez aktywację ścieżki HOG (High Osmolarity Glicerol), co w konsekwencji powoduje śmierć komórek wrażliwych [70, 71, 73].

Kolejnym często opisywanym mechanizmem działania toksyn killerowych jest blokowanie cyklu komórkowego. W ten sposób toksyna killerowa K28 wywiera efekt cytotoksyczny. Po związaniu się z receptorem drugiego rzędu, toksyna K28 podlega translokacji do retikulum endoplazmatycznego. Podjednostka β ulega ubikwitynacji, a następnie zostaje skierowana

do proteasomu i ulega degradacji, natomiast podjednostka α , przedostaje się do cytozolu, gdzie wysłany zostaje sygnał do jądra komórkowego komórki wrażliwej, w wyniku czego następuje zahamowanie syntezy DNA oraz zatrzymanie cyklu komórkowego we wczesnej fazie S [46, 55, 81].

Zbliżony mechanizm działania opisano również dla zymocyny, produkowanej przez drożdże *K. lactis*. Białko to zbudowane jest z trzech podjednostek. Podjednostka α ma aktywność chitynazy, funkcją kolejnej, hydrofobowej podjednostki β jest ułatwienie transportu podjednostki γ , która z kolei wywiera efekt cytotoksyczny na komórki docelowe. Polega on na rozszczepianiu transportującego RNA. Podjednostka γ hydroлізуje antykodon UUC tRNA, w wyniku czego następuje zahamowanie modyfikacji posttranslacyjnych oraz zatrzymanie cyklu komórkowego u drożdży wrażliwych w fazie G1 [38, 50, 55].

Klassen i Meinhardt [42] przeprowadzili badania dotyczące mechanizmu działania toksyny killerowej PaT, wytwarzanej przez *P. acaciae*, na drożdże wrażliwe należące do gatunku *S. cerevisiae*. Po około 4-godzinnej inkubacji obserwowano zmniejszoną żywotność komórek drożdży wrażliwych oraz zatrzymanie cyklu komórkowego we wczesnej fazie S. Kolejny, wyraźny spadek żywotności komórek wrażliwych nastąpił po około 10 h. Obserwowano znaczne zmiany morfologiczne komórek wrażliwych, w tym fragmentację DNA, prowadzące do apoptozy komórek drożdży *S. cerevisiae* [42]. Do zablokowania cyklu komórkowego w fazie syntezy DNA dochodzi również w przypadku aktywności toksyny PMKT2, wydzielanej przez *P. membranifaciens* CYC 1086 [70].

Kolejnym często opisywanym mechanizmem działania toksyn killerowych jest hydroliza β -1,3-D-glukanów. Izgü i Altinbay [36] wykazali, że toksyna (panamykocyna) produkowana przez *W. anomalus* (*Pichia anomala*), charakteryzuje się aktywnością egzoglykanazy. Mechanizm cytotoksycznego działania tego białka prawdopodobnie polega na hydrolizie β -1,3-D-glukanu – podstawowego składnika ściany komórkowej drożdży. Prowadzi to do wycieku cytoplazmy i śmierci komórki wrażliwej. Panamykocyna wykazuje aktywność bójczą szczególnie wobec tych drożdży, których ściany komórkowe charakteryzują się dużą zawartością β -1,3-D-glukanu, tj. *C. albicans*, *Torulaspora delbrueckii* oraz *Kluyveromyces marxianus* [36].

Podobny mechanizm działania, wiązany z aktywnością hydrolityczną wobec głównego składnika ściany komórkowej drożdży wrażliwych, opisali Guyard i wsp. [33] dla toksyny WmKT, produkowanej przez *W. saturnus* ser. *mraakii* MUCL 41968. Ponieważ sekwencja aminokwasowa toksyny WmKT wykazywała znaczne podobieństwo do sekwencji glukanaz, badano wpływ kastanosperminy (inhibitora glikozydaz) na aktywność

tej toksyny. Kastanospermina całkowicie hamowała aktywność toksyny WmKT. Przy zastosowaniu skaningowej mikroskopii elektronowej zobrazowano zmiany morfologiczne komórek wrażliwych po działaniu toksyny, świadczące o częściowej degradacji ściany komórkowej. Podobny efekt stwierdzono stosując zymoliazę – enzym hydrolizujący glukany [33].

Analogiczny sposób działania opisano dla toksyny killerowej KpKt, wydzielanej przez *Tetrapisispora phaffii* (*Kluyveromyces phaffii*). Toksyna ta działa na ścianę komórkową drożdży wrażliwych, powodując zmiany morfologii komórek. Zastosowanie kastanosperminy doprowadziło do zahamowania aktywności biologicznej toksyny KpKt. Na tej podstawie wysunięto hipotezę, że KpKt wykazuje aktywność hydrolityczną w stosunku do β -glukanów, znajdujących się w ścianie komórek docelowych. Koncepcję tę potwierdza brak wiązania i interakcji toksyny ze sferoplastami [21].

Selektywne blokowanie syntezy β -1,3-glukanu przypisuje się toksynie HM-1, produkowanej przez szczep drożdży *Williopsis saturnus* ser. *mrakii* IFO 0895. Inne polisacharydy wchodzące w skład ściany komórkowej, takie jak mannan i chityna, powstają w niezmiennym sposobie [88].”

Odmienny mechanizm działania zaproponowano dla toksyny KP4, produkowanej przez *U. maydis*. Wysunięto hipotezę, że ta toksyna hamuje wzrost i podział komórki poprzez blokowanie szlaków transdukcji sygnałów, regulowanych jonami wapnia [28, 46].

Mechanizm działania toksyn jest zależny nie tylko od rodzaju toksyny killerowej, ale i jej stężenia. Reiter i wsp. [67] udowodnili, że w przypadku trzech toksyn – K1, K28 i zygotyny, kodowanych przez geny zlokalizowane w cytoplazmatycznym dsRNA, białko killerowe w niskim i umiarkowanym stężeniu (< 1 pM) indukuje apoptozę komórki wrażliwej za pośrednictwem kaspazy drożdżowej Yca1p i reaktywnych form tlenu (ROS). Procesowi towarzyszy fragmentacja DNA, kondensacja chromatyny oraz translokacja fosfatydyloseryny na zewnątrz błony cytoplazmatycznej [82]. Białko killerowe w wysokim stężeniu (> 10 pM) powoduje nekrozę komórki wrażliwej na drodze typowej dla danej toksyny [82], poprzez przerwanie integralności błony komórkowej albo oddziaływanie z białkami komórki gospodarza zaangażowanymi w cykl komórkowy i/lub syntezę chromosomalnego DNA. Dwoistość mechanizmu działania, w tym programowaną śmierć komórki wrażliwej przy niskich stężeniach toksyny, obserwowano również dla białek killerowych PMKT i PMKT2 kodowanych chromosomalnie, bez obecności cząstek wirusopodobnych [8]. Wydaje się, że w naturalnym środowisku, toksyny killerowe występują w niskich stężeniach i właśnie indukcja apoptozy może odgrywać kluczową rolę w skutecznej eliminacji drożdży wrażliwych za pośrednictwem wydzielanych przez drożdże killerowe toksyn [67, 82].

5. Zastosowanie drożdży killerowych i ich toksyn

W tabeli 1 przedstawione zostały podstawowe informacje dotyczące wybranych szczepów drożdży killerowych, produkowanych przez nie toksyn oraz zakresu ich aktywności, a także przykłady ich potencjalnego zastosowania.

5.1. Wykorzystanie w winiarstwie

Jednym z obszarów przemysłu spożywczego, w którym drożdże killerowe i produkowane przez nie toksyny mogą znaleźć potencjalne zastosowanie jest przemysł fermentacyjny. Rozwój drożdży dzikich w moszczu gronowym oraz winie jest poważnym problemem dla producentów, gdyż może skutkować zaburzeniem procesu fermentacji. Drożdże killerowe są obiektem badań pod kątem zastosowania ich do ograniczenia rozwoju niepożądanych mikroorganizmów i poprawy cech jakościowych produktu.

Drożdże killerowe należące do gatunku *S. cerevisiae*, zastosowane jako kultury starterowe podczas fermentacji moszczów gronowych, mogą korzystnie wpłynąć na proces produkcji wina i jego jakość. Ograniczeniem stosowania toksyn K1, K2 i K28, produkowanych przez *S. cerevisiae*, jest wąskie spektrum aktywności antagonisticznej do wrażliwych szczepów *Saccharomyces* [17]. Jedynie szczepy drożdży *S. cerevisiae*, produkujące toksynę Klus, mogą także eliminować drożdże należące do innych gatunków niż producent toksyny, takie jak *C. albicans* oraz *K. lactis* [68]. Drożdże *Hanseniaspora/Kloeckera* dominują na powierzchni winogron oraz w świeżo wytłoczonym soku. Wzrost tych drożdży ogranicza się w niesterylnym środowisku, np. w moszczu gronowym, przez stosowanie ditlenku siarki. Jedną z alternatyw dla chemicznych środków może być użycie toksyn killerowych wykazujących aktywność wobec *Hanseniaspora/Kloeckera* [17]. Toksyną potencjalnie użyteczną w kontrolowaniu wzrostu *Hanseniaspora/Kloeckera* w świeżym moszczu i podczas pierwszego etapu fermentacji jest toksyna Kpkt, wytwarzana przez *T. phaffii* DBVPG 6076. Wyniki badań Ciani i Faticenti [17] wskazały, że efekt bójczy lub mykostatyczny toksyny Kpkt względem niepożądanych drożdży uzależniony był od jej stężenia. Działanie toksyny Kpkt w moszczu gronowym było porównywalne do skuteczności działania SO_2 [17].

Poważnym problemem w winiarstwie są zanieczyszczenia drożdżami z rodzaju *Brettanomyces/Dekkera*, które przekształcają hydrokwasy do lotnych fenoli, takich jak: 4-etylofenol, 4-etylogwajakol i 4-etylokatechol. Prowadzi to do pojawienia się w winie niepożądanych aromatów (określanych jako „apteczne”, ziemiste, kojarzone ze stajnią, końską derką), zarówno pod koniec fermentacji, jak i podczas późniejszego dojrzewania.

Tabela I
Wybrane szczepy drożdży killerowych i ich potencjalne zastosowanie

Producent toksyny killerowej	Nazwa toksyny/ Masa cząsteczkowa	Zakres aktywności toksyny (pH, temp.)	Potencjalne zastosowanie	Piśmien- nictwo
<i>Candida nodaensis</i> PYCC 3198	CnKT	pH 3–7,5; < 40–50°C	konserwowanie żywności	[26]
<i>Candida pyralidae</i> IWB T Y1140 i IWB T Y1057	CpKT1 i CpKT2/ > 50 kDa	pH 3,5–4,5; 15–25°C	winiarstwo	[56, 57]
<i>Kluyveromyces lactis</i> IFO1267	zymocyna/ 157 kDa (α 97 kDa, β 31 kDa i γ 28 kDa)	pH 4,4–5,8; < 40°C	konserwowanie żywności	[8, 38]
<i>Kluyveromyces wickerhamii</i> DBVPG 6077	KwKt/ 72 kDa	pH 3,8–4,6; < 25°C	winiarstwo	[19, 20]
<i>Mrakia frigida</i> 2E00797	55,6 kDa	optymalne pH 4,5; < 25°C, 3% NaCl	zwalczanie chorób zwierząt morskich	[35, 47]
<i>Pichia kluyveri</i> DBVPG 5826	PkKp/ 54 kDa	środowisko kwaśne	winiarstwo	[44]
<i>Pichia kudriavzevii</i> RY55	39,8 kDa	środowisko kwaśne	środki terapeutyczne	[4]
<i>Pichia membranifaciens</i> CYC 1086	PMKT2/ 30 kDa	pH 2,5–4,8; < 20°C	winiarstwo	[8, 70, 76]
<i>Pichia membranifaciens</i> CYC 1106	PMKT/ 18 kDa	pH 3–4,8; < 20°C	winiarstwo, biologiczna ochrona roślin	[71, 72, 73, 74, 75, 77]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> AWRI796	K2/ 21,5 kDa	optymalne pH 4,2–4,4; < 30°C	winiarstwo	[8]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> CBS 8112	K28/ 21 kDa) (α 10,5 kDa i 11 kDa	optymalne pH 5	model biologiczny w badaniach endocytozy	[7]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Klus	Klus	pH 3,5–5,5; < 30°C	winiarstwo	[68]
<i>Tetrapisispora phaffii</i> DBVPG 6706	KpKt/ 33 kDa	pH 3–5; < 40°C	winiarstwo	[17, 20, 21, 22]
<i>Torulospora delbrueckii</i> NPCC 1033	TdKT/ 30 kDa	pH 4,2–4,8; < 40°C	winiarstwo	[91]
<i>Torulospora delbrueckii</i> Kbarr-1	Kbarr-1	środowisko kwaśne	winiarstwo	[66, 90]
<i>Ustilago maydis</i> P4	KP4/13,6 kDa	środowisko kwaśne	rośliny transgeniczne	[1, 59]
<i>Ustilago maydis</i> P6	KP6/ α 8,6 kDa i β 9,1 kDa	środowisko kwaśne	rośliny transgeniczne	[41]
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> DBVPG 3003	PiKt/ ~8 kDa	optymalne pH 4,4; 25–35°C	winiarstwo	[20]
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> ATCC 96603	PaKT	środowisko kwaśne	konstrukcja przeciwciał	[16, 52, 83]
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> NCYC 434	panamykocyna/ 49 kDa	pH 3–5,5; < 37°C	biologiczna ochrona roślin	[36, 37]
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> YF07b	47 kDa; 67 kDa	pH 3–5; < 40°C	zwalczanie chorób zwierząt morskich	[32, 93, 94, 95]
<i>Williopsis saturnus</i> DBVPG 4561	KT4561/ 62 kDa	pH 4,5–8; < 45°C	konserwowanie żywności, środki terapeutyczne	[13]
<i>Williopsis saturnus</i> WC91-2	11,6 kDa	pH 3–4; < 35°C; 8% NaCl	zwalczanie chorób zwierząt morskich	[96]
<i>Williopsis saturnus ser. mrakii</i> NCYC 2251	HM-1 (HMK)/ 10,7 kDa	pH 2–11; pozostaje aktywna po 10 min w 100°C	środki terapeutyczne, konserwowanie żywności	[49]
<i>Williopsis saturnus ser. mrakii</i> MUCL 41968	WmKT/ 85 kDa	optymalne pH 4,5; 26–28°C	środki terapeutyczne	[33]
<i>Zygosaccharomyces bailii</i> DSM 12864	KT412 (zygocyna)/ 10 kDa	środowisko kwaśne	środki terapeutyczne	[97]

Drożdże z rodzaju *Brettanomyces/Dekkera* dobrze adaptują się do warunków panujących w środowisku, jakim jest wino, charakteryzującym się wysokim stężeniem etanolu, wysoką kwasowością, niskim stężeniem cukrów oraz dużą zawartością związków polifenolowych. Wciąż poszukiwane są skuteczne sposoby zapobiegania rozwojowi *Brettanomyces/Dekkera* (w szczegól-

ności *D. bruxellensis*) w winie. Zastosowanie związków chemicznych (kwasu benzoowego lub sorbowego), jak również metod fizycznych (np. filtracji) okazuje się niewystarczająco efektywne. Dodatek SO₂ niekorzystnie wpływa na organizm człowieka, dlatego Światowa Organizacja Zdrowia podkreśla konieczność ograniczenia stosowania tego środka przeciwdrobnoustrojowego

w produktach spożywczych [17, 20]. Jednym ze sposobów eliminowania zanieczyszczeń *Brettanomyces/Dekkera* może być użycie toksyny killerowej KwKt, produkowanej przez *K. wickerhamii* DBVPG 6077. Dodatek oczyszczonej toksyny w stężeniu 40 i 80 mg·l⁻¹ skutecznie przeciwdziałał wzrostowi niepożądanych drożdży. W winie nie stwierdzono etylofenoli, produkowanych przez *Brettanomyces/Dekkera*. Dodatek toksyny Kwkt może być skuteczną biologiczną metodą zwalczania drożdży *Brettanomyces/Dekkera* podczas fermentacji, dojrzewania i przechowywania wina [19].

Labrani i wsp. [44] wyizolowali białko killerowe Pkkp, wydzielane przez *P. kluyveri* DBVPG 5826, które wykazywało aktywność wobec wielu mikroorganizmów skażających żywność i napoje. Aktywność bójcza toksyny Pkkp względem *D. bruxellensis* była wielokrotnie wyższa niż powszechnie stosowanego w winiarstwie pirosiarczynu potasu. Nie odnotowano synergizmu działania Pkkp w połączeniu z pirosiarczynem potasu, sorbinianem potasu lub etanolem [44]. Skuteczność działania innego białka, toksyny PMK2, względem *D. bruxellensis* została udokumentowana w badaniach Santosa i wsp. [76]. Obiecujące wyniki otrzymano także w badaniach toksyn CpKT1 oraz CpKT2, wytwarzanych przez *Candida pyralidae*. Białka te wykazywały aktywność killerową wobec *D. bruxellensis* w warunkach fermentacji winiarskiej. Aktywność toksyn CpKT1 oraz CpKT2 nie malała w obecności etanolu i cukru (glukozy i fruktozy w stosunku 1:1), w zakresie stężeń typowych dla wina oraz moszczu gronowego. Ponadto toksyny te nie wpływały negatywnie na rozwój drożdży *S. cerevisiae* oraz bakterii kwasu mlekowego [57]. Antagonistyczne działanie tych toksyn wobec *D. bruxellensis* polega na uszkodzeniu ściany komórkowej wrażliwych drożdży [56].

Szczep killerowy *T. delbrueckii* NPCC 1033, produkujący toksynę TdKT, jest kolejnym przykładem drożdży działających antagonistycznie w stosunku do mikroorganizmów niepożądanych w winiarstwie. Szczep ten i syntetyzowana toksyna wykazują aktywność killerową wobec *D. bruxellensis* i *H. uvarum* oraz niektórych szczepów *M. guilliermondii* i *P. membranifaciens*, jednocześnie nie hamują rozwoju drożdży szlachetnych *S. cerevisiae*. Badania prowadzone przez Villalba i wsp. [91] dowiodły, że w obecności toksyny TdKT, po trzygodzinnej inkubacji dochodzi do nekrozy, a po dłuższej, trwającej 24 h, do apoptozy komórek wrażliwych [91]. Drożdże *T. delbrueckii* mogą być wprowadzane do fermentacji winiarskiej w celu poprawy niektórych specyficznych cech wina. W badaniach Velázquez i wsp. [90] do produkcji białych win stołowych użyto nowych szczepów killerowych *T. delbrueckii* Kbar [66], które wykazują aktywność antagonistyczną również wobec *S. cerevisiae*. Sekwencyjna inokulacja niejałowego moszczu, najpierw kulturą

T. delbrueckii, a następnie *S. cerevisiae*, nie zapewniła dominacji szczepów *T. delbrueckii* ani poprawy jakości wina. Tylko w przypadku moszczu, który inokulowano równocześnie *T. delbrueckii* i *S. cerevisiae*, w proporcji 9:1, szczepy killerowe *T. delbrueckii* zdominowały środowisko fermentacyjne i uzyskano produkt o zawartości etanolu ponad 11%.

Nie stwierdzono istotnych różnic w końcowym wyniku oceny sensorycznej otrzymanych win. Jednak wina, gdzie szczepy *S. cerevisiae* dominowały były preferowane w porównaniu z winami, gdzie dominowały drożdże *T. delbrueckii*, ponieważ te pierwsze miały intensywniejsze aromaty świeżych owoców, podczas gdy te drugie charakteryzowały się mniej intensywnymi, ale również ocenianymi jako przyjemne aromatami suszonych owoców [90].

Toksyna PMKT, wytwarzana przez *P. membranifaciens* i aktywna jak większość białek killerowych w środowisku o niskim pH oraz w niskiej temperaturze, może znaleźć potencjalne zastosowanie w winiarstwie do zwalczania drożdży z rodzaju *Zygosaccharomyces*, które są odporne nie tylko na wysokie stężenia cukru, ale także na dodatek sorbinianu potasu. Drożdże *Zygosaccharomyces* stanowią zagrożenie szczególnie w produkcji win słodkich, gdzie powodują wtórną fermentację. Z przeprowadzonych badań przez Alonso i wsp. [2] wynika, że toksyna PMKT działa synergistycznie z pirosiarczynem potasu, umożliwiając skuteczne hamowanie rozwoju drożdży *Zygosaccharomyces* [2].

Badano również wpływ obecności drożdży *W. anomalus* CBS 1982 i *W. anomalus* CBS 5759 na skład chemiczny i cechy sensoryczne win jabłkowych. Niepasteryzowane i pasteryzowane moszcze jabłkowe inokulowano kulturą mieszaną tych drożdży i *S. cerevisiae*. Dodatek szczepów killerowych do niepasteryzowanych moszczów znacząco zmienił kinetykę fermentacji i korzystnie wpłynął na skład chemiczny win jabłkowych. W pasteryzowanych moszczach jabłkowych obecność szczepów killerowych skutkowała wzrostem wydajności fermentacji oraz zwiększeniem poziomu polifenoli. Zastosowanie szczepów *W. anomalus* wraz z drożdżami *S. cerevisiae* w formie kultury mieszanej poprawiło skład chemiczny i cechy sensoryczne win jabłkowych [78]. Otrzymane wina charakteryzowały się wyżej ocenianą barwą, łagodniejszym smakiem i przyjemniejszym aromatem.

Sprawdzono również czy dodatek białek killerowych nie zaburzy fermentacji, prowadzonej przez *S. cerevisiae* i nie wpłynie niekorzystnie na skład chemiczny wina. W tym celu badano wpływ preparatów częściowo oczyszczonych toksyn typu K8, K4 i K7 (wydzielanych przez szczepy drożdży *W. anomalus* CBS 1981, *W. anomalus* CBS 5759 oraz *P. membranifaciens* CBS 7373) na przebieg procesu fermentacji i skład chemiczny win jabłkowych. Dodatek toksyn do moszczów jabłkowych,

uprzednio inokulowanych kulturami starterowymi drożdży *Saccharomyces*, nie zmienił w znaczący sposób kinetyki fermentacji, w większości otrzymane wina jabłkowe charakteryzowały się nieco wyższą zawartością alkoholu etylowego. Dodatek toksyn w niewielkim stopniu wpłynął na profil związków lotnych [10].

5.2. Potencjalne zastosowanie w medycynie

W próbach praktycznego zastosowania toksyn killerowych należy brać pod uwagę, że ich działanie w znacznym stopniu ograniczone jest do środowiska o stosunkowo niskim pH oraz niskiej temperaturze. Udowodniono, że wiele toksyn, m.in. HM-1, PaKT, zygocyna, w badaniach *in vitro* wykazuje aktywność przeciwmikrobiologiczną względem patogennych drożdży, takich jak *C. albicans* oraz *Cryptococcus neoformans* [8, 51, 92, 97]. Toksyny te mogłyby być użyteczne w zwalczaniu infekcji wywołanych przez chorobotwórcze grzyby, jednak ich zastosowanie jest ograniczone ze względu na niestabilność w fizjologicznym pH i temperaturze panującej w organizmie ludzkim [8]. Jedynie niektóre toksyny killerowe, np. wytwarzane przez *Williopsis*, charakteryzujące się znaczną jak na tego typu białka stabilnością, mogą być wykorzystane do celów terapeutycznych [13]. Próby użycia preparatów zawierających stabilne toksyny na zainfekowaną skórę, powierzchnię błon śluzowych lub jako dodatek do rozтворów buforowych wydają się być obiecujące [8].

Drożdże z rodzaju *Candida* licznie występują w mikrobiomie jelita człowieka, ale również zasiedlają jamę ustną i płuca [53]. Rodzaj *Candida* obejmuje około 150 gatunków, ale tylko 9 z nich uznaje się za patogenne dla człowieka [69]. Banjara i wsp. [5] przeprowadzili badania nad redukcją liczby patogennych drożdży *Candida* przez zastosowanie drożdży killerowych *D. hansenii*. 42 szczepy *D. hansenii*, wyizolowane z 22 próbek różnych rodzajów serów dojrzewających, oceniono pod kątem aktywności wobec drożdży *Candida* sp. Dwaścieścia trzy szczepy wykazywały aktywność killerową w stosunku do *C. albicans* i *C. tropicalis* w środowisku o pH < 6,5 i w temperaturze ≤ 35°C. Preparat nieoczyszczonej toksyny, wytwarzanej przez szczep *D. hansenii* Dh-237, redukował wzrost *C. albicans* w temperaturze 35°C przez okres 24 h. Natomiast szczep killerowy zawarty w próbce sera Romano zachowywał aktywność killerową, zarówno przeciwko *C. albicans*, jak i *C. tropicalis*, przez okres 10 dni w temperaturze 37°C. Na podstawie tych obserwacji autorzy pracy wysnuli przypuszczenie, że szczepy killerowe *D. hansenii* zawarte w serze mogą wpływać na populację drożdży *Candida* w jelitach [5].

Obiecujące wyniki uzyskano w przypadku szczepu drożdży *W. anomalus* Wa1F1 wyizolowanego z muchy piaszkowej *Phlebotomus perniciosus*. Toksyna killerowa

produkowana przez ten szczep została oczyszczona i scharakteryzowana, a jej aktywność przeciwdrobnoustrojowa była testowana *in vitro* przeciwko zarówno wrażliwym, jak i opornym na flukonazol, izolatom klinicznym i szczepom laboratoryjnym *C. albicans* i *C. glabrata* oraz ich mutantom. W temperaturze 25°C toksyna nie wykazywała aktywności killerowej wobec referencyjnego szczepu *C. albicans* SC5314, wrażliwych na flukonazol izolatów klinicznych (*C. albicans* DSY347 i DSY544) oraz mutantu DSY775 opornego na flukonazol, pochodzącego od szczepu *C. albicans* DSY544. Toksyna była aktywna w stosunku do mutantu DSY289 opornego na flukonazol, wywodzącego się od szczepu *C. albicans* SY347, a także wobec wszystkich użytych w badaniu, wrażliwych i opornych na flukonazol, izolatów klinicznych *C. glabrata* i ich mutantów [30].

Jedne z badań prowadzonych w ostatnich latach wskazują, że toksyny killerowe również mogą znaleźć zastosowanie w walce z malarią. Malaria jest chorobą tropikalną, wywołowaną przez pierwotniaki z rodzaju *Plasmodium* i przenoszona przez samice komarów z rodzaju *Anopheles*. Programy zwalczania malarii obejmują leczenie farmakologiczne, które jednak może powodować skutki uboczne, nie zawsze jest skuteczne, a także kosztowne. Przy braku skutecznych szczepionek, stosuje się środki owadobójcze w celu zmniejszenia liczebności populacji owadów stanowiących wektory przenoszące pierwotniaki. Cappelli i wsp. [15] wykazali, że szczep *W. anomalus* WaF17.12 znajdujący w gonadach oraz w jelitach samic komarów *Anopheles stephensi* produkuje toksynę killerową WaKT. Toksyna ta działa antagonistycznie wobec zarodźca *Plasmodium berghei* w warunkach *in vitro*. Obserwowano zahamowanie wzrostu pierwotniaków poddanych działaniu toksyny WaKT sięgające nawet 90% [15, 89].

Nieliczne badania sugerują, że toksyny killerowe mogą również wykazywać działanie przeciwbakteryjne. Szczepem drożdży, któremu przypisuje się taki potencjał jest *Pichia kudriavzevii* RY55. Bajaj i wsp. [4] odnotowali, że produkuje on toksynę killerową, która wykazuje aktywność bójczą w stosunku do bakterii: *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella* sp., *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* i *Pseudomonas alcaligenes*. Według autorów, toksyna produkowana przez *P. kudriavzevii* RY55 może zostać użyta podczas opracowywania nowych środków przeciwbakteryjnych, także do konserwowania żywności oraz jako składnik kultur starterowych dla przemysłu fermentacyjnego [4]. W innych badaniach wykazano natomiast, że wyizolowany z owoców cytrusowych szczep killerowy *Kazachstania exigua* 120 hamuje rozwój bakterii *P. aeruginosa*, *E. coli* i *Klebsiella pneumoniae* [60].

Hu i wsp. [34] wskazują, że drożdże killerowe mogą również hamować rozwój komórek nowotworowych w warunkach *in vitro*. Autorzy badali wpływ filtratów

pohodowlanych drożdży killerowych z rodzaju *Barnetozyma* oraz *Pseudozyma* na linię komórek nowotworowych HepG2. Stwierdzono, że filtry zawierają związki, które indukują apoptozę komórek nowotworowych, bez uszkodzenia komórek zdrowych [34]. Ponieważ w badaniu nie zostały użyte oczyszczone białka killerowe, nie można jednoznacznie stwierdzić, że za obserwowany efekt cytotoksyczny odpowiadają toksyny killerowe, a nie inne związki wchodzące w skład filtratów.

Nadal istnieje potrzeba opracowania nowych, profilaktycznych oraz terapeutycznych strategii przeciwzakaźnych. Przeciwciała naśladujące aktywność biologiczną toksyn (KTAbs), które w swej strukturze zawierają wewnętrzny obraz centrum aktywnego toksyny, hamują funkcje, które są krytyczne dla przeżycia mikroorganizmów, wywierając w ten sposób działanie przeciwmikrobiologiczne [52]. Toksyna killerowa PaKT, produkowana przez drożdże *W. anomalus* ATCC 96603, charakteryzuje się szerokim spektrum aktywności przeciwdrobnoustrojowej i może także znaleźć zastosowanie w zwalczaniu pneumocystozy – choroby płuc, wywoływanej przez grzyby *Pneumocystis jiroveci* (*Pneumocystis carinii*). Choroba ta dotyka głównie pacjentów z obniżoną odpornością, np. zakażonych wirusem HIV, chorujących na białaczkę, chłoniaki, jak również leczonych immunosupresyjnie. Stwierdzono, że toksyna PaKT w badaniach *in vitro* skutecznie ogranicza rozwój *P. jiroveci*. Ponieważ ta toksyna killerowa nie może być stosowana bezpośrednio jako środek leczniczy, dlatego też opracowano podstawy nowej strategii terapeutycznej z zastosowaniem antyidiotypowych przeciwciał przypominających toksynę PaKT oraz naśladujących jej aktywność przeciwgrzybiczą [83, 84]. Konstruuąc przeciwciała opierano się na założeniu, że interakcja pomiędzy toksyną killerową (KT) a specyficznymi przeciwciałami zdolnymi do neutralizacji jej aktywności może odzwierciedlać oddziaływanie toksyny ze specyficznymi receptorami ściany komórki wrażliwej. Przeciwciało monoklonalne anti-PaKT (mAb KT4) wytworzone zostało metodą fuzji splenocytów myszy, które uprzednio immunizowano PaKT, z komórkami szpiczaka. Otrzymane przeciwciało mAb KT4 neutralizowało aktywność bójczą PaKT przeciwko referencyjnemu szczepowi *C. albicans* [52]. Kiedy mAb KT4 zastosowano do immunizacji królików przez szczepienie idiotypowe, uzyskano antyidiotypowe KAbs, które były w stanie konkurować z PaKT o wiązanie z mAb KT4 i, co istotne, hamować wzrost referencyjnego szczepu wrażliwego *C. albicans*, tym samym naśladując aktywność PaKT [52].

Skonstruowano poliklonalne, monoklonalne i rekombinowane przeciwciała antyidiotypowe naśladujące aktywność biologiczną toksyn, które w badaniach *in vitro* wykazały szerokie spektrum działania bójczego przeciwko *C. albicans* [63] oraz innym gatunkom

drożdży z rodzaju *Candida* [54], *P. jiroveci* [83, 84], *Aspergillus fumigatus* [16], jak również wobec bakterii patogennych, w tym *Mycobacterium tuberculosis* o oporności wielolekowej [23], opornych na antybiotyki Gram-dodatnich ziarniaków [24], paciorkowców izolowanych z jamy ustnej [25] oraz pierwotniaków: *Leishmania major*, *Leishmania infantum* [79] i *Acanthamoeba castellanii* [27].

Podjęto również próby zastosowania drożdży killerowych do szybkiej identyfikacji patogennych szczepów *Nocardia asteroides* [64]. W oparciu o 4 szczepy drożdży killerowych (*Candida maltosa* G7A, *D. hansenii* P41, *W. saturnus* DBVPG 3127 i *W. saturnus* DBVPG 3671) opracowano procedurę pozwalającą na odróżnienie *C. albicans* od innych gatunków z rodzaju *Candida* [14].

5.3. Zwalczanie chorób grzybowych roślin

Owoce i warzywa podczas wzrostu i przechowywania są narażone na choroby wywołane przez pleśń. Konsekwencją występowania chorób grzybowych jest zmniejszenie zbiorów i pogorszenie ich jakości. Straty owoców, np. jabłek, podczas przechowywania, wywołane przez grzyby fitopatogenne sięgają nawet 25% początkowej ilości [39]. Oprócz strat ekonomicznych, wzrost pleśni w artykułach spożywczych, może mieć niebezpieczne konsekwencje dla zdrowia ludzi w związku z produkcją mikotoksyn oraz wytwarzaniem konidiów, które mogą powodować alergie [18]. Aby zapobiec chorobom grzybowym stosuje się fungicydy, których zaletami są wysoka skuteczność i łatwość stosowania. Jednak zwalczanie pozbiorowych chorób grzybowych przez stosowanie środków chemicznych niesie wiele skutków. Pozostałości fungicydów mogą negatywnie wpływać na bezpieczeństwo zdrowotne konsumentów. Stosowanie fungicydów powoduje zanieczyszczenie środowiska i może prowadzić do wzrostu oporności fitopatogenów na czynniki chemiczne oraz redukcji liczebności pożytecznych organizmów. Nadal poszukuje się nowych rozwiązań, a biologiczne metody ochrony roślin cieszą się dużym zainteresowaniem. Biokontrola chorób roślin pochodzenia grzybowego może obejmować stosowanie drożdży antagonistycznych. Drożdże killerowe mają właściwości, które pozwalają uznać je za potencjalną, bezpieczną alternatywę dla środków chemicznych. W warunkach konkurencyjnych fenotyp killerowy daje przewagę szczepom drożdży killerowych w stosunku do innych, wrażliwych mikroorganizmów zasiedlających tę samą niszę ekologiczną [80]. Jednak produkcja toksyn killerowych jest tylko jednym ze sposobów antagonistycznego działania drożdży wobec patogenów grzybowych. Innymi są m.in. konkurencja o przestrzeń i składniki odżywcze (np. źródło węgla, azotu, kationy żelaza), wytwarzanie enzymów degradujących ściany komórkowe (np. chitynaz i glukanaż),

produkcja metabolitów lotnych, indukcja odporności gospodarza i tworzenie biofilmu [43, 58, 85].

Aloui i wsp. [3] badali możliwość zastosowania powłok otrzymanych z alginianu sodu lub mączki chleba świętojańskiego, zawierających drożdże killerowe *W. anomalus* BS 91, do kontroli wzrostu *Penicillium digitatum* na powierzchni owoców pomarańczy. Powłoki wzbogacone o drożdże killerowe *W. anomalus* hamowały rozwój pleśni *P. digitatum* na owocach o ponad 73% po 13 dniach ich przechowywania w temperaturze 25°C. Dodatkowo, bioaktywne powłoki ograniczały utratę wody i pozwalały na utrzymywanie jędrności owoców w czasie ich przechowywania. W innych badaniach Platania i wsp. [62] odnotowali, że szczep killerowy *W. anomalus* BS91 hamował wzrost *P. digitatum* na owocach pomarańczy do 10 dnia przechowywania. Poza produkcją toksyn killerowych szczepy drożdży należące do gatunku *W. anomalus* mogą wytwarzać β -glukanazy, które degradują ścianę komórkową i powodują lizę komórek grzybów [62]. W innej pracy odnotowano również, że panamykocyna, toksyna killerowa *W. anomalus* NCYC 434 o aktywności β -glukanazy, zastosowana na powierzchnię owoców cytryny, uprzednio mechanicznie uszkodzonych i skażonych pleśniami *P. digitatum* oraz *P. italicum*, redukowała psucie się owoców i wydłużała okres ich trwałości. Toksyna ta w stężeniu $16 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ całkowicie hamowała rozwój wspomnianych pleśni przez okres 7 dni [37]. Badania przeprowadzone przez Pereza i wsp. [60] wykazały, że mikroorganizmami, które skutecznie przeciwdziałają rozwojowi *P. digitatum* oraz *P. italicum* na powierzchni cytryn, poza drożdżami z rodzajów *Pichia* i *Wickerhamomyces*, są również *K. exigua* (*Saccharomyces exiguous*), uznawane jako organizmy GRAS [60].

Lima i wsp. [45] badali skuteczność antagonistycznego działania dwóch szczepów killerowych, *W. anomalus* 422 oraz *Meyerozyma guilliermondii* 443, wobec *Colletotrichum gloeosporioides*, fitopatogenu wywołującego antraknozę papai i innych owoców tropikalnych. Otrzymano obiecujące wyniki wskazujące, że szczepy *W. anomalus* i *M. guilliermondii* redukowały częstość występowania antraknozy na owocach odpowiednio o 24,62% i 20,68% podczas przechowywania przez 6 dni.

Santos i wsp. [77] wykazali, że stosowanie szczepu killerowego *P. membranifaciens* CYC 1106 skutecznie ograniczało rozwój pleśni *B. cinerea* CYC 20010. Drożdże killerowe, w ilości około 10^6 komórek w 1 ml, całkowicie zahamowały wzrost *B. cinerea* na uszkodzonych mechanicznie i uprzednio skażonych jabłkach. Ograniczenie rozwoju *B. cinerea* uzyskano także stosując oczyszczoną toksynę killerową PMKT, produkowaną przez *P. membranifaciens* CYC 1106. Mniejsze hamowanie wzrostu patogenu obserwowane po zastosowaniu oczyszczonej toksyny w porównaniu z aplikacją szczepu killerowego potwierdziło, że dodatkowe mechani-

zmy były zaangażowane w antagonistyczne działanie *P. membranifaciens* CYC 1106 [77]. Mechanizmami tymi mogą być współzawodnictwo o składniki odżywcze lub wydzielanie enzymów degradujących ścianę komórkową *B. cinerea* [77]. W innych badaniach oceniano wpływ drożdży killerowych *P. membranifaciens* i oczyszczonej toksyny PMKT na rozwój *B. cinerea* na skażonych liściach *Vitis vinifera* [74]. Również w tym przypadku obserwowano całkowite zahamowanie wzrostu fitopatogenu, gdy użyto aktywnych komórek *P. membranifaciens* CYC 1106, natomiast gdy stosowano oczyszczoną toksynę ograniczenie rozwoju *B. cinerea* wynosiło 80%. Obserwacja ta potwierdza występowanie dodatkowych, poza produkcją białek killerowych, mechanizmów antagonistycznej aktywności *P. membranifaciens*, takich jak produkcja enzymów hydrolicyzujących ścianę komórkową *B. cinerea* lub rywalizacja o składniki pokarmowe. Wyniki te wskazują, że drożdże killerowe *P. membranifaciens* i ich toksyny mogą być brane pod uwagę przy opracowaniu preparatów służących skutecznej kontroli rozwoju *B. cinerea*.

Badano również antagonistyczne oddziaływanie szczepów killerowych *Debaryomyces hansenii* KI2a, *D. hansenii* MI1a i *W. anomalus* BS91 wobec *Monilinia fructigena* i *M. fructicola*. Spośród testowanych drożdży najwyższą aktywnością przeciwwgrzybiczą *in vitro* cechowały się *D. hansenii* KI2a i *W. anomalus* BS91 poprzez produkcję toksyn killerowych, enzymów hydrolitycznych i lotnych związków organicznych (VOCs – Volatile Organic Compounds). Wspomniane szczepy skutecznie hamowały występowanie brązowej zgnilizny na owocach brzoskwiń i śliw uprzednio inokulowanych fitopatogenami *M. fructigena* i *M. fructicola* [31]. Antagonistyczne szczepy *D. hansenii* i *W. anomalus* mogą być użyteczne jako składniki aktywne podczas opracowania biofungicydów przeciwko grzybom z rodzaju *Monilinia*.

5.4. Transgeniczne rośliny wytwarzające toksyny killerowe

Jedną z prób rozwiązania problemu chorób grzybowych roślin jest transgeniczna ekspresja peptydów przeciwwgrzybiczych. Toksyny killerowe KP4 i KP6, produkowane przez gatunek *U. maydis*, okazały się skuteczne w uodpornieniu uprawy tytoniu oraz kukurydzy na choroby grzybowe. Dzięki zastosowaniu inżynierii genetycznej geny kodujące toksyny KP4 i KP6 zostały przeniesione do komórek tytoniu za pomocą promotora konstytutywnego wirusa mozaiki kalafiora. Transgeniczna roślina wytwarzała znaczne ilości toksyny KP4, która miała tą samą masę cząsteczkową oraz wykazywała identyczną specyficzność działania, co toksyna KP4, produkowana przez *U. maydis*. Poziom ekspresji toksyny KP4 w transgenicznym tytoniu był co najmniej 500 razy wyższy niż KP6. Transgeniczne

rośliny wydzielające toksynę KP4 były odporne na grzyby patogenne, których antagonistą jest toksynotwórczy szczep *U. maydis* [41, 59]. Otrzymano również transgeniczną kukurydzę wytwarzającą aktywną toksynę KP4 w ilości wystarczającej do zahamowania rozwoju grzybów patogennych. Ponadto, nie stwierdzono negatywnego wpływu tej toksyny na wzrost roślin transgenicznych [1].

5.5. Zastosowanie drożdży killerowych w środowisku morskim

Podjmuje się również próby wykorzystania drożdży killerowych w środowisku wodnym. Choroby zwierząt morskich wywołane przez mikroorganizmy występujące w środowisku wodnym przynoszą znaczne straty ekonomiczne. Patogendem odpowiedzialnym za mleczne zabarwienie tkanek krabów portuników (*Portunus trituberculatus*) i ich znaczną śmiertelność jest *M. bicuspidata* WCY. Zastosowanie nystatyny, związku o działaniu przeciwgrzybiczym, skutecznie hamuje wzrost patogenu, jednak nawet w niskich stężeniach jest ona toksyczna dla krabów. Stosowanie kosztownego antybiotyku na otwartym morzu wydaje się również mało racjonalnym postępowaniem z ekonomicznego punktu widzenia [46, 94].

Organizmem antagonistycznym w stosunku do *M. bicuspidata* WCY jest szczep drożdży *W. anomalus* YF07b, wyizolowany z jelit zachw (*Ascidia*). Produkuje on dwa białka killerowe, jedno o masie cząsteczkowej 47 kDa [95], a drugie o masie 67 kDa [32], które są aktywne w obecności chlorku sodu. Szczep drożdży *Kluyveromyces siamensis* HN12-1 również wykazuje aktywność killerową wobec *M. bicuspidata* WCY, a optymalne warunki do produkcji toksyny HN12-1 to pH równe 4, temperatura 25°C oraz 0,5% chlorku sodu. Oczyszczona toksyna nie była aktywna wobec protoplastów drożdży patogennych, co sugeruje, że pierwszy etap działania białka najprawdopodobniej polega na oddziaływaniu z receptorami znajdującymi się w ścianie komórkowej drożdży wrażliwych [12]. Psychrotolerancyjny szczep drożdży *M. frigida* 2E00797, wyizolowany z osadów morskich, produkuje toksynę killerową o masie cząsteczkowej 55,6 kDa, której aktywność killerowa jest najwyższa w środowisku o pH 4,5 oraz w obecności chlorku sodu w stężeniu 6%. Białko to nie tylko działa na patogenne grzyby, wywołujące choroby krabów, lecz jest także cytotoksyczne w stosunku do patogenów człowieka – *C. tropicalis* oraz *C. albicans* [35, 47]. Kolejnym szczepem drożdży killerowych o interesujących cechach i potencjalnym zastosowaniu jest *W. anomalus* HN1-2, wyizolowany z ekosystemu lasu namorzynowego. Odnotowano, że białko killerowe produkowane przez ten szczep działa cytotoksycznie wobec komórek wielu grzybów szeroko rozpowszechnionych w środo-

wisku naturalnym: *M. bicuspidata*, *C. albicans*, *M. guilhermondii*, *Lodderomyces elongisporus*, *Yarrowia lipolytica* oraz *Kluyveromyces aestuarii* [86]. Do grupy toksyn, których producentem bytuje w środowisku morskim należy również białko killerowe, wydzielane przez *W. saturnus* WC91-2, wykazujące antagonistyczne działanie w stosunku do szeregu patogenów: *M. bicuspidata* WCY, *C. albicans*, *C. tropicalis*, *Cryptococcus aureus*, *Y. lipolytica*, *L. elongisporus*. Optymalne warunki środowiska, zapewniające wysoką stabilność tej toksyny to pH w zakresie 3–3,5 i 8% NaCl [93, 96]. Środowisko morskie charakteryzuje się temperaturą i zawartością soli, które są odpowiednie dla zapewnienia wysokiej aktywności killerowej wielu toksyn produkowanych przez drożdże, izolowane ze środowiska wodnego. Lekko zasadowy odczyn wody wykracza poza optymalny zakres pH dla większości toksyn killerowych.

6. Podsumowanie

Nadal opisywane są nowe szczepy drożdży killerowych, a niektóre z nich (szczególnie należące do rodzajów *Wickerhamomyces* i *Pichia*) charakteryzują się szerokim zakresem aktywności antagonistycznej wobec wielu szczepów drożdży i grzybów strzępkowych. Stosunkowo niska stabilność toksyn killerowych, ograniczona do wąskiego zakresu pH i temperatury, zmniejsza możliwości ich potencjalnego zastosowania jedynie do środowisk, które zapewniają odpowiednie warunki fizykochemiczne. Użycie toksyn killerowych na szerszą skalę może być również ograniczone z powodu wysokich kosztów izolacji oraz oczyszczania. Prostsze i znacznie tańsze wydaje się stosowanie aktywnych szczepów drożdży, będących ich producentami. Drożdże killerowe i ich toksyny mogą znaleźć potencjalne zastosowanie w wielu dziedzinach, m.in.: w przemyśle fermentacyjnym, jako czynniki biologiczne kontroli chorób roślin, w biotypowaniu szczepów drożdży, a także podczas projektowania nowych środków przeciwgrzybiczych.

Nadal wiele zagadnień związanych ze strukturą toksyn killerowych, mechanizmami ich działania, a także odpowiedzią komórkową mikroorganizmów wrażliwych wymaga poznania. Wyjaśnienie tych wątpliwości pozwoli na opracowanie skuteczniejszych strategii zwalczania niepożądanych mikroorganizmów i stworzy podstawy do szerszego stosowania drożdży killerowych i ich toksyn.

Piśmiennictwo

1. Allen A., Islamovic E., Kaur J., Gold S., Shah D., Smith T.J.: Transgenic maize plants expressing the Totivirus antifungal protein, KP4, are highly resistant to corn smut. *Plant Biotechnol. J.* 9, 857–864 (2011)

2. Alonso A., Belda I., Santos A., Navascués E., Marquina D.: Advances in the control of the spoilage caused by *Zygosaccharomyces* species on sweet wines and concentrated grape must. *Food Control*, **51**, 129–134 (2015)
3. Aloui H., Licciardello F., Khwaldia K., Hamdi M., Restuccia C.: Physical properties and antifungal activity of bioactive films containing *Wickerhamomyces anomalus* killer yeast and their application for preservation of oranges and control of postharvest green mold caused by *Penicillium digitatum*. *Int. J. Food Microbiol.* **200**, 22–30 (2015)
4. Bajaj B.K., Raina S., Singh S.: Killer toxin from a novel killer yeast *Pichia kudriavzevii* RY55 with idiosyncratic antibacterial activity. *J. Basic Microbiol.* **53**, 645–656 (2013)
5. Banjara N., Nickerson K.W., Suhr M.J., Hallen-Adams H.E.: Killer toxin from several food-derived *Debaryomyces hansenii* strains effective against pathogenic *Candida* yeasts. *Int. J. Food Microbiol.* **222**, 23–29 (2016)
6. Bartunek M., Jelinek O., Vondrejs V.: Susceptibility of individual cells of *Saccharomyces cerevisiae* to the killer toxin K1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **283**, 526–530 (2001)
7. Becker B., Schmitt M.J.: Yeast killer toxin K28: biology and unique strategy of host cell intoxication and killing. *Toxins*, **9**, 333 (2017)
8. Belda I., Ruiz J., Alonso A., Marquina D., Santos A.: The biology of *Pichia membranifaciens* killer toxins. *Toxins*, **9**, 112 (2017)
9. Bevan E.A., Makower M.: The physiological basis of the killer character in yeast. *Proceeding of the XIth International Conference on Genetics*, 1, 202–203 (1963)
10. Błaszczuk U., Satora P., Sroka P., Duliński R.: Effect of *Wickerhamomyces anomalus* and *Pichia membranifaciens* killer toxins on fermentation and chemical composition of apple wines produced from high-sugar juices. *J. Food Nutr. Res.* **56**, 189–199 (2017)
11. Breinig F., Tipper D.J., Schmitt M.J.: Kre1p, the plasma membrane receptor for the yeast K1 viral toxin. *Cell*, **108**, 395–405 (2002)
12. Buzdar M.A., Chi Z., Wang Q., Hua M.X., Chi Z.M.: Production, purification and characterization of a novel killer toxin from *Kluyveromyces siamensis* against a pathogenic yeast in crab. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **91**, 1571–1579 (2011)
13. Buzzini P., Corazzi L., Turchetti B., Buratta, Martini A.: Characterization of the *in vitro* antimycotic activity of a novel killer protein from *Williopsis saturnus* DBVPG 4561 against emerging pathogenic yeasts. *FEMS Microbiol. Lett.* **238**, 359–365 (2004)
14. Buzzini P., Martini A.: Discrimination between *Candida albicans* and other pathogenic species of the genus *Candida* by their differential sensitivities to toxins of a panel of killer yeasts. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 3362–3364 (2001)
15. Cappelli A., Ulissi U., Valzano M., Damiani C., Epis S., Gabrielli M.G., Conti S., Polonelli L., Bandi C., Favia G., Ricci I.: A *Wickerhamomyces anomalus* killer strain in the malaria vector *Anopheles stephensi*. *PLoS One*, **9**, e95988 (2014)
16. Cenci E., Romani L., i wsp.: Protection of killer antiidiotypic antibodies against early invasive aspergillosis in a murine model of allogeneic T-cell-depleted bone marrow transplantation. *Infect. Immun.* **70**, 2375–2382 (2002)
17. Ciani M., Fatichenti F.: Killer toxin of *Kluyveromyces phaffii* DBVPG 6076 as a biopreservative agent to control apiculate wine yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**, 3058–3063 (2001)
18. Coda R., Cassone A., Rizzello C.G., Nionelli L., Cardinali G., Gobetti M.: Antifungal activity of *Wickerhamomyces anomalus* and *Lactobacillus plantarum* during sourdough fermentation: Identification of novel compounds and long-term effect during storage of wheat bread. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 3484–3492 (2011)
19. Comitini F., Ciani M.: *Kluyveromyces wickerhamii* killer toxin: purification and activity towards *Brettanomyces/Dekkera* yeasts in grape must. *FEMS Microbiol. Lett.* **316**, 77–82 (2011)
20. Comitini F., De Ingeniis J., Pepe L., Mannazzu I., Ciani M.: *Pichia anomala* and *Kluyveromyces wickerhamii* killer toxins as new tools against *Dekkera/Brettanomyces* spoilage yeasts. *FEMS Microbiol. Lett.* **238**, 235–240 (2004)
21. Comitini F., Di Pietro N., Zacchi L., Mannazzu I., Ciani M.: *Kluyveromyces phaffii* killer toxin active against wine spoilage yeasts: purification and characterization. *Microbiology*, **150**, 2535–2541 (2004)
22. Comitini F., Mannazzu I., Ciani M.: *Tetrapisispora phaffii* killer toxin is a highly specific β -glucanase that disrupts the integrity of the yeast cell wall. *Microb. Cell Fact.* **8**, 55–66 (2009)
23. Conti S., Fanti F., Magliani W., Gerloni M., Bertolotti D., Salati A., Cassone A., Polonelli L.: Mycobactericidal activity of human natural, monoclonal, and recombinant yeast killer toxin-like antibodies. *J. Infect. Dis.* **177**, 807–811 (1998)
24. Conti S., Magliani W., Arseni S., Dieci E., Frazzi R., Salati A., Varaldo P.E., Polonelli L.: *In vitro* activity of monoclonal and recombinant yeast killer toxin-like antibodies against antibiotic-resistant gram-positive cocci. *Mol. Med.* **6**, 613–619 (2000)
25. Conti S., Magliani W., Arseni S., Frazzi R., Salati A., Ravanetti L., Polonelli L.: Inhibition by yeast killer toxin-like antibodies of oral *Streptococci* adhesion to tooth surfaces in an *ex vivo* model. *Mol. Med.* **8**, 313–317 (2002)
26. da Silva S., Calado S., Lucas C., Aguiar C.: Unusual properties of the halotolerant yeast *Candida nodaensis* killer toxin, CnKT. *Microbiol. Res.* **163**, 243–51 (2008)
27. Fiori P.L., Mattana A., Dessi D., Conti S., Maglaini W., Polonelli L.: *In vitro* acanthamoebicidal activity of a killer monoclonal antibody and a synthetic peptide. *J. Antimicrob. Chemother.* **57**, 891–898 (2006)
28. Gage M.J., Rane S.G., Hockerman G.H., Smith T.J.: The virally encoded fungal toxin KP4 specifically blocks L-type voltage-gated calcium channels. *Mol. Pharmacol.* **61**, 936–944 (2002)
29. Gier S., Schmitt M.J., Breinig F.: 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**, 345 (2017)
30. Giovati L., Santinoli C., Ferrari E., Ciociola T., Martin E., Bandi C., Ricci I., Epis S., Conti S.: Candidacidal activity of a novel killer toxin from *Wickerhamomyces anomalus* against fluconazole-susceptible and -resistant strains. *Toxins*, **10**, 68 (2018)
31. Grzegorzczuk M., Żarowska B., Restuccia C., Cirvilleri G.: Postharvest biocontrol ability of killer yeasts against *Monilinia fructigena* and *Monilinia fructicola* on stone fruit. *Food Microbiol.* **61**, 93–101 (2017)
32. Guo F.J., Ma Y., Xu H.M., Wang X.H., Chi Z.M.: A novel killer toxin produced by the marine-derived yeast *Wickerhamomyces anomalus* YF07b. *Antonie van Leeuwenhoek*, **103**, 737–746 (2013)
33. Guyard C., Dehecq E., Tissier J.P., Polonelli L., Dei-Cas E., Cailliez J.C., Menozzi F.D.: Involvement of β -glucans in the wide-spectrum antimicrobial activity of *Williopsis saturnus* var. *mrakii* MUCL 41968 killer toxin. *Mol. Med.* **8**, 686–694 (2002)
34. Hu R.Y., Lee C.F., Chou H.C.: *Pseudozyma* spp. and *Barnettozyma* spp. effectively kill cancer cells *in vitro*. *Genomic Medicine, Biomarkers and Health Sciences*, **4**, 61–64 (2012)
35. Hua M.X., Chi Z., Liu G.L., Buzdar M.A., Chi Z.M.: Production of a novel and cold-active killer toxin by *Mrakia frigida* 2E00797 isolated from sea sediment in Antarctica. *Extremophiles*, **14**, 515–521 (2010)

36. Izgu F., Altinbay D.: Isolation and characterization of the K5-type yeast killer protein and its homology with an α -1,3-glucanase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68**, 685–693 (2004)
37. Izgu D.A., Kepekci R.A., Izgu F.: Inhibition of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum* *in vitro* and *in planta* with Panomycocin, a novel α -1,3-glucanase isolated from *Pichia anomala* NCYC 434. *Antonie van Leeuwenhoek* **99**, 85–91 (2011)
38. Jablonowski D., Schaffrath R.: Zymocin, a composite chitinase and tRNase killer toxin from yeast. *Biochem. Soc. Trans.* **35**, 1533–1537 (2007)
39. Jijakli M.H., Lepoivre P.: State of the art and challenges of post-harvest disease management in apples (w) Fruit and vegetable diseases, red. K.G. Mukerji, Kluwer Academic Publishers (2004)
40. Keszthelyi A., Ohkusu M., Takeo L., Pfeiffer I., Litter J., Kucsera J.: Characterization of anticryptococcal effect of the FC-1 toxin produced by *Filobasidium capsuligenum*. *Mycoses*, **49**, 176–183 (2006)
41. Kinal H., Park Ch.M., Berry J.O., Koltin Y., Bruenn J.A.: Processing and secretion of a virally encoded antifungal toxin in transgenic tobacco plants: evidence for a Kex2p pathway in plants. *Plant Cell*, **7**, 677–688 (1995)
42. Klassen R., Meinhardt F.: Induction of DNA damage and apoptosis in *Saccharomyces cerevisiae* by a yeast killer toxin. *Cell. Microbiol.* **7**, 393–401 (2005)
43. Kordowska-Wiater M.: Drożdże jako czynniki ochrony biologicznej roślin. *Post. Mikrobiol.* **50**, 107–119 (2011)
44. Labbani F.Z.K., Turchetti B., Bennamoun L., Dakhmouche S., Roberti R., Corazzi L., Meraihi Z., Buzzini P.: A novel killer protein from *Pichia kluyveri* isolated from an Algerian soil: purification and characterization of its *in vitro* activity against food and beverage spoilage yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek*, **107**, 961–970 (2015)
45. Lima J.R., Gondim D.M.F., Oliveira J.T.A., Oliveira F.S.A., Gonçalves L.R.B., Viana F.M.P.: Use of killer yeast in the management of postharvest papaya anthracnose. *Postharvest Biol. Technol.* **83**, 58–64 (2013)
46. Liu G.L., Chi Z., Wang G.Y., Wang Z.P., Li Y., Chi Z.M.: Yeast killer toxins, molecular mechanisms of their action and their applications. *Crit. Rev. Biotechnol.* **35**, 222–234 (2015)
47. Liu G.L., Wang K., Hua M.X., Buzdar M.A., Chi Z.M.: Purification and characterization of the cold-active killer toxin from the psychrotolerant yeast *Mrakia frigida* isolated from sea sediments in Antarctica. *Proc. Biochem.* **47**, 822–827 (2012)
48. Llorente P., Marquina D., Santos A., Peinado J.M., Spencer-Martins I.: Effect of salt on the killer phenotype of yeasts from olive brines. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 1165–1167 (1997)
49. Lowes K., Shearman C., Payne J., MacKenzie D., Archer D., Merry R., Gasson M.: Prevention of yeast spoilage in feed and food by the yeast mycocin HMK. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 1066–1076 (2000)
50. Lu J., Huang B., Esberg A., Johansson M.J.O., Byström A.S.: The *Kluyveromyces lactis* γ -toxin targets tRNA anticodons. *RNA*, **11**, 1648–1654 (2005)
51. Magliani W., Conti S., Gerloni M., Bertolotti D., Polonelli L.: Yeast killer systems. *Clin. Microbiol. Rev.* **10**, 369–400 (1997)
52. Magliani W., Conti S., Travassos L.R., Polonelli L.: From yeast killer toxins to antibiodies and beyond. *FEMS Microbiol. Lett.* **288**, 1–8 (2008)
53. Malinowska M., Tokarz-Deptuła B., Deptuła W.: Mikrobiom człowieka. *Post. Mikrobiol.* **56**, 33–42 (2017)
54. Manfredi M., McCullough M.J., Conti S., Polonelli L., Vescovi P., AlKaraawi Z.M., Porter S.R.: *In vitro* activity of a monoclonal killer anti-idiotypic antibody and a synthetic killer peptide against oral isolates of *Candida* spp. differently susceptible to conventional antifungals. *Oral Microbiol. Immunol.* **20**, 226–232 (2005)
55. Marquina D., Santos A., Peinado J.M.: Biology of killer yeasts. *Int. Microbiol.* **5**, 65–71 (2002)
56. Mehlomakulu N.N., Prior K.J., Setati M.E., Divol B.: *Candida pyralidae* killer toxin disrupts the cell wall of *Brettanomyces bruxellensis* in red grape juice. *J. Appl. Microbiol.* **122**, 747–758 (2017)
57. Mehlomakulu N.N., Setati M.E., Divol B.: Characterization of novel killer toxins secreted by wine-related non-*Saccharomyces* yeasts and their action on *Brettanomyces* spp. *Int. J. Food Microbiol.* **188**, 83–91 (2014)
58. Muccilli S., Restuccia C.: Bioprotective role of yeasts. *Microorganisms*, **3**, 588–611 (2015)
59. Park C.M., Berry J.O., Bruenn J.A.: High-level secretion of a virally encoded anti-fungal toxin in transgenic tobacco plants. *Plant. Mol. Biol.* **30**, 359–366 (1996)
60. Perez M.F., Contreras L., Garnica N.M., Fernández-Zenoff M.V., Fariás M.E., Sepulveda M., Ramallo J., Dib J.R.: Native killer yeasts as biocontrol agents of postharvest fungal diseases in lemons. *PLoS ONE*, **11**, e0165590 (2016)
61. Pintar J., Starmer W.T.: The costs and benefits of killer toxin production by the yeast *Pichia kluyveri*. *Antonie van Leeuwenhoek*, **83**, 89–98 (2003)
62. Platania C., Restuccia C., Muccilli S., Cirvilleri G.: Efficacy of killer yeasts in the biological control of *Penicillium digitatum* on Tarocco orange fruits (*Citrus sinensis*). *Food Microbiol.* **30**, 219–225 (2012)
63. Polonelli L., De Bernardis F., Conti S., Boccanera M., Gerloni M., Morace G., Magliani W., Chezzi C., Cassone A.: Idiotypic intravaginal vaccination to protect against candidal vaginitis by secretory, yeast killer toxin-like anti-idiotypic antibodies. *J. Immunol.* **152**, 3175–3182 (1994)
64. Provost F., Polonelli L., Conti S., Fiscicaro P., Gerloni M., Boiron P.: Use of yeast killer system to identify species of the *Noctardia asteroides* complex. *J. Clin. Microbiol.* **33**, 8–10 (1995)
65. Ramírez M., Velázquez R., López-Piñero A., Naranjo B., Roig F., Llorens C.: New insights into the genome organization of yeast killer viruses based on “atypical” killer strains characterized by high-throughput sequencing. *Toxins*, **9**, 292 (2017)
66. Ramírez M., Velázquez R., Maqueda M., López-Piñero A., Ribas J.C.: A new wine *Torulaspota delbrueckii* killer strain with broad antifungal activity and its toxin-encoding double-stranded RNA virus. *Front. Microbiol.* **6**, 983 (2015)
67. Reiter J., Herker E., Madeo F., Schmitt M.J.: Viral killer toxins induce caspase-mediated apoptosis in yeasts. *J. Cell Biol.* **168**, 353–358 (2005)
68. Rodríguez-Cousiño N., Maqueda M., Ambrona J., Zamora E., Esteban R., Ramirez M.: 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. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 1822–1832 (2011)
69. Rogalski P.: Kandydoza przewodu pokarmowego – fakty i mity. *Gastroenterologia kliniczna*, **2**, 87–97 (2010)
70. Santos A., Alonso A., Belda I., Marquina D.: Cell cycle arrest and apoptosis, two alternative mechanisms for PMKT2 killer activity. *Fungal Genet. Biol.* **50**, 44–54 (2013)
71. Santos A., del Mar Álvarez M., Mauro M.S., Abrusci C., Marquina D.: The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to *Pichia membranifaciens* killer toxin. *J. Biol. Chem.* **280**, 41881–41892 (2005)
72. Santos A., Marquina D., Leal J.A., Peinado J.M.: (1-6)- β -D-glucanase cell wall receptor for *Pichia membranifaciens* killer toxin. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 1809–1813 (2000)
73. Santos A., Marquina D.: Ion channel activity by *Pichia membranifaciens* killer toxin. *Yeast*, **21**, 151–162 (2004)

74. Santos A., Marquina D.: Killer toxin of *Pichia membranifaciens* and its possible use as a biocontrol agent against grey mould disease of grapevine. *Microbiology*, **150**, 2527–2534 (2004)
75. Santos A., Mauro M.S., Abrusci C., Marquina D.: Cwp2p, the plasma membrane receptor for *Pichia membranifaciens* killer toxin. *Mol. Microbiol.* **64**, 831–843 (2004)
76. Santos A., San Mauro M., Bravo E., Marquina D.: PMKT2, a new killer toxin from *Pichia membranifaciens* and its promising biotechnological properties for control of the spoilage yeast *Brettanomyces bruxellensis*. *Microbiology*, **155**, 624–634 (2009)
77. Santos, A., Sánchez A., Marquina D.: Yeasts as biological agents to control *Botrytis cinerea*. *Microbiol. Res.* **159**, 331–338 (2004)
78. Satora P., Tarko T., Sroka P., Blaszczyk U.: The influence of *Wickerhamomyces anomalus* killer yeast on the fermentation and chemical composition of apple wines. *FEMS Yeast Res.* **14**, 729–740 (2014)
79. Savoia D., Avanzini C., Conti S., Magliani V., Frazzi R., Polonelli L.: *In vitro* leishmanicidal activity of a monoclonal antibody mimicking a yeast killer toxin. *J. Eukaryot. Microbiol.* **49**, 319–323 (2002)
80. Schmitt M.J., Breinig F.: The viral killer system in yeast: from molecular biology to application. *FEMS Microbiol. Rev.* **26**, 257–276 (2002)
81. Schmitt M.J., Breinig F.: Yeast viral killer toxins: lethality and self-protection. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**, 212–221 (2006)
82. Schmitt M.J., Reiter J.: Viral induced yeast apoptosis. *Biochem. Biophys. Acta*, **1783**, 1413–1417 (2008)
83. Séguy N., Polonelli L., Dei-Cas E., Cailliez J.C.: Effect of a killer toxin of *Pichia anomala* to *Pneumocystis*. Perspectives in the control of pneumocystosis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **22**, 145–149 (1998)
84. Séguy N., Polonelli L., Dei-Cas E., Cailliez J.C.: Monoclonal killer toxin-like antiidiotypic antibodies to control rat-pneumocystosis. *J. Eukaryot. Microbiol.* **44**, 37S (1997)
85. Spadaro D., Droby S.: Development of biocontrol products for postharvest diseases of fruit: the importance of elucidating the mechanisms of action of yeast antagonists. *Trends Food Sci. Technol.* **47**, 39–49 (2016)
86. Sun H.Y., Wang K., Chi Z., Xu H.M., Chi Z.M.: Simultaneous production of single cell protein and killer toxin by *Wickerhamomyces anomalus* HN1–2 isolated from mangrove ecosystem. *Proc. Biochem.* **47**, 251–256 (2012)
87. Suzuki C., Nikkuni S.: The primary and subunit structure of a novel type killer toxin produced by a halotolerant yeast *Pichia farinosa*. *J. Biol. Chem.* **269**, 3041–3046 (1994)
88. Takasuka T., Komiyama T., Furuichi Y., Watanabe T.: Cell wall synthesis specific cytotoxic effect of *Hansenula mrakii* toxin-1 on *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Mol. Biol. Res.* **41**, 575–581 (1995)
89. Valzano M., Ricci I., i wsp.: A yeast strain associated to *Anopheles* mosquitoes produces a toxin able to kill malaria parasites. *Malar. J.* **15**, 21–30 (2016)
90. Velázquez R., Zamora E., Álvarez M.L., Hernández L.M., Ramírez M.: Effects of new *Torulaspora delbrueckii* killer yeasts on the must fermentation kinetics and aroma compounds of white table wine. *Front. Microbiol.* **3**, 1222 (2015)
91. Villalba M.L., Sáez J.S., del Monaco S., Lopes C.A., Sangorrín M.P.: TdKT, a new killer toxin produced by *Torulaspora delbrueckii* effective against wine spoilage yeasts. *Int. J. Food Microbiol.* **217**, 94–100 (2016)
92. Walker G.M., McLeod A.H., Hodgson V.J.: Interactions between killer yeasts and pathogenic fungi. *FEMS Microbiol. Lett.* **127**, 213–222 (1995)
93. Wang L., Yue L., Chi Z., Wang X.: Marine killer yeasts active against a yeast strain pathogenic to crab *Portunus trituberculatus*. *Dis. Aquat. Organ.* **80**, 211–218 (2008)
94. Wang X., Chi Z., Yue L., Li J., Li M., Wu L.: A marine killer yeast against the pathogenic yeast strain in crab (*Portunus trituberculatus*) and an optimization of the toxin production. *Microbiol. Res.* **162**, 77–85 (2007)
95. Wang X.H., Chi Z.M., Yue L., Li J.: Purification and characterization of killer toxin from a marine yeast *Pichia anomala* YF07b against the pathogenic yeast in crab. *Curr. Microbiol.* **55**, 396–401 (2007)
96. Wang X.X., Chi Z., Peng Y., Wang X.H., Ru S.G., Chi Z.M.: Purification, characterization and gene cloning of the killer toxin produced by the marine-derived yeast *Williopsis saturnus* WC91–2. *Microbiol. Res.* **167**, 558–563 (2012)
97. Weiler F., Schmitt M.J.: Zygocin, a secreted antifungal toxin of the yeast *Zygosaccharomyces bailii*, and its effect on sensitive fungal cells. *FEMS Yeast Res.* **3**, 69–76 (2003)
98. Żarowska B.: Biosynteza i charakterystyka toksyn killerowych drożdży *Debaryomyces hansenii*. Wrocław, UWP (2012)

