

4
НОМЕР

БОНЦ

ISSN 2304-9081

ЭЛЕКТРОННЫЙ ЖУРНАЛ
On-line версия журнала на сайте
<http://www.elmag.uran.ru>

БЮЛЛЕТЕНЬ

ОРЕНБУРГСКОГО НАУЧНОГО ЦЕНТРА УРО РАН

Cetonia aurata (Linnaeus, 1761)
Золотистая бронзовка
Шовкун Д.Ф.



2019

УЧРЕДИТЕЛЬ
ОРЕНБУРГСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР УРО РАН

© Коллектив авторов, 2019

УДК 579.61

А.В. Вальшев, К.Л. Чертков, Н.А. Вальшева

АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ КИЛЛЕРНЫХ ТОКСИНОВ ДРОЖЖЕЙ

Оренбургский федеральный исследовательский центр УрО РАН (Институт клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН), Оренбург, Россия

В обзоре представлены данные о киллерных токсинах (КТ) дрожжей. Описаны источники выделения продуцентов, механизм действия и спектр антибактериальной активности КТ этой биотехнологически важной группы микроорганизмов.

Ключевые слова: дрожжи, грибы, бактериоцины, микоцины, киллерные токсины, антимикробное действие.

A.V. Valyshev, K.L. Chertkov, N.A. Valysheva

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF YEAST KILLER TOXINS

Orenburg Federal Research Center, UB RAS (Institute of Cellular and Intracellular Symbiosis, UB RAS), Orenburg, Russia

This review focuses on the yeast killer toxins (KTs). The sources of producers, mode of action, and antibacterial spectrum of KT of this biotechnologically important group of microorganisms are described.

Key words: yeasts, fungi, bacteriocins, mycocins, killer toxins, antimicrobial action.

Феномен продукции некоторыми дрожжами киллерных токсинов (КТ), известных также как “микоцины”, “зимоцины” и “зимоциды”, описан в середине XX века [1, 2]. Киллерные дрожжи встречаются на всех континентах, включая Антарктиду, среди аскомицетов и базидиомицетов (табл. 1). Их источником являются разные объекты окружающей среды: поверхность листьев, опавшие листья (мёртвый покров), слизевый поток древесных растений, фрукты, стебли и кладоды кактусов, кишечник насекомых, фекалии млекопитающих, гнёзда муравьёв-листорезов, озёрная вода, океанические отложения, почва, вино, хлебобулочные изделия и молочные продукты [3].

Киллерные токсины – белки или гликопротеины, которые взаимодействуют с рецепторами на поверхности чувствительных клеток; клетки-продуценты обычно имеют иммунитет к собственным токсинам. КТ оказывают губительное действие в отношении дрожжей того же вида и/или других видов. Генетические детерминанты КТ расположены в хромосоме, либо в ци-

топлазме в виде вирусоподобных частиц, содержащих двуцепочечную РНК или ДНК. Молекулярный вес КТ варьирует от ~1,8 до >150 кДа, большинство из них состоят из одной субъединицы, хотя встречаются КТ, образованные двумя (К1, К28, SMКТ) или даже тремя субъединицами (например, КТ *Kluveromyces lactis*, *Pichia acaciae*).

Большинство КТ стабильны в кислой среде, некоторые из них сохраняют активность в широком диапазоне значений рН, например, НМ-1 культуры *Cyberlindnera trakii*.

Диапазон температур, в котором КТ «работает», зависит от естественного местообитания киллерных дрожжей: КТ морских дрожжей имеют оптимальную температуру 15°C, а, например, КрКт почвенного штамма *Tetrapisispora phaffii* – 25°C. В целом, большинство КТ утрачивают активность при температуре более 40°C, хотя некоторые устойчивы к воздействию высокой температуры (например, НМ-1 остается активным спустя 1 ч инкубации при 60°C). Более того, некоторые КТ меняют спектр действия и проявляют более выраженную активность в присутствии хлорида натрия. Это особенно характерно для КТ дрожжей, выделенных из солевого раствора при мариновании оливок или из морских местообитаний [4].

Несмотря на большое разнообразие КТ, киллинг чувствительных клеток обычно проходит в два этапа. В течение первой фазы КТ распознают и связываются с первичными рецепторами на клеточной стенке. В этой связи КТ, продуцируемые *Tetrapisispora phaffii* (КрКт), *Pichia anomala* (PiКТ) и *Kluveromyces siamensis*, не могут вызвать гибель сферопластов чувствительных мишеней. Плазматическая мембрана дрожжей и грибов заряжена отрицательно, а КТ заряжены в большей или меньшей степени положительно. Поэтому взаимодействие между КТ и плазматической мембраной может также зависеть от сетевого катионного заряда КТ [4].

Поскольку клеточная стенка является первичным сайтом действия КТ, различные её компоненты выполняют роль первичных рецепторов. Для большинства КТ, описанных на сегодняшний день, рецепторами обычно являются β -1,3-D-глюканы и β -1,6-D-глюканы, хотя для ряда КТ первичными рецепторами служат также маннопротеины и хитин (табл. 2).

Считают, что на втором этапе КТ транслоцируются в клеточную мембрану, где они взаимодействуют с вторичным рецептором. Этот этап гораздо

менее изучен и вторичные рецепторы известны только для очень небольшого числа КТ (табл. 2). После связывания с вторичным рецептором запускаются различные механизмы киллинга: пермеабиллизация клеточной мембраны, подавление синтеза ДНК, пертурбация клеточного цикла, фрагментация РНК (табл. 2). В других случаях КТ действуют преимущественно на клеточную стенку чувствительной мишени. Некоторые токсины имеют β -глюканазную активность и гидролизуют глюканы клеточной стенки, что приводит к лизису клетки. Токсин НМ-1 культуры *Cyberlindnera mrakii* IFO0895 нарушает биосинтез клеточной стенки, ингибируя фермент β -1,3-глюкансинтазу [4].

Таблица 1. Семейства дрожжей, у которых обнаружена продукция киллерных токсинов [3]

Отдел	Семейство	Киллинг*		Пример вида
		внутри-видовой	меж-видовой	
Ascomycota	Debaryomycetaceae			<i>Meyerozyma guilliermondii</i>
Ascomycota	Dipodascaceae			<i>Dipodascus geotrichum</i>
Ascomycota	Lipomycetaceae			<i>Lipomyces lipofer</i>
Ascomycota	Metschnikowiaceae			<i>Metschnikowia saccharicola</i>
Ascomycota	Pichiaceae			<i>Pichia punctispora</i>
Ascomycota	Saccharomycetaceae			<i>Debaryomyces hansenii</i>
Ascomycota	Saccharomycetales Incertae sedis			<i>Candida maltosa</i>
Ascomycota	Saccharomycodaceae			<i>Hanseniaspora uvarum</i>
Ascomycota	Schizosaccharomycetaceae	^a		<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
Ascomycota	Wickerhamomycetaceae			<i>Wickerhamomyces anomalous</i>
Basidiomycota	Agaricostilbaceae			<i>Sterigmatomyces halophilus</i>
Basidiomycota	Bulleraceae			<i>Bullera hannaе</i>
Basidiomycota	Cystofilobasidiaceae			<i>Cystofilobasidium infirmominiatum</i>
Basidiomycota	Kondoaceae			<i>Kondoa miscanthi</i>
Basidiomycota	Malasseziaceae	^b		<i>Malassezia furfur</i>
Basidiomycota	Mrakiaceae			<i>Tausonia pullulans</i>
Basidiomycota	Piskurozymaceae			<i>Piskurozyma capsuligena</i>
Basidiomycota	Tremellales Incertae sedis			<i>Hannaella sinensis</i>
Basidiomycota	Tremellaceae			<i>Naganishia albida</i>
Basidiomycota	Trichosporonaceae	^b		<i>Vanrija humicola</i>
Basidiomycota	Robbaueraceae			<i>Robbaueria albescens</i>
Basidiomycota	Sporidiobolales Incertae sedis			<i>Rhodotorula mucilaginosа</i>
Basidiomycota	Sporobolomycetaceae			<i>Sporobolomyces salmonicolor</i>
Basidiomycota	Ustilaginaceae			<i>Pseudozyma tsukubaensis</i>

Примечание:

* Серая заливка (фон) указывает, что в рамках данного семейства обнаружен внутри и/или межвидовой киллинг.

^a Внутривидовой киллинг обнаружен только у сестринских спор в асках.

^b Обнаружен киллинг чувствительных представителей того же рода, но не указан вид чувствительного штамма. В случае с *Vanrija humicola* авторы сообщили, что микроорганизмы *Cryptococcus humicola* активны в отношении представителей рода *Cryptococcus*. *C. humicola* позже был переименован в *V. humicola*.

Таблица 2. Биоразнообразии и механизм действия киллерных токсинов [4]

Штамм дрожжей – продуцент киллерного токсина	Прежнее название	Токсин		Мишень в клетке		Механизм действия
		Название	Молекулярный вес (кДа)	Первичная	Вторичная	
Хромосомные гены						
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 111		KHR	20	ну	ну	ну
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 115		KHS	75	ну	ну	Пермеабиллизация мембраны
<i>Candida nodaeensis</i> PYCC3198		CnKT	ну	ну	ну	ну
<i>Candida saturnus</i> IFO0117	<i>W. saturnus</i> var. <i>saturnus</i>	HYI	9,5	ну	ну	ну
<i>Cyberlindnera mrakii</i> IFO0895	<i>W. saturnus</i> var. <i>mrakii</i> ; <i>H. mrakii</i>	HM-1 или HMK	10,7	β -глюкан	ну	Подавление β -1,3-глюкансинтазы
<i>Cyberlindnera mrakii</i> MUCL41968	<i>W. saturnus</i> var. <i>mrakii</i>	WmKT	85	β -глюкан	ну	Повреждение клеточной стенки
<i>Cyberlindnera mrakii</i> NCYC500	<i>W. saturnus</i> var. <i>mrakii</i>	K500	~1,8	ну	ну	ну
<i>Debaryomyces hansenii</i> CYC1021		-	23	β -1,6-глюкан	ну	ну
<i>Kluyveromyces marxianus</i> NCYC587	<i>K. fragilis</i>	K6	42	ну	ну	ну
<i>Kluyveromyces wickerhamii</i> DBVPG6077		KwKT	72	ну	ну	ну
<i>Millerozyma farinosa</i> KK1	<i>P. farinosa</i>	SMKT	6,6(α), 7,9(β)	ну	ну	Пермеабиллизация мембраны
<i>Pichia kluyveri</i> DBVPG5286		-	19	ну	ну	Пермеабиллизация мембраны
<i>Pichia membranifaciens</i> CYC1106		PMKT	18	β -1,6-глюкан	Cwp2p	Пермеабиллизация мембраны
<i>Pichia membranifaciens</i> CYC1086		PMKT2	30	Маннопротеин	ну	Арест клеточного цикла
<i>Schwanniomyces occidentalis</i> ATCC44252		-	7,4(α), 4,9(β)	Маннопротеин	ну	Пермеабиллизация мембраны
<i>Tetrapispora phaffii</i> DBVPG6076	<i>K. phaffii</i>	KpKT	33	β -1,3/ β -1,6-глюкан	ну	β -глюканазная активность
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> BCA15, BCU24, BS91		-	ну	β -1,3/ β -1,6-глюкан	ну	β -глюканазная активность
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> NCYC434	<i>P. anomala</i>	Panomycocin	49	β -1,3-глюкан	ну	Гидролиз β -1,3-глюкана
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> DBVPG 3003	<i>P. anomala</i>	PiKT	<8	β -1,6-глюкан	ну	ну
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> YF07b	<i>P. anomala</i>	-	47	ну	ну	β -1,3-глюканазная активность
<i>Wickerhamomyces anomalus</i> ATCC 96603	<i>P. anomala</i>	PaKt	85	β -1,3-глюкан	ну	ну
Внехромосомные вирусоподобные частицы, содержащие двуцепочечную РНК						
<i>Hanseniaspora uvarum</i> 470		-	18	β -1,6-глюкан	ну	ну
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		K1	9,5 (α), 9(β)	β -1,6-глюкан	Kre1p	Пермеабиллизация мембраны
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		K2	38,7	β -1,6-глюкан	ну	Пермеабиллизация мембраны
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		K28	10,5(α), 11(β)	α -1,3- Маннопротеин	Erd2p	Подавление синтеза ДНК и блок клеточного цикла
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		Klus	ну	ну	ну	ну
<i>Zygosaccharomyces bailii</i>		Zygoicin	10,4	Маннопротеин	ну	Пермеабиллизация мембраны
Внехромосомные вирусоподобные частицы, содержащие двуцепочечную ДНК						
<i>Debaryomyces robertsiae</i> CBS6693	<i>W. robertsiae</i>	DrT	>100	Хитин	ну	Фрагментация рРНК, пертурбация клеточного цикла
<i>Kluyveromyces lactis</i> IFO1267		Zymocin	97(α), 31(β), 28(γ)	Хитин	Ipt1p	Экзохитиназная активность; фрагментация тРНК; пертурбация клеточного цикла
<i>Babjeviella inositovora</i> NRRLY18709	<i>P. inositovora</i>	PiT	>100	Хитин	ну	Фрагментация рРНК
<i>Millerozyma acaciae</i> NRRLY18665	<i>P. acaciae</i>	PaT	110(α), 39(β), 38(γ)	Хитин	ну	Фрагментация тРНК, пертурбация клеточного цикла

Примечание: ну – не установлено.

Антибактериальная активность КТ дрожжей впервые была продемонстрирована в 1986 г. в работе L. Polonelli и G. Morace [5]. Из 36 исследованных культур 33 (91,7%) штамма подавляли рост хотя бы одной тест-культуры – золотистого стафилококка, синегнойной палочки, энтеробактерий (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*).

Продуценты антибактериальных КТ обнаружены среди представителей родов *Hansenula* (*anomala*, *californica*, *canadensis*, *dimennae*, *fabianii*, *holstii*, *mrakii*, *nonfermentans*, *subpelliculosa*, *petersonii*), *Pichia* (*farinosa*, *guilliermondii*, *kluuyveri*, *membranifaciens*, *ohmeri*, *spartinae*), *Candida* (*guilliermondii*, *maltosa*, *pseudotropicalis*), а также *Saccharomyces cerevisiae*. У культур *Hansenula bimundalis* и *Pichia carsonii* антибактериальная активность не была выявлена [5].

Позже этот феномен удалось подтвердить при проведении других исследований. Так, например, киллерные токсины пяти видов (*Hansenula anomala*, *Hansenula (Williopsis) mrakii*, *Candida tropicalis*, *Kluuyveromyces drosophilorum* и *Kluuyveromyces lactis*) подавляли рост грамположительных патогенных бактерий [6].

При изучении технологических характеристик штаммов дрожжей, выделенных из черных оливок при греческом способе ферментации, были отобраны 13 штаммов *Debaryomyces hansenii* и один штамм *Torulaspora delbrueckii*, фильтраты которых обладали антимикробным действием по отношению хотя бы к одной тест-культуре (*Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium*) [7]. Исследование штаммов дрожжей из ферментированных овощей, приобретенных на местных рынках в южных провинциях Таиланда (Паттани и Наратхиват), показало, что дрожжи подавляют рост возбудителей кишечных и пищевых токсикоинфекций: шесть культур *Candida krusei* из продукта Pak-sien (клеома, *Cleome rutidosperma* DC.) активны в отношении *Escherichia coli* TISTR 887, *Salmonella typhimurium* TISTR 292, *Staphylococcus aureus* TISTR 118 и *Bacillus cereus* TISTR 868 [8].

Уникальную антимикробную активность проявляет киллерный токсин культуры *Pichia kudriavzevii* RY55 [9]. Очищенный белок (молекулярный вес 39,8 кДа) не подавляет рост *Penicillium* sp. и *Candida* sp., но оказывает губительное действие на все исследованные бактериальные патогены, включая *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella* sp., *Staphylococcus aureus*,

Pseudomonas aeruginosa и *P. alcaligenes*. Максимальный уровень активности наблюдали при 30°C, однако выраженное действие регистрировали также при 20, 25 и 37°C. Токсин стабилен при 4°C (активность 100%) в течение 60 дней, при 20°C активность (>90%) сохраняется на срок до 24-48 ч. При 50°C в течение первых 15-30 мин наблюдали сниженную активность, при более высокой температуре действие КТ не регистрировали. КТ проявляет активность при pH 4-7 (максимум при pH 5). Анализ влияния различных добавок на очищенный КТ показал, что ионы Mg²⁺ и Ca²⁺ не влияют, а ионы Mn²⁺, Fe²⁺ и Zn²⁺ существенно снижают активность. Ион NH⁴⁺ оказывает умеренное ингибирующее влияние; этилендиаминтетрауксусная кислота и додецилсульфат натрия полностью подавляют киллерную активность [9].

Изложенные выше результаты экспериментальных исследований указывают, что дрожжи – продуценты киллерных токсинов – представляют важную в биотехнологическом плане группу микроорганизмов. Киллерные токсины и созданные на их основе пептидные производные могут получить широкое применение в медицине, ветеринарии, виноделии и пищевой промышленности.

(Работа выполнена при поддержке программы фундаментальных исследований УрО РАН, проект № 18-7-8-26).

ЛИТЕРАТУРА

1. Bevan E.A., Makower M. The physiological basis of the killer character in yeast. Paper presented at the 11th International Congress on Genetics, Oxford. 1963.
2. Makower M., Bevan E.A. The inheritance of the killer character in yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). Paper presented at the 11th International Congress on Genetics, Oxford. 1963.
3. Boynton P.J. The ecology of killer yeasts: Interference competition in natural habitats. *Yeast*. 2019. 36(8): 473-485.
4. Mannazzu I., Domizio P., Carboni G., Zara S., Zara G., Comitini F., Budroni M., Ciani M. Yeast killer toxins: from ecological significance to application. *Crit. Rev. Biotechnol.* 2019. 39(5): 603-617.
5. Polonelli L., Morace G. Reevaluation of the yeast killer phenomenon. *J. Clin. Microbiol.* 1986. 24(5): 866-869.
6. Izgü F., Altinbay D. Killer toxins of certain yeast strains have potential growth inhibitory activity on gram-positive pathogenic bacteria. *Microbios.* 1997. 89(358): 15-22.
7. Psani M., Kotzekidou P. Technological characteristics of yeast strains and their potential as starter adjuncts in Greek-style black olive fermentation *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2006. 22(12): 1329-1336.
8. Waema S., Maneesri J., Masniyom P. Isolation and identification of killer yeast from fermented vegetables. *As. J. Food Ag-Ind.* 2009. 2(4): 126-134.
9. Bajaj B.K., Raina S., Singh S. Killer toxin from a novel killer yeast *Pichia kudriavzevii* RY55 with idiosyncratic antibacterial activity. *J. Basic Microbiol.* 2013. 53(8): 645-656.

Поступила 9 декабря 2019 г.

(*Контактная информация:* **Валышев Александр Владимирович** – кандидат медицинских наук, доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории микробной экологии и дисбиозов Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН; адрес: 460000, г. Оренбург, ул. Пионерская, 11, ИКВС УрО РАН; тел. (3532) 775417; e-mail: valyshev@esoo.ru)

Образец ссылки на статью:

Валышев А.В., Чертков К.Л., Валышева Н.А. Антибактериальная активность киллерных токсинов дрожжей. Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН. 2019. 4. 6с. [Электр. ресурс] (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2019-4/Articles/VAV-2019-4.pdf>). DOI: 10.24411/2304-9081-2019-14030.