

КИЛЛЕРНАЯ АКТИВНОСТЬ ДРОЖЖЕЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ

С.А. Цапко, В.О. Красинько

Национальный университет пищевых технологий, Киев, Украина, sophie.tsapko@gmail.com

Вступление. Дрожжи как микроорганизмы с высоким биотехнологическим потенциалом являются объектами различных научных исследований. Особый интерес для ученых представляют киллер-токсины дрожжей – экзометаболиты белкового происхождения с ярко выраженной антагонистической активностью против чувствительных микроорганизмов. Прежде, чем попасть в клетку чувствительного микроорганизма, киллер-токсин должен пройти два этапа связывания с рецепторами: с первичными рецепторами, которые находятся на клеточной стенке, и вторичными рецепторами, расположенными в плазматической мембране клетки. Такие первичные рецепторы, как β -1,3-глюкан, были обнаружены в *Williopsis saturnus* WC91-2 [1], *Tetrapisispora phaffii* DBVPG6076 [2] и *Pichia anomala* ATCC 96603 [3]; β -1,6-глюкан – у *P. anomala* DBVPG 3003 [4], маннопротеин – у *P. membranifaciens* CUC1086 [5]; хитин – у *Debaryomyces robertsiae* CBS6693 [6]. Этап связывания киллер-токсина с первичными рецепторами не требует затрат энергии, а значит, является энергонезависимым. Следующий этап воздействия киллер-токсинов на клетку-мишень заключается во взаимодействии токсина с вторичными рецепторами на цитоплазматической мембране, образовании энергозависимого комплекса из вторичных рецепторов и киллер-токсина с последующей активацией мембранных каналов. В результате такого взаимодействия нарушается функция избирательной проницаемости клеточной мембраны для протонов и высокомолекулярных соединений, таких как АТФ, изменяется градиент заряда вокруг мембраны с последующей гибелью клетки [7].

Киллерные дрожжи являются типичными представителями аутомикрофлоры растений. В последнее десятилетие были изолированы новые виды эпифитных киллерных дрожжей из различного растительного сырья. Группой бразильских исследователей во главе с *de Lima* [8] было изолировано из тропических фруктов около 580 видов дрожжей, 29 из которых обладали киллерной активностью. Наивысшая антагонистическая активность против фитопатогенных грибов вида *Colletotrichum gloeosporioides* была обнаружена у изолятов с поверхности папайи, которые позже были идентифицированы как *Meyerozyma guilliermondii*.

Из листьев, корней и коры мангрового дерева китайскими учеными [9] был выделен новый штамм *Kluyveromyces siamensis* HN12-1, являющийся активным продуцентом киллер-токсина, который характеризуется высокой активностью против патогенных для крабов дрожжей.

Группе ученых из Аргентины и Чили [10] удалось изолировать из семян араукарии чилийской штамм *Saccharomyces eubayanus* NPCC 1302, продуцирующий киллер-токсин SeKT с молекулярной массой 70 кДа. Данный токсин проявляет широкий спектр антагонистической активности против дрожжей-вредителей виноматериалов, а именно: *Brettanomyces bruxellensis*, *Pichia membranifaciens*, *Meyerozyma guilliermondii* и *Pichia manshurica*.

Еще одними потенциальными продуцентами киллер-токсинов для применения в виноделии являются дрожжи *Candida pyralidae*, выделенные *Mehlomakulu et al* [11] с поверхности ягод винограда сортов Каберне Совиньон и Шардоне. Установлено, что культура синтезирует два вида киллер-токсинов: СрКТ1 и СрКТ2 с молекулярной массой более 50 кДа. Данные киллер-токсины характеризуются высокой антагонистической активностью против вредителей виноматериалов – *Brettanomyces bruxellensis*.

Группой польских ученых во главе с *Wójcik* [12] были изолированы из разного растительного сырья (листьев деревьев и кустов, лепестков цветов, злаков) 102 вида дрожжей, 24 из которых имели киллерную активность. Наивысшую киллерную активность и широкий спектр антагонистической активности проявили изоляты из лепестков цветков вишни и калины, которые ингибировали рост *C. fluviatilis*, *C. freyschussi*, *C. parapsilosis*, *Rhodotorula rubra*, *Pichia stipitis*, *Yarrowia lipolytica*. Ярко выраженную ингибирующую активность против *C. fluviatilis*, *C. parapsilosis* и *R. pallida* имели также изоляты из колосков пшеницы и ржи.

Отдельно также следует рассмотреть и эндофитные виды киллерных дрожжей, выделенных из камеди деревьев пакистанскими учеными во главе с *Mushtaq* [13]. Установлено, что самая высокая киллерная активность характерна для дрожжей *Bullera pseudoalba* Y21 и *Pichia anomala* Y16, способных ингибировать рост чувствительных дрожжей, относящихся к родам *Candida*, *Debaryomyces*, *Mrakia*, *Pichia*, *Saitoella*, *Sporidiobolus* и *Williopsis*.

В данной статье представлены результаты исследования антагонистической активности чистых культур дрожжей, выделенных из растительного сырья, собранного на территории Черниговской и Киевской области Украины: ягод и листьев винограда сорта Черный принц, виноматериалов – сброженного виноградного сока, ферментированного березового сока.

Материалы и методы. Выделение чистых культур дрожжей осуществляли из следующего природного сырья: ягоды YF(4), листья LF(3) и ферментированный сок винограда сорта Черный принц FCh(1), собранных в Черниговской обл. (октябрь 2020 г.), сброженный сок дикого винограда, собранного в Киевской области FK1(2), FK2(5), ферментированный березовый сок FB(6). Чистые культуры дрожжей получали путем культивирования в чашках Петри на питательной среде – сусло-агар с добавлением хлорамфеникола (0,05 г/л). Инкубацию образцов осуществляли в термостате при температуре 30 °С в течение 96 часов.

Исследование способности выделенных чистых культур дрожжей ингибировать рост других микроорганизмов осуществляли методом встречных культур на питательных средах сусло-агара и среде Сабуро при температуре 20 °С в течение 72-96 часов.

Для проведения исследований были использованы тест-культуры дрожжей из коллекции микроорганизмов кафедры биотехнологии и микробиологии Национального университета пищевых технологий: *Candida tropicalis*, *Candida aquatica*, *Candida lipolytica*, *Candida albicans*, *Candida utilis*, *Candida scottii*, *Rhodotorula glutinis*, *Trichosporon cutaneum*. Поддержание тест-культур осуществляли на скошенном сусло-агара при температуре 3 °С.

Для контрольных исследований киллерной активности к наиболее чувствительным штаммам дрожжей по методу встречных культур подсевались чистые культуры выделенных дрожжей.

Результаты и обсуждение. В результате проведенных исследований была обнаружена способность чистых культур дрожжей, выделенных с растительного сырья, к подавлению роста других чувствительных видов дрожжей. Наиболее выраженный спектр антагонистической активности наблюдался для чистой культуры дрожжей, изолированной из ферментированного сока дикого винограда FK1(2), против тест-культур *R. glutinis*, *C. utilis*, *C. aquatica* и *C. tropicalis*. Культура дрожжей, выделенная из сброженного виноградного сока сорта Черный принц FCh(1), ингибировала рост дрожжей *C. aquatica*, *R. glutinis* и *C. utilis*. Слабая антагонистическая активность против дрожжей *C. utilis* была характерна для культуры дрожжей, выделенной из ягод винограда сорта Черный принц YF(4), и против *R. glutinis* у чистой культуры дрожжей, изолированной из листьев винограда сорта Черный принц LF(3). Полное отсутствие признаков подавления роста тест-

культур было характерным для дрожжей, выделенных из ферментированного березового сока FB(6).

В результате контрольных исследований киллерной активности по методу встречных культур было определено, что дрожжи *C. tropicalis* чувствительны к чистым культурам дрожжей FCh(1), FK1(2), LF(3), YF(4); дрожжи *R. glutinis* чувствительны к чистым культурам дрожжей FCh(1), LF(3), YF(4), FK2(5) и слабо чувствительны к FK1(2); *C. utilis* и *C. aquatica* слабо чувствительны к FK2(5). Следует также отметить, что для всех чистых культур дрожжей было характерным отсутствие антагонистической активности в отношении тест-культур *Trichosporon cutaneum* и *C. lipolytica*.

Наличие антагонистической активности у чистых культур, выделенных из растительного сырья, против тест-культур дрожжей свидетельствует о возможном наличии у изолятов киллерного фенотипа. В связи с этим, дальнейшие исследования будут ориентированы на подбор оптимальных условий культивирования киллерных чистых культур для интенсификации их антагонистической активности.

Список использованных источников

1. 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.* 2012, 167(9): 558-563. doi:10.1016/j.micres.2011.12.001.
2. Chessa R., Landolfo S., Ciani M. Biotechnological exploitation of *Tetrapisispora phaffii* killer toxin: heterologous production in *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*). *Appl Microbiol Biotechnol.* 2017, 101(7): 1-12. doi:10.1007/s00253-016-8050-2.
3. Polonelli L., Magliani W., Ciociola T., Giovati L., Conti S. From *Pichia anomala* killer toxin through killer antibodies to killer peptides for a comprehensive anti-infective strategy. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2011, 99(1): 35-41. doi:10.1007/s10482-010-9496-3.
4. De Ingeniis J., Raffaelli N., Ciani M., Mannazzu I. *Pichia anomala* DBVPG 3003 secretes a ubiquitin-like protein that has antimicrobial activity. *Appl Environ Microbiol.* 2010, 75(1): 1129-34.
5. 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*. *Microbiol.* 2009, 155(2): 624-634. doi:10.1099/mic.0.023663-0.6.
6. Klassen R., Kast A., Wünsche G., Paluszynski J.P., Wemhoff S., Meinhardt F. Immunity factors for two related tRNAGln targeting killer toxins distinguish cognate and non-cognate toxic subunits. *Curr Genet.* 2014, 60(3): 213-222. doi:10.1007/s00294-014-0426-1.
7. Sambuk E.V., Muzaev D.M., Rumyantsev A.M., Padkina M.V. *Saccharomyces cerevisiae* killer toxins: synthesis, mechanisms of action and practical use. *Ecological genetics.* 2019, 17(3): 59-73. doi:10.17816/ecogen17359-73.
8. de Lima J.R., Gonçalves L.R., Brandão L.R., Rosa C.A., Viana F.M. Isolation, identification, and activity in vitro of killer yeasts against *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from tropical fruits. *J Basic Microbiol.* 2013, 53(7): 590-599. doi:10.1002/jobm.201200049.
9. 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.* 2011, 91(6): 1571-1579. doi:10.1007/s00253-011-3220-8.
10. Mazzucco, M.B., Ganga, M.A., Sangorrín, M.P. Production of a novel killer toxin from *Saccharomyces eubayanus* using agro-industrial waste and its application against wine spoilage yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek. Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 2019, 112(1): 965-973. doi:10.1007/s10482-019-01231-5.
11. 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.* 2014, 188: 83-91. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.07.015.
12. Wójcik M, Kordowska-Wiater M. The occurrence of killer activity in yeasts isolated from natural habitats. *Acta Biochim Pol.* 2015, 62(4): 821-824. doi:10.18388/abp.2015_1141.
13. Mushtaq M., Nahar S., Shahab Alam M., Shaheen G., Hashmi M.H. Screening killer activity of some yeast strains isolated from slime fluxes of trees. *Int J Biol Biotech.* 2017, 14 (1): 1-9.