

УДК 579.97

**ВЛИЯНИЕ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО, ТЕПЛОВОГО И ЭТАНОЛЬНОГО СТРЕССОВ НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ ДРОЖЖЕЙ *YARROWIA LIPOLYTICA***© 2010 г. *Г.П. Ежова*<sup>1</sup>, *А.Ю. Аринбасарова*<sup>2</sup>, *В.Ф. Смирнов*<sup>1</sup>, *Е.В. Гусева*<sup>1</sup><sup>1</sup> Нижегородский госуниверситет им. Н.И. Лобачевского<sup>2</sup> Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина, г. Пущино

vestnik@unn.ru

*Поступила в редакцию 19.10.2010*

Изучено влияние окислительного, теплового и этанольного стрессов на выживаемость дрожжей *Yarrowia lipolytica*. Показано, что многие стрессоры снижают рост и развитие дрожжей, но их выживаемость может быть повышена в результате предобработки клеток нелетальными дозами стрессоров. Такая предобработка приводит к перекрестной устойчивости. Стрессоры оказывают ингибирующее действие на интенсивность дыхания дрожжей, но выживаемость клеток повышается за счет функционирования цианидрезистентной альтернативной оксидазы, уровень активности которой увеличивается по сравнению с основной дыхательной цепью.

*Ключевые слова:* дрожжи *Yarrowia lipolytica*, окислительный, тепловой, этанольный стрессы.

В настоящее время в лабораторных исследованиях наиболее часто используются дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, однако постепенно интерес к себе начинают привлекать и другие представители, например *Yarrowia lipolytica*, которые способны к активному росту на многих средах. Они образуют белки, по аминокислотному составу полноценные для животных (их содержание в биомассе дрожжей достигает 60%) [1–3] и являются продуцентами многих практически значимых органических кислот, липаз, цитохрома с, их митохондриальная дыхательная цепь содержит три пункта сопряжения, в чем сходна с дыхательной цепью животных клеток. Этот высокий потенциал к белковой секреции позволяет использовать *Yarrowia lipolytica* в работах по клеточной инженерии как мощную систему экспрессии белка.

Одной из актуальных проблем микробиологии является частое несовпадение «оптимальных» условий культивирования в лаборатории с условиями природных экотопов, в которых микроорганизмы постоянно подвергаются воздействию экстремальных (стрессовых) факторов внешней среды. В природе выживание под действием стрессов – достаточно распространённый факт. Однако механизмы адаптации и способы выживания организмов до настоящего времени остаются мало изученными.

К стрессорам относятся воздействия, приводящие к снижению или ингибированию роста. Исследование адаптационных механизмов представляется актуальным, поскольку именно в стрессовых условиях микроорганизмы спо-

собны осуществлять процессы, важные для человека: трансформацию токсичных соединений, синтез и накопление различных метаболитов (антибиотиков, токсинов, пигментов).

Цель данной работы – исследование влияния стрессовых факторов на микроскопические грибы *Yarrowia lipolytica*, а также изучение адаптивного ответа грибов на окислительный, тепловой и этанольный стрессы.

**Материалы и методы**

В качестве объектов исследования взяты дрожжи *Yarrowia lipolytica* Y-155. Выращивание производили на солевой среде Ридер, содержащей (г/л): 10.0 – глюкозы, 3.0 –  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.7 –  $\text{MgSO}_4$ , 0.4 –  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , 0.5 –  $\text{NaCl}$ , 2.0 –  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.2%-ный дрожжевой экстракт (Difco); микроэлементы по Буркгольдеру (мг/мл):  $\text{KI}$  – 0.02,  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$  – 0.01,  $\text{MnSO}_4$  – 0.01,  $\text{ZnSO}_4$  – 0.01,  $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$  – 0.01,  $\text{FeSO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$  – 0.05,  $\text{NaMoO}_4$  – 0.01.

Культивирование проводили при 29°C в колбах объёмом 750 мл со 100 мл среды. Рост происходил на качалке при 200 об/мин, при pH 5.5, его оценивали по оптической плотности при длине волны 540 нМ. Исследовались клетки из экспоненциальной (10–12 ч) и стационарной (24 ч) фаз роста.

Условия окислительного стресса были смоделированы путём инкубирования клеток в присутствии  $\text{H}_2\text{O}_2$  или супероксид-генерирующих агентов: менадиона (2-метил-1,4-нафтохинона) и юглона (5-окси-1,4-нафтохинона);

теплового стресса – путём инкубирования клеток при температуре 45°C; этанольного стресса – путём инкубирования клеток в присутствии различных концентраций этанола. В экспериментальных исследованиях использовали летальные, сублетальные и малые дозы стрессовых факторов: оксидантов (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, менадиона, юглона), этанола, а также инкубации при 37°C. Выживаемость клеток определяли путем их высева на сусло-агар. Учет колоний осуществляли после 48–72 ч культивирования при 29°C.

Скорость потребления кислорода клетками измеряли на полярографе LP-7. Конечный объём пробы составлял 2 мл, температура измерения 20–22°C. Концентрация растворённого в среде кислорода принималась равной 250 мкМ. Активность дыхания выражали в нмоль O<sub>2</sub>/(мин на 1 мг сухих клеток).

С целью определения альтернативной оксидазы у *Yarrowia lipolytica* в зависимости от стрессового воздействия и их физиологического состояния был проведен ингибиторный анализ дыхания. Для этой цели клетки, у которых активны оба пути окисления, подвергали воздействию либо H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (120 мМ), либо температуры (45°C) в присутствии антимицина А или бензгидроксамовой кислоты (БГК).

### Результаты и их обсуждение

За 10–15 часов культивирования *Yarrowia lipolytica* образуется достаточно большая биомасса клеток. Накопление биомассы оценивали путем взятия проб на разных фазах культивирования. Влияние стрессового воздействия оценивали по выживаемости клеток, по их адаптивному ответу на разные концентрации пероксида водорода. Полное подавление роста происходило при концентрации H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100 мМ. Сохранить большую выживаемость удавалось путем предварительной обработки клеток меньшими дозами: обработка клеток *Yarrowia lipolytica* экспоненциальной фазы роста низкой дозой H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.5 мМ) в течение 60 мин приводила к повышению устойчивости клеток к оксиданту, выживаемость сохранялась на уровне 35%.

Окислительный стресс у дрожжей могут вызывать также соединения, способные при попадании в клетку генерировать супероксидные радикалы: менадион и юглон [4]. В присутствии 0.5 мМ менадиона выживаемость клеток составляла менее 1%, тогда как летальная концентрация юглона была на порядок меньше – 0.05 мМ). Предобработка клеток нелетальными концентрациями менадиона (0.05 мМ) или юглона (0.005 мМ) приводила к

развитию статистически значимой устойчивости к более высоким дозам оксидантов менадиона и юглона ( $p < 0.05$ ).

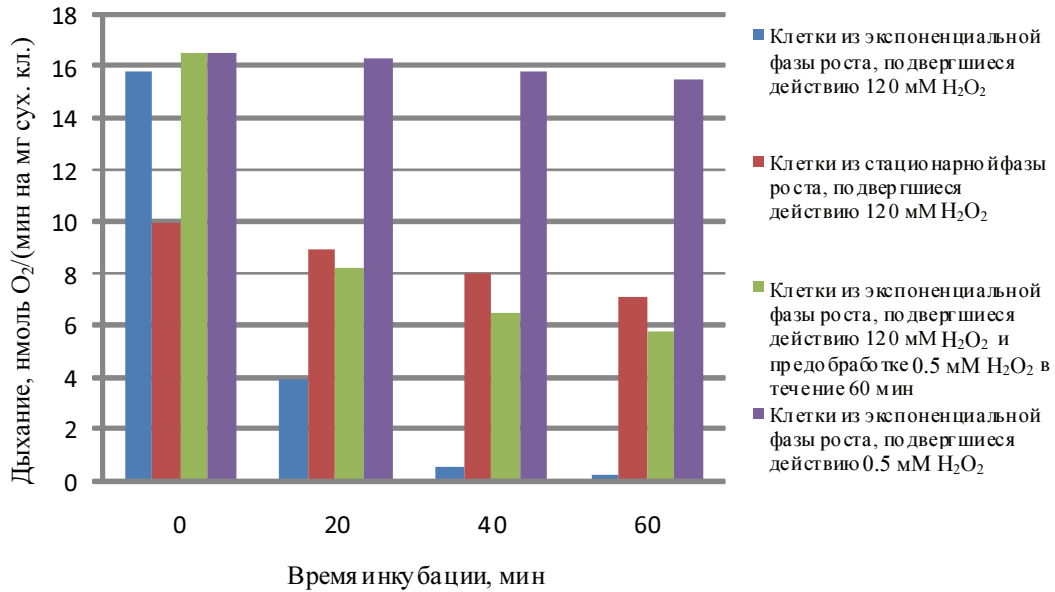
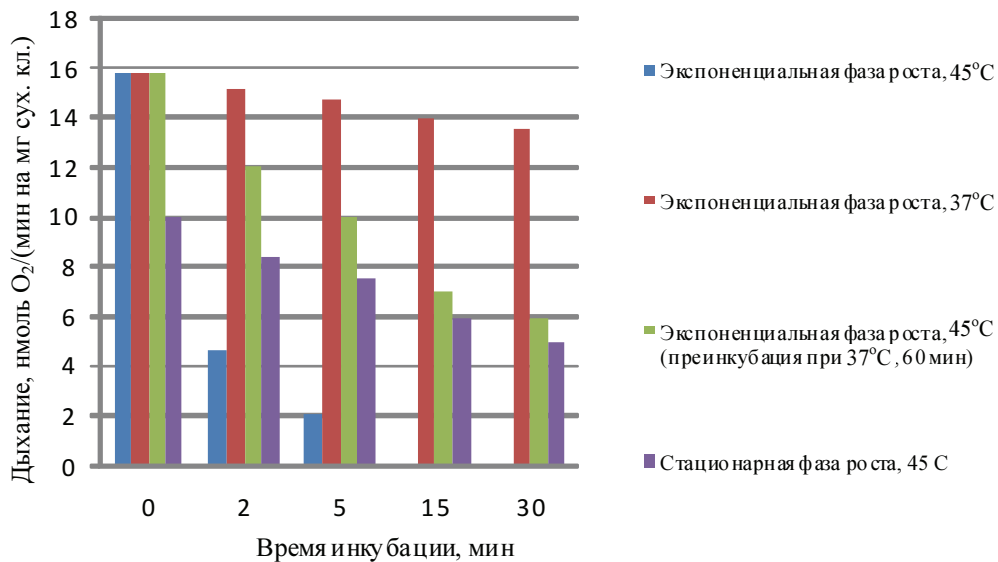
Предварительная обработка клеток юглоном в нелетальной концентрации (0.005 мМ) повышала их устойчивость и к более высоким дозам H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, а предобработка низкой дозой H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.5 мМ) сопровождалась повышением устойчивости к высокой концентрации юглона. То есть отмечалась перекрестная устойчивость к различным оксидантам, отмечался более высокий адаптационный потенциал.

Изучена выживаемость клеток различных фаз роста к тепловому воздействию. Показано, что при 45°C выживаемость клеток из экспоненциальной фазы роста заметно снижалась: через 5 минут жизнеспособными оставались 4% клеток, через 10 мин – менее 0.1%. В отличие от экспоненциальной фазы роста, клетки из стационарной фазы были более устойчивы к тепловому воздействию – после инкубирования при 45°C в течение 30 мин выживаемость клеток сохранялась на уровне 5%.

Возможность повышения термоустойчивости *Yarrowia lipolytica* установили мягкой тепловой предобработкой. Инкубация клеток при 37°C практически не оказывала влияния на их жизнеспособность, такое тепловое воздействие приводило к заметному увеличению выживаемости (до 40%) с последующей инкубацией их при 45°C в течение 30 мин, т.е. мягкая тепловая (37°C) предобработка индуцирует толерантность к последующему воздействию более высоких температур. Это явление известно как индуцированная термотолерантность или «тепловая закалка».

Изучена выживаемость *Yarrowia lipolytica* в условиях этанольного стресса. Установлено, что с увеличением концентрации спирта происходило заметное снижение жизнеспособности клеток из экспоненциальной фазы роста. Летальная концентрация этанола составляла 15%. Клетки из стационарной фазы роста были более устойчивы к этанолу, их выживаемость составляла более 20%.

Токсичность этанола связана с его способностью подавлять биосинтез макромолекул, денатурировать белки цитоплазмы, снижать активность гликолитических ферментов, нарушать транспортные процессы ионов и метаболитов через плазматическую мембрану, изменять липидный состав мембраны. Действие этанола обусловлено увеличением анионной и протонной проницаемости плазматической мембраны, что сопровождается ее дезэнергизацией и снижением внутриклеточного рН.

Рис. 1. Дыхательная активность *Yarrowia lipolytica* в условиях окислительного стресса ( $p < 0.05$ )Рис. 2. Дыхательная активность *Yarrowia lipolytica* в условиях теплового стресса ( $p < 0.05$ )

*Y. lipolytica* проявляют способность к перекрестной адаптации, когда один вид стресса способен индуцировать развитие устойчивости к другим стрессовым воздействиям. Если принять во внимание, что один вид стресса способен индуцировать развитие устойчивости к другим стрессовым воздействиям, можно предположить наличие общего фактора, контролирующего запуск определённых защитных механизмов.

Стрессовые воздействия изменяют дыхательную активность клеток, а мягкие стрессовые воздействия приводят к адаптации, к сохране-

нию дыхательной активности на более высоком уровне (рис. 1, 2).

Одной из мишеней действия окислительных стресс-факторов является дыхательная цепь, повреждение которой прямо или косвенно приводит к образованию активных форм кислорода на уровне убихинона. Активные формы кислорода вызывают перекисное окисление кардиолипина, который абсолютно необходим для активности цитохромоксидазы и непосредственно инактивирует переносчики электронов по дыхательной цепи, АТФазу, трансгидрогеназу и другие белки.

Активность дыхания *Yarrowia lipolytica* в условиях окислительного и теплового стрессов

Условия, фаза роста культуры	Дыхание, нмоль O <sub>2</sub> / (мин на 1 мг сухих клеток)	Ингибирование дыхания, %			Активность альтернативной оксидазы, нмоль O <sub>2</sub> / (мин на 1 мг сухих клеток)
		KCN, 1 мМ	Антимицин А, 5 мкМ	KCN (1 мМ) + БГК (5 мМ)	
Экспоненциальная без предобработки	15.8	98	98	100	0
Стационарная, без предобработки	10.9	+190*	+160*	96	32
Экспоненциальная, тепловая предобработка (37°C, 60 мин)	16.8	70	68	98	5.5
Экспоненциальная предобработка H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (0.5 мМ, 60 мин)	16.5	60	70	97	6.5

\* Знак «+» указывает на стимулирующее действие ингибитора, БГК – бензгидроксановая кислота.

Тепловое и окислительное воздействие вызывало резкое падение дыхания клеток. Так, через 5 мин скорость потребления кислорода в условиях теплового стресса составляла менее 10% от исходного уровня и полностью отсутствовала через 15 мин. Выдерживание *Yarrowia lipolytica* при 37°C в течение 30 мин (мягкая тепловая обработка) практически не влияло на их дыхание, но заметно увеличивало их устойчивость к последующему воздействию более высокой температуры.

При изучении влияния этанола на дыхание оказалось, что в низкой (2%) концентрации он практически не оказывал влияния на скорость потребления кислорода клетками. В присутствии 5% этанола активность дыхания *Yarrowia lipolytica* сохранялась на уровне 45–50%, при увеличении концентрации спирта до 15% дыхание клеток снижалось практически до нуля уже через 30 мин инкубации. Как в условиях теплового и окислительного стрессов, адаптация (5% этанол, 60 мин) приводила к сохранению дыхательной активности *Y. lipolytica* на более высоком уровне.

Результаты исследования указывают на то, что окислительный и тепловой стрессы вызывали заметное снижение дыхательной активности клеток. Это позволило предположить, что одной из мишеней действия повреждающих факторов в условиях теплового и окислительного стрессов являлась дыхательная цепь.

Была исследована возможность участия альтернативной оксидазы в механизме адаптивного ответа *Yarrowia lipolytica* на окислительный и тепловой стрессы. Полученные данные представлены в таблице.

Показано, что в условиях окислительного и теплового стрессов дыхание клеток из экспоненциальной фазы роста было весьма чувствительно к цианиду и антимицину А, поскольку подавлялось в их присутствии почти на 100%. Напротив, дыхание *Y. lipolytica* из стационарной фазы роста не только не ингибировалось цианидом, но заметно ускорялось в его присутствии. Однако совместно KCN + БГК полностью подавляли дыхание. Эти результаты свидетельствуют о том, что в клетках из стационарной фазы роста наряду с цитохромной цепью функционирует альтернативный цианид-резистентный путь переноса электронов.

Инкубация *Y. lipolytica* из экспоненциальной фазы роста в присутствии нелетальной дозы H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.5 мМ, 60 мин) или мягкая тепловая предобработка (37°C, 60 мин) приводили к снижению ингибирующего действия KCN на дыхание, которое полностью подавлялось при совместном действии KCN и БГК. Эти результаты указывают на то, что в процессе предобработки в клетках происходило появление альтернативного пути переноса электронов. В присутствии антимицина А, ингибирующего основную дыхательную цепь на уровне цитохрома b, была активна только альтернативная оксидаза; тогда как в присутствии БГК, подавляющей альтернативный путь, функционировала только цитохромная цепь.

В присутствии ингибиторов выживаемость клеток во всех исследуемых стрессовых условиях была ниже по сравнению с контролем (без ингибиторов). При этом функционирование альтернативной оксидазы обеспечивало выживаемость *Yarrowia lipolytica* на более высоком уровне, по

сравнению с основной дыхательной цепью. Эти данные свидетельствуют о том, что дыхательная цепь у *Yarrowia lipolytica* играет важную роль в поддержании жизнеспособности клеток в условиях как окислительного, так и теплового стрессов.

По данным литературы, действие стрессоров приводит к заметной активации защитных генов, в результате чего наблюдается появление стрессовых белков, участвующих в адаптации клеток к летальному действию АФК и высокой температуры. Стресс-индуцируемые белки имеют митохондриальную локализацию, что указывает на участие митохондрий в ответе клеток на действие стрессоров [5]. Альтернативная оксидаза, локализованная в митохондриях, ответвляется от основной дыхательной цепи на уровне убихинона и специфически подавляется БГК [6].

Представленные нами данные однозначно свидетельствуют о том, что, наряду с увеличением активности антиоксидантных ферментов, *Yarrowia lipolytica* способны также к индукции альтернативной (цианидрезистентной) оксидазы, обеспечивающей выживаемость за счет сохранения способности к синтезу АТФ в первом пункте сопряжения на уровне эндогенной НАДН-дегидрогеназы. Причём альтернативный путь окисления более устойчив к действию стрессоров, нарушающих перенос электронов на цитохромном участке дыхательной цепи.

Предполагается, что цианидрезистентная оксидаза более устойчива к действию высокой концентрации этанола, по сравнению с основной дыхательной цепью. Альтернативная оксидаза ответвляется от основной дыхательной цепи на уровне коэнзима Q (убихинона) и переносит на кислород восстановительные эквиваленты от комплекса I (эндогенная НАДН-дегидрогеназа) и комплекса II (экзогенная НАДН-дегидрогеназа, сукцинатдегидрогеназа, глицерофосфатдегидрогеназа). Следовательно, можно полагать, что слабым звеном в основной дыхательной цепи в ответ на действие этанола является цитохромный участок от убихинона до цитохромоксидазы. Наиболее вероятным претендентом на роль слабого звена может быть относительно подвижный компонент дыха-

тельной цепи – цитохром с. Возможно, что наблюдающееся под действием этанола нарушение мембранной проницаемости приводит к тому, что низкомолекулярный цитохром с диффундирует через наружную мембрану митохондрий в цитозоль, а дыхательная цепь перестает функционировать.

Таким образом, показано влияние окислительного, теплового и этанольного стрессов на выживаемость дрожжей *Yarrowia lipolytica*. Многие стрессоры снижают рост и развитие дрожжей, но их выживаемость может быть повышена в результате предобработки клеток нелетальными дозами стрессоров. Эти результаты согласуются с данными, полученными на *S. cerevisiae*, у которых после адаптации отмечается жизнеспособность того же порядка (на 18–20%) [7]. Предобработка приводит к перекрестной устойчивости. Стрессоры оказывают ингибирующее действие на интенсивность дыхания дрожжей, но выживаемость клеток повышается за счет функционирования цианидрезистентной альтернативной оксидазы, уровень активности которой увеличивается по сравнению с основной дыхательной цепью.

#### Список литературы

1. Беккер З.Э. Физиология и биохимия грибов. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1988. 230 с.
2. Юдин А.В. Большой определитель грибов. М.: АСТ, Астрель, 2001. 254 с.
3. Jamieson D.J. *Saccharomyces cerevisiae* has distinct adaptive responses to both hydrogen peroxide and menadione // *J. Bacteriol.* 1992. V. 174. P. 6678–6681.
4. Flattery-O'Brien J., Collinson L.P., Dawes I.W. *Saccharomyces cerevisiae* has an inducible response to menadione which differs from that to hydrogen peroxide // *J. Gen. Microbiol.* 1993. V. 139. P. 501–507.
5. Plesofsky-Vig N., Brambl R. Gene sequence and analysis of hsp30, a small heat shock protein of *Neurospora crassa* which associates with mitochondria // *J. Biol. Chem.* 1990. V. 265. P. 15432–15440.
6. Plesofsky-Vig N., Brambl R. Heat shock response of *Neurospora crassa* protein synthesis and induced thermotolerance // *J. Bacteriol.* 1985. V. 162. P. 1083–1091.
7. Ruis H., Schuller C. Stress signaling in yeast // *Bioassays.* 1995. V. 17. P. 959–965.

**INFLUENCE OF OXIDIZING, THERMAL AND ETHANOL STRESSES ON SURVIVAL RATE OF YEAST YARROWIA LIPOLYTICA**

*G.P. Ezhova, A.Yu. Arinbasarova, V.F. Smirnov, E.V. Guseva*

The influence of oxidizing, thermal and ethanol stresses on the survival rate of yeast *Yarrowia lipolytica* was investigated. It is shown that many stressors reduce the growth and development of the yeast, however, the survival rate can be raised by cell preprocessing with non-lethal doses of stressors. Such preprocessing leads to cross tolerance. Stressors exert an inhibitory action on the yeast breath intensity, but the cell survival rate increases due to the functioning of cyanide-resistant alternative oxidase whose level of activity increases in comparison with the main respiratory chain.

*Keywords:* yeast *Yarrowia lipolytica*; oxidative (oxidizing), thermal, ethanol stress.