

УДК 579.61.57.043

ОСОБЕННОСТИ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ АДАПТАЦИИ ПОЛИЭКСТРЕМОФИЛЬНОГО ШТАММА ДРОЖЖЕЙ *Yarrowia lipolytica* W29 В ХОДЕ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

© 2022 г. Н. Н. Гесслер¹, Н. О. Иванова¹, А. С. Кокорева¹, О. И. Кляйн¹,
Е. П. Исакова¹, Ю. И. Дерябина¹, *

¹Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр
“Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

*e-mail: yul_der@mail.ru

Поступила в редакцию 10.05.2022 г.

После доработки 24.06.2022 г.

Принята к публикации 04.07.2022 г.

Исследовали окислительно-восстановительный статус, состояние митохондрий, а также другие показатели старения клеток в ходе культивирования экстремофильных дрожжей *Yarrowia lipolytica* W29 в течение 120 ч. Увеличение уровня АФК при переходе в стационарную фазу роста сопровождалось снижением скорости дыхания клеток, увеличением вклада альтернативной оксидазы, повышением уровня активности супероксиддисмутазы и каталазы. В стационарной фазе роста соотношение глутатион/дисульфид глутатиона снижалось в 2–3 раза. Цитометрические исследования с прижизненной окраской потенциометрическим красителем показало снижение митохондриального потенциала по мере старения культуры. В стадии позднего стационарного роста выявлена активация лизосомальных процессов в клетках *Y. lipolytica*, что, по-видимому, обуславливает устойчивость клетки к окислительному стрессу и способствует сохранению выживаемости на уровне 80%.

Ключевые слова: стресс, продолжительное культивирование, антиоксидантные ферменты, супероксиддисмутазы, каталаза, активные формы кислорода, *Yarrowia lipolytica*

DOI: 10.31857/S0555109922060046

Дрожжи *Yarrowia lipolytica* активно используются в биотехнологии для получения органических кислот и улучшения состава липидов. Благодаря способности расти на различных органических субстратах эти дрожжи находят применение также при ремедиации почв и водных сред, загрязненных нефтепродуктами или отходами масложировой промышленности, и утилизации широкого спектра токсичных поллютантов — от *n*-алканов до тринитротолуола и лигноцеллюлозного сырья [1, 2]. *Y. lipolytica* активно используется также для секреции белков по ко-транскрипционному принципу [3] и экспрессии гетерологичных белков [4–6].

Полиэкстремофильные дрожжи *Y. lipolytica* способны расти в широком диапазоне pH, обладают гибкой системой редокс-адаптации, позволяющей эффективно переносить повышение уровня активных форм кислорода (АФК) в клетках без заметных изменений параметров роста культуры, что делает их привлекательным объектом для использования в качестве промышленного продуцента [7, 8]. *Y. lipolytica* является распространённым продуцентом рекомбинантного белка, причем в работе [9] было показано, что организация произ-

водства рекомбинантного белка предпочтительна в непрерывном режиме — это позволяет повысить индукцию промоторов и выход целевого продукта. Однако, несмотря на широкие возможности *Y. lipolytica*, биотехнологический потенциал данного объекта реализуется на практике крайне мало: можно отметить лишь производство лимонной кислоты [10], а также применение этого организма в пищевой промышленности для улучшения вкусовых качеств продуктов и обработке гидрофобных отходов пищевых производств [11]. Во многом это обусловлено противоречивыми и неполными данными о физиологии *Y. lipolytica* и ее адаптивном ресурсе. Как известно, стрессовые воздействия на клетку, такие как экстремальные значения pH и температуры, лимитирование по какому-либо компоненту питания или изменение условий аэрации, зачастую являются неотъемлемым элементом биотехнологического процесса. *Y. lipolytica* проявляют чрезвычайно высокую устойчивость к различным неблагоприятным факторам, связанным с развитием окислительного стресса, например, повышению температуры и уровня этанола, внесению сублетальных доз перекиси водорода или

прооксидантов [12]. В связи с этим исследование физиологических характеристик *Y. lipolytica* в процессе продолжительного культивирования является актуальной задачей, решение которой может позволить найти новые промоторы генов, индукция которых возрастает и стабилизируется в поздней стационарной стадии роста.

Известно, что в процессе длительного культивирования на фоне истощения субстратов также наблюдается повышение уровня АФК и развитие окислительного стресса, что приводит к возникновению различных повреждений и старению культуры. В значительной степени развитие этих процессов связано с нарушением митохондриальных процессов и деэнергизации клеток [13]. Низшие эукариоты-дрожжи представляют собой прекрасную модель изучения клеточного и организменного старения на уровне одной клетки [14, 15]. На дрожжевых организмах изучены 2 модели старения: репликативная, при которой продолжительность жизни определяется числом дочерних клеток, продуцируемых материнской до физиологического старения. Хронологическая продолжительность жизни характеризует тот отрезок времени, который клетка существует в неделиющемся состоянии. Исследование старения дрожжевых клеток убедительно показало, что АФК накапливаются в период так называемого диауксического сдвига (стадии перехода в стационарную фазу роста микроорганизмов) и в стационарной фазе роста [16]. Процессы, позволяющие снижать генерацию АФК в митохондриях, замедляют старение клеток [17].

Помимо снижения уровня АФК одним из важнейших механизмов метаболической адаптации к стрессовым условиям рассматривают аутофагию [18]. В ходе аутофагоцитоза не только происходит деградация окисленных органических молекул и поврежденных органелл, но и высвобождается материал для их обновления, что позволяет поддерживать жизнеспособность клеток при истощении субстратов в процессе длительного культивирования.

Цель работы – характеристика показателей старения в ходе продолжительного культивирования дрожжей *Y. lipolytica* W29.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования. В работе использовали штамм экстремофильного вида *Y. lipolytica* W29 (дикий тип), полученный из коллекции типовых штаммов CIRM-Levures (Франция).

Культивирование клеток. Выращивание штамма *Y. lipolytica* W29 для проведения экспериментов проводили на синтетической среде YNB следующего состава (г/л): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0.3; KH_2PO_4 – 2; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ – 0.5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.5; NaCl – 0.1;

CaCl_2 – 0.05; глицерин – 10; дрожжевой экстракт – 2; микроэлементы (мкг/мл): KI – 0.2; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0.08; MnSO_4 – 0.08; $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0.4; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0.4; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.08; H_3BO_3 – 1.0; витамины (мкг/мл): биотин – 0.02; фолиевая кислота – 0.02; пантотенат кальция – 0.6; инозит – 3.0; никотиновая кислота – 0.6; пара-аминобензойная кислота – 0.3; пиридоксин- HCl – 0.6; рибофлавин – 0.3; тиамин- HCl – 0.15; pH 5.5–5.6.

Долгосрочное поддержание культур, а также опыты по определению выживаемости клеток проводили на твердых средах следующего состава (г/л): дрожжевой экстракт – 2.0; пептон – 5.0; солодовый экстракт – 3.0; глицерин – 10; агар-агар – 20; КОН или H_2SO_4 – по показаниям pH-метра.

Культуры выращивали в качалочных колбах Эрленмейера объемом 750 мл в 100 мл жидкой среды при 180 об./мин.

Для проведения физиологических экспериментов использовали оптимальные условия культивирования: pH 5.5 и температуру – 28°C. Все эксперименты проводили в трех аналитических и биологических повторностях, рассчитывая средние значения физиолого-биохимических показателей. Накопление биомассы оценивали по нарастанию в культуре оптической плотности (ОП) при длине волны $\lambda = 590$ нм.

Анализ выживаемости клеток. Выживаемость клеток оценивали методом Коха по их способности образовывать колонии на агаризованной полнотенной среде после посева на чашках Петри.

Флуоресцентное окрашивание и проточная цитометрия. Состояние митохондрий дрожжей определяли методом проточной цитометрии после окрашивания MitoTracker™ Red CMXRos (“Invitrogen™ Thermo Scientific”, США) [19]. Клетки дрожжей отмывали в растворе фосфатно-солевого буфера, суспензию разводили до ОП, равной 2.0, и вносили краситель в равном объеме до конечной концентрации 100 нМ. Образцы инкубировали в темноте 30 мин при комнатной температуре, затем готовили разведение для достижения ОП 0.1 и анализировали в 96-луночных планшетах на цитометре Beckman Cytoflex V2B2Y2R0 (“Thermo Scientific”, США).

Цитологическое окрашивание с помощью LysoTracker Red DND 99. На этапе подготовки образцов отбирали 1–2 мл клеточной суспензии, осаждали в эппендорфах в течение 1–2 мин при 4000 g и дважды промывали фосфатно-солевым буфером. Затем ресуспендировали, доводя до ОП 0.05–0.1 ед. После этого клетки окрашивали 100 нМ LysoTracker Red DND-99 (“Invitrogen™ Thermo Scientific”, США) в ДМСО в течение 2 ч при 37°C. Образцы исследовали с помощью флуоресцентного микроскопа Axioskop 40 FL (“Carl Zeiss”, Германия) при длине волны возбуждения 543 нм.

Изображения были созданы с помощью браузера изображений “Carl Zeiss LSM”.

Дыхательная активность клеток. Скорость потребления кислорода клетками дрожжей исследовали полярографическим методом, используя многоканальную микроэлектродную установку с системой сбора информации и программой Record-4, (рабочий объем ячейки 1.0 мл) [20]. Исследования дыхательной и фосфорилирующей активности проводили в среде, содержащей 50 мМ К-фосфатный буфер, pH 5.5, и 1% глюкозы (конечный объем 1 мл). Скорость дыхания оценивали по увеличению потребления кислорода за 1 мин. Полученные количественные значения рассчитывали относительно сухой биомассы. Для определения сухой биомассы 1–2 мл суспензии отмытых клеток, используемых для полярографического анализа дыхательной активности, сушили в бюксах при 104°C до постоянного веса.

Ингибиторный анализ клеточного дыхания проводили следующим образом: к дышащей суспензии клеток добавляли ингибитор терминальной цитохромоксидазы – KCN (“Реахим”, Россия) в концентрации 1–4 мМ и фиксировали уменьшение скорости дыхания. Расчет ингибирования проводили в аналитической программе Analyse Record-4 (в %). Вклад цианид-нечувствительного дыхания (активность альтернативной оксидазы) рассчитывали в нг-атом кислорода/мин на мг сухой биомассы.

Анализ содержания восстановленной и окисленной форм глутатиона. Клетки разрушали растиранием в жидком азоте и переносили в 0.1 М калий-фосфатный буфер, pH 8.0, в соотношении 1 : 5 об. Белки осаждали внесением равного объема 5%-ной метафосфорной кислоты (“Реахим”, Россия), выдерживая смесь в течение 20 мин на льду. Далее экстракты центрифугировали в течение 20 мин при 15000 g. В полученных супернатантах, разведенных в 10 раз 0.1 М калий-фосфатным буфером, определяли содержание окисленной и восстановленной форм глутатиона. Для определения содержания глутатиона в кварцевую кювету объемом 3 мл вносили 100 мкл исследуемого экстракта и ортофталевый альдегид (“Fluca Analytical”, Германия) до конечной концентрации 0.3 мкМ, смесь инкубировали в темноте в течение 15 мин. Глутатион определяли по спектру испускания в диапазоне длин волн 360–500 нм при возбуждении светом с длиной волны 350 нм, на спектрофотометре “Shimadzu RF 5301 PC” (“Shimatsu”, Япония). О концентрации восстановленной формы глутатиона судили по площади под кривой спектра испускания. Определение окисленной формы глутатиона проводили аналогичным образом в 0.1 М NaOH. Исходные экстракты перед измерением были разведены в 10 раз 0.1 М NaOH с добавлением 1.6 мМ N-метилmaleимида (“Sigma-Aldrich”,

США), полученную смесь инкубировали в течение 30 мин. Для измерения концентраций восстановленной и окисленной форм глутатиона в каждой серии экспериментов строили калибровочные кривые с диапазоном концентраций 1–10 мкг/мл, для чего были использованы восстановленная форма глутатиона (“Serva”, Германия) и окисленная форма глутатиона (“Reagent”, Венгрия). Полученные значения рассчитывали на г сухой биомассы.

Определение уровня АФК в клетках. Общее содержание АФК в клетках определяли флуориметрическим методом с использованием флуоресцентного красителя эфира дигидро-2',7'-дихлорофлуоресцеина диацетата (ДХФДА) (“Sigma-Aldrich”, США). В клеточную суспензию дрожжей, разведенную фосфатно-солевым буфером в соотношении 1 : 2, добавляли ДХФДА в ДМСО до конечной концентрации 40 мкМ и экспонировали в течение 30 мин в темноте, после чего дважды промывали буфером того же состава. В качестве “положительного контроля” использовались клетки дрожжей, обработанные в растворе прооксиданта 600 мкМ 2,2'-азобис(2-метилпропионамидин) дигидрохлорида (АМПА, “Sigma”, США). Полученную суспензию вносили по 200 мкл в ячейки 96-луночного планшета. Измерение флуоресценции проводили при длине волны возбуждения 485 нм и длине волны эмиссии 528 нм каждые 5 мин на микропланшетном фотофлуориметре Synergy 2 (“Bio Teck”, США) при чувствительности 100% и 35%. Содержание АФК рассчитывали на г сухой биомассы.

Приготовление клеточных гомогенатов. Клетки дрожжей отделяли от культуральной жидкости центрифугированием, дважды отмывали охлажденной до 4°C водой, суспендировали в соотношении 1 : 1 (г/мл) в среде следующего состава: 2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота – 10 мМ, сорбит – 0.5 М, манит – 0.5 М, ЭДТА – 5 мМ, фенилметилсульфонил фторид – 0.5 мМ, pH 6.5. Клетки дрожжей разрушали на ультразвуковом дезинтеграторе MSE (“Farmacia”, Швеция) в течение 2 мин (4 цикла по 30 с, с перерывом 30 с) при 4–0°C. Полученный гомогенат центрифугировали при 20000 g 30 мин. Для исследований использовали супернатант.

Определение активности каталазы. Суммарную каталазную активность определяли по скорости расщепления пероксида водорода (при ОП₂₄₀) и выражали в микромолях расщепленного H₂O₂ в мин на 1 мг белка [20]. В качестве ингибитора каталазной активности использовали аминотриазол (АТЗ).

Определение активности супероксиддисмутазы (СОД). Активность СОД определяли непрямым методом, измеряя ингибирование автоокисления кверцетина при ОП₄₀₆ как описано в работе [21]. Исследование проводили в 20 мМ К-фосфатном буфере, содержащем 0.1 мМ ЭДТА, pH 7.8, добав-

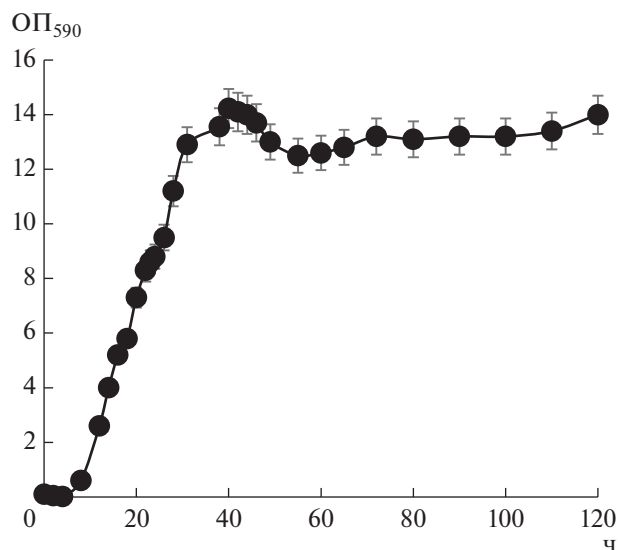


Рис. 1. Кривая роста *Y. lipolytica* (ОП₅₉₀) при культивировании на среде YNB с глицерином в качестве источника углерода.

ля тетраметилэтилендиамин до pH 10.0. Затем к реакционной смеси добавляли 10 мкл гомогената, разведенного 1 : 10 или при высокой активности 1 : 100. Реакцию запускали добавлением кверцетина (0.36 мМ в ДМСО). За единицу ферментативной активности СОД принимали количество белка, вызывающего 50% ингибирование автоокисления кверцетина. В качестве специфического ингибитора СОД применяли диэтилдитиокарбамат (ДДК).

Определение белка. Содержание белка в клеточных экстрактах определяли по методу Бредфорда [22] с использованием Кумасси G-250 (“VWR Amresco”, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Кинетика роста культуры клеток дрожжей *Y. lipolytica* при продолжительном культивировании. Культивирование дрожжей *Y. lipolytica* проводили на среде YNB с глицерином в качестве субстрата в оптимальных условиях (28°C, pH 5.5) в течение 120 ч. Как видно из рис. 1, лаг-фаза длилась 6 ч, через 38–40 ч культивирования происходил переход в стационарную стадию роста, которая длилась более 400 ч без заметного снижения ОП культур (не показано).

Для дальнейших исследований физиолого-биохимических показателей адаптации *Y. lipolytica* к длительному культивированию были выбраны следующие точки: 18 ч (логарифмическая фаза), 40 ч (переход в стационарную фазу роста), 70 ч (стационарная фаза роста), 120 ч (поздняя стадия стационарного культивирования). У ото-

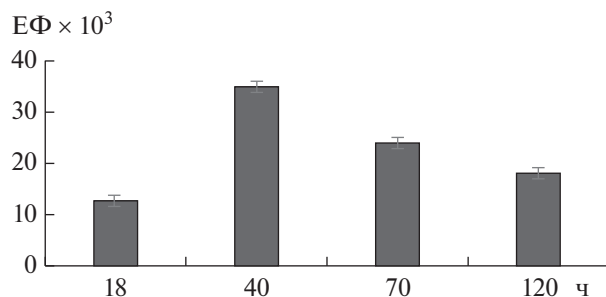


Рис. 2. Уровень АФК (ед. флуоресценции, ЕФ × мг⁻¹ сухой биомассы) в клетках *Y. lipolytica* в ходе продолжительного культивирования.

бранных в эти точки клеток были определены: уровень АФК, скорость дыхания, вклад альтернативной оксидазы митохондрий в общую дыхательную активность, анализ активностей антиоксидантных ферментов (каталазы и СОД) и соотношение восстановленной и окисленной форм глутатиона.

Исследование уровня АФК в клетках *Y. lipolytica*. Показано, что уровень АФК в клетках *Y. lipolytica* был минимальным в логарифмической фазе роста, достигал максимального значения при переходе в стационарную (40 ч), после чего снижался примерно на 45–50% при переходе клеток в позднюю стационарную фазу (рис. 2). Снижение уровня АФК в поздней стационарной фазе свидетельствовало об адаптации культуры и активации антиоксидантных защитных механизмов.

Исследование скорости дыхания и активности альтернативной оксидазы митохондрий *Y. lipolytica*. Скорость дыхания является важнейшим показателем энергетического статуса клеток, а включение в дыхание альтернативной оксидазы рассматривается как один из универсальных механизмов ответа клеток на стрессовые воздействия различной природы. Индукция альтернативной оксидазы позволяет избежать “утечки” электронов из электрон-транспортной цепи и снизить таким образом генерацию АФК, которая делает процесс дыхания менее энергетически выгодным [23].

Анализ интенсивности дыхания и вклада альтернативной оксидазы митохондрий у клеток *Y. lipolytica* (рис. 3) показал, что скорость дыхания клеток достигала максимального значения в логарифмической фазе роста (51 нг-атом О/мг сухой биомассы), после чего клетки, по всей видимости, проходили некий период адаптации, в течение которого скорость уменьшалась в переходной фазе более, чем в 3 раза, стабилизируясь в стационарной фазе роста на одном минимальном уровне (рис. 3). У всех образцов клеток *Y. lipolytica* также был исследован вклад альтернативной оксидазы митохондрий в общую скорость дыхания (рис. 3). Цианид-резистентность клеток *Y. lipolytica* была

минимальной в логарифмической стадии роста (31% от общего дыхания клеток), далее наблюдалось возрастание активности альтернативной оксидазы по мере перехода в стационарную фазу роста — от 61% от общего дыхания клеток в переходной фазе до 68% в стадии устойчивого стационара (рис. 3).

Определение активностей антиоксидантных ферментов клеток *Y. lipolytica*. Во всех образцах клеток была исследована активность ферментов первой линии защиты против АФК — СОД и каталазы. Показано, что активность СОД (рис. 4, 1) постепенно увеличивалась по мере перехода клеток в стационарную стадию роста (от 173 до 236 ед./мг белка) и достигала максимального значения в поздней стационарной стадии роста.

Активность клеточной каталазы (рис. 4, 2) увеличивалась примерно в 2.5 раза в стадии перехода в стационарную фазу по сравнению с логарифмической фазой, а затем постепенно снижалась, достигая уровня 18 ч роста в поздней стационарной фазе.

Исследование соотношения восстановленной и окисленной форм глутатиона *Y. lipolytica*. Соотношение восстановленной и окисленной форм глутатиона в клетке является одним из важнейших параметров, который характеризует уровень окислительного стресса в клетке [24]. Значения соотношения восстановленной и окисленной форм глутатиона в клетках *Y. lipolytica* в логарифмической стадии и фазе перехода были практически одинаковыми (0.9 ± 0.1) и уменьшались примерно в 3 раза по мере перехода клеток в позднюю стационарную фазу ($0.3-0.4 \pm 0.05$) (рис. 5).

Анализ выживаемости клеток *Y. lipolytica*. Оценка выживаемости клеток *Y. lipolytica* на разных стадиях роста проводилась методом Коха. Анализ жизнеспособности клеток дрожжей *Y. lipolytica* показал, что выживаемость клеток в ходе продолжительного культивирования постепенно снижалась с 94% в 18 ч роста до ~80% в 120 ч (рис. 6).

Анализ энергетического статуса клеток *Y. lipolytica* по окрашиванию с потенциометрическим красителем MitoTracker Red. Митохондрии выполняют основную функцию в энергообеспечении клетки. Состояние митохондрий в процессе старения культуры оценивали цитометрически по окраске с MitoTracker Red. Флуоресцентный краситель MitoTracker Red несет на себе два положительно заряженных атома азота (обладает катионными свойствами), что позволяет ему накапливаться в митохондриях живых клеток с отрицательным мембранным потенциалом [25]. При анализе энергетического статуса клеток *Y. lipolytica* [26] на проточном цитометре оценивали распределение клеток в зависимости от их флуоресценции после окрашивания MitoTracker Red. Анализ энергетического статуса клеток *Y. lipolytica* показал, что в

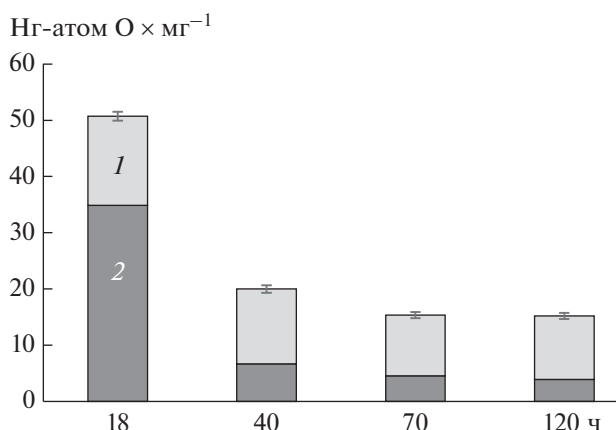


Рис. 3. Вклад альтернативной оксидазы митохондрий (1) и цианид-чувствительного дыхания клеток (2) в общую скорость дыхания *Y. lipolytica* в ходе продолжительного культивирования.

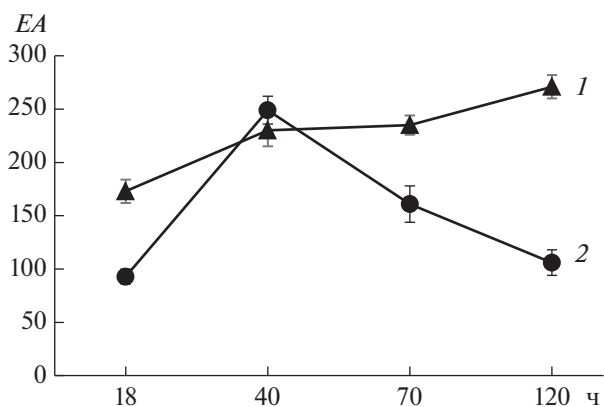


Рис. 4. Суммарная активность СОД (1, ед. акт \times мг $^{-1}$ белка) и каталазы (2, мкмоль $\text{H}_2\text{O}_2 \times$ мин $^{-1} \times$ мг $^{-1}$ белка) в клетках *Y. lipolytica*.

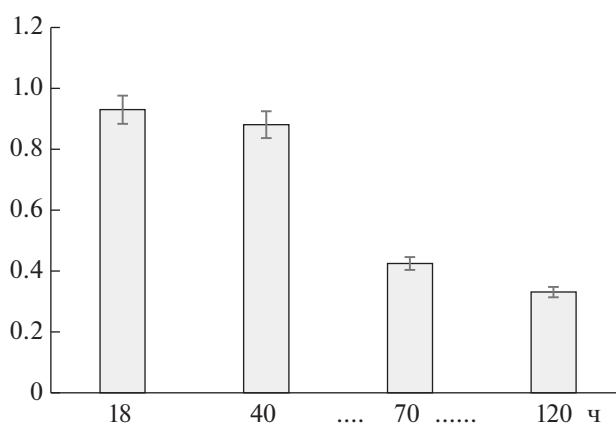


Рис. 5. Соотношение восстановленной и окисленной форм глутатиона в клетках *Y. lipolytica*.

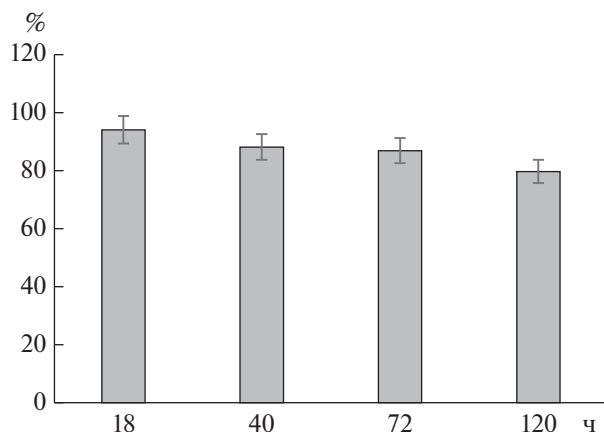


Рис. 6. Выживаемость клеток *Y. lipolytica*.

зависимости от уровня мембранного потенциала митохондрии распределялись на группы с высокими, средними и низкими показателями (рис. 7). В логарифмической фазе роста преобладали клетки с высоким и средним потенциалом митохондрий — до 97% (рис. 7а, б, д). При 40 и 70 ч культивирования сумма клеток с высокой и средней энергизацией снижалась до 60%. В поздней стационарной фазе роста суммарная доля клеток с высоким и средним уровнем энергизации снижалась до 42% (рис. 7в, г, д). Снижение энергетического статуса совпадало со снижением уровня дыхания вследствие снижения уровня метаболизма в стационарной фазе (рис. 3).

Окрашивание клеток *Y. lipolytica* LysoTracker Red DND 99. Лизосомы являются основными органеллами клетки, где происходит гидролиз различных макромолекул. Они характеризуются высокой концентрацией протонов и содержанием более 50 гидролаз с оптимальным рН ниже 6.36 [27]. Для детекции этих органелл в клетках используются специфические зонды на основе слабоосновных аминов, которые избирательно накапливаются в клеточных компартментах с низким рН и могут быть использованы для исследования биосинтеза и патогенеза лизосом [28]. Зонды группы LysoTracker, состоящие из флуорофора, связанного со слабым основанием, лишь частично протонируются при нейтральном рН, свободно проникают через клеточные мембраны и обычно концентрируются в сферических органеллах клетки. Было проведено прижизненное окрашивание клеток *Y. lipolytica* специфическим зондом LysoTracker Red DND 99, в результате чего было показано, что в клетках логарифмической фазы роста наблюдалось слабое окрашивание пристеночной области цитоплазмы без видимого усиления флуоресценции в сферических органеллах (рис. 8а), в то время как в клетках поздней ста-

ционарной фазы были отчетливо видны сферические области, которые можно отнести к лизосомальным структурам (рис. 8г).

В результате проведенных исследований на модели *Y. lipolytica* W29 была выполнена оценка некоторых показателей физиологического старения в ходе продолжительного культивирования дрожжей: параметров роста и основных показателей окислительно-восстановительного статуса клеток. Известно, что *Y. lipolytica* обладает полным набором ферментов дыхательной цепи и точками сопряжения, характерными для клеток млекопитающих. В ходе эксперимента в логарифмической фазе роста (18 ч) наблюдали высокую скорость дыхания, низкий уровень АФК (рис. 2), высокий уровень соотношения GSH/GSSG (рис. 5) и относительно невысокую активность антиоксидантных ферментов СОД и каталазы (рис. 4). Все вместе эти экспериментальные факты свидетельствуют о высоком восстановительном потенциале культуры в этой фазе. Переход в стационарную фазу сопровождался наибольшими изменениями в состоянии клеток — уровень АФК возрастал почти в 3 раза (рис. 2), дыхательная активность снижалась в 2.5 раза на фоне возрастания вклада альтернативной оксидазы (рис. 3), а также возрастала активность СОД и в большей мере активность каталазы (рис. 4), что подтверждало развитие окислительного стресса. Ранее при анализе неспецифических изменений проницаемости внутренней мембраны митохондрий в ходе роста и старения культуры дрожжей *Endomyces magnusii* также наблюдали увеличение активности митохондриальных антиоксидантных ферментов и уровня АФК [29]. По-видимому, высокая продукция АФК, наблюдаемая в этот период, приводит к индукции альтернативного цианид-резистентного пути переноса электронов, который является элементом антиоксидантной защиты, как показано в ряде исследований [30–32]. При этом накопленных ресурсов еще достаточно для поддержания соотношения GSH/GSSG на уровне, соответствующем логарифмической фазе роста: в этой стадии развития деление клеток идет еще достаточно активно.

Показатели окислительно-восстановительного статуса в стадии глубокого стационара указывали, с одной стороны, на снижение окислительного стресса, которое выражалось в некотором снижении уровня АФК (рис. 2) и активности каталазы (рис. 4, 2), однако, падение соотношения GSH/GSSG в 3 раза по сравнению с логарифмической стадией роста (рис. 5) отражало в целом уменьшение восстановительного потенциала клетки, что сопряжено со снижением способности клеток к интенсивному росту и делению. Согласно современным представлениям, снижение уровня GSH ниже определенного порогового значения

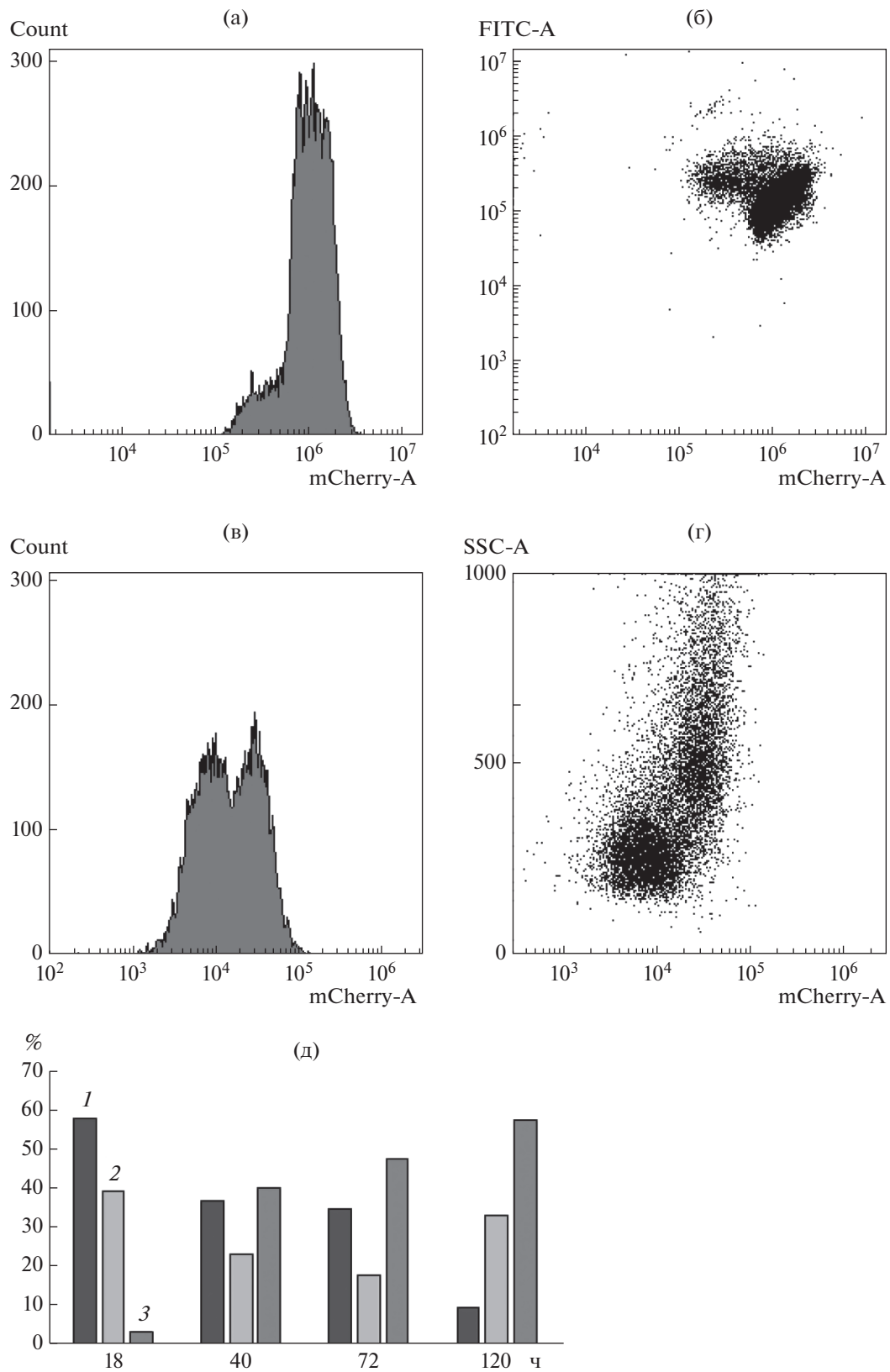


Рис. 7. Распределение клеток (%) в зависимости от интенсивности их флуоресценции (окраска потенциометрическим красителем MitoTracker Red): а, б – 18 ч роста; в, г – 120 ч; а, в – гистограмма; б, г – точечные графики; д – распределение клеток по степени энергизации митохондрий: 1 – высокий потенциал; 2 – средний потенциал; 3 – низкий потенциал.

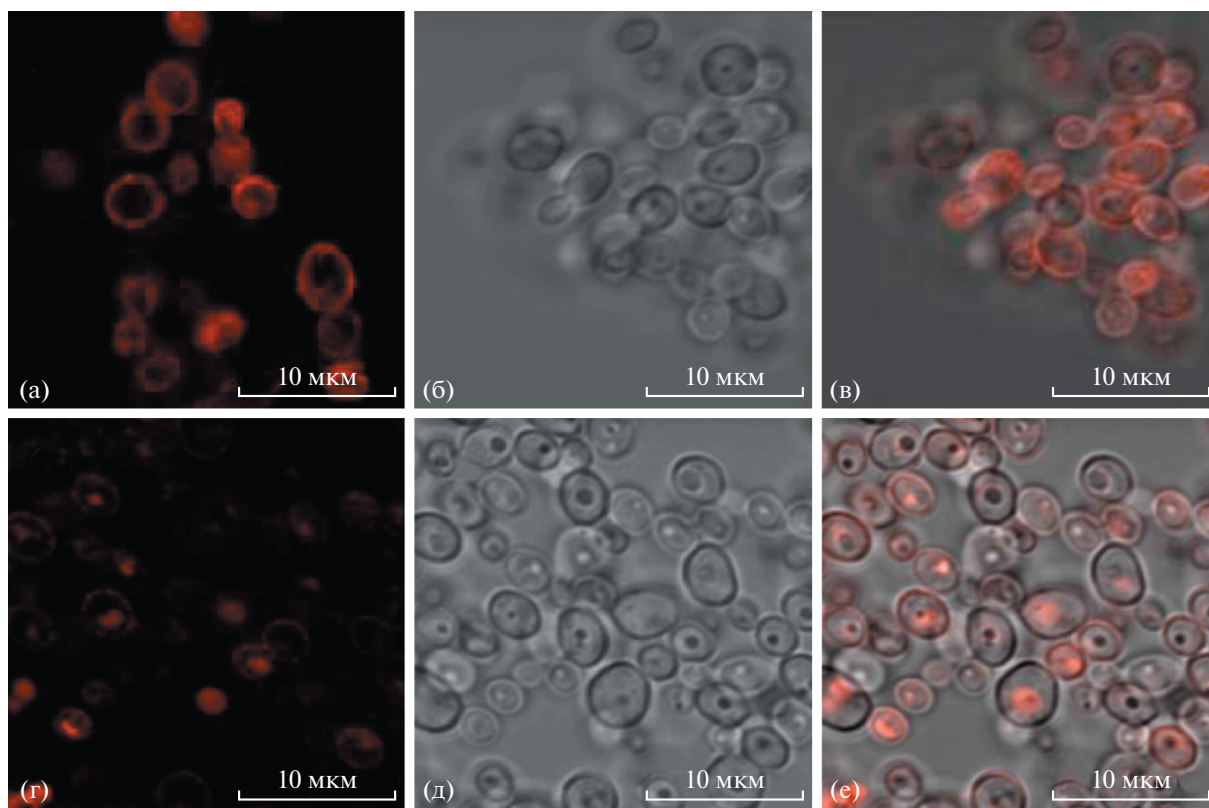


Рис. 8. Визуализация лизосом после окрашивания LysoTracker Red DND-99 при помощи флуоресцентного микроскопа: а, г — флуоресцентная микроскопия; б, д — оптическая микроскопия; в, е — наложение изображений.

ведет к появлению сигнала к развитию апоптоза, который инициируется активацией рецептора смерти или митохондриальным апоптопотическим сигналингом [33]. Это предположение подтверждалось общим снижением энергетического потенциала, которое характеризовалось уменьшением доли клеточной популяции с высоким мембранным потенциалом митохондрий (рис. 7д).

При длительном культивировании клеток митохондрии дрожжей претерпевают изменения, определяющие их последующее существование и их способность к пролиферации или переходу в стадию относительного покоя [34]. Клетки *Y. lipolytica* при снижении восстановительного потенциала после 70–120 ч культивирования сохраняли высокую жизнеспособность на уровне 80%, что может свидетельствовать об их переходе в состояние высокой устойчивости к окислительному стрессу.

Способность клеток *Y. lipolytica* W29 сохранять жизнеспособность в условиях продолжительного роста может быть связана с процессами аутофагии. При недостатке питательных веществ или факторов роста аутофагия считается неселективным и целенаправленным процессом, который приводит к массовой деградации любого цитозольного белка

и других макромолекул для доставки необходимых питательных веществ клеткам [35, 36]. Известно, что аутофагия может также избирательно воздействовать на клеточные структуры, такие как органеллы, ядерные компоненты, протеасомы, белковые агрегаты и т.д. в случае селективного цитопротекторного процесса. Результаты окрашивания показали, что количество активных лизосом увеличивалось, либо их биогенез индуцировался в стадии устойчивого стационара (рис. 8г), что свидетельствовало о протекании процессов аутофагии с участием лизосом. Это, в свою очередь, объясняет, с одной стороны, падение выживаемости, то есть фактическую гибель ~20% клеточной популяции, которая может происходить за счет аутофагии, а с другой — поддержание относительно стабильной выживаемости остальной части популяции.

При проведении исследований использовалось оборудование Центра коллективного пользования “Промышленные биотехнологии” Федерального исследовательского центра “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Song H.T., Yang Y.M., Liu D.K., Xu X.Q., Xiao W.J., Liu Z.L. et al. // *Bioengineered*. 2017. V. 8. № 5. P. 624–629.
<https://doi.org/10.1080/21655979.2017.1293219>
2. Louhasakul Y., Cheirsilp B., Treu L., Kougias P.G., Angelidaki I. // *Biotechnol. Appl. Biochem.* 2020. V. 67. № 6. P. 1020–1029.
<https://doi.org/10.1002/bab.1878>
3. Bae S.J., Park B.G., Kim B.G., Hahn J.S. // *Biotechnol. J.* 2020. V. 15. № 1. e1900238.
<https://doi.org/10.1002/biot.201900238>
4. Darvishi F., Ariana M., Marella E.R., Borodina I. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2018. V. 102. № 14. P. 5925–5938.
<https://doi.org/10.1007/s00253-018-9099-x>
5. Shi T.Q., Huang H., Kerkhoven E.J., Ji X.J. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2018. V. 102. № 22. P. 9541–9548.
<https://doi.org/10.1007/s00253-018-9366-x>
6. Patra P., Das M., Kundu P., Ghosh A. // *Biotechnology Advances*. 2021. V. 47. P. 107695.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107695>
7. Секова В.Ю., Гесслер Н.Н., Исакова Е.П., Антипов А.Н., Дергачева Д.И., Дeryabina Ю.И., Трубникова Е.В. // *Прикл. биохимия и микробиология*. 2015. Т. 51. № 6. С. 570–577.
8. Sekova V.Yu., Dergacheva D.I., Isakova E.P., Gessler N.N., Tereshina V.M., Deryabina Y.I. // *Metabolites*. V. 2019. № 9. P. 307.
<https://doi.org/10.3390/metabo9120307>
9. Korpys-Woźniak P., Kubiak P., Biatas W., Celińska E. // *Applied microbiology and biotechnology*. 2020. V. 104. № 22. P. 9785–9800.
10. Rzechonek D.A., Dobrowolski A., Rymowicz W., Mirończuk A.M. // *Bioresour Technol.* 2019. V. 271. P. 340–344.
<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.09.118>
11. Fickers P., Marty A., Nicaud J.-M. // *Biotechnol. Adv.* 2011. V. 29. № 6. P. 632–644.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.04.005>
12. Аринбасарова А.Ю., Бирюкова Е.Н., Меденцев А.Г. // *Прикладная биохимия и микробиология*. 2015. Т. 51. № 2. С. 122–131.
13. Dahiya R., Mohammad T., Alajmi M.F., Rehman M.T., Hasan G.M., Hussain A., Hassan M.I. // *Biomolecules*. 2020. V. 10. P. 882.
<https://doi.org/10.3390/biom10060882>
14. Dakik P., Titorenko V.I. // *Front. Genet.* 2016. V. 7. P. 177.
<https://doi.org/10.3389/fgene.2016.00177>
15. Postnikoff S.D.L., Johnson J.E., Tyler J.K. // *Microb. Cell.* 2017. V. 4. № 11. P. 368–375.
16. Herker E., Jungwirth H., Lehmann K.A., Maldener C., Fröhlich K.-Uwe., Wissing S. et al. // *J. Cell Biol.* 2004. V. 164. № 4. P. 501–507.
17. Vyssokikh M.Y., Holtze S., Averina O.A., Lyamzaev K.G., Panteleeva A.A., Marey M.V. et al. // *PNAS*. 2020. V. 117. № 12. P. 6491–6501.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1916414117>
18. Lei Y., Huang Y., Wen X., Yin Z., Zhang Z., Klionsky D.J. // *Antioxidants*. 2022. V. 11. P. 304.
<https://doi.org/10.3390/antiox11020304>
19. Deere D., Shen J., Vesey G., Bell P., Bissinger P., Veal D. // *Yeast*. 1998. V. 14. № 2. P. 147–160.
20. Deryabina Y., Isakova E., Antipov A., Saris N.E. // *J. Bioenerg. Biomembr.* 2013. V. 45. № 5. P. 491–504.
21. Костюк В.А., Потапович А.И., Ковалева Ж.В. // *Вопросы мед. химии*. 1990. № 2. С. 88–91.
22. Bradford M.M. // *Anal. Biochem.* 1976. V. 72. P. 248–254.
23. Рогов А.Г., Звягильская Р.А. // *Биохимия*. V. 2015. V. 80. № 4. С. 472–479.
24. Белозерская Т.А., Гесслер Н.Н. // *Прикл. биохимия и микробиология*. 2007. Т. 43. № 5. С. 565–575.
25. Poot M., Zhang Y.Z., Kramer J.A., Wells K.S., Jones L., Hanzel D.K. et al. // *J. Histochem. Cytochem.* 1996. V. 44. № 12. P. 1363–1372.
<https://doi.org/10.1177/44.12.8985128>
26. Monteiro L.B., Davanzo G.G., Aguiar C.F., Moraes-Vieira P.M.M. // *Methods X*. 2020. V. 7.
<https://doi.org/10.1016/j.mex.2020.100938>
27. Zhu H., Fan J., Du J., Peng X. // *Acc. Chem. Res.* 2016. PMID, 27661761.
28. Martins W.K., Santos N.F., Rocha C.S., Bacellar I.O.L., Tsubone T.M. // *Autophagy*. 2019. V. 15. № 2. P. 259–279.
<https://doi.org/10.1080/15548627.2018.1515609>
29. Deryabina Y., Isakova E., Sekova V., Antipov A., Saris N.E. // *Bioenerg. Biomembr.* 2014. V. 46. № 6. P. 479–492.
30. Veiga A., Arrabaça J.D., Loureiro-Dias M.C. // *FEMS Yeast Res.* 2003. V. 3. № 3. P. 239–245.
31. Vanlerberghe G.C. // *J. Mol. Sci.* 2013. V. 14. № 4. P. 6805–6847.
32. Saha, B., Borovskii, G., Panda, S.K. // *Plant Signal Behav.* 2016. V. 11. № 12. e1256530.
33. Shi Y., Buffenstein D.A. // *Integr. Comp. Biol. Res.* 2010. V. 50. № 5. P. 869–879.
34. Laporte D., Gouleme L., Jimenez L., Khemiri I., Sagotet I. // *eLife*. 2018. V. 7. e35685. doi.org/
<https://doi.org/10.7554/eLife.35685>
35. Dikic I. // *Annu. Rev. Biochem.* 2017. 86. № 5. P. 193–224.
<https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-044908>
36. Madeo F., Zimmermann A., Maiuri M.C., Kroemer G. // *J. Clin. Invest.* 2015. V. 125. № 1. P. 85–93.
<https://doi.org/10.1172/JCI73946>

Physiological Adaptation Features of the Poly-Extremophilic *Yarrowia lipolytica* Yeast W29 During Long-Lasting Cultivation

N. N. Gessler^a, N. O. Ivanova^a, A. S. Kokoreva^a, O. I. Klein^a, E. P. Isakova^a, and Y. I. Deryabina^{a, *}

^a A.N. Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Center of Biotechnology
of the Russian Academy of Sciences, Moscow 119071 Russia

*e-mail: yul_der@mail.ru

The study of the redox and mitochondria state, as well as some other hallmarks of cell aging was performed using the extremophilic yeast of *Yarrowia lipolytica* W29 during long-lasting cultivation for 120 h. An increase in the ROS level upon the transition to the stationary growth phase was accompanied by a decrease in the cell respiratory rates, an increase in the alternative oxidase share. Moreover the activities of superoxide dismutase and catalase rose. In the stationary growth phase, the ratio of glutathione/glutathione disulfide two-three-fold decreased. Cytometric studies of the populations *in vivo* stained with a potentiometric mitotracker showed a decrease in mitochondrial potential as the culture gets old. At the late stationary growth stage, some lysosomal processes in the *Y. lipolytica* cells were induced that apparently increased the resistance to oxidative stress and let the culture keep the survival rate at the level of 80%.

Keywords: stress, long-lasting cultivation, antioxidant enzymes, superoxide dismutase, catalase, reactive oxygen species, *Yarrowia lipolytica*