

УДК 577.112:579.861.043:535.31

ПЕРЕКРЕСТНАЯ АНТИСТРЕССОВАЯ ЗАЩИТА УФ-ОБЛУЧЕННЫХ КЛЕТОК ДРОЖЖЕЙ ПРИ УЧАСТИИ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ПЕПТИДНЫХ ФАКТОРОВ

© 2011 г. Л. И. Воробьева*, Е. Ю. Ходжаев*, М. М. Вустин**

*Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119899
e-mail: nvvorobieva@mail.ru

**ГосНИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов, Москва

Поступила в редакцию 30.09.2010 г.

Изучалось антистрессовое действие внеклеточных пептидов на УФ-облученные клетки дрожжей различных филогенетических групп. Показано, что дрожжи разных экологических и систематических групп, подверженные УФ-облучению летальной интенсивности, проявляют защитное и реактивирующее действие при участии внеклеточных пептидов. Наибольшая защитная активность обнаружена у пептидных реактивирующих факторов (РФ) пищевых дрожжей — *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces fragilis* и *Candida utilis*; наибольшая реактивирующая активность — у факторов из указанных культур, а также из *Debariomyces hansenii*. Показано перекрестное защитное и реактивирующее действие РФ дрожжей, принадлежащих к разным систематическим группам. Перекрестная защита увеличивалась в 2–3 раза после предварительного облучения факторов реактивации УФ-светом (активация), в отличие от их реактивирующего действия.

Реакция на стрессы у прокариотных и эукариотных микроорганизмов и у высших эукариот имеет большое сходство в отношении индукции классического механизма, включающего образование внутриклеточных сигнальных (сенсорных) молекул (часто в виде поврежденной ДНК). Однако микроорганизмы, обитающие в постоянно изменяющихся условиях окружающей среды, обладают дополнительными средствами антистрессовой защиты с использованием внеклеточных химических сенсоров.

В настоящее время известно, что большая часть стрессовых ответов микроорганизмов реализуется с участием внеклеточных сенсорных факторов [1]. Индукция, опосредованная внеклеточными метаболитами, важна для быстрого ответа на внезапное стрессовое воздействие, что особенно необходимо для организмов, подвергающихся стрессам летальной интенсивности. Кроме того, диффундирующие сенсорные молекулы выполняют превентивную роль в популяции микроорганизмов, предупреждая клетки о возможной угрозе жизни.

Основополагающие исследования образования и защитного действия внеклеточных пептидных факторов в условиях различных стрессов на примере *Escherichia coli* были выполнены Р. Роубери [2]. В наших работах впервые было показано, что различные штаммы *E. coli*, *Luteococcus japonicus* subsp. *casei* и низшие эукариоты — дрожжи в обычных условиях роста выделяют в среду вещества пептидной природы не только защитного, но и реактивирующего действия (реактивирующий фак-

тор, РФ) [3–5]. РФ присутствуют в культуральной жидкости (КЖ) и функционируют в ничтожных количествах, а их активность, по-видимому, обусловлена мембранным механизмом действия, о чем свидетельствует концентрационная зависимость и зависимость от состояния цитоплазматической мембраны [6]. Показано участие сенсорных белковых экзометаболитов в защите и реактивации клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis*, *Kluyveromyces lactis* и перекрестное действие РФ дрожжей *S. cerevisiae* и бактерий *L. casei* [7].

В настоящей работе мы расширили круг изучаемых дрожжей, включив в число объектов представителей других семейств и обитателей различных экологических, имеющих важное практическое применение.

Цель работы — изучение защитной и реактивирующей по отношению к УФ-излучению активности представителей различных систематических и экологических групп дрожжей.

МЕТОДИКА

Объекты исследований. В работе изучались дрожжи *S. cerevisiae* ВКПМ Y-1200, *K. lactis* ВКПМ Y-1174, *C. utilis* ВКПМ Y-25, *D. hansenii* ВКПМ Y-1007, *A. shoenii* ВКПМ Y-2895, *R. glutinis* ВКПМ Y-993, *Phaffia rhodozyma* ВКМП Y-1657, полученные из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ), *Y. lipolytica* и *E. mag-nusii*, предоставленные д.б.н. Р.А. Звягильской.

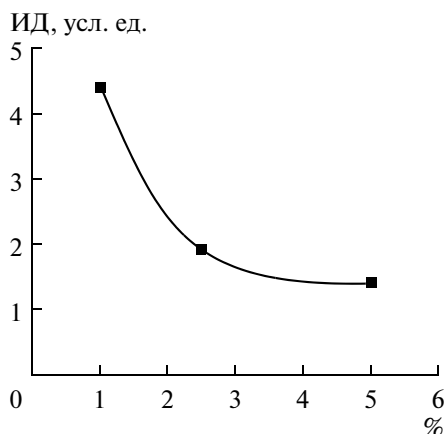


Рис. 1. Защитный эффект активированного РФ из *S. cerevisiae*, выделенного из культур того же штамма, выращенных в присутствии разных концентраций глюкозы (%).

Аскомицетные дрожжи *Debariomyces hansenii* выделены из муравейника. Это соле- и кислотоустойчивые дрожжи, встречаются в морской воде, вареньях, сиропах и джемах, играют отрицательную роль в рассолах. Активные продуценты липидов, протеаз и инулиназ, хорошо усваивают лактозу и образуют большую биомассу при росте на молочной сыворотке [8]. Эти дрожжи давно используются в пищевой промышленности при приготовлении сыровяленых колбас [9].

Arthroascus shoenii — аскомицетовые дрожжи семейства Saccaromycetaceae, часто выделяются из сокоотечений дуба. *Rhodotorula glutinis* — аспорогенные красные дрожжи базидиомицетного аффинитета семейства Стуртоссасеае, типичные фитобионты, обитают на поверхности листьев различных растений. Служат источниками внеклеточных протеаз, L-аспарагиназы (антираковое средство) и каротиноидов [8]. С использованием этих дрожжей разработан способ получения фенилаланинаммиаклиазы — фермента, участвующего у растений в синтезе фитоалексинов, защищающих растения от стрессов [9].

Phaffia rhodozyma — базидиомицетовые красные дрожжи, эпифиты, выделяются только из сокоотечений деревьев, максимальная температура роста 25°C. Единственные дрожжи, способные синтезировать каротиноид астаксантин, широко используемый в медицине, косметике и как кормовая добавка при выращивании лососевых рыб.

Yarrowia lipolytica, также дрожжи аскомицетового аффинитета семейства Dipodascaceae, выделены с поверхности экскретирующих соль листьев пустынных растений Африки. Осмо-, соле- и щелочустойчивый штамм дрожжей, в отличие от других представителей этого вида, способен к быстрому

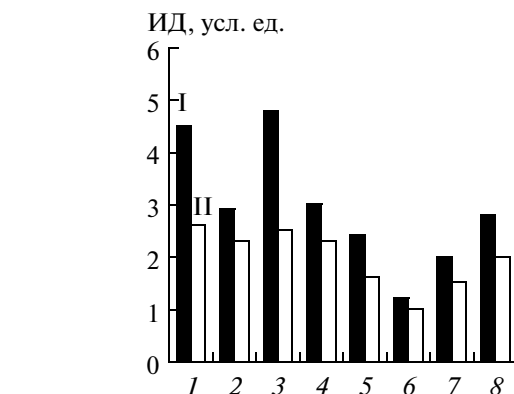


Рис. 2. Защитный (I) и реактивирующий (II) эффекты РФ, синтезированных различными штаммами дрожжей, на УФ-облученные клетки тех же культур: 1 — *S. cerevisiae*; 2 — *C. utilis*; 3 — *K. lactis*; 4 — *D. hansenii*; 5 — *R. glutinis*; 6 — *A. shoenii*; 7 — *P. rhodozyma*; 8 — *Y. lipolytica*. Во всех экспериментах РФ предварительно активировался облучением УФ-светом (доза — 146 Дж/м²).

росту при щелочных значениях pH. Предложены в качестве продуцентов лимонной кислоты из углеводородов нефти, являются хорошим продуцентом липаз и протеаз [10].

Endomyces magnusii, аскомицеты, дрожжеподобные грибы, способные образовывать истинный мицелий, облигатные паразиты грибов.

Дрожжи выращивали в колбах на 500 мл, содержащих 100 мл среды, на качалке (200 об/мин) при 28°C в аэробных условиях на 4-баллинговом солодовом сусле (pH 6.5) и в синтетической среде следующего состава (%): (NH₄)₂SO₄ — 0.5, KH₂PO₄ — 0.1, MgSO₄ · 7H₂O — 0.05, CaCl₂ · 2H₂O — 0.01, NaCl — 0.01, глюкоза — 1.0, дрожжевой экстракт — 0.1. Оптическую плотность растущей культуры дрожжей измеряли нефелометрически (ФЭК 56 ПМ, Россия, кюветы 3 мл, фильтр № 6). Использовали культуру конца экспоненциальной фазы роста.

Клетки дрожжей отделяли от среды центрифугированием (10000 g, 20 мин), промывали в 0.05 M Na-фосфатном буфере (pH 7.0) и суспендировали в том же буфере до оптической плотности 0.8. Полученные клеточные суспензии служили объектами стрессорных воздействий. Отделенную от клеток КЖ использовали в качестве источника РФ. Численность жизнеспособных клеток в суспензиях дрожжей определяли по титру колониеобразующих единиц (КОЕ/мл) после высева 10^N-кратно разведенных суспензий на соответствующие плотные среды с 1.5% агаром. Для посева использовали микрометод с внесением аликвоты суспензий объемом 5 мкл в шестикратной повторности для каждого разведения. Посевы инкубировали при 30°C (*P. rhodozyma* при 22°C) в течение 48 ч.

Определение защитной и реактивирующей активности РФ. Суспензии клеток дрожжей подвергали

Таблица 1. Защитное и реактивирующее действие РФ из *D. hansenii* и *R. glutinis* на УФ-облученные клетки той же культуры

Условия эксперимента	Численность жизнеспособных клеток $\times 10^5$ КОЕ/мл	Выживаемость, %	Индекс деления
<i>D. hansenii</i>			
Защита			
Интактные клетки	80 \pm 5.1	100	–
Клетки, инкубированные:			
с NaCl, затем облученные	0.010 \pm 0.001	0.013	1.0
с РФ _{акт} , затем облученные	0.030 \pm 0.002	0.038	3.0
Реактивация			
Интактные клетки	70 \pm 3.9	100	–
Облученные клетки, затем инкубированные:			
с NaCl	0.012 \pm 0.001	0.017	1.0
с РФ _{акт}	0.028 \pm 0.002	0.040	2.3
<i>R. glutinis</i>			
Защита			
Интактные клетки	160 \pm 13.1	100	–
Клетки, инкубированные:			
с NaCl, затем облученные	0.014 \pm 0.001	0.009	1.0
с РФ _{акт} , затем облученные	0.034 \pm 0.002	0.021	2.4
Реактивация			
Интактные клетки	120 \pm 7.8	100	–
Облученные клетки, затем инкубированные:			
с NaCl	0.036 \pm 0.003	0.030	1.0
с РФ _{акт}	0.056 \pm 0.003	0.047	1.6

УФ-облучению на установке из двух параллельно смонтированных ламп БУВ-15 (Россия) мощностью 30 Вт, с эмиссией в области 253.7 нм. Для подбора доз облучения проводили предварительные эксперименты для установления зависимости доза–ответ. В клеточные суспензии вносили препараты РФ в стандартном соотношении (1 : 1 об./об.) до или после облучения для определения защитной и реактивирующей активности, соответственно, и инкубировали в течение 15 мин при 30°C. В ряде экспериментов препараты РФ подвергали УФ-облучению или нагреванию перед внесением в суспензии клеток в соответствии с ранее описанными методиками [11].

В некоторых экспериментах РФ из ряда штаммов, активированных УФ-облучением, предварительно инкубировали с протеиназой К (50 мкг/мл) в течение 1 ч при 37°C в присутствии Трис-буфера (20 мМ) – ЭДТА (5 мМ), pH 8.0.

Эффективность защитного или реактивирующего эффекта оценивали по соотношениям титров

КОЕ в суспензиях, инкубированных с РФ до или после УФ-облучения, к титру КОЕ в облученной культуре без пред- и постинкубации. При оценках числа КОЕ принимали в расчет разбавление исходной клеточной суспензии препаратом РФ.

Статистическая обработка. В таблицах приведены средние арифметические величины из 3 независимых экспериментов и их стандартные отклонения.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Чувствительность клеток дрожжей к УФ-облучению снижалась в следующем порядке: *A. shoenii*, *D. hansenii*, *S. cerevisiae*, *K. lactis*, *C. utilis*, *P. rhodozyma*, *E. magnusii*, *Y. lipolytica*, *R. glutinis*. Наибольшей устойчивостью обладали красные дрожжи *R. glutinis*, *P. rhodozyma* за счет высокого содержания каротиноидных пигментов и *Y. lipolytica*, выделенная из мест с высокой солнечной радиацией. К дрож-

Таблица 2. Защитное и реактивирующее действие РФ из *A. shoenii* и *P. rhodozyma* на УФ-облученные клетки той же культуры

Условия эксперимента	Численность жизнеспособных клеток $\times 10^5$ КОЕ/мл	Выживаемость, %	Индекс деления
<i>A. shoenii</i>			
Защита			
Интактные клетки	17 \pm 0.59	100	—
Клетки, инкубированные:			
с NaCl, затем облученные	0.010 \pm 0.001	0.059	1.0
с РФ _{акт} , затем облученные	0.012 \pm 0.001	0.071	1.2
Реактивация			
Интактные клетки	15 \pm 0.41	100	—
Облученные клетки, затем инкубированные:			
с NaCl	0.011 \pm 0.002	0.073	1.0
с РФ _{акт}	0.011 \pm 0.001	0.073	1.0
<i>P. rhodozomat</i>			
Защита			
Интактные клетки	100 \pm 5.4	100	—
Клетки, инкубированные:			
с NaCl, затем облученные	0.012 \pm 0.001	0.012	1.0
с РФ _{акт} , затем облученные	0.024 \pm 0.002	0.024	2.0
Реактивация			
Интактные клетки	70 \pm 3.8	100	—
Облученные клетки, затем инкубированные:			
с NaCl	0.022 \pm 0.002	0.031	1.0
с РФ _{акт}	0.034 \pm 0.002	0.049	1.5

Таблица 3. Защитное и реактивирующее действие РФ из *Y. lipolytica* на УФ-облученные клетки той же культуры

Условия эксперимента	Численность жизнеспособных клеток $\times 10^5$ КОЕ/мл	Выживаемость, %	Индекс деления
Защита			
Интактные клетки	90 \pm 4.3	100	—
Клетки, инкубированные:			
с NaCl, затем облученные	0.008 \pm 0.001	0.009	1.0
с РФ, затем облученные	0.022 \pm 0.001	0.024	2.8
с РФ _{акт} , затем облученные	0.022 \pm 0.001	0.024	2.8
Реактивация			
Интактные клетки	88 \pm 4.8	100	—
Облученные клетки, затем инкубированные:			
с NaCl	0.006 \pm 0.001	0.007	1.0
с РФ	0.012 \pm 0.001	0.014	2.0
с РФ _{акт}	0.012 \pm 0.001	0.014	2.0

Таблица 4. Перекрестное действие РФ из некоторых штаммов дрожжей на УФ-облученные клетки тех же культур

Тест-культура	Источник РФ					
	<i>S. cerevisiae</i>		<i>C. utilis</i>		<i>K. fragilis</i>	
	РФ	РФ _{акт}	РФ	РФ _{акт}	РФ	РФ _{акт}
Защита						
<i>S. cerevisiae</i>	—	—	1.7	2.6	1.5	4.2
<i>C. utilis</i>	1.3	2.3	—	—	1.7	2.9
<i>K. fragilis</i>	1.7	4.2	1.6	3.3	—	—
Реактивация						
<i>S. cerevisiae</i>	—	—	2.0	2.0	2.4	2.3
<i>C. utilis</i>	1.5	1.6	—	—	1.6	1.7
<i>K. fragilis</i>	2.1	2.1	1.8	1.9	—	—

жам, устойчивым к УФ-облучению, относятся также дрожжеподобные грибы *E. magnusii*.

В предварительных экспериментах для всех изучаемых дрожжей было подобрано время экспозиции, при котором выживаемость находилась в пределах 0.01–0.05%. При такой выживаемости, как было ранее показано на модельной тест-культуре *S. cerevisiae*, РФ проявлял максимальный защитный и реактивирующий эффекты [11]. Чем объясняется такой характер зависимости? Известно, что репарационные системы в клетках присутствуют в низких концентрациях, особенно ферменты репарации ДНК [12]. При слабом облучении (высокая выживаемость) индуцируются ферменты расщепления димеров тимина (главный продукт УФ-облучения) и активируются ферменты репарации. Летальные дозы УФ-облучения приводят к образованию такого количества димеров, при котором ферменты репарации подавлены, и именно такие клетки становятся наиболее восприимчивыми к внешним факторам реактивации [13].

Оптимальное содержание глюкозы для образования РФ подбирали при культивировании дрожжей на синтетической среде. Для ряда ферментов была показана прямая зависимость синтеза белка от содержания цАМФ, уровень которого повышался при снижении концентрации глюкозы [14]. Из рис. 1 видно, что при снижении содержания глюкозы с 5 до 1% образование РФ клетками дрожжей заметно увеличивалось.

Из данных табл. 1–3 видно, что защитное и реактивирующее действие проявляли РФ дрожжей из разных экотопов, при этом очень слабое у *A. schoenii* и наиболее сильное у *Y. lipolytica* и *D. hansenii*. Наиболее высокий защитный эффект РФ, обнаруженный у *Y. lipolytica*, можно отчасти объяснить его высокой устойчивостью к другим стрессам (см. выше) и существованием перекрестной стрессовой устойчивости [13].

На рис. 2 представлены данные по сравнительному защитному и реактивирующему действию РФ изученных дрожжей, откуда видно, что защитное действие превышало реактивирующее. Наибольшей эффективностью обладал РФ близких в систематическом отношении пищевых дрожжей *S. cerevisiae* и *K. lactis*. У дрожжей, выделенных из природных экотопов, особенно окрашенных штаммов *R. glutinis* и *P. rhodozyma*, действие РФ было менее выражено, по-видимому, в связи с наличием других природных защитных систем, например каротиноидов. Кроме того, в тех стрессовых условиях, в которых фактически обитают эти дрожжи в природе, в первую очередь, снижается синтез рРНК и рибосомных белков [15], поскольку синтез рибосом связан с большими энергетическими затратами. Более слабый рост дрожжей, выделенных из экстремальных экотопов, наблюдался и в наших исследованиях.

Ранее сообщалось о перекрестном действии РФ дрожжей *S. cerevisiae* и бактерий *L. casei*, а в составе РФ этих микроорганизмов были обнаружены пептиды с идентичной молекулярной массой (ММ) [16]. Предварительная обработка РФ протеиназой К приводила к существенному снижению реактивирующей активности: РФ из *S. cerevisiae* терял ее на 86%, РФ из *K. lactis* – на 67%, РФ из *C. utilis* – на 89% (данные не приведены). Можно сделать вывод о том, что реактивирующая активность преимущественно обусловлена факторами белковой природы.

В настоящем исследовании было показано перекрестное защитное и реактивирующее действие РФ разных дрожжей (табл. 4). Причем перекрестная защита увеличивалась в 2–3 раза при активации (облучение) РФ, которая, впрочем, не влияла на реактивирующее действие. Наблюдение свидетельствует о нестрогой специфичности РФ, образованных *S. cerevisiae*, *K. lactis* и *C. utilis*, которая еще больше снижалась после их облучения. Возможно, при этом происходило изменение конфор-

мации пептида или каких-то его групп, что облегчало его узнавание и связывание с рецепторными белками цитоплазматической мембраны. В случае реактивации облученных клеток может происходить модификация не только сенсорных молекул, но и рецепторов, что может снижать их сродство.

В работе были использованы штаммы, имеющие разнообразное биотехнологическое применение. При процессинге (например, при получении этанола) дрожжи подвергаются воздействию ряда стрессорных факторов. Использование природных протекторных факторов может увеличить выход полезных продуктов за счет снижения ингибирующего действия стрессоров на клетки продуцентов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rowbury R.J. // Sci. Prog. 2003. V. 86. № 4. P. 313–332.
2. Rowbury R.J. // Sci. Prog. 2001. V. 84. № 3. С. 205–233.
3. Воробьёва Л.И., Ходжаев Е.Ю., Пономарева Г.М. // Микробиология. 2003. Т. 72. № 4. С. 482–487.
4. Воробьёва Л.И., Ходжаев Е.Ю., Пономарева Г.М., Брюханов А.Л. // Прикл. биохимия и микробиология. 2003. Т. 39. № 2. С. 202–207.
5. Воробьёва Л.И., Федотова А.В., Ходжаев Е.Ю. // Прикл. биохимия и микробиология. 2010. Т. 46. № 6. С. 1–7.
6. Воробьёва Л.И., Ходжаев Е.Ю., Мулюкин А.Л., Торопыгин И.Ю. // Прикл. биохимия и микробиология. 2009. Т. 45. № 5. С. 544–549.
7. Воробьёва Л.И., Ходжаев Е.Ю. // Прикл. биохимия и микробиология. 2010. Т. 46. № 2. С. 191–197.
8. Квасников У.И., Щелокова И.Ф. Дрожжи. Биология. Пути использования. Киев: Наукова Думка, 1991. С. 300.
9. Бабьева И.П., Чернов И.Ю. Биология дрожжей. М.: Товарищество научных изданий КМК, 2004. С. 122.
10. Walker G.M. // The Desk Encyclopedia of Microbiology. Ed. Schaechter M. N.Y.: Academic Press, 2009. P. 1174–1188.
11. Воробьёва Л.И., Ходжаев Е.Ю., Пономарева Г.М. // Прикл. биохимия и микробиология. 2008. Т. 44. № 2. С. 176–180.
12. Booth I.R. // Int. J. Food Microbiol. 2002. V. 78. № 1–2. P. 19–30.
13. Rowbury R.J. // J. Appl. Microbiol. 2001. V. 90. № 2. P. 677–695.
14. Глик Б., Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. М.: Мир, 2002. С. 107–108.
15. Gasch A.P., Spellman P.T., Kao C.M., Carmel-Harel O., Eisen M.B., Storz G., Botstein D., Brown P.O. // Mol. Biol. Cell. 2000. V. 11. № 12. P. 4241–4257.
16. Воробьёва Л.И., Ходжаев Е.Ю., Пономарева Г.М. // Прикл. биохимия и микробиология. 2005. Т. 41. № 2. С. 171–175.

Antistress Cross-Protection of UV Irradiated Yeast Cells with Participation of Extracellular Peptide Factors

L. I. Vorob'eva^a, E. Yu. Khodzhaev^a, and M. M. Vustin^b

^a Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

e-mail: nvvorobieva@mail.ru

^b Research Institute of Genetics and Selection of Industrial Microorganisms, Moscow, Russia

Received September 30, 2010

Abstract—Antistress effect of extracellular peptides on UV irradiated yeast of different phylogenetic groups was studied. Yeast from different ecotopes and taxonomic groups exposed to UV radiation of a lethal intensity showed a protective effect and reactivating effect with participation of extracellular peptides. The highest protective activity was found in peptide reactivation factors (RFs) of bakery yeast—*Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces fragilis*, and *Candida utilis*; the highest reactivating activity was exhibited by factors of the above-mentioned cultures and *Debariomyces hansenii*. Cross-protective and reactivating effects of RFs of yeast belonging to different taxonomic groups were demonstrated. Cross-protection increased two to three times after preexposure of reactivation factors to UV light (activation) in contrast to their reactivating effect.