

УДК 579.222  
AGRIS F62

https://doi.org/10.33619/2414-2948/61/02

## АКТИВНОСТЬ АНТИОКСИДАНТНЫХ ФЕРМЕНТОВ ПОЛИЭКСТРЕМОФИЛЬНЫХ ДРОЖЖЕЙ *YARROWIA LIPOLYTICA* ПРИ РАЗВИТИИ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА В ХОДЕ ПРОДОЛЖИТЕЛЬНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

©**Секова В. Ю.**, ORCID: 0000-0002-7366-1083, SPIN-код: 1849-1566,  
ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН,  
г. Москва, Россия, beauveria606@gmail.com

©**Боброва Е. А.**, ORCID: 0000-0001-6541-4552, Московский политехнический университет,  
г. Москва, Россия, eckaterina.bobrova@icloud.com

©**Исакова Е. П.**, ORCID: 0000-0003-3250-1814, SPIN-код: 1736-8167, канд. биол. наук,  
ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН,  
г. Москва, Россия, elen\_iss@mail.ru

©**Дерябина Ю. И.**, ORCID: 0000-0002-8850-4881, SPIN-код: 8599-0143, канд. биол. наук,  
ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН,  
г. Москва, Россия, yul\_der@mail.ru

## THE ANTIOXIDANT ENZYMES ACTIVITY FROM THE POLY-EXTROMOPHILIC *YARROWIA LIPOLYTICA* YEAST UNDER OXIDATIVE STRESS DURING LONG-LASTING CULTIVATION

©**Sekova V.**, ORCID: 0000-0002-7366-1083, SPIN-code: 1849-1566, Federal Research Center  
“Fundamentals of Biotechnology” RAS, Moscow, Russia, beauveria606@gmail.com

©**Bobrova E.**, ORCID: 0000-0001-6541-4552, Moscow Polytechnic University,  
Moscow, Russia, eckaterina.bobrova@icloud.com

©**Isakova E.**, ORCID: 0000-0003-3250-1814, SPIN-code: 1736-8167, Ph.D., Federal Research  
Center “Fundamentals of Biotechnology” RAS, Moscow, Russia, elen\_iss@mail.ru

©**Deryabina Yu.**, ORCID: 0000-0002-8850-4881, SPIN code: 8599-0143, Ph.D., Federal Research  
Center “Fundamentals of Biotechnology” RAS, Moscow, Russia, yul\_der@mail.ru

*Аннотация.* Перекись водорода является одной из наиболее распространенных активных форм кислорода, способной свободно диффундировать через клеточные мембраны, вызывая изменения редокс-статуса клеток и развитие окислительного стресса. В работе показано, что эффекты, вызываемые перекисью водорода, дозозависимы и могут вызывать как повреждение клеток, так и усиление их устойчивости к окислительному стрессу. В данной работе изучалось влияние различных доз H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> на редокс-статус клеток дрожжей *Yarrowia lipolytica* в процессе длительного культивирования. Было показано, что введение оксиданта в логарифмической стадии роста имеет отсроченный эффект на уровень АФК в поздней стационарной стадии роста. При этом зависимость окислительно-восстановительного статуса от вводимой концентрации не линейна, что позволяет предположить инициацию различных сигнальных механизмов разными концентрациями оксиданта.

*Abstract.* Hydrogen peroxide is one of the most widespread reactive oxygen species, which can diffuse through cell membranes, causing changes in the redox status of cells and the development of oxidative stress. The results show that the effects caused by hydrogen peroxide are dose-dependent and can lead to both damage to cells and an increase in their resistance to

oxidative stress. In this study, we assayed the effect of various concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on the redox status of the *Yarrowia lipolytica* yeast during long-lasting cultivation. The oxidant application to the cells in the logarithmic growth stage was shown to delay the impact on the ROS level in the late stationary growth stage. In this case, the dependence of the injected concentration on the redox status is not linear, which suggests triggering different signaling mechanisms by various concentrations of the oxidant.

**Ключевые слова:** дрожжи, *Yarrowia lipolytica*, окислительный стресс, каталаза, супероксиддисмутаза, активные формы кислорода.

**Keywords:** yeast, *Yarrowia lipolytica*, oxidative stress, catalase, superoxide dismutase, reactive oxygen species.

### Введение

Активные формы кислорода (АФК), в частности, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> играют неоднозначную роль в биологических системах [1–2]. Высокие концентрации H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> вызывают окислительный стресс, в то время как при низких концентрациях это соединение является триггером многочисленных сигнальных путей клетки [3]. При низких концентрациях H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> также играет решающую роль в индукции т. н. гормезиса – явления, заключающегося в приобретении устойчивости к неблагоприятным воздействиям при мягком воздействии другого стрессового фактора. При этом потенциальный эффект H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> зависит не только от концентрации, но и от физиологического состояния клетки [4].

Продолжительное культивирование дрожжей приводит к накоплению в клетках повреждений, связанных с (1) накоплением мутаций и последующей утратой репродуктивной способности; (2) появлению повреждений дыхательной цепи, вызывающих развитие окислительного стресса по механизму с положительной обратной связью [5]. В этой связи фундаментальный и практический интерес представляет изучение гормезиса, вызываемого различными неблагоприятными воздействиями, как фактора защиты клеток против старения. Исследования, проведенные на модели дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, показали, что умеренный окислительный стресс, вызванный как варьированием источников углерода, так и предобработкой низкими дозами H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, способствует развитию устойчивости к сильному окислительному стрессу [4, 6], а инициируемые повышением АФК сигнальные события в логарифмической стадии роста дрожжевой культуры приводят к увеличению метаболической активности клеток в поздней стационарной стадии роста [7].

Несмотря на широкое практическое и фундаментальное применение *S. cerevisiae* в качестве модели окислительно-восстановительных процессов в клетках млекопитающих, этот объект имеет ряд недостатков. Во-первых, *S. cerevisiae* являются факультативным аэробом, способным к утилизации преимущественно субстратов бродильного типа. Во-вторых, этот вид дрожжей не имеет комплекса I дыхательной цепи митохондрий, а также содержит убихинон вида Q6, который значительно отличается по своей структуре от убихинона «животного типа» Q9-Q10. По этой причине в качестве модели для изучения гормезиса, обусловленного H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, мы выбрали лишённые этих недостатков полиэкстремофильные дрожжи *Yarrowia lipolytica*, которые являются строго аэробным микроорганизмом с полностью компетентной дыхательной цепью митохондрий, и, в отличие от *S. cerevisiae*, содержат убихинон вида Q9, с девятью единичными изопреноидными боковыми цепями и, таким образом, обнаруживают высокую степень гомологии с

убихиноном Q9-Q10 [8], обнаруженным у млекопитающих. Более того, девятнадцать из 23 вспомогательных субъединиц митохондриального комплекса I *Y. lipolytica* имеют явные ортологи в I комплексе млекопитающих [9].

Предлагаемый модельный организм — полиэкстремофильные дрожжи *Y. lipolytica* — устойчив к ряду неблагоприятных воздействий и обладает гибкой системой редокс-адаптации, позволяющей эффективно переносить повышение уровней генерации АФК в клетках без заметных изменений параметров роста культуры [10–13]. Несмотря на множество проведенных ранее работ по изучению стрессовых воздействий на клетки дрожжей *Y. lipolytica*, ключевая сигнальная роль АФК в регуляции метаболизма этого организма остается неясной.

В данной работе изучалось влияние различных концентраций перекиси водорода на окислительно-восстановительный статус в процессе продолжительного культивирования дрожжей *Y. lipolytica*.

#### *Материал и методы исследования*

*Объект исследования и условия культивирования.* В работе использован штамм *Y. lipolytica* W29 (дикий тип), полученный из коллекции типовых штаммов CIRM-Levures (Франция). Культивирование штамма проводили как описано в работе [14]. Культуры инкубировали в 750 мл колбах Эрленмейера, содержащих 100 мл среды, на шейкере при температуре 28°C и скорости аэрации 180 об./мин. Оптическую плотность (ОП) культуры оценивали спектрофотометрическим методом при длине волны 590 нм. При достижении культурой стационарной стадии роста (18 ч, ОП<sub>590нм</sub> = 7,5–8,0) в культуральную жидкость вносили перекись водорода в конечной концентрации 10, 15 и 25 мМ, после чего различные физиолого-биохимические параметры оценивались во временных точках 24, 40 и 120 ч роста культуры, что соответствовало поздней экспоненциальной, ранней и поздней стационарным стадиям роста культуры, соответственно.

*Приготовление клеточных гомогенатов.* Для изучения активности антиоксидантных ферментов возникла необходимость разработки метода приготовления клеточных экстрактов из очень небольшого (20–80 мг) количества влажной биомассы из-за необходимости производить отбор проб в течение продолжительного культивирования без значительного нарушения параметров аэрации. Для этого из каждой колбы отбирали по 5 мг клеточной суспензии, для поддержания постоянного объема после отбора проб в колбы вносили по 5 мл стерильной дистиллированной воды. Клеточные суспензии центрифугировали в пластиковых пробирках при 6 000 g, после чего осажденную биомассу переносили на фильтр “Milli Q”, промывали дистиллированной водой и отжимали вручную. Полученные таким образом пеллеты взвешивали и помещали в стеклянный притертый гомогенизатор, где растирали на льду в течение 60 с. Полученный гомогенат разводили в соотношении 1:10 в среде следующего состава: MES — 10 мМ, сорбит — 0.5 М, маннит — 0.5 М, ЭДТА — 5 мМ, фенилметилсульфонилфторид, ФМСО — 0,5 мг/мл; рН 6,5. Полученную суспензию переносили в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл и осаждали клеточный дебрис при 15 000 g в течение 20 мин при температуре 0–4°C. Клеточные экстракты использовали для исследования активности ферментов первой линии защиты — СОД и каталазы.

*Уровень АФК.* Для оценки уровня АФК в клетках использовали флуоресцентный краситель эфир дигидро-2',7'-дихлорофлуоресцеина диацетата (ДХФДА). В клеточную суспензию дрожжей, разведенную буфером PBS в соотношении 1:2, добавляли 4 мМ раствор ДХФДА (Sigma, США) 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 600 мкМ 2,2'-азобис(2-метилпропионамидин) дигидрохлоридом (АМПА). Измерение флуоресценции полученной суспензии проводили в 96-луночной планшете для измерения флуоресценции при длине волны возбуждения 485 нм и длине волны эмиссии 528 нм каждые 10 мин на микропланшетном фотофлуориметре Synergy 2 Bio Teck, США) при чувствительности 60% [15].

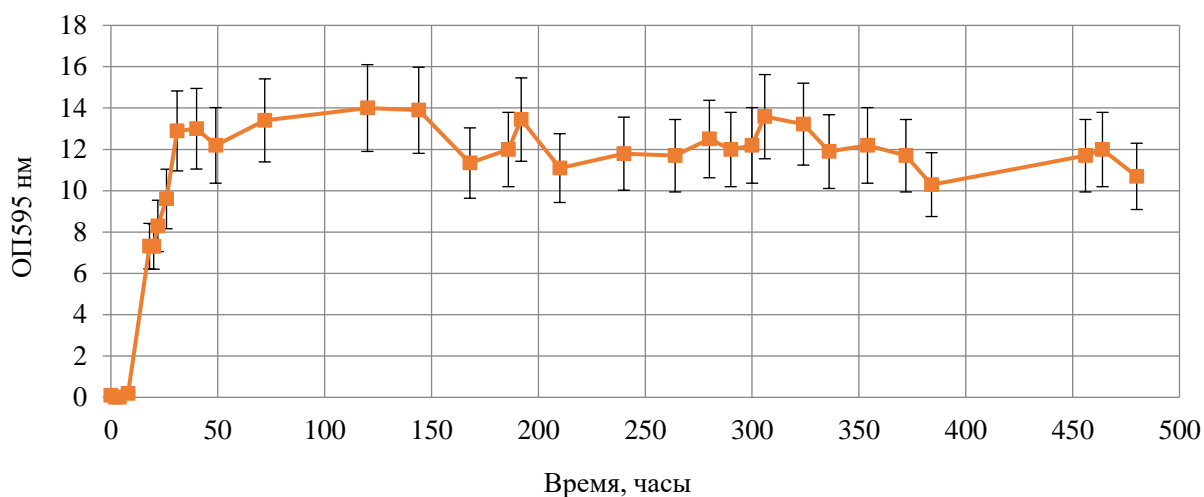
*Измерение активности СОД.* Активность СОД оценивали непрямой методом, по ингибированию автоокисления кверцетина [16]. Кверцетин автоокисляется в щелочных условиях (рН 10,0) в присутствии 0,8 мМ тетраметилэтилендиамина (ТМДА) с выделением в качестве побочного продукта реакции супероксид-анион-радикала и разрушением хромофора с максимумом поглощения при 406 нм. Исследование проводили в 20 мМ К-фосфатном буфере, содержащем 0,1 мМ ЭДТА, и 0,8 мМ ТМДА, рН 7,8 В реакционную смесь вносили 10 мкл гомогената, разведенного 1:50. Реакцию запускали добавлением кверцетина (0,36 мМ). За единицу ферментативной активности СОД принимали 50%-е ингибирование автоокисления кверцетина [16].

*Определение каталазной активности.* Суммарную каталазную активность определяли по скорости расщепления пероксида водорода. Концентрацию  $H_2O_2$  измеряли в режиме реального времени фотометрическим методом по поглощению УФ-излучения с длиной волны 240 нм. Активность выражали в миллимолях расщепленной  $H_2O_2$  в мин на 1 мг белка [16].

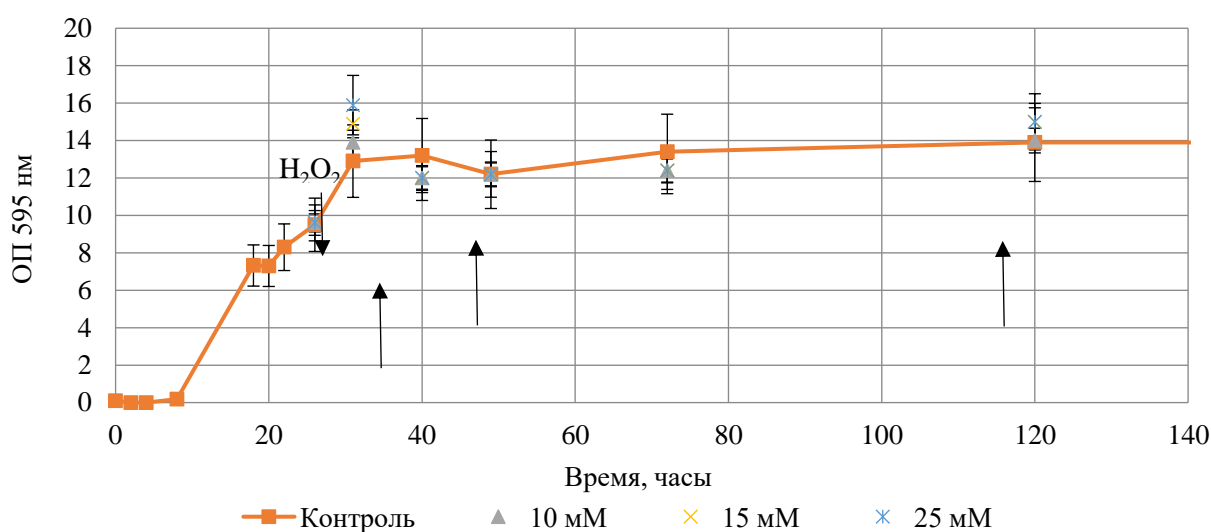
*Статистическая обработка результатов.* Каждое измерение было проведено не менее, чем в 4-х физических повторностях и в 3–5 биологических. Достоверными были признаны значения, СКО для которых составило  $\leq 10\%$  от среднего.

### *Результаты и обсуждение*

Как видно на рисунке 1, культивирование клеток *Y. lipolytica* продолжалось более 450 ч (Рисунок 1, а). Лаг-фаза длилась около 8 часов (Рисунок 1, б), а переход в стационарную стадию роста происходил через 28-30 ч роста. Значительных изменений в течение стационарной стадии роста не отмечалось. Для дальнейших манипуляций и оценки окислительно-восстановительного статуса клеток дрожжей были выбраны следующие точки: 24 ч — поздняя логарифмическая стадия роста; 40 ч — ранняя стационарная и 120 ч — поздняя стационарная стадия. Не наблюдалось и значительных изменений ОП и после внесения различных концентраций перекиси водорода. Таким образом, выбранные нами концентрации перекиси водорода не влияли на параметры накопления биомассы, по крайней мере, на выбранном нами отрезке времени в 120 ч. Кинетика накопления биомассы приведена на Рисунке 1.



а.



б.

Рисунок 1. Кривые роста дрожжей *Y. lipolytica* W29: а — при продолжительном культивировании; б — после внесения различных концентраций  $H_2O_2$  в логарифмической стадии роста (показано стрелками).

Изменения уровня АФК в культурах клеток приведены на Рисунке 2.

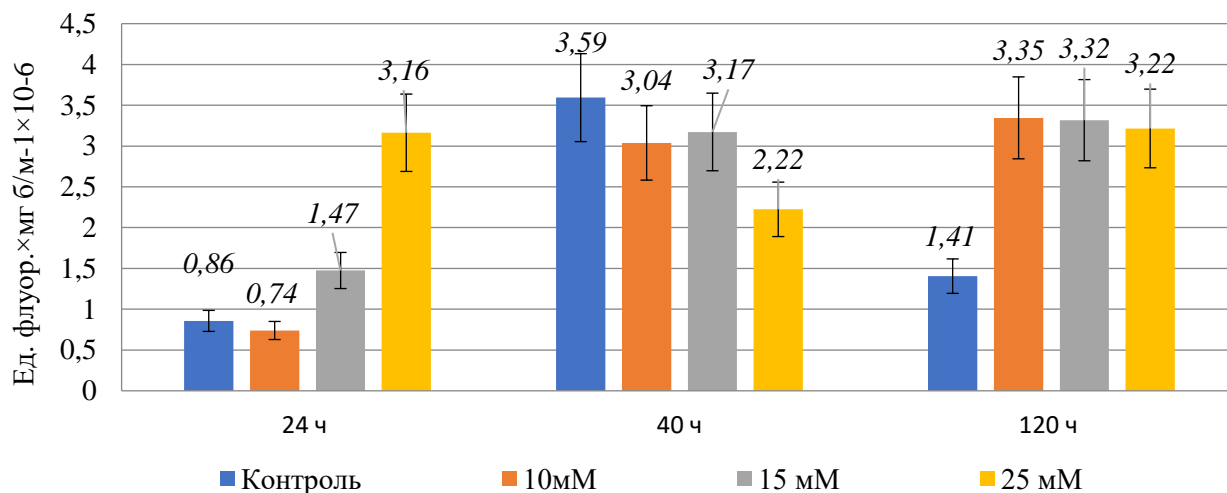


Рисунок 2. Интенсивность флуоресценции (ед.) клеточной суспензии *Y. lipolytica* W29 через 45 мин после окрашивания ДХФДА.



Из Рисунка 2 видно, что в контрольной культуре клеток минимальный уровень АФК отмечался в логарифмической стадии роста, а максимальный — в ранней стационарной стадии роста, что можно связать с метаболической перестройкой культуры для жизни в условиях ограничения по субстрату. К поздней стационарной стадии роста уровень АФК снижался, однако, оставался в 1,5-2 раза выше, чем в логарифмической стадии роста. Введение 10 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> не приводило к значительному изменению уровня АФК через 24 ч и 40 ч культивирования относительно контроля, однако через 120 ч уровень АФК поддерживался на уровне раннего стационара и оставался в этой временной точке более, чем в 2 раза выше, чем в контроле. Введение 15 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> приводило к повышению уровня АФК относительно контроля на 40% в логарифмической стадии роста, при этом в ранней стационарной стадии роста этот параметр находился на уровне контроля, оставаясь достаточно высоким (как и при 10 мМ) в поздней стационарной стадии. Введение 25 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> приводило к резкому росту уровня АФК, который был в 4 раза выше, чем в контроле, уже через 6 часов после внесения. В ранней стационарной стадии роста, однако, этот параметр заметно снижался относительно остальных образцов и составлял ~70% от контроля. К поздней стационарной стадии роста значение этого параметра возвращалось к первоначально высокому значению и заметно не отличалось от других образцов.

Активность СОД в ходе продолжительного культивирования *Y. lipolytica* представлена на Рисунке 3. СОД является антиоксидантным ферментом первой линии защиты, дисмутирующим супероксид-анион с образованием перекиси водорода.

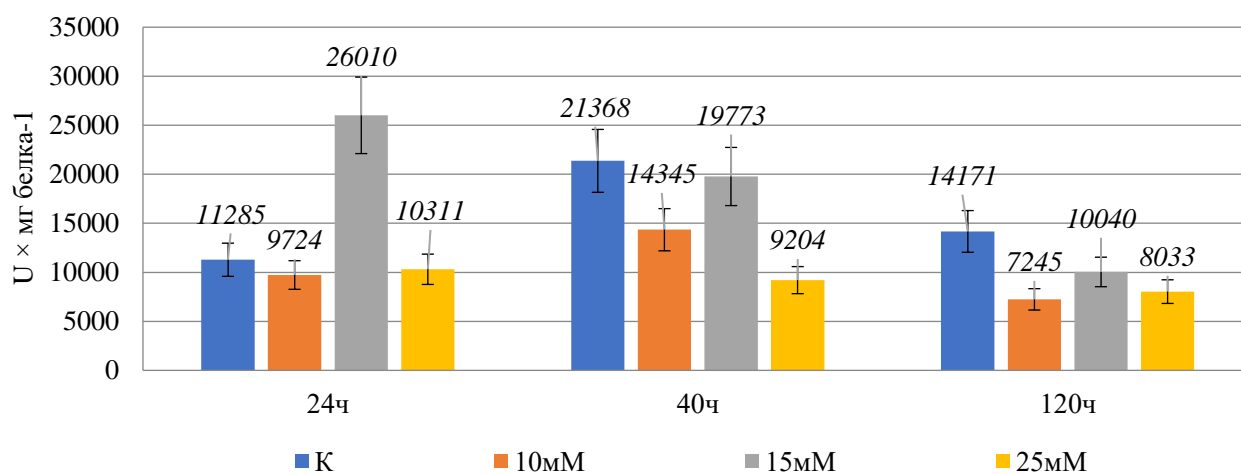


Рисунок 3. Активность СОД в зависимости от времени и внесённой концентрации перекиси водорода.

Профиль изменения СОД в контрольном образце коррелировал с профилем изменения АФК, что может говорить о связи этих двух параметров (Рисунок 4). Введение 10 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> никак не влияло на активность фермента в логарифмической стадии роста, однако уже в ранней стационарной стадии роста измеряемая активность фермента снизилась по сравнению с контролем на ~25%, что может быть связано с эффектом ингибирования фермента конечным продуктом. Сниженная по сравнению с контролем активность СОД наблюдалась в этом случае и в поздней стационарной стадии роста. Введение 15 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> приводило к резкому (более, чем в 2 раза) росту активности СОД в логарифмической стадии роста, однако, уже в ранней стационарной стадии активность фермента достигала значения, характерного для контрольного образца. В поздней стационарной стадии активность СОД

снижалась относительно контроля на 20–25%. 25 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> не позволяла активности СОД изменяться ни в ранней, ни в поздней стационарной стадии роста.

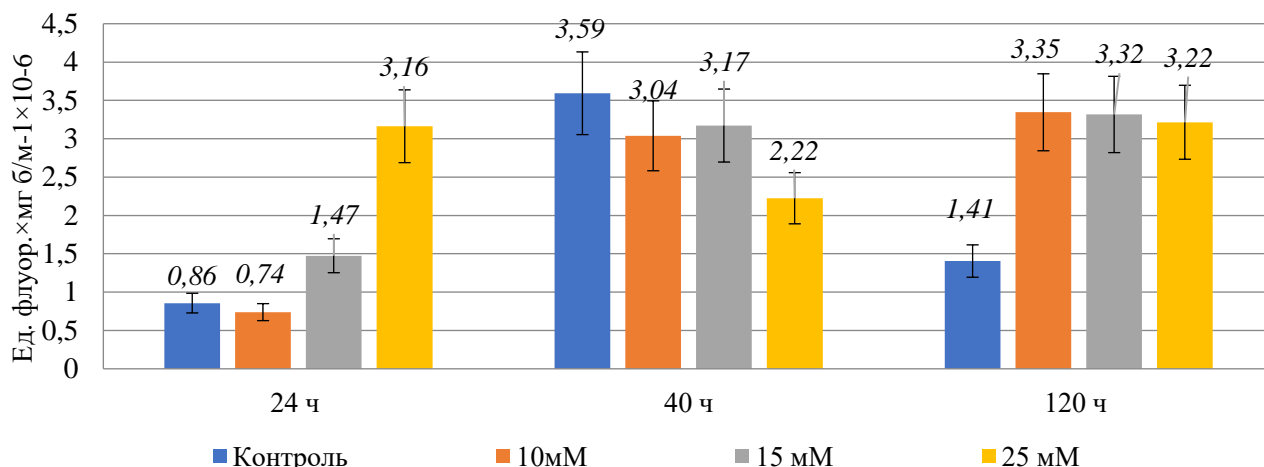


Рисунок 4. Интенсивность флуоресценции (ед.) клеточной суспензии *Y. lipolytica* W29 через 45 мин после окрашивания ДХФДА.

На протяжении всего культивирования активность СОД оставалась на уровне контроля в логарифмической стадии, что можно связать с эффектом ингибирования продуктом. Активность каталазы приведена на Рисунке 5.

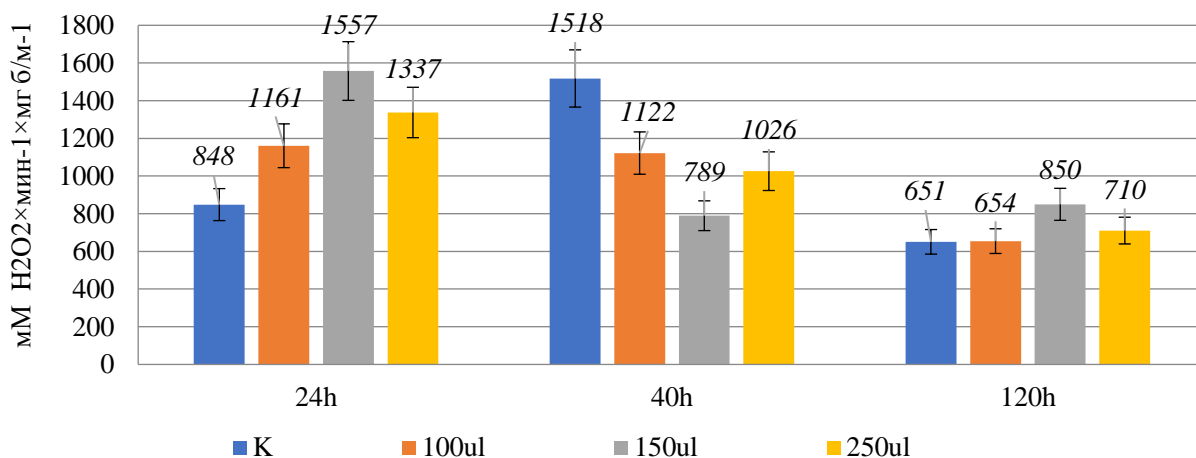


Рисунок 5. Активность каталазы в зависимости от времени и внесенной концентрации перекиси водорода.

Активность каталазы в контрольном образце изменялась пропорционально активности СОД и уровню АФК с течением времени. Введение различных концентраций перекиси водорода оказывало значительное влияние на этот параметр. 10 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> приводила к возрастанию активности каталазы по сравнению с контролем на ~20% в логарифмической стадии роста. При этом в ранней стационарной стадии роста этот параметр оставался неизменным, принимая значение на ~20% ниже по сравнению с контролем в этой точке. К поздней стационарной стадии активность этого фермента снижалась до уровня контроля. 15 мМ перекись оказывала более выраженный эффект на активность каталазы в логарифмической стадии роста, который отменялся к началу стационарной стадии — в этом случае значение параметра было вдвое ниже, чем в контроле. Тем не менее, это значение

сохранялось и в поздней стационарной стадии роста, что превышало уровень контроля на 25–30%. Эффект, оказываемый 25 мМ  $H_2O_2$  достоверно не отличался от эффекта, оказываемого 10 мМ. Можно предположить, что внесение  $H_2O_2$  приводило к быстрой индукции каталазы, однако в отличие от СОД, этот эффект длится не долго и снимался уже в ранней стационарной стадии роста.

Сопоставляя данные об уровне АФК в ходе продолжительного культивирования, можно говорить о развитии индуцированного окислительного стресса через 6 часов после внесения  $H_2O_2$ . Уровень АФК при этом увеличивался дозозависимым образом. Что касается активности антиоксидантных ферментов, то в первую очередь следует отметить ожидаемый всплеск активности каталазы в ответ на внесение  $H_2O_2$  [17]. Здесь стоит отметить, что активность фермента после внесения 10 мМ  $H_2O_2$  достоверно отличалась от активности фермента после внесения 15 мМ  $H_2O_2$ . Также следует отметить достоверный рост активности СОД через 6 часов после внесения 15 мМ оксиданта на фоне остальных образцов. Связать такие различия в индукции активностей ферментов в существовании т. н. градиента перекиси водорода [18], который обусловлен внеклеточной концентрацией  $H_2O_2$  с одной стороны, и скоростью инактивации оксиданта — с другой. Также большое значение имеет проницаемость ЦПМ, которая в ряде случаев является лимитирующим фактором установления перекисного градиента, если клетки имеют конститутивно высокое содержание цитоплазматических каталаз и глутатионпероксидаз, а реакции разложения перекиси имеют кинетику первого порядка. Следует отметить, что все три этих фактора взаимосвязаны между собой, так как внеклеточная перекись водорода способна влиять как на проницаемость мембран [19], так и на активность антиоксидантных ферментов [20]. Таким образом, 15 мМ, предположительно, является именно той концентрацией  $H_2O_2$ , которая с одной стороны достаточно быстро повышает проницаемость ЦПМ, а с другой — быстро инициирует сигнальные события, приводящие к повышению активности антиоксидантных ферментов.

Наибольший интерес в данном случае представляет эффект резкого роста активности СОД через 6 часов после внесения 15 мМ  $H_2O_2$ . Известно, что митохондриальная Mn-SOD экспрессируется в ответ на повышение уровня АФК [21], причем этот эффект является дозозависимым, а различные концентрации АФК инициируют различные сигнальные механизмы, приводящие в конечном счете к экспрессии генов, кодирующих СОД. Эффект от воздействия 15 мМ  $H_2O_2$  сохранялся до ранней стационарной стадии, однако, к поздней стационарной стадии роста активность фермента снижалась и оставалась вдвое ниже контроля в этой точке. Ожидается, происходило повышение уровня АФК во всех образцах, за исключением обработанного 25 мМ  $H_2O_2$  — в этом случае к началу стационарной стадии роста уровень АФК достоверно снижался. Можно предположить, что заметное повышение уровня АФК через 6 часов после введения оксиданта приводило к быстрой инициации сигнальных событий с последующей активацией защитных механизмов. Таким образом, всплеск генерации АФК, связанный с метаболической перестройкой в начале стационарной стадии роста, клетки переживали, будучи «подготовленными» к этому событию. Сравнительно невысокие активности СОД и каталазы в данном случае говорят о том, что в качестве защитных механизмов выступали не ферменты первой линии защиты, а другие, компоненты, такие как ферменты глутатионовой системы, а также низкомолекулярные антиоксиданты. Стоит отметить, что на протяжении как минимум 12 часов после внесения перекиси водорода клетки продолжали делиться. То есть возникшие изменения могли частично передаваться от материнских клеток дочерним. В данном случае можно предположить, что метаболическая перестройка, связанная с исчерпанием субстрата,



приводила к повышению уровня АФК, который затем снижался. Введение 10 и 15 мМ перекиси оказывало слабое влияние на этот параметр в логарифмической и ранней стационарной стадиях культивирования, однако оказывало неожиданный эффект сохранения высокого уровня АФК и в поздней стационарной стадии роста. При введении 25 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> картина несколько изменялась: первые часы культивирования с оксидантом сопровождались резким ростом уровня АФК, после чего он заметно снижался. Этот эффект можно связать с активацией некоторых сигнальных каскадов введением достаточной концентрации перекиси водорода [4, 22], которые «подготавливают» клетку к существованию в условиях ограничения ресурсов. В поздней стационарной стадии роста этот эффект «смягчения» метаболической перестройки отменяется, и уровень АФК снова возрастал.

Влияние умеренного окислительного стресса у молодых культур/организмов на последующее накопление повреждений с течением жизни было продемонстрировано как на модели *S. cerevisiae* [7], так и на модели свободноживущей нематоды *Caenorhabditis elegans*, являющейся популярным объектом для исследования процессов старения [23]. В случае *Y. lipolytica* нам не удалось выявить горметических эффектов 10-25 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> на состояние культуры в поздней стационарной стадии роста. Более того, 15 мМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> оказывала негативное воздействие на редокс-статус культуры. Это можно связать с развитием окислительного стресса по механизму с положительной обратной связью, в том числе с формированием в ЦПМ кальциевых пор, повышением содержания ионов калия в цитоплазме и повышением в ЦПМ содержания белков семейства НАДФН-оксидаз (NOX), которые, сами по себе могут быть источниками супероксид-радикала при неполном восстановлении H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [24].

#### Заключение

Исходя из полученных данных можно заключить следующее: введение перекиси водорода в логарифмической стадии роста может иметь отсроченные последствия и приводить к развитию окислительного стресса в поздней стационарной стадии роста, что особенно выражено в случае внесения 15 мМ перекиси. Наблюдаемые эффекты зависят от воздействующего на клетку градиента перекиси водорода в первые часы после введения оксиданта. Этот параметр, в свою очередь, определяется концентрацией H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, проницаемостью ЦПМ и совокупностью антиоксидантных факторов внутри клеток. Различные концентрации H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> инициируют различные сигнальные события, часть которых приводит к индукции ферментов первой линии защиты, а часть — к повышению содержания низкомолекулярных компонентов.

*Работа выполнена при поддержке госзадания №0112-2019-0001.*

#### Список литературы:

1. Ruttkay-Nedecky B., Nejdil L., Gumulec J., Zitka O., Masarik M., Eckschlager T., ... Kizek R. The role of metallothionein in oxidative stress // International journal of molecular sciences. 2013. V. 14. №3. P. 6044-6066. <https://doi.org/10.3390/ijms14036044>
2. Bleier L., Wittig I., Heide H., Steger M., Brandt U., Dröse S. Generator-specific targets of mitochondrial reactive oxygen species // Free Radical Biology and Medicine. 2015. V. 78. P. 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.10.511>
3. Ludovico P., Burhans W. C. Reactive oxygen species, ageing and the hormesis police // FEMS yeast research. 2014. V. 14. №1. P. 33-39. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12070>

4. Semchyshyn H. M., Valishkevych B. V. Hormetic effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in *Saccharomyces cerevisiae*: involvement of TOR and glutathione reductase // Dose-Response. 2016. V. 14. №2. P. 1559325816636130. <https://doi.org/10.1177/1559325816636130>
5. Baccolo G., Stamerra G., Coppola D. P., Orlandi I., Vai M. Mitochondrial Metabolism and Aging in Yeast // Mitochondria and Longevity. 2018. 1-33. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2018.05.001>
6. Vasylykowska R., Petriv N., Semchyshyn H. Carbon Sources for Yeast Growth as a Precondition of Hydrogen Peroxide Induced Hormetic Phenotype // International Journal of Microbiology. 2015. V. 2015. P. 1-8. <https://doi.org/10.1155/2015/697813>
7. Burdyliuk N., Bayliak M. Effects of Long-Term Cultivation on Medium with Alpha-Ketoglutarate Supplementation on Metabolic Processes of *Saccharomyces cerevisiae* // Journal of aging research. 2017. V. 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/8754879>
8. Parey K., Haapanen O., Sharma V., Köfeler H., Züllig T., Prinz S., ... Kühlbrandt W. High-resolution cryo-EM structures of respiratory complex I: Mechanism, assembly, and disease // Science advances. 2019. V. 5. №12. P. eaax9484. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aax9484>
9. Maclean A. E., Kimonis V. E., Balk J. Pathogenic mutations in NUBPL affect complex I activity and cold tolerance in the yeast model *Yarrowia lipolytica* // Human molecular genetics. 2018. V. 27. №21. P. 3697-3709. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddy247>
10. Rzechonek D. A., Day A. M., Quinn J., Mironczuk A. M. Influence of yIHog1 MAPK kinase on *Yarrowia lipolytica* stress response and erythritol production // Scientific reports. 2018. V. 8. №1. P. 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33168-6>
11. Arinbasarova A. Y., Machulin A. V., Biryukova E. N., Sorokin V. V., Medentsev A. G., Suzina N. E. Structural changes in the cell envelope of *Yarrowia lipolytica* yeast under stress conditions // Canadian journal of microbiology. 2018. V. 64. №5. P. 359-365. <https://doi.org/10.1139/cjm-2018-0034>
12. Kolhe N., Zinjarde S., Acharya C. Impact of uranium exposure on marine yeast, *Yarrowia lipolytica*: Insights into the yeast strategies to withstand uranium stress // Journal of hazardous materials. 2020. V. 381. P. 121226. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121226>
13. Walker C., Ryu S., Haridas S., Na H., Zane M., LaButti K., ... Trinh C. T. Draft Genome Assemblies of Ionic Liquid-Resistant *Yarrowia lipolytica* PO1f and Its Superior Evolved Strain, Y1CW001 // Microbiology resource announcements. 2020. V. 9. №9. <https://doi.org/10.1128/MRA.01356-19>
14. Секова В. Ю., Гесслер Н. Н., Исакова Е. П., Антипов А. Н., Дергачева Д. И., Дерябина Ю. И., Трубникова Е. В. Окислительно-восстановительный статус экстремофильных дрожжей *Yarrowia lipolytica* при адаптации к рН-стрессу // Прикладная биохимия и микробиология. 2015. Т. 51. №6. С. 570-570. <https://doi.org/10.7868/S0555109915060136>
15. Davey H., Guyot S. Estimation of Microbial Viability Using Flow Cytometry // Current Protocols in Cytometry. 2020. V. 93. №1. P. e72. <https://doi.org/10.1002/cpsc.72>
16. Дергачева Д. И., Машкова А. А., Исакова Е. П., Гесслер Н. Н., Дерябина Ю. И. Действие ресвератрола и дигидрохверцетина на физиолого-биохимические характеристики полиэкстремофильных дрожжей *Yarrowia lipolytica* в условиях температурного стресса // Прикладная биохимия и микробиология. 2019. Т. 55. №2. С. 158-165. <https://doi.org/10.1134/S0555109919020041>

17. Martins D., English A. M. Catalase activity is stimulated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in rich culture medium and is required for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> resistance and adaptation in yeast // *Redox biology*. 2014. V. 2. P. 308-313. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.12.019>
18. Marinho H. S., Cyrne L., Cadenas E., Antunes F. The cellular steady-state of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: latency concepts and gradients // *Methods in Enzymology*. Academic Press. 2013. V. 527. P. 3-19. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405882-8.00001-5>
19. Branco M. R., Marinho H. S., Cyrne L., Antunes F. Decrease of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> plasma membrane permeability during adaptation to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in *Saccharomyces cerevisiae* // *Journal of Biological Chemistry*. 2004. V. 279. №8. P. 6501-6506. <https://doi.org/10.1074/jbc.M311818200>
20. Гордеева А. В., Звягильская Р. А., Лабас Ю. А. Взаимосвязь между активными формами кислорода и кальцием в живых клетках обзор // *Биохимия*. 2003. Т. 68. №10. С. 1318-1322.
21. Scandalios J. G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses // *Brazilian journal of medical and biological research*. 2005. V. 38. №7. P. 995-1014. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2005000700003>
22. Zhang N., Cao L. Starvation signals in yeast are integrated to coordinate metabolic reprogramming and stress response to ensure longevity // *Current genetics*. 2017. V. 63. №5. P. 839-843. <https://doi.org/10.1007/s00294-017-0697-4>
23. Yang W., Hekimi S. A mitochondrial superoxide signal triggers increased longevity in *Caenorhabditis elegans* // *PLoS Biol*. 2010. V. 8. №12. P. e1000556. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000556>
24. Zhang J. et al. ROS and ROS-mediated cellular signaling // *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2016. V. 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/4350965>

#### References:

1. Ruttkay-Nedecky, B., Nejdil, L., Gumulec, J., Zitka, O., Masarik, M., Eckschlager, T., ... & Kizek, R. (2013). The role of metallothionein in oxidative stress. *International journal of molecular sciences*, 14(3), 6044-6066. <https://doi.org/10.3390/ijms14036044>
2. Bleier, L., Wittig, I., Heide, H., Steger, M., Brandt, U., & Dröse, S. (2015). Generator-specific targets of mitochondrial reactive oxygen species. *Free Radical Biology and Medicine*, 78, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.10.511>
3. Ludovico, P., & Burhans, W. C. (2014). Reactive oxygen species, ageing and the hormesis police. *FEMS yeast research*, 14(1), 33-39. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12070>
4. Semchyshyn, H. M., & Valishkevych, B. V. (2016). Hormetic effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in *Saccharomyces cerevisiae*: involvement of TOR and glutathione reductase. *Dose-Response*, 14(2), 1559325816636130. <https://doi.org/10.1177/1559325816636130>
5. Baccolo, G., Stamerra, G., Coppola, D. P., Orlandi, I., & Vai, M. (2018). Mitochondrial Metabolism and Aging in Yeast. *Mitochondria and Longevity*, 1-33. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2018.05.001>
6. Vasylykova, R., Petriv, N., & Semchyshyn, H. (2015). Carbon Sources for Yeast Growth as a Precondition of Hydrogen Peroxide Induced Hormetic Phenotype. *International Journal of Microbiology*, 2015, 1-8. <https://doi.org/10.1155/2015/697813>
7. Burdyliuk, N., & Bayliak, M. (2017). Effects of Long-Term Cultivation on Medium with Alpha-Ketoglutarate Supplementation on Metabolic Processes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of aging research*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/8754879>

8. Parey, K., Haapanen, O., Sharma, V., Köfeler, H., Züllig, T., Prinz, S., ... & Kühlbrandt, W. (2019). High-resolution cryo-EM structures of respiratory complex I: Mechanism, assembly, and disease. *Science advances*, 5(12), eaax9484. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aax9484>
9. Maclean, A. E., Kimonis, V. E., & Balk, J. (2018). Pathogenic mutations in NUBPL affect complex I activity and cold tolerance in the yeast model *Yarrowia lipolytica*. *Human molecular genetics*, 27(21), 3697-3709. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddy247>
10. Rzechonek, D. A., Day, A. M., Quinn, J., & Mirończuk, A. M. (2018). Influence of yIHog1 MAPK kinase on *Yarrowia lipolytica* stress response and erythritol production. *Scientific reports*, 8(1), 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33168-6>
11. Arinbasarova, A. Y., Machulin, A. V., Biryukova, E. N., Sorokin, V. V., Medentsev, A. G., & Suzina, N. E. (2018). Structural changes in the cell envelope of *Yarrowia lipolytica* yeast under stress conditions. *Canadian journal of microbiology*, 64(5), 359-365. <https://doi.org/10.1139/cjm-2018-0034>
12. Kolhe, N., Zinjarde, S., & Acharya, C. (2020). Impact of uranium exposure on marine yeast, *Yarrowia lipolytica*: Insights into the yeast strategies to withstand uranium stress. *Journal of hazardous materials*, 381, 121226. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121226>
13. Walker, C., Ryu, S., Haridas, S., Na, H., Zane, M., LaButti, K., ... & Trinh, C. T. (2020). Draft Genome Assemblies of Ionic Liquid-Resistant *Yarrowia lipolytica* PO1f and Its Superior Evolved Strain, YICW001. *Microbiology resource announcements*, 9(9). <https://doi.org/10.1128/MRA.01356-19>
14. Sekova, V. Y., Gessler, N. N., Isakova, E. P., Antipov, A. N., Deryabina, Y. I., Dergacheva, D. I., & Trubnikova, E. V. (2015). Redox status of extremophilic yeast *Yarrowia lipolytica* during adaptation to pH-stress. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 51(6), 649-654. <https://doi.org/10.7868/S0555109915060136>
15. Davey, H., & Guyot, S. (2020). Estimation of Microbial Viability Using Flow Cytometry. *Current Protocols in Cytometry*, 93(1), e72. <https://doi.org/10.1002/cpcy.72>
16. Dergacheva, D. I., Mashkova, A. A., Isakova, E. P., Gessler, N. N., & Deryabina, Y. I. (2019). Influence of Resveratrol and Dihydroquercetin on physiological and Biochemical Parameters of the Poly-extremophilic Yeast *Yarrowia lipolytica* under Temperature Stress. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 55(2), 152-158. (in Russian). <https://doi.org/10.1134/S0555109919020041>
17. Martins, D., & English, A. M. (2014). Catalase activity is stimulated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in rich culture medium and is required for H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> resistance and adaptation in yeast. *Redox biology*, 2, 308-313. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2013.12.019>
18. Marinho, H. S., Cyrne, L., Cadenas, E., & Antunes, F. (2013). The Cellular Steady-State of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Hydrogen Peroxide and Cell Signaling, Part B*, 3-19. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-405882-8.00001-5>
19. Branco, M. R., Marinho, H. S., Cyrne, L., & Antunes, F. (2004). Decrease of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> plasma membrane permeability during adaptation to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(8), 6501-6506. <https://doi.org/10.1074/jbc.M311818200>
20. Gordeeva, A. V., Zvyagilskaya, R. A., & Labas, Y. A. (2003). Cross-talk Between Reactive Oxygen Species and Calcium in Living Cells. *Biochemistry*, 68(10), 1077-1080.
21. Scandalios, J. G. (2005). Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Brazilian journal of medical and biological research*, 38(7), 995-1014. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2005000700003>

22. Zhang, N., & Cao, L. (2017). Starvation signals in yeast are integrated to coordinate metabolic reprogramming and stress response to ensure longevity. *Current genetics*, 63(5), 839-843. <https://doi.org/10.1007/s00294-017-0697-4>

23. Yang, W., & Hekimi, S. (2010). A mitochondrial superoxide signal triggers increased longevity in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Biol*, 8(12), e1000556. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000556>

24. Zhang, J., Wang, X., Vikash, V., Ye, Q., Wu, D., Liu, Y., & Dong, W. (2016). ROS and ROS-mediated cellular signaling. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/4350965>

Работа поступила  
в редакцию 18.11.2020 г.

Принята к публикации  
22.11.2020 г.

---

*Ссылка для цитирования:*

Секова В. Ю., Боброва Е. А., Исакова Е. П., Дерябина Ю. И. Активность антиоксидантных ферментов полиэкстремофильных дрожжей *Yarrowia lipolytica* при развитии окислительного стресса в ходе продолжительного культивирования // Бюллетень науки и практики. 2020. Т. 6. №12. С. 23-35. <https://doi.org/10.33619/2414-2948/61/02>

*Cite as (APA):*

Sekova, V., Bobrova, E., Isakova, E., & Deryabina, Yu. (2020). The Antioxidant Enzymes Activity From the Poly-extromophilic *Yarrowia lipolytica* Yeast Under Oxidative Stress During Long-lasting Cultivation. *Bulletin of Science and Practice*, 6(12), 23-35. (in Russian). <https://doi.org/10.33619/2414-2948/61/02>