

РГБ 01

Государственный комитет Российской Федерации

по высшему образованию

Казанский государственный университет им. В.И.Ульянова-Ленина

На правах рукописи

ЛУЦКАЯ АННА ЮРЬЕВНА

ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННЫХ РИБОНУКЛЕАЗ НА ФИЗИОЛОГИЮ
РОСТА

ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

03.00.07-микробиология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидат биологических наук

Казань - 1997

Работа выполнена в лаборатории биосинтеза и биоинженерии ферментов Казанского государственного университета.

Научный руководитель: доктор биологических наук,
вед.н.с. Куприянова-Ашнина
Ф.Г.

Консультант: доктор биологических наук,
профессор, академик АН РТ
Лещинская И.Б.

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук,
профессор, академик АН РТ
Зубаиров Д.М.

кандидат биологических наук,
с.н.с. Давыдова М.Н.

Ведущая организация: Казанский государственный технологический университет.

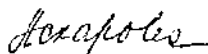
Защита диссертации состоится 5 июня 1997 г. в 14 ч. на заседании диссертационного Совета К.053.29.19 при Казанском государственном университете имени В.И.Ульянова-Ленина по адресу: 420008, Казань, ул. Кремлевская, 18.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Казанского государственного университета.

Автореферат разослан "5" мая 1997 г.

Ученый секретарь

специализированного совета, к.б.н.



А.Н.Аскарова

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Одной из важнейших проблем современной микробиологии является изучение механизмов регуляции роста и размножения микроорганизмов. Интерес к факторам роста (стимуляторам) обусловлен рядом обстоятельств, таких как: проявление ростостимулирующего эффекта в супернизких дозах; многообразие зачастую непредсказуемых ответных реакций организма на популяционном и на клеточном уровне. Кроме того, имеются данные, что интенсификация процессов вторичного метаболизма приводит к обогащению клеток биологически ценными соединениями и к заметному повышению устойчивости к стрессовым факторам (Сухаревич В.И. и др., 1982; Автушенко С.С. и др., 1991; Киселева В.М. и др., 1993; Vandijk P., 1995).

В настоящее время в качестве стимуляторов роста часто используются сложные смеси, нестабильные по составу, а следовательно, и по свойствам. В этом случае значительно усложняется выяснение механизма действия на клетку фактора роста. Поэтому особый интерес представляют гомогенные по составу биологически активные вещества, к числу которых относятся рибонуклеазы (РНКаза) микробного и животного происхождения.

К началу наших исследований продолжительное время велось определение диапазона стимулирующего действия РНКаза. Так, было изучено влияние экзогенных рибонуклеаз на размножение бактерий (Егоров С.Ю. и др., 1989) и дрожжей рода *Candida* (Колпаков А.И. и др., 1989; Куприянова Ф.Г. и др., 1989; 1992а; 1992б; Колпаков А.И., 1993), на урожай клеток и усиление синтеза физиологически активных веществ *Trichoderma harzianum* (Захарова Н.Г. и др., 1992). Было показано, что РНКаза *B.intermedius* способствует увеличению выхода биомассы *B.bifidium* ЛБА-3, *Lactobacillus fermentum*, *E.coli*, применяемых в медицине при дисбактериозах (Колпаков А.И. и др., 1996а, 1996б).

Известно, что увеличение скорости роста популяции под действием внешних агентов является результатом сложного комплекса биохимических превращений в клетке (Подгорский В.С., Иванов В.Н., 1975). В связи с этим является актуальным не только выявление ростостимулирующего действия РНКаза на микроорганизмы разных таксономических групп, но и исследование закономерностей взаимодействия РНКаза с живой клеткой и многообразие ответных реакций клеток с учетом таких факторов, как возрастная, трофическая структура популяции, синтез клетками циклических нуклеотидов и

протекторных соединений, а также устойчивость микроорганизмов к стрессовым воздействиям.

Целью настоящего исследования явилось выявление основных закономерностей стимулирующего действия экзогенных РНКаз на клетки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Изучить влияние РНКазы *Bacillus intermedius* (биназы) и панкреатической РНКазы (РНКазы I) на размножение дрожжей в зависимости от физиологического состояния культуры.
2. Определить влияние биназы на возрастную и трофическую структуру популяции дрожжей, на биосинтез ДНК и циклического АМФ.
3. Определить возможность использования РНКазы как стимулятора роста пекарских дрожжей *S. cerevisiae* в производственных условиях.
4. Исследовать действие РНКаз на жизнеспособность клеток *S. cerevisiae*, подвергнутых стрессовым воздействиям.

Научная новизна работы. Впервые обнаружена способность экзогенных РНКаз (биназа, РНКазы I) оказывать стимулирующее действие на рост культуры спорообразующих дрожжей *S. cerevisiae*. Установлено, что биназа в низких дозах при добавлении ее в начале лаг-фазы и фазу экспоненциального роста стимулирует почкование клеток. Анализ возрастной структуры популяции показал, что стимулирующий эффект обусловлен избирательным действием РНКазы на клетки стадии подготовки к почкованию и поздней стадии почкования. Впервые выявлено, что под действием РНКазы изменяется трофическая структура популяции. Стимулирование синтеза ДНК связано с сокращением G_1 - фазы митотического цикла за счет уменьшения экзотрофного периода (G_{1ex}) этой фазы. Более раннее нарастание пула вторичного мессенджера -цАМФ в клетке способствует переключению с G_{1ex} на эндотрофный период G_1 -фазы (G_{1end}). Установлено, что РНКазы обладает антистрессовой функцией. Клетки, выращенные в присутствии РНКазы, приобретают повышенную термо-, осмо- и ксероустойчивость, что коррелирует с увеличением пула внутриклеточной трегалозы.

Проведенные исследования показали, что экзогенные РНКазы оказывают существенное влияние на метаболизм дрожжей. Таким образом, появляется возможность направленного изменения обмена веществ дрожжей, что может быть использовано в биотехнологии.

Практическая значимость работы. Разработан способ выращивания пекарских дрожжей при добавлении панкреатической РНКазы в производственные емкости, позволяющий увеличить биомассу товарных дрожжей на 5-15% (заявка на изобретение № 95114100/13 (024148)). Биомасса дрожжей, полученная при внесении РНКазы, характеризуется улучшением ряда свойств, определяющих качество пекарских дрожжей таких, как подъемная сила, стойкость при хранении, повышенное содержания трегалозы.

Апробация работы. Материалы диссертации были доложены на итоговых научных конференциях Казанского государственного университета (1994, 1995, 1996, 1997 гг.), на Международной конференции "*Ribonucleases: Chemistry, Biology, Biotechnology*" (Нидерланды, Гронинген, 1996).

Объем и структура работы. Диссертация, изложенная на 136 страницах, состоит из введения, обзора литературы, 3 глав собственных исследований, обсуждения результатов, выводов, списка литературы (141 наименований, из них 53 в международных изданиях) и приложения. Работа содержит 15 таблиц и 17 рисунков.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 3 работы, подана заявка на изобретение (приоритет от 08.08.1995), 1 статья находится в печати.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В работе использовали штаммы дрожжей: *Saccharomyces cerevisiae* 823, применяющийся в производстве хлебопекарских дрожжей (ВНИИ пищевой биотехнологии, г.Москва); *S. cerevisiae cdc-28*, условно-летальный мутант по клеточному делению (Тс-ген), любезно предоставленный Вагабовым В.М. (НБФМ, г.Пушино); *Candida utilis* 424, аспорогенные дрожжи, (КХТУ, г.Казань).

Исследования проведены со следующими ферментными препаратами: внеклеточная щелочная рибонуклеаза *B.intermedius*; панкреатическая РНКазы "Завод медицинских препаратов", Санкт-Петербург; очищенный в НИЛ ББФ КГУ препарат панкреатической

РНКазы. Очистку препарата РНКазы I до электрофоретически гомогенного состояния вели по методу Лебедева Ю.О. с соавт., (1981). Оценку гомогенности экзогенных РНКаз давали по результатам сканирования электрофореграммы белков в 15% ПААГ (Lammlí U.K., 1970). Ферментативную активность РНКаз оценивали, как описано у Лещинской И.Б. и др., (1980).

Культуру дрожжей *S.cerevisiae* 823 выращивали на солодовом и меласном сусле; *S.cerevisiae* CDC-28 - на среде YM-1 (Lenand H. Hartwell, 1967); этанолюкисляющих дрожжей *C.utilis* - на среде с этанолом (Подгорский В.С., Иванов В.И., 1975).

Синхронизацию роста культур *S.cerevisiae* 823, *C.utilis* осуществляли стационарно-фазовым методом (Кулаев И.С. с соавт., 1973). Рост культуры *S. cerevisiae* cdc-28 синхронизировали инкубированием в свежей среде в непермиссивных условиях (37°C).

Рост культуры дрожжей контролировали с помощью автоматического анализатора оптической плотности микробной суспензии (г.Казань), а также подсчетом числа клеток в камере Горяева под микроскопом с фазово-контрастным устройством.

Количественную оценку ростовых процессов давали, как описано у Коротяева А.И., (1973). Выход биомассы (экономический коэффициент) определяли по С.Дж. Перту (1978).

Жизнеспособные клетки в пробах определяли по числу выросших колоний на 2% сусле-агаре или окрашиванием клеток метиленовым синим. Жизнеспособность обезвоженных клеток определяли методом "подмоладки" дрожжей на солодовом сусле (Семихатова Е.К. 1980).

Влажность, подъемную силу дрожжей, осмоустойчивость, стойкость в процессе хранения дрожжей анализировали по действующим ГОСТам (Инструкция по микробиологическому ..., 1984).

Активность зимазно-мальтазного комплекса дрожжей определялась по Новаковской С.С., Шишацкому Ю.И. (1980). Содержание CO₂ в пробах определяли методом газовой-адсорбционной хроматографии на хроматографе "Хром-5".

Обезвоживание дрожжей осуществляли в двух режимах: а) конвекционная сушка при 35°C б) сушка в тонком слое дрожжевой массы при 50°C (Бекер М.Е., 1981). Выявление толерантности клеток к повышенному осмотическому давлению проводили по методике *Altohammad M.M., Knowles C.J.* (1974). Устойчивость клеток к повышенной температуре определяли инкубированием клеточной суспензии при 40°C.

Определение возрастной структуры популяции вели по методу *Wienken A., et al.* (1970), трофической структуры популяции по методу *Ciriacy M.*, (1975) и Иванова В.Н. с соавт., (1987). В основе определения состояния экзотрофии дрожжей лежит дифференцированное окрашивание экзотрофных клеток, ассимилирующих в данный момент экзосубстраты в отличие от эндотрофных микроорганизмов, использующих в это время внутриклеточные накопленные источники углерода.

Протопласты дрожжей *S. cerevisiae* получали по методу Лихачева Л.И. и Горлова Ю.А. (1979). Синтез ДНК определяли изотопным методом (Шаткин В.А., 1972) Количество цАМФ в лизатах протопластов регистрировали методом Джилмана (*Gilman A.G.*, 1972).

Пул трегалозы в дрожжевых клетках выявляли антроновым методом (*Lillie Sue H., Pringle J.R.*, 1980) и высокоэффективной жидкостной хроматографией (*Vialle J., Kolonsky M.*, 1981).

Математическая обработка результатов проводилась с помощью программного пакета статистического анализа *Statgraphics*.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННЫХ РНКаз НА РАЗМНОЖЕНИЕ ДРОЖЕЙ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ КУЛЬТУРЫ

В условиях первичного культивирования дрожжей *S. cerevisiae* было выявлено, что действие экзогенных РНКаз (РНКазы *B.intermedius*, РНКазы I) определяется концентрацией вносимого фермента. Максимально стимулирующий рост клеток концентрацией биназы является - 10^{-5} мг/мл, а РНКазы I - $1 \cdot 10^{-6}$ мг/мл (при количестве клеток в инокуляте - $1 \cdot 10^7$ /мл).

Стимуляция роста дрожжей зависит от физиологического состояния популяции (рис. 1). Наибольшее увеличение численности популяции наблюдается при внесении биназы в

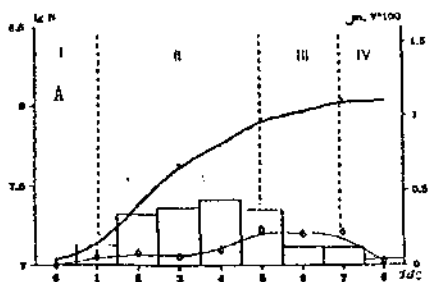
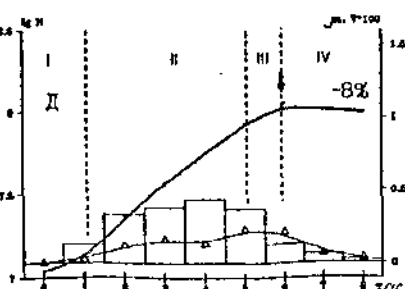
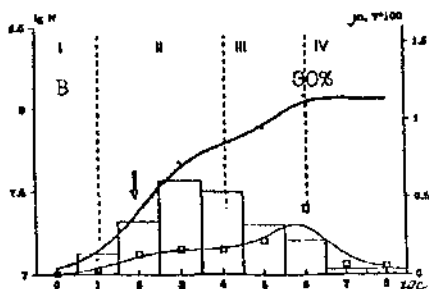
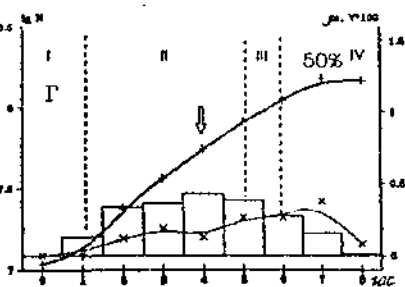
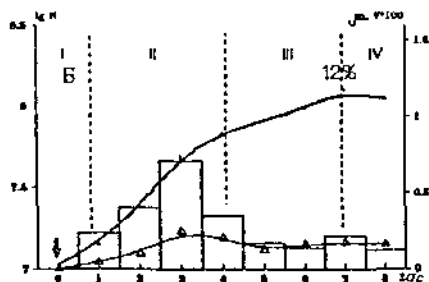


Рис. 1. Рост дрожжей *S. cerevisiae* при разном времени внесении РНКазы в среду. А - контроль (без фермента); Б, В, Г, Д - внесение фермента соответственно через 0, 2, 4, 6 ч роста культуры. U - время внесения фермента. $lg N$ - количество клеток в логарифмическом выражении. % - стимуляция размножения клеток (% к контролю), выраженная в абсолютных числах. μ - удельная скорость роста ($1/h$). I - IV - фазы роста культуры соответственно лаг-, экспоненциальная, замедления роста, стационарная фазы



культуру экспоненциального роста (рис.1 Г). Внесение фермента в фазу замедления роста приводит к уменьшению прироста клеток в сравнении с контролем (рис.1 Д).

Данные анализа возрастной структуры популяции свидетельствуют, что действие РНКазы направлено на ограниченную часть популяции дрожжей с определенным физиологическим состоянием клеток. Добавление РНКазы в начале лаг- и экспоненциальной фаз роста в 0ч и 2 ч (рис.1Б и 1В) ведет к увеличению количества клеток I фазы почкования на 3-ий час от момента посева культуры .

Известно, что дрожжевые организмы I-фазы почкования соответствуют, в основном, клеткам S-стадии митотического цикла, II- и III- фаз почкования - клеткам G₂ и M+ C стадий (Wienkel A., et al.,1970). Стимуляция почкования дрожжей РНКазой, по-видимому, обусловлена тем, имеющиеся в инокуляте клетки одиночные и поздних стадий почкования под действием биназы быстрее достигают объема, близкого к значениям "критической" массы, необходимой для почкования.

Добавление РНКазы в культуру экспоненциального роста (когда в ней возрастает количество микроорганизмов поздних стадий почкования) способствует увеличению дрожжевых клеток I-фазы почкования и одиночных клеток. Следовательно, стимулирующее действие РНКазы опосредованно через влияние ее на клетки, находящиеся не только в G₁-, а частично и в G₂- стадиях митотического цикла.

В экспериментах с многократным последовательным внесением биназы в активно растущую популяцию наблюдаемый нами эффект биназы был максимальным. Так, из данных рисунка 2 (кривая 1) видно, что двукратное добавление фермента (0 ч и 2 ч) стимулировало размножение клеток к началу стационарной фазы (6ч) на 40%. Последовательное добавление РНКазы в культуру через 0 ч, 2 ч и 4 ч вызывало примерно 60%-ный эффект стимуляции (рис.2, кривая 2). При этом показано, что РНКазы сорбируется на дрожжевых клетках, все возрастающее количество микроорганизмов сорбирует биназу, а добавляемый многократно фермент действует на вновь появившиеся дочерние клетки. На основании полученных данных можно говорить, что проявление стимулирующего действия РНКазы зависит как от дозы добавляемого фермента, так и от физиологического состояния

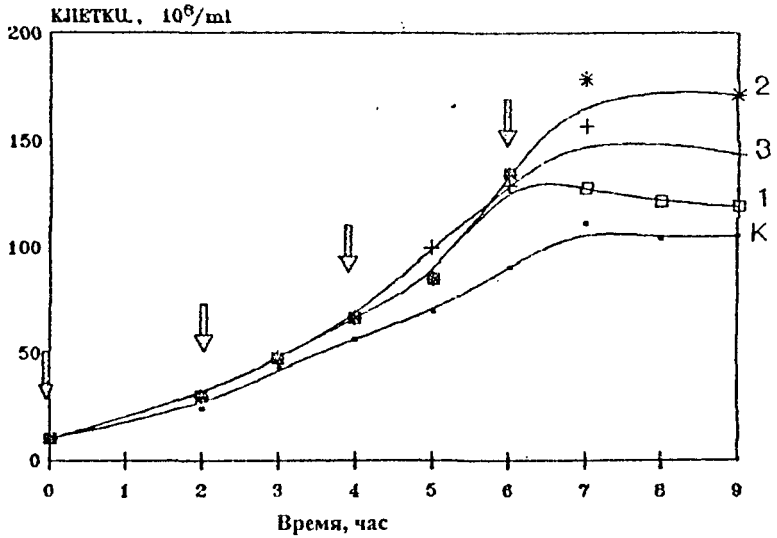


Рис.2 Изменение численности популяции *S. cerevisiae* в зависимости от кратности добавления биназы в растущую культуру.

- ↓ - время внесения фермента.
 К - рост культуры в среде без фермента.
 1,2,3 - внесение фермента, соответственно,
 1 - двукратное (0 ч и 2 ч - 0.02 мкг/мл);
 2 - трехкратное (0 ч, 2 ч и 4 ч - 0.03 мкг/мл);
 3 - четырехкратное (0 ч, 2 ч, 4 ч и 6 ч - 0.04 мкг/мл);

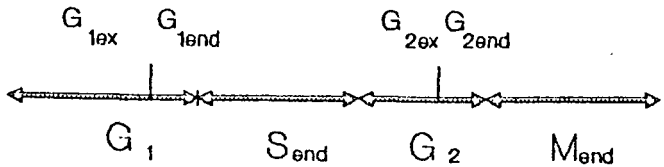


Рис.3 Соотношение фаз клеточного цикла дрожжей *Candida utilis* и периодов экзо- и эндотрофии по Иванову В.П., Угодчикову (1984), где ex - экзотрофный период ($G_{1\text{ex}}$, $G_{2\text{ex}}$); end - эндотрофный период ($G_{1\text{end}}$, S_{end} , $G_{2\text{end}}$, M_{end}).

клеток культуры *S.cerevisiae*. Об этом свидетельствуют и данные, полученные в результате дополнительного четвертого внесения фермента в культуру, находящуюся в конце фазы замедления роста (рис.2, кривая 3). При этом наблюдалось уменьшение эффекта на 30% в сравнении с 3-х кратным добавлением биназы.

ВЛИЯНИЕ БИНАЗЫ НА ВОЗРАСТНУЮ И ТРОФИЧЕСКУЮ СТРУКТУРУ ПОПУЛЯЦИИ

Влияние РНКазы на продолжительность фаз клеточного цикла исследовали с помощью изотопного метода и анализа возрастной структуры популяции дрожжей *S.cerevisiae* cdc-28 с высоким индексом синхронизации. Было показано, что под влиянием биназы стимуляция роста клеток коррелировала с сокращением G_1 - периода, а частично и G_2 -периода.

Учитывая, что в ходе митотического цикла дрожжевые организмы находятся в качественно различных состояниях экзо- и эндотрофии (рис.3), изучили влияние РНКазы на трофическую организацию митотического цикла на синхронизированной культуре *S.utilis*. Как видно из данных рис.4, в митотическом цикле клеток, растущих в среде с РНКазой, регистрируется сокращение продолжительности пика экзотрофных клеток как в течение G_1 , так G_2 -фазы. Исходя из полученных данных можно заключить, что сокращение митотического цикла связано с сокращением экзотрофных периодов G_1 и, вероятно, G_2 .

Согласно гипотезе Иванова В.Н.(1990), сокращение экзотрофного периода возможно за счет более раннего переключения экзотрофного периода на эндотрофный. Следовательно, в наших экспериментах РНКазы способствовала изменению клеточного метаболизма, а, именно, переходу $G_{1ex} \Rightarrow G_{1end}$, и, вероятно, $G_{2ex} \Rightarrow G_{2end}$.

Учитывая, что цАМФ играет, по-видимому, одну из основных ролей в переключении процессов экзо- и эндотрофии клетки (Birch et al.,1983; Cooper et al.,1985; Иванов В.Н.,1990) было определено содержание цАМФ в течение 2-х генераций клеточного цикла дрожжей. Показано, что максимальный уровень цАМФ в клеточном цикле дрожжей, растущих в присутствии биназы, достигался раньше в сравнении с контролем, непосредственно перед началом ДНК-синтетической фазы. В дальнейшем уровень цАМФ снижался, однако появление второго пика цАМФ, который, как известно соответствует G_2 -стадии, в опыте также опережало контроль (рис.5).

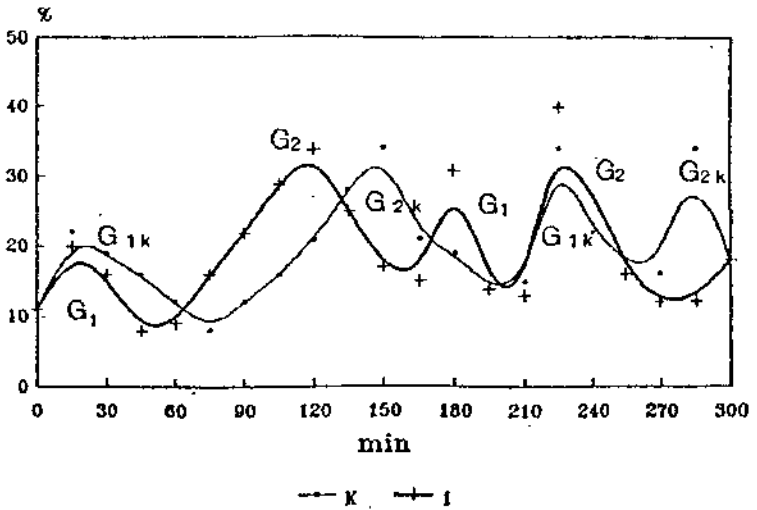


Рис.4 Влияние биназы на трофическую структуру популяции *C. utilis*.

К - контроль, I - РНКаза добавлена вместе с инокулятом.

% - содержание экзотрофных (одиночных (в G₁- стадии) и II фазы почкования (в G₂- стадии) клеток в опыте (G₁, G₂) и в контроле (G_{1k}, G_{2k}), соответственно.

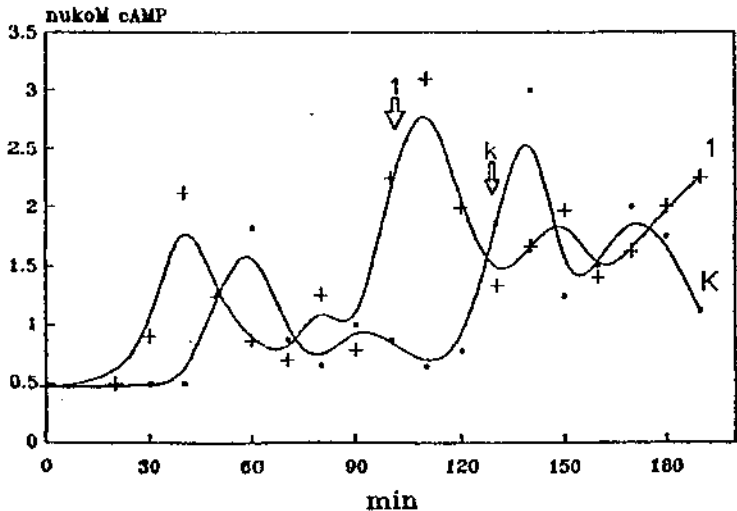


Рис.5 Влияние биназы на пул цАМФ в клетках *S. cerevisiae cdc-28*.

К - контроль, I - РНКаза добавлена вместе с инокулятом.

Появление клеток второй генерации в контроле (⊞)

и в опыте (⊞), соответственно.

Следовательно, наблюдаемая стимуляция роста дрожжей РНКазой сопровождается сокращением G₁- и G₂-стадий, за счет уменьшения экзотрофных периодов, а основной системой эндогенной регуляции экзо- и эндотрофной клетки является система регуляции метаболизма на основе циклических нуклеотидов, прежде всего, цАМФ.

ИСПЫТАНИЕ ДЕЙСТВИЯ РНКаз В ПРОИЗВОДСТВЕННЫХ УСЛОВИЯХ

Исследования влияния РНКаз на рост культуры дрожжей в производственных условиях проводили в дрожжевом цехе Буинского завода РТ. В качестве стимулятора роста применили коммерческий препарат панкреатической РНКазы (содержит более 40% примесных белков), цена которого на 2 порядка ниже, чем биказы. Исследования, направленные на установление ростостимулирующей дозы коммерческого препарата, а также очищенного в лаборатории препарата фермента показали, что величина эффекта не зависит от наличия или отсутствия в препарате примесных белков, а сам эффект стимуляции роста обусловлен влиянием РНКазы I на культуру клеток. При этом стимулирующее действие РНКазы на клетки *S. cerevisiae* - 823 зависит от дозы фермента и от начальной плотности клеточной взвеси.

В технологическом процессе наращивания дрожжевой массы в каждую емкость добавляли фермент в ростостимулирующей дозе, соответствующей определенной плотности клеточной взвеси.

В первую емкость (инокулятор) вносили РНКазу одновременно с посевным материалом. К концу культивирования (16 часов) дрожжей в инокуляторе в среде с РНКазой происходит увеличение количества клеток в культуре на 19% по сравнению с контролем за счет увеличения количества клеток I-фазы почкования. Однако по величине биомассы (сырой вес) опытные и контрольные варианты практически не различаются.

Существенно, что в среде с РНКазой уменьшается экономический коэффициент, что коррелирует с описанными результатами о сокращении периода экзотрофии (рис.5) и в итоге ведет к ускорению роста культуры.

На основании наших данных о максимальном увеличении численности популяции при многократном введении фермента в растущую культуру (рис.2) в следующей серии

экспериментов РНКазу добавляли двукратно: 1) в инокулятор вместе с посевным материалом и 2) в посевную емкость сразу после перекачивания культуры из инокулятора.

Как видно из данных табл.1, РНКазы, внесенная в инокулятор и в посевной аппарат, увеличивала выход биомассы на 18%. Исследование наращивания биомассы в процессе всего цикла культивирования дрожжей (от инокулятора до окончания ферментации в 5 ферментерах) показало, что эффект стимуляции роста *S.cerevisiae*, достигнутый в посевной емкости, сохранялся на уровне 15%, т.е. почти не терялся в процессе многократных переводов при отъемно-доливном методе выращивания культуры в ферментерах.

Таблица 1

Накопление биомассы дрожжей при добавлении РНКазы в производственные емкости (схемы №1, №2)

Добавление РНКазы в аппараты:	Выход биомассы, кг		Стимуляция, % к контролю
	Опыт	Контроль	
СХЕМА №1			
1. Инокулятор	121,3 ± 17,1	119,9 ± 10,7	101,1
2. Посевной аппарат	1611,5 ± 238,0	1367,5 ± 158,2	118,0
Суммарный выход с 5 ферментеров	25880,0 ± 3008,0	22500,0 ± 1276,5	115,0
СХЕМА №2			
ФЕРМЕНТЕРЫ:			
№2Б	4080,0 ± 313,6	3915,5 ± 467,6	104,2
№3А	4896,0 ± 429,0	4650,0 ± 342,8	105,3
№3Б	5346,0 ± 724,0	5054,2 ± 508,5	105,8
Суммарный выход с 3 ферментеров	14322,0 ± 1056,0	13627,0 ± 978,0	105,1

С целью выявления стимуляции наращивания биомассы в ферментерах РНКазу добавляли лишь в 3 отборочных аппарата, из которых дрожжи сразу поступают на сепарацию, минуя предыдущие дрожженакопительные. Из данных табл.1 видно, что внесение РНКазы в каждый из трех ферментеров (№ 2Б, 3Б и 3А) одновременно с посевным материалом способствовало увеличению выхода целевого продукта на 4 - 5% в сравнении с контролем. Слабое проявление эффекта РНКазы в этом случае, вероятно, связано с тем, что культура в ферментерах находится в стадии почкования лишь незначительное время, т.к. в процессе ферментации идет преимущественно рост дочерних клеток ("дозревание" дрожжей).

Таким образом, экзогенная РНКазы стимулирует почкование клеток культуры, растущей в инокуляторе. Максимально проявляется действие фермента на активно растущую культуру в посевном аппарате. Популяция дрожжей в ферментерах, которая по физиологическому состоянию близка к культуре стационарной фазы роста, мало чувствительна к действию экзогенного фермента. Поэтому в процессе производственного цикла для увеличения выхода биомассы достаточно двукратного введения фермента: в начале культивирования дрожжей в инокуляторе и посевной емкости.

Нами показано, что культивирование дрожжей в присутствии РНКазы в заводских и в лабораторных условиях увеличивает подъемную силу дрожжей. Это свойство улучшается при достижении культурой стационарной фазы роста, которая у опытных дрожжей наступает раньше (рис. 1). Нами установлено, что РНКазой стимулируется лишь активность ферментов зимазного комплекса. Поэтому повышение бродильной активности дрожжей происходит за счет сбраживания глюкозы, но не мальтозы муки.

АНТИСТРЕССОВАЯ ФУНКЦИЯ РНКаз

Изучение стойкости дрожжей при хранении показало, что этот показатель улучшается, т.е. дрожжевые организмы приобретают дополнительные защитные свойства от неблагоприятных факторов. Результаты экспериментов, в которых дрожжи целенаправленно подвергались нами различным стрессовым воздействиям, подтвердили наше предположение. Так, исследование термо-, осморезистентности дрожжей показало, что наиболее устойчивыми к воздействию неблагоприятных факторов являются клетки стационарной фазы роста, что согласуется с данными литературы (Бекер М.Е., Упит А.А., 1972). Повышение резистентности клеток в среде с РНКазой обусловлено более ранним переходом культуры в стационарную фазу роста вследствие стимуляции роста.

Исследование ксерорезистентности выявило, что дрожжи опытного варианта характеризовались как большей жизнеспособностью, так и более высокой остаточной активностью ферментов зимазно- мальтазного комплекса.

По мнению Piper (1993), в устойчивости клеток дрожжей к неблагоприятным факторам первостепенное значение имеет внутриклеточный пул трегалозы. Проведенные исследования, направленные на определение содержания трегалозы в клетках, показали, что

дрожжи, выращенные как в лабораторных, так и в заводских условиях (табл.2) характеризуются повышенным уровнем этого дисахарида, а увеличение числа жизнеспособных клеток, выращенных в присутствии РНКазы, коррелировало с повышением пула трегалозы.

Из литературы известно, что этот дисахарид изменяет физические свойства мембранных липидов (Иванов В.Н.,1987) образованием водородных связей между ОН-группами трегалозы и полярными головками фосфолипидов мембран. В результате происходит стабилизация клеточных мембран (Crowe J.H. et al., 1984). Синтез трегалозы обнаруживает обратную связь по отношению к ростовой активности мицелия, так как синтез трегалозо-6- фосфатсинтетазы регулируется вторичными метаболитами, выделяемыми в среду культивирования при замедлении роста культуры (Gounalaki, Thireos, 1994). Поэтому более раннее увеличение уровня трегалозы в клетках под действием РНКазы обусловлено опережающим вступлением культуры в стационарную фазу роста.

Следовательно, выявленная антистрессовая функция РНКазы не только коррелирует с более ранним наступлением стационарной фазы и с увеличением пула трегалозы, но и обусловлена этими процессами. Однако нельзя пренебречь и другими изменениями в составе клеток в ответ на факторы, вызывающие стресс, описанными Феофиловой Е.П., (1992), а именно, в липидном составе мембран, антиоксидантном статусе и т.д.

Исходя из факта повышения уровня трегалозы под действием РНКазы становится понятным регистрируемое нами увеличение подсымной силы товарных дрожжей, т.к. при

Таблица 2

Влияние РНКазы I на содержание трегалозы в товарных дрожжах в зависимости от схемы внесения фермента

Внесение фермента в аппараты:	Содержание трегалозы, %/сух. вес биомассы		% к контролю
	Контроль	Опыт	
СХЕМА №1			
Инокулятор, посевной	7,26 ± 0,2	8,4 ± 0,3	115,7
СХЕМА №2			
Отборочные ферментеры	7,26 ± 0,2	9,1 ± 0,4	125,0

внесении в тесто, дрожжи в первую очередь используют внутриклеточные субстраты, и деградация трегалозы, по данным *Hottiger et al.* (1989), начинается с первых минут культивирования. *Vandijk et al.* (1995) в своих экспериментах показал положительную корреляцию между содержанием трегалозы и бродительной активностью дрожжей.

Нами отмечена более высокая остаточная активность ферментов зимазино-мальтазного комплекса дрожжей, культивируемых в среде с РНКазой при их подсушивании. Это объясняется данными литературы о том, что молекулы трегалозы образуют водородные связи с частично погруженными в мембрану белками, стабилизируя их пространственное расположение в плоскости мембраны и препятствуя их сближению и образованию дисульфидных связей при деформациях клеточных оболочек при стрессовых воздействиях, каковым является высушивание (Волков В.Я., 1994).

Таким образом, проведенные исследования показали, что экзогенные РНКазы оказывают существенное влияние на метаболизм дрожжей, и при их воздействии появляется возможность направленного изменения свойств дрожжей, что может быть использовано в биотехнологии.

ВЫВОДЫ

1. Экзогенные РНКазы микробного и животного происхождения ускоряют размножение дрожжей *S.cerevisiae*. Эффект РНКазы зависит от физиологического состояния популяции и от концентрации вносимого фермента.

2. Стимуляция роста культуры *S.cerevisiae* экзогенной РНКазой выражается в ускорении инициации синтеза ДНК и почкования клеток и коррелирует с сокращением G₁-стадии митотического цикла дрожжей.

3. Под действием РНКазы уменьшается продолжительность экзотрофного периода G₁-стадии. Этот процесс коррелирует с сокращением времени достижения максимального уровня в клетке вторичного мессенджера - цАМФ.

4. Панкреатическая РНКаза, использованная в качестве стимулятора роста дрожжей в производственных условиях, вызывает наибольший эффект при добавлении фермента в аппараты с активно растущей культурой. РНКаза улучшает потребительские свойства дрожжей, такие как подъемная сила и стойкость при хранении.

5. Экзогенные РНКазы в ростостимулирующих дозах обладают антистрессовой функцией, способствуют повышению термо-, осмо-, ксероустойчивости клеток и возрастанию пула трегалозы.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Куприянова-Ашина Ф.Г., Колпаков А.И., Луцкая А.Ю., Эль-Регистан Г.И., Козлова А.Н., Дужа М.В. Действие мембраноактивных физиологически активных веществ на рост культуры *Saccharomyces cerevisiae* // Микробиология. -1995. -Т.64, вып.5. -С.596-600.

2. Куприянова-Ашина Ф.Г., Луцкая А.Ю., Колпаков А.И., Кепчева Р.М., Лещинская И.Б. Влияние РНКазы *Bacillus intermedius* на рост культуры дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*// Прикладная биохимия и микробиология. -1996. N 2, -С.254-259.

3. Loutskaia A.Yu., Gasheva S.V., Kolpakov A.I., Kupriyanova-Ashina F.G. The effect of exogenous RNases on *Saccharomyces cerevisiae* growth // 4th International Meeting

"Ribonucleases: chemistry, biology and biotechnology". Netherlands. Groningen, Juli 14-18, 1996. SIP10.

4. Куприянова-Ашина Ф.Г., Луцкая А.Ю., Кепечева Р.М., Колпаков А.И. Способ получения биомассы хлебопекарных дрожжей в производственных условиях. Заявка N 95114100/13 (024148) на изобретение. Приоритет от 08.03.95.

5. Луцкая А.Ю., Колпаков А.И., Кепечева Р.М., Игнатъева Н.П., Куприянова-Ашина Ф.Г. Применение панкреатической РНКазы в производстве хлебопекарских дрожжей //Прикладная биохимия и микробиология. -1997 (принята к печати в 11.23.1995).

A handwritten signature in black ink, consisting of stylized, overlapping letters and a long horizontal stroke extending to the right.