

УДК 664.663.531

Применение пептидных продуктов, выделенных методами бионанотехнологией на жизнедеятельность хлебопекарных дрожжей при стрессовых факторах

Андреев А.Н., Жилинский Д.В., Попова И.А.,
andreevanatoly@yandex.ru

Санкт-Петербургский государственный университет
низкотемпературных и пищевых технологий

В работе исследовано влияние пептидных фракций, выделенных из Saccharomyces sp., на дрожжи, поврежденные действием экзогенной H₂O₂ и УФ-излучением. Показано влияние фракции пептидов с основной изоэлектрической точкой на количество выделяемого диоксида углерода тестом. Установлена повышенная адаптация дрожжей к стрессовым факторам в присутствии пептидных фракций, что говорит о важной роли данных соединений в их защите.

Ключевые слова: окислительный стресс, адаптация, пептиды, дрожжи, нуклеопротеиновый комплекс, мука, тесто.

УДК 664.663.531

The influence of peptide products which are excreted with bionanotechnology methods on the life of yeast under stress factors

Andreyev A.N., Zhilinski D.V., Popova, I.A.,
andreevanatoly@yandex.ru

Saint-Petersburg state university of refrigeration and food engineering

The influence of peptide fractions isolated from Saccharomyces sp., In yeast, the influence of exogenous H₂O₂ damaged and UV radiation. The influence of the main fraction of peptides with an isoelectric point of the number of emitted carbon dioxide test. Increase of yeast adaptation to stress factors in the presence of the peptide fractions, indicating the important role of these compounds to protect them.

Keywords: oxidative stress, adaptation, peptides, yeast nucleoprotein complex, flour, dough.

В последнее время в сфере биотехнологии уделяют повышенное внимание к поиску улучшителей, которые способны положительно влиять на биотехнологические свойства дрожжей в процессе тестоприготовления.

В данной статье рассмотрен процесс регулирования биотехнологических свойств прессованных дрожжей с использованием пептидных комплексов, выделенных из дрожжевых клеток методами бионанотехнологии и представляющих собой смесь низкомолекулярных пептидов с диапазоном молекулярных масс 1-5 кДа [1,2].

Из литературы известно, что пептиды с молекулярной массой 1-5 кДа, выделенные из клеток *Saccharomyces sp.*, оказывают биологическое действие на клетки дрожжей при выращивании их на минимальной среде и способствуют более активному росту [3]. В ряде работ показано, что из клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* были получены комплексы нуклеиновых кислот с ядерными белками (нуклеопротеиновый комплекс, НПК) и исследована их биологическая активность по отношению к культуре дрожжей, подверженных действию ультрафиолетового (УФ) облучения или перекиси водорода. Установлено, что НПК усиливает деление клеток, угнетенное действием мутагенных факторов [4].

В Институте высокомолекулярных соединений РАН (Санкт-Петербург) были выделены пептидные препараты из клеток дрожжей с кислой и основной (щелочной) изоэлектрической точкой методами инновационной биотехнологии: с использованием трековых мембран и полимерных сорбентов, предназначенных для ситования малых молекул. Пептидный препарат представлял собой высокоочищенную фракцию, не содержащую балластные примеси [5,9].

Целью работы было: изучение влияния щелочной и кислой фракций пептидов, полученных из дрожжей, на жизнедеятельность хлебопекарных прессованных дрожжей. В задачу входило:

1. исследовать влияние различной: объемной концентрации дрожжевой суспензии, концентрации и продолжительности действия пероксида водорода, количества добавляемой муки на процесс газообразования теста
2. исследовать влияние пептидных фракций и продолжительности брожения теста на процесс газообразования
3. исследовать влияние бактерицидного воздействия на жизнеспособность дрожжей при добавлении щелочной фракции пептидов и продолжительности брожения теста на процесс газообразования

Для оценки влияния биологически активной добавки на дрожжи в качестве моделей нами были выбраны клетки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* с повреждениями, индуцированными действием пероксида водорода или УФ-излучения,

Объектами исследования были: дрожжи хлебопекарные прессованные высокоактивные производства ОАО «Хладокомбинат пищевых производств» (Санкт-Петербург) с влажностью . 72,5%, подъемной силой 36 мин. . (ГОСТ

171-81); мука пшеничная хлебопекарная I сорта (ГОСТ 26574-85); пептидные препараты дрожжей. Основные характеристики пептидных препаратов дрожжей даны в табл.1 в расчете на раствор с концентрацией $1 \text{ мг}\cdot\text{мл}^{-1}$.

Таблица 1

Характеристика кислой и щелочной пептидных фракций

Параметр	Кислая фракция пептидов	Щелочная фракция пептидов
Содержание α -аминного азота по лейцину, $\text{мг}\cdot\text{мл}^{-1}$	$0,59\pm 0,03$	$0,77\pm 0,05$
pH	6,03	10,24
Молекулярная масса компонентов, Да	менее 1200	менее 1200
Максимум поглощения, нм	260	261

Методика экспериментов.

Определяли динамику выделения диоксида углерода волюметрическим методом на приборе АГ-1М [6].

Определение газообразующей активности теста может служить адекватной моделью для определения биологической активности пептидных препаратов, выделенных из клеток дрожжей, так как при брожении в клетках дрожжей выделяется определенное количество диоксида углерода, которое может служить характеристикой их метаболизма.

Доза повреждающих факторов была выбрана эмпирически, так чтобы выживаемость клеток была 25-30%. Облучение дрожжей *S. cerevisiae* проводили, расположив открытые чашки Петри с суспензией $5\cdot 10^8$ клеток $\cdot\text{мл}^{-1}$ непосредственно под лампой БУВ-15. Клетки облучали в течение 20 мин., после чего в полученную суспензию дрожжей добавляли по 5 и 10 г пшеничной муки, измеряли газообразующую активность дрожжей.

Пероксид водорода разводили стерильной дистиллированной водой до концентрации 0,1%. Смешивали 6 мл. полученного раствора с суспензией клеток дрожжей $5\cdot 10^8$ клеток $\cdot\text{мл}^{-1}$ и выдерживали при комнатной температуре в течение 45 мин. и 24 ч, добавляли по 5 и 10 г пшеничной муки, замешивали тесто и измеряли газообразующую активность дрожжей [7].

В качестве контроля на жизнеспособность исходной культуры использовали суспензию клеток дрожжей *S. cerevisiae*, не подверженных действию повреждающих факторов.[8].

Обсуждение результатов.

Известно, что пероксид водорода обладает выраженным антимикробным действием, но микроорганизмы обладают различной чувствительностью к нему. Очевидно, что для получения поврежденных клеток дрожжей действие на них стрессовых факторов должно превышать адаптационные возможности клеток. В связи с этим первоначальной задачей, стоящей перед нами, было определение чувствительности дрожжей *S.*

Saccharomyces cerevisiae к пероксиду водорода [7]. Обработку проводили в условиях дрожжевой суспензии, используемой на хлебопекарных предприятиях.

Дрожжевую суспензию, содержащую 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 грамм дрожжей в 6 мл растворе пероксида водорода термостатировали при 30⁰С, в течение 30 мин. добавляли 5 г муки и замешивали тесто. Результаты приведены на рис.1.

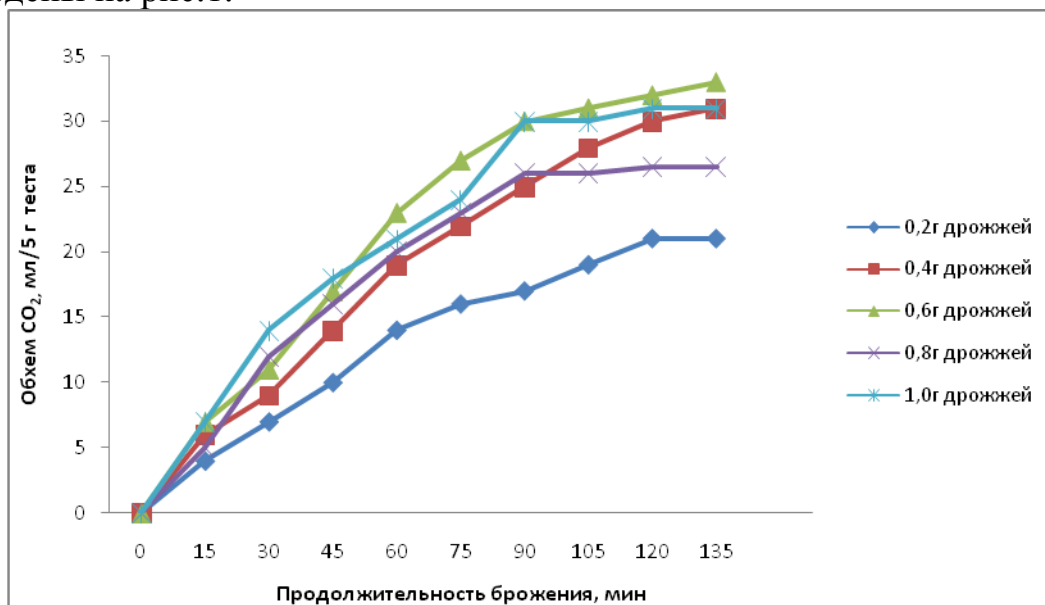


Рис.1. Влияние объемной концентрации дрожжевой суспензии в растворе пероксида водорода и продолжительности брожения теста на процесс газообразования

Как видно из рисунка, наибольшее количество CO₂, выделяется при внесении дрожжей массой 0,6 г, наименьшее массой 0,2 г. Внесение дрожжей массой 0,8 и 1 г снижает количество, выделившегося диоксида углерода, что может быть связано с повышенной объемной концентрацией дрожжевой суспензии и неполным сбраживанием пшеничной муки. Для дальнейших исследований принята рабочая концентрация дрожжевой суспензии при внесении дрожжей массой 0,6г.

При действии пероксида водорода в течение 30 мин. клетки дрожжей успевали адаптироваться к окислительному стрессу за данный промежуток времени инкубирования, поэтому проводили эксперимент для определения продолжительности действия пероксида водорода на дрожжи и брожения теста на процесс газообразования. Дрожжевую суспензию, содержащую 0,6; грамм дрожжей в 6 мл растворе пероксида водорода инкубировали в течение 30 мин. и 21 часа, после этого добавляли 5 г муки и замешивали тесто. Результаты приведены на рис.2.

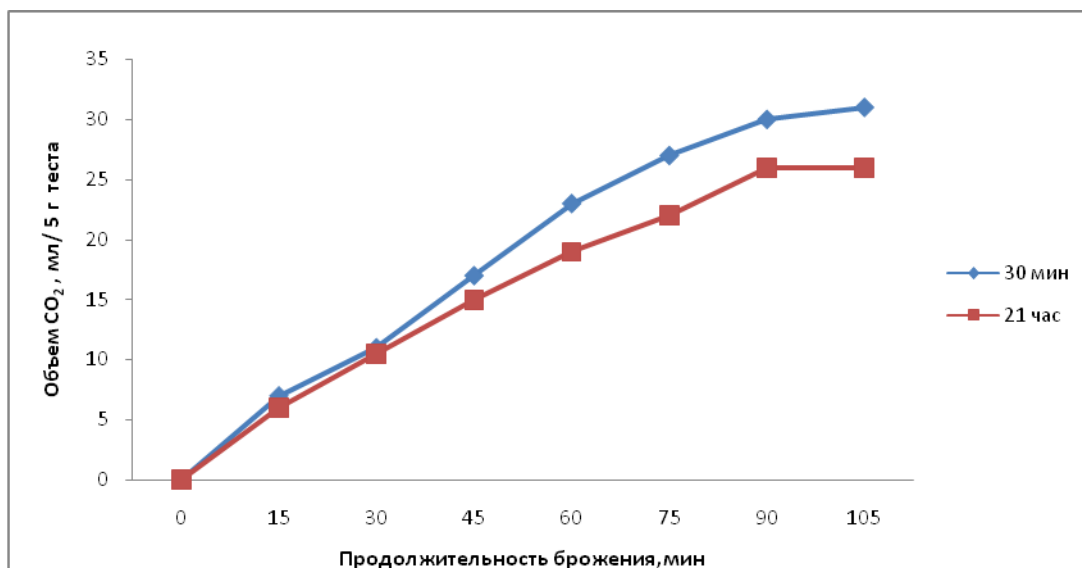


Рис.2. Влияние продолжительности действия пероксида водорода на дрожжи и продолжительности брожения теста на процесс газообразования

Как видно из рисунка, интенсивность газообразования дрожжевой суспензии, уменьшается при суточном инкубировании с раствором пероксида водорода, что говорит об окислительном повреждении клеток. Также данный эксперимент позволяет исключить влияние низкомолекулярных компонентов, входящих в состав муки на количество выделяемого диоксида углерода. В дальнейшем использовали выбранные условия обработки пероксидом водорода, для получения дрожжей с пониженной формой метаболизма.

Для оценки влияния содержания пероксида водорода и продолжительности брожения теста на процесс газообразования готовили растворы пероксида водорода с содержанием 0,25%, 0,5%, 0,75% и 1,0%, которые инкубировали в течении 24 часов, затем добавляли 5 г муки и замешивали тесто. Результаты экспериментов приведены на рис.3.

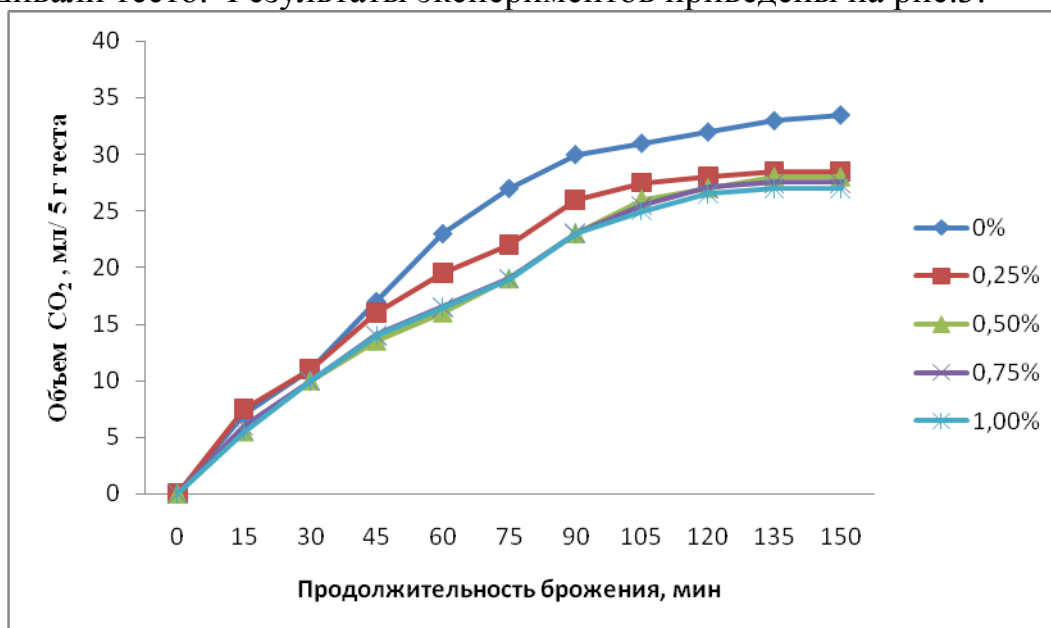


Рис.3. Влияние содержания пероксида водорода и продолжительности брожения теста на процесс газообразования

Из рисунка видно, что с повышением концентрации пероксида водорода и продолжительности брожения снижается количество диоксида углерода. Для дальнейших исследований выбрана концентрация пероксида водорода 0,25%, что соответствует минимальному расходу пероксида водорода. Интенсивность газообразования дрожжей уменьшается при росте концентрации выше 0,75%, что свидетельствует о значительном окислительном повреждении клеток.

Для изучения влияния различного содержания добавляемой муки в растворе пероксида водорода и продолжительности брожения теста на процесс газообразования готовили дрожжевую суспензию, содержащую 0,6г дрожжей в 6 мл раствора пероксида водорода, и инкубировали в течение 21ч, добавляли 5,10,15г муки и замешивали тесто. Результаты приведены на рис.4.

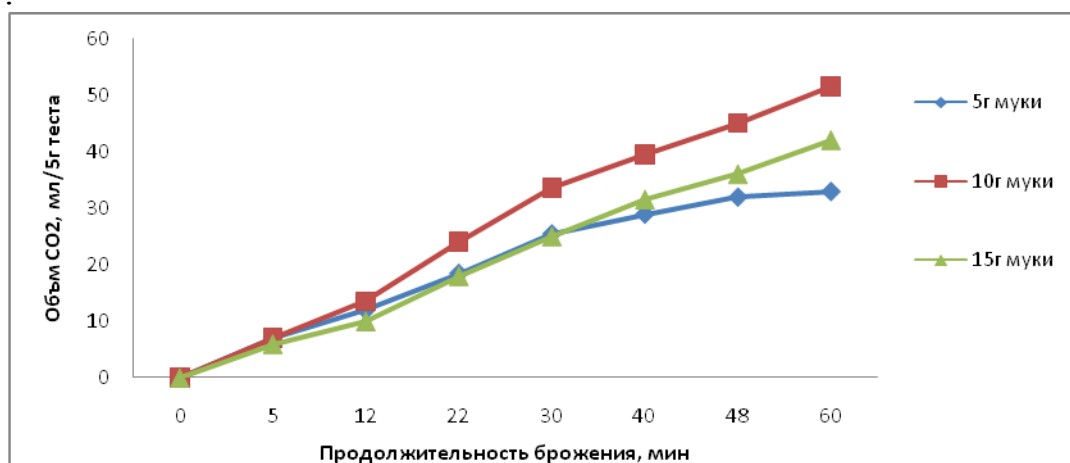


Рис.4. Влияние различного содержания муки в растворе пероксида водорода и продолжительности брожения теста на процесс газообразования

Из рисунка видно, что, наибольшее количество CO_2 , выделяется при внесении дрожжевой суспензии 10 г муки, наименьшее массой 5 г. Для дальнейших исследований принимали рабочую концентрацию вносимой муки равной 10г.

В результате экспериментов были определены оптимальные условия для оценки влияния пептидных препаратов дрожжей на их газообразующую активность: суточное инкубирование 0,6 г дрожжей в 6 мл 0,25 % пероксида водорода и добавление к раствору 10 г муки.

Для изучения влияния пептидных фракций и продолжительности брожения теста на процесс газообразования дрожжей, готовили суспензию 0,6 г дрожжей в 6 мл 0,25 % растворе пероксида водорода. В раствор дрожжевой суспензии добавляли пептидные фракции и инкубировали раствор в течение суток, затем добавляли 10 г муки и замешивали тесто. Результаты экспериментов приведены на рис.5.

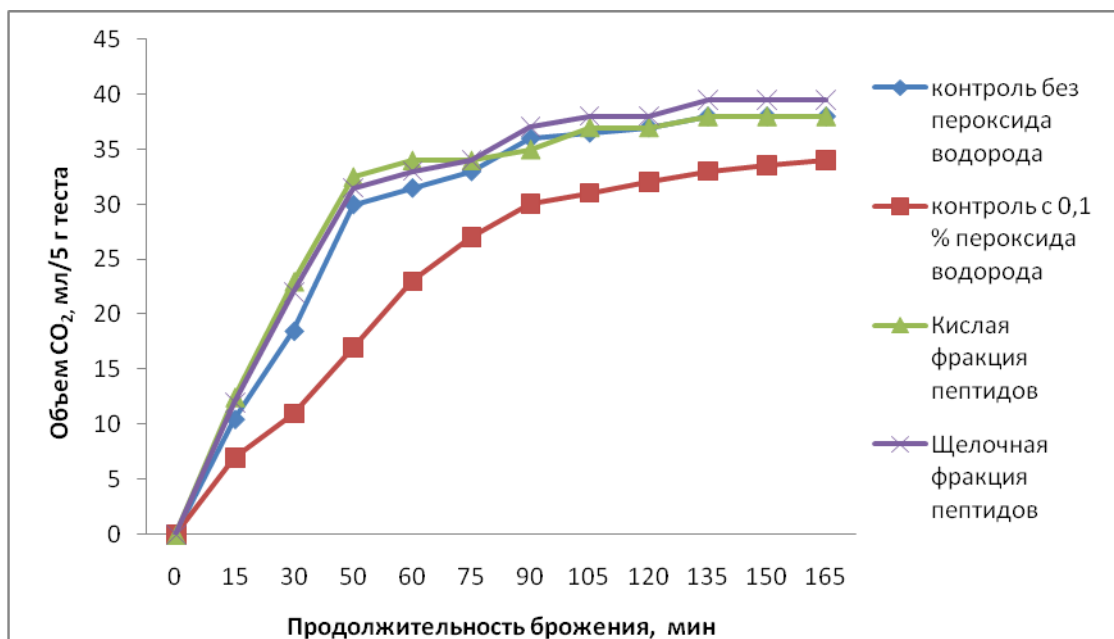


Рис.5. Влияние пептидных фракций и продолжительности брожения теста на процесс газообразования

Таким образом, суточное инкубирование дрожжей в растворе пероксида водорода, приводит к их окислительному повреждению, что отражено в виде снижения выделения CO_2 в контрольных образцах дрожжей. При этом клетки дрожжей в перексиде водорода, инкубированные в течение суток с добавлением кислых и щелочных фракций пептидов восстанавливают свою биологическую активность после их окислительного повреждения, что можно подтвердить количеством выделенного диоксида углерода, сравнимого с контрольным образцом без окислительного действия на дрожжи. Механизм репарирующего воздействия пептидов кислой и щелочной фракций отличается. Эффективным репарирующим эффектом при окислительном действии на клетки дрожжей обнаруживается в присутствии пептидов щелочной фракции при концентрации $1,7 \text{ мг}\cdot\text{мл}^{-1}$ в растворе.

Известно, что ультрафиолетовое (УФ) облучение оказывает губительное действие на микроорганизмы, включая дрожжи. Использовали модель повреждения дрожжей УФ-излучением, которое создается с помощью бактерицидной лампы БУФ.

Для оценки влияния бактерицидного воздействия на жизнеспособность дрожжей при добавлении щелочной фракции пептидов и продолжительности брожения теста на процесс газообразования использовали выбранные условия в модели окислительного повреждения дрожжей. Готовили дрожжевую суспензию, содержащую 0,6г дрожжей в 6 мл воды и подвергали действия УФ-излучения в течение 20 мин. в открытых стерильных чашках Петри с добавлением щелочной фракции пептидов. В качестве контроля служили образцы дрожжей не подверженные действию УФ-излучения. В полученные образцы добавляли по 10г муки и замешивали тесто. Полученные результаты представлены на рис. 6.

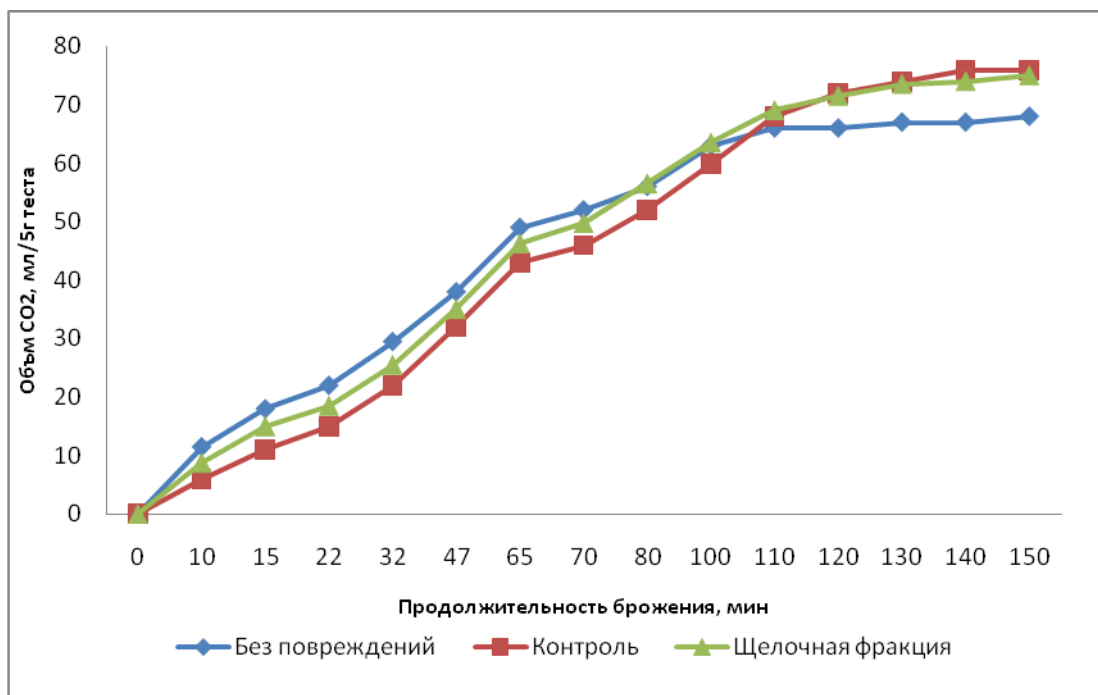


Рис.6. Влияние бактерицидного воздействия на жизнеспособность дрожжей при добавлении щелочной фракции пептидов и продолжительности брожения теста на процесс газообразования

При действии на дрожжи ультрафиолетового излучения наблюдается значительное снижение биологической активности дрожжей. При добавлении 10 мг щелочного пептида интенсивность газообразования достигает объема диоксида углерода, которые не подверглись действию УФ-излучения культуры дрожжей. Таким образом, щелочная фракция пептидов способна восстанавливать биохимические характеристики поврежденных клеток дрожжей УФ-излучения.

Выводы

Было показано на двух моделях поврежденных клеток дрожжей, что использование пептидных фракций приводит к восстановлению биохимических характеристик клеток.

При добавлении к культуре дрожжей, подвергшихся воздействию раствора перекиси водорода, кислой и щелочной пептидных фракций наблюдается увеличение биологической активности дрожжей, что приводит к увеличению интенсивности выделения диоксида углерода.

При добавлении к культуре дрожжей, подвергшейся воздействию бактерицидного ультрафиолетового излучения (БУФ) наблюдается восстановление биологической активности дрожжей до неповрежденной культуры дрожжей.

Выделенные биологически активные пептиды из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* могут быть применены в качестве БАД в

тестоприготовлении для повышения устойчивости клеток дрожжей к различным стрессовым факторам.

Список литературы

1. Андреев А.Н. Современные технологии производства хлебобулочных изделий из замороженных тестовых полуфабрикатов. СПб., ГУНиПТ, 2005. С 35-39.
2. Китиссу П.А., Андреев А.Н. Исследование влияния различных видов дрожжей на свойства быстрозамороженных тестовых полуфабрикатов. Известия СПбГУНиПТ, 2009. – С. 39-41.
3. Cortes, Dino Paolo A. A Possible Role of Peptides in the Growth Enhancement of an Industrial Strain of *Saccharomyces* sp. / Dino Paolo A. Cortes, Albert Francis E. Domingo, Alexes C. Daquinag, Cynthia T. Hedreyda // *Science Diliman*. – 2005. – V. 17. – P. 15-22.
4. Синицкая, Н. С. Нуклеопротеиновые комплексы дрожжей: получение и характеристика : дис. ... канд. биол. наук : 03.00.23. ; СПХФА. – СПб., 2000. – 132 с.
5. Хавинсон В.Х., Шатаева Л.К., Соловьёв А.Ю., Рыжак Г.А., Козлов Л.В. Способ получения средства, обладающего тканеспецифической активностью, и средство, полученное данным способом (варианты). Патент РФ № 241676 //опубл. 10.04.2011., Бюл.№ 10.
6. Пучкова Л.И. Лабораторный практикум по технологии хлебопекарного производства. — 3-е изд. — М.: Легкая и пищевая промышленность, 1982. — 232 с.
7. Ямашев Т. А., Решетник О. А. Влияние предварительной активации дрожжей пероксидом водорода на их адаптацию к кислотному стрессу. // Вестник Казанского технологического университета. 2010. №11. С.301-306.
8. Берри, Д. Р. Биология дрожжей / Д. Р. Берри. – М. : Мир, 1985. – С.
9. Соловьёв А.Ю., Жилинский Д.В., Чернова И.А., Шатаева Л.К., Хавинсон В.Х. Выделение регуляторных пептидов из тимусамина — нуклеопротеинового комплекса тимуса // Сорбционные и хроматографические процессы, 2011, Т.11, №6, С.760-768.