

ИЗУЧЕНИЕ ТИЛОВЫХ ВЕЩЕСТВ В ХЛЕБОПЕКАРНЫХ ДРОЖЖАХ

А.Г. Шлейкин, Н.Т. Жилинская, А.В. Кабанов
alk979@yandex.ru

Санкт-Петербургский государственный университет
низкотемпературных и пищевых технологий.

Проведено определение белковых и низкомолекулярных тиоловых веществ в водных экстрактах хлебопекарных дрожжей. При хранении в течение 35 дней при 0-4°C содержание белковых тиолов снижается в среднем на 31%. В таких же условиях концентрация низкомолекулярных тиоловых веществ увеличивается в 2 раза. Обсуждаются возможные причины и биологическое значение полученных результатов.

Ключевые слова: *Saccharomyces cerevisiae*, тиоловые соединения, активные формы кислорода, окислительный стресс

THE STUDY OF THIOL SUBSTANCES IN THE BAKER'S YEAST

A.G. Shleikin, N.T. Zhilinskaya, A.V. Kabanov
alk979@yandex.ru

Saint-Petersburg state university of refrigeration and food
engineering

Both protein and low-molecular thiol-containing substances were studied in water extracts from baker's yeast. After 35-days of storage, the thiol level in proteins was measured and found to be reduced by 31%. At the same time the content of low-molecular thiols in the solute, on average, increased twofold under the same storage conditions. The putative reasons and biologic implications of the observed phenomena are currently being discussed.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, thiol compounds, reactive oxygene species, oxidative stress

Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, являясь источниками высоко- и низкомолекулярных биологически активных веществ, широко применяются в промышленности технологиях, включая пищевые [1]. Кроме того культуры дрожжевых клеток используются для моделирования физико-химических процессов *in vivo* в медико-биологических исследованиях [17].

Среди внутриклеточных метаболитов дрожжей особый интерес представляют тиол-содержащие вещества, к числу которых относится водорастворимый антиоксидант – трипептид глутатион, на который

приходится до 90% внутриклеточных низкомолекулярных тиолов. Глутатион участвует в окислительно-восстановительном гомеостазе, в защите клеточных структур от повреждающего действия активных форм кислорода [15;18], регуляции активности ферментов и иммунных реакций [2;9]. Ранее было установлено, что тиолдисульфидная система клеток участвует в ответе живых систем на геофизические, биологические и техногенные факторы окружающей среды [6]. По-видимому, низкомолекулярные тиолы выполняют роль клеточных детекторов, неспецифически реагирующих на внешние воздействия изменением соотношения восстановленных и окисленных сульфгидрильных групп. Последние в свою очередь вступают в реакции тиолдисульфидного обмена с сульфгидрильными группами белков-триггеров, что вызывает конформационную модификацию этих белков, инициирующую включение биохимических адаптационных механизмов [11]. Наиболее вероятным ключевым белком в описанном механизме окислительно-восстановительной сигнализации клеток служит тиоредоксин [16]. Известно также, что истощение фонда восстановленного глутатиона и окисление белковых тиолов приводит к активации транскрипции генов белков теплового шока [13].

Известно, что с возрастом происходит истощение антиоксидантного фонда клеток и тканей [5]. Однако имеются данные об увеличении в дрожжах содержания глутатиона при старении [4].

Следует отметить, что исследование динамики накопления восстановленных низкомолекулярных тиолов (в первую очередь – глутатиона) как активаторов тиоловых ферментов представляет интерес не только для микробиологов, энзимологов и биохимиков, но и для биотехнологов. Последнее определяется тем, что используемые в технологии способы хранения дрожжей при положительных низких температурах 0 – 4 °С приводят к существенному изменению биохимических характеристик культур, что важно для их дальнейшего использования как в исследовательских целях, так и в промышленности.

В связи с этим в настоящей работе мы поставили задачу изучения изменения соотношения высоко- и низкомолекулярных тиолов в культурах дрожжей в условиях длительного хранения при низких положительных температурах.

Материал и методы

Хлебопекарные дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, штамм ЛВ-7, получали на Санкт-Петербургском комбинате пищевых продуктов. Свежие дрожжи помещали в холодильник, где хранили в течение 35 суток при 0 – 4 °С. Для исследования еженедельно отбирали аликвоты дрожжей. Пробы подвергали замораживанию при -20 °С и размораживанию для разрушения клеточных стенок дрожжей, затем гомогенизировали в течение 5 мин в стеклянном гомогенизаторе типа Potter-Elvehjem с дистиллированной водой (соотношение дрожжи: вода = 1 : 10). Полученные водные суспензии осаждали в центрифуге в течение 30 мин при 13000 g при температуре +4 °С.

Содержание общего белка в надосадочной жидкости определяли методом Лоури [14]. Определение высокомолекулярных (белковых) и низкомолекулярных сульфгидрильных (SH-) и дисульфидных (SS-) групп проводили, соответственно, прямым [7] и обратным [8] амперометрическим титрованием на анализаторе ТДА-02 Института аналитического приборостроения РАН. Содержание белковых SH- и SS-групп в пробах выражали в мкмоль/г белка, концентрацию низкомолекулярных SH- и SS-групп – в мкмоль/л. Статистическая обработка результатов проводилась стандартными методами (t-тест Стьюдента) в программе Microsoft Excel-2000. Различия между сравниваемыми величинами считали достоверными при $P < 0,05$ [3].

Результаты и их обсуждение

Результаты количественных определений белка, SH- и SS-групп в надосадочной жидкости, полученной из свежих дрожжей и после 7 суток хранения, а также в интервалах 14-21 и 28-35 суток хранения статистически мало различались, поэтому они были объединены. Содержание белка в надосадочной жидкости свежих дрожжей составляло $1,04 \pm 0,06$ г/л. Через 35 суток хранения количество белка в пробах снижалось до $0,81 \pm 0,03$ г/л. В таблице приведены средние величины содержания сульфгидрильных и дисульфидных групп в водорастворимых белках и низкомолекулярных веществах дрожжей в разные интервалы времени хранения: первый – 0-7; второй – 14-21; третий – 28-35 суток.

Таблица 1

**Содержание восстановленных (SH) и окисленных (SS) групп
в водных экстрактах дрожжей, мкмоль/г белка**

Тиоловые вещества		Срок хранения, сутки		
		0-7	14-21	28-35
Белковые	-SH	353	352	243
	-SS-	147	139	129
Низкомолекулярные	-SH	60	78	120
	-SS-	36	37,5	39

Как видно из приведенных в таблице данных, в белках водных дрожжевых экстрактов содержание SH-групп снизилось за 35 суток хранения в среднем на 31% (от 353,41 до 243,15 мкмоль/г), а количество SS-групп достоверно не изменилось, но проявило тенденцию к снижению (147,52 и 129,36 мкмоль/г, соответственно).

В тех же условиях содержание низкомолекулярных SH-групп увеличилось в 2 раза (от 60,29 до 120,45 мкмоль/л), а SS-групп достоверно не изменилось (36,18 и 39,29 мкмоль/л, соответственно).

Поскольку в клетках, лишенных питательной среды, не могут эффективно протекать анаболические процессы, в том числе энергозависимый синтез глутатиона, на который приходится большая часть небелковых SH-групп в биологических средах, а восстановление его окисленной (дисульфидной) формы привело бы к снижению количества SS-групп, то вероятных причин увеличения содержания низкомолекулярных тиоловых веществ в дрожжах в условиях опыта может быть несколько. Первая возможная причина – уменьшение использования восстановленного глутатиона в реакциях внутриклеточного метаболизма, замедленного вследствие низкой температуры; вторая – активация частичного протеолиза внутриклеточных белков с образованием низкомолекулярных пептидов, обладающих высоким содержанием цистеина, в боковом радикале которого содержится SH-группа.

В пользу второго механизма косвенно свидетельствуют данные об интенсивной экспрессии синтеза металлотионеинов, характеризующихся высоким содержанием серосодержащих аминокислот – до 30 % на моль белка, в штамме дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* ДВ 747, отличающимся сравнительно большей устойчивостью к действию активных форм кислорода [10].

Можно предположить, что в условиях данного эксперимента дрожжевые клетки испытывают голодовой стресс, приводящий к активации свободно-радикального окисления и механизмов антиоксидантной защиты.

Установленное нами увеличение водорастворимых низкомолекулярных тиолов при низкотемпературном хранении дрожжей может служить интегральным показателем ответной реакции клеток на действие неблагоприятного фактора. В дальнейших исследованиях планируется изучить механизм накопления восстановленных форм низкомолекулярных тиоловых веществ в дрожжевых клетках при хранении, а также факторы, влияющие на этот процесс.

Список литературы:

1. Бабьева И.П., Чернов И.Ю. 2004. Биология дрожжей // М.: Товарищество научных изданий КМК.
2. Головкин В.И., Калинина Н.И., Шлейкин А.Г. 2003. Иммуноопосредованный ремитирующий рассеянный склероз (Под ред. В.И. Головкина) / СПб.: Лики России.
3. Джонсон Н., Лион Ф. 1980. Статистика и планирование эксперимента в технике и науке // М.: Наука.
4. Еркинбаева Р.К., Поландова Р.Д. 2008. Повышение биотехнологических свойств и микробиологической чистоты хлебопекарных дрожжей. Мат. Межд. науч. конф. РАСХН. Углич, С. 95-97.
5. Макаров В.Г. 1986. Онтогенетические и суточные особенности состояния тиолдисульфидной системы крови белых крыс. Флюктуации состояния биохимических систем. Л.: ЛСГМИ, С. 12-18.

6. Соколовский В.В. 2008. Тиолдисульфидная система в реакции организма на факторы окружающей среды// СПб.: Наука.
7. Соколовский В.В. 1962. Определение содержания сульфгидрильных групп в крови амперометрическим титрованием / Лаб. дело. № 8. С. 3-6.
8. Соколовский В.В., Белозерова Л.А., Огурцова Р.Е. 1977. Количественное определение тканевых дисульфидных групп обратным амперометрическим титрованием // Вопросы мед. химии. 23(5):709-712.
9. Соколовский В.В., Шлейкин А.Г. 1992. Роль окислительно-восстановительных процессов в организме при действии повреждающих факторов // Современные проблемы изучения и сохранения биосферы. Т. 2: Живые системы при внешнем воздействии/СПб.: Гидрометеиздат, С. 132-136.
10. Шаронов Б.П., Киселев О.И., Кондратьева Л.Д. 1989. Действие свободных радикалов кислорода на жизнеспособность штаммов *Saccharomyces* с различными уровнями экспрессии металлотioneинов// ДАН. 307(6):1490-1493.
11. Шлейкин А.Г. 2002. Антиоксидантный механизм клеточной адаптации// Мат. НПК «Актуальные проблемы современной медицины»/СПб.: ВМА, С. 47- 48.
12. Leung-Toung R., Li W., Tam T., Karimian K. 2002. Thiol-dependent enzymes and their inhibitors: a review// *Curr. Med. Chem.* 9 (9): 979-1002.
13. Liu H., Lightfoot R., Stevens J. 1996. Activation of heat shock factor by alkylating agents is triggered by glutathione depletion and oxidation of protein thiols// *J. Biol. Chem.* 271(9): 4805-4812.
14. Lowry O.H., Rosenbrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent// *J. Biol. Chem.* 193 (1). P. 265-275.
15. Munday R., Winterbourn C. 1989. Reduced glutathione in combination with superoxide dismutase as an important biological antioxidant defense mechanism // *Biochem. Pharmacol.* 38(24): 4349-4352.
16. Nakamura H. 2004. Thioredoxin as a key molecule in redox signaling // *Antioxid. Redox Signal.* 6 (1): 15-17.
17. Saroja Gurazada 2008 Use of Yeast species as the Biocomponent for Priority Environmental Contaminants Biosensor Devices//Thesis submitted to Auckland University of Technology in fulfilment of the degree of Doctor of Philosophy (PhD)
18. Schafer F., Buettner G. 2001. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple// *Free Radic. Biol. Med.* 30 (11): 1191-1212.