

Изучение тиолдисульфидного равновесия в хлебопекарных дрожжах

Д-р мед. наук А. Г. ШЛЕЙКИН¹, *канд. биол. наук* А. В. КАБАНОВ²,
канд. техн. наук Е. С. СЕРГАЧЁВА³, Е. В. СОБОЛЕВА⁴,
И. А. ПОПОВА⁵, К. Р. МАМАДЖАНЗОДА⁶

¹shleikin@yandex.ru, ²alk979@yandex.ru, ³essergaail.rucheva@mail.ru,
⁴elenavsoboleva@mail.ru, ⁵akreditiv@mail.ru, ⁶koba_90@mail.ru

Университет ИТМО

Институт холода и биотехнологий
191002, Санкт-Петербург, ул. Ломоносова, 9

Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, являются источниками высоко- и низкомолекулярных биологически активных веществ, они широко применяются в биотехнологической промышленности, в пищевых технологиях. Ранее было установлено, что в условиях холодильного хранения содержание низкомолекулярных SH-групп в хлебопекарных дрожжах увеличивается, что требует объяснения. Определение редокс-потенциала в разных штаммах промышленных дрожжей имеет теоретический и практический интерес, однако в литературе такие данные отсутствуют. Проведенный в данной работе расчет E_0' в тиолдисульфидной системе разных штаммов промышленных дрожжей, показало отсутствие внутривидовых различий этого показателя. При сравнении редокс-потенциала лабораторных культур и прессованных хлебопекарных дрожжей найдены более высокие значения E_0' в клетках культур. Обсуждаются теоретическое и практическое значение полученных результатов.

Ключевые слова: *Saccharomyces cerevisiae*, тиоловые соединения, окислительно-восстановительный потенциал.

Thioldisulfid balance in baker's yeast

D. Sc. A. G. SHLEIKIN¹, *Ph. D.* A. V. KABANOV²,
Ph. D. E. S. SERGACHEVA³,
E. V. SOBOLEVA⁴,
I. A. POPOVA⁵,
K. R. MAMADZHANZODA⁶

¹shleikin@yandex.ru, ²alk979@yandex.ru,

³essergaail.rucheva@mail.ru,

⁴elenavsoboleva@mail.ru, ⁵akreditiv@mail.ru,

⁶koba_90@mail.ru

University ITMO

Institute of Refrigeration and Biotechnologies
191002, Russia, St. Petersburg, Lomonosov str., 9

Yeast *S. cerevisiae*, are sources of high and low molecular weight biologically active substances. They are widely used in the biotechnology and in food technologies. Previously it was found that under conditions of refrigeration storage content of low molecular SH- groups in baking yeast is increased, but this result requires explanation. Evaluation of the redox potential in different strains of industrial yeast is of great interest, however in literature such data are not available. The calculation of E_0' in thioldisulfid system of different industrial yeast strains has been made. No indicator variations in the strains has been shown to exist. By comparing redox potential of laboratory cultures to the one of compressed baker's yeast a higher values of E_0' have been found in the cells of the former. The theoretical and practical significance of the results obtained is discussed.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, thiol compounds, redox potential.

Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, являются источниками высоко- и низкомолекулярных биологически активных веществ, они широко применяются в биотехнологической промышленности, в пищевых технологиях [1, 2]. Кроме того, культуры дрожжевых клеток используются в моделировании жизненно-важных биохимических процессов *in vivo* в медико-биологических исследованиях.

Среди внутриклеточных метаболитов дрожжей особый интерес представляют серосодержащие вещества, в том числе водорастворимый антиоксидант — трипептид глутатион, на который приходится до 90% внутриклеточных низкомолекулярных тиолов. Для восстановленного глутатиона (GSH) характерны активная тиоловая группа и гамма-глутамильная пептидная связь, что делает его устойчивым к действию пептидаз. Многофункциональность GSH проистекает из его химических свойств и позволяет быть одновременно как нуклеофильным агентом, так и активным восстановителем. GSH взаимодействует с многочисленными электрофильными и окисляющими компонентами, такими как H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$ и OH^{\cdot} . GSH легко реагирует со свободными радикалами, отдавая атом водорода. Подобные взаимодействия обеспечивают защиту, нейтрализуя активный OH^{\cdot} .

В качестве восстановителя GSH играет важную роль в процессах детоксикации. Накопление активных форм кислорода и других токсичных веществ, наблюдаемое в процессе старения, вызывает активацию таких ферментов как глутатионпероксидаза и глутатионтрансфераза, что приводит к истощению внутриклеточного GSH в большинстве клеток [3].

Количество GSH зависит от условий существования клеток, в том числе от возраста. Было показано, что снижение уровня GSH при старении может быть связано или с возрастным увеличением скорости окис-

ления, или со снижением тотального количества GSH, что в свою очередь может быть вызвано или усилением его деградации или снижением биосинтеза [4].

Биосинтез GSH катализируют два фермента: гамма-глутамилцистеинсинтетаза и глутатионсинтетаза. Снижение уровня GSH в клетках нарастает одновременно с увеличением количества пероксидов, что происходит, в частности, при старении [5]. В реакциях обезвреживания пероксидов образуется окисленный глутатион (GSSG), обладающий токсическим действием, поэтому он быстро конвертируется обратно в GSH ферментом глутатионредуктазой. Снижение уровня GSH в клетках может произойти вследствие его утечки через плазматическую мембрану. Ранее была изучена роль восстановленных (SH) и окисленных (S-S) тиолов и их отношения (SH/S-S) в адаптации организма [6], а также взаимосвязь между тиолдисульфидной и иммунной системами [7]. Известно также, что истощение фонда GSH и окисление белковых тиолов приводит к активации транскрипции генов белков теплового шока. Изучение роли GSH в запрограммированной смерти клеток (апоптозе) показало, что снижение этого трипептида в митохондриях может служить важным пусковым механизмом апоптотического пути. Имеющиеся данные позволяют предполагать, что, по крайней мере, в некоторых типах клеток контроль гомеостаза GSH играет центральную роль в регуляции клеточной смерти [8]. Учитывая, что процесс созревания мясного сырья зависит от факторов, участвующих в физиологических условиях в апоптозе, изучение редокс-состояния тиолов в клеточной модели дрожжей имеет значение и для переработки животного сырья.

Таким образом, исследование динамики накопления восстановленных тиолов 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 от 0 до 4 °C приводят к существенному изменению биохимических характеристик культур, что важно для их дальнейшего использования, как в исследовательских целях, так и в промышленности.

Ранее было установлено, что в условиях холодильного хранения содержание SH-групп в белках водных дрожжевых экстрактов снижается за 35 сут. хранения в среднем на 31%, а количество SS-групп проявляет тенденцию к снижению. В тех же условиях содержание низкомолекулярных SH-групп увеличивалось в 2 раза [4]. Представляет интерес исследование окислительно-восстановительного потенциала разных рас дрожжевых клеток, имеющих промышленное значение.

Материал и методы

Объектом исследования служили штаммы *Saccharomyces cerevisiae*:

- ЛВ-7 (классическая культура дрожжей);
- Л-128 (высокоактивный штамм дрожжей);
- «опытный образец дрожжей», полученный из французского эубиотического лекарственного препарата, а также прессованные хлебопекарные дрожжи.

Все исследованные образцы принадлежат коллекции кафедры биотехнологии продуктов из растительного

сырья ИХиБТ НИУ ИТМО. Концентраты дрожжевых культур (прессованные свежие дрожжи) хранили в холодильнике при температуре от 0 до 4 °C. Для исследования отбирали аликвоты дрожжей, которые подвергали быстрому замораживанию до -20 °C и размораживанию для разрушения клеточных стенок, 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 г при температуре 4 °C.

Определение общих белковых сульфгидрильных (SH) и дисульфидных (S-S) групп проводили, соответственно, прямым и обратным амперометрическим титрованием на анализаторе ТДА-02 Института аналитического приборостроения РАН. Содержание SH- и SS-групп в пробах прессованных дрожжей выражали в мкмоль/г, в культурах — в мкмоль/10⁻¹² клеток. Результаты определения тиоловых и дисульфидных групп использовали для расчета окислительно-восстановительного потенциала дрожжей по уравнению Нернста. Статистическая обработка результатов проводилась стандартными методами (*t*-тест Стьюдента) в программе Microsoft Excel-2000. Различия между сравниваемыми величинами считали достоверными при *P* < 0,05 [9].

Результаты и их обсуждение

Ниже приведены данные количественного определения тиоловых (SH-) и дисульфидных (S-S) -групп амперометрическим методом в надосадочной жидкости, полученной из клеток дрожжей, по описанному выше методу.

В ходе экспериментов использовали следующую маркировку штаммов дрожжей:

- №1 — штамм ЛВ 7 «классические дрожжи», культивированные в ИХиБТ;
- №2 — штамм Л-128 «высокоактивные дрожжи», культивированные в ИХиБТ;
- №3 — «опытные дрожжи», полученные из французского эубиотического лекарственного препарата;
- №4 — штамм ЛВ 7 «классические дрожжи», промышленного культивирования;
- №5 — штамм Л-128 «высокоактивные дрожжи», промышленного культивирования.

Таблица 1

Содержание тиоловых и дисульфидных групп в надосадочной жидкости лабораторных культур дрожжей

| Штамм | SH-группы, мкмоль/10 ⁻¹² клеток | S-S- группы, мкмоль/10 ⁻¹² клеток | E _o ', мВ |
|------------------------------|--|--|----------------------|
| №2 — «высокоактивные дрожжи» | 0,220±0,030 | 0,050±0,010 | — 307,5±5,16 |
| №3 — «опытные дрожжи» | 0,230±0,250 | 0,040±0,008 | — 314,3±4,23 |

Содержание SH- и S-S- групп в прессованных дрожжах

| № образца | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|--------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| SH- группы, мкмоль/г | 0,980±0,073 | 1,294±0,033 | 0,520±0,044 | 1,180±0,051 | 1,342±0,070 |
| S-S- группы, мкмоль/г | 0,480±0,050 | 0,581±0,021 | 0,206±0,035 | 0,325±0,014 | 0,217±0,036 |
| E_o' , мВ | 0,221±0,013 | 0,219±0,023 | 0,215±0,017 | 0,206±0,034 | 0,193±0,045 |

Результаты определения общих SH- и S-S- групп, а также расчетные величины редокс-потенциала в образцах дрожжей, выращенных в лабораторных условиях и смытых с твердой питательной среды, показаны в табл. 1.

Приведенные в таблице результаты показывают, что содержание восстановленных и окисленных тиоловых веществ в штаммах дрожжей, различающихся своими технологическими свойствами и промышленным применением, статистически не различаются, что является, по-видимому, их видовым признаком. В литературе имеются данные о величинах редокс-потенциала (E_o') в окислительно-восстановительных системах белка тиоредоксина ($-240 \div -260$ мВ), и низкомолекулярных тиоловых веществ, представленных на 90% глутатионом ($-230 \div -250$ мВ) [10]. Значения полученных нами расчетных величин являются выше экспериментальных значений, найденных в литературных источниках. Этот факт можно объяснить методическими различиями в проведении экспериментов.

Во второй части исследования сравнивали концентрации тиоловых веществ и величины окислительно-восстановительного потенциала в дрожжевых клетках, полученных из прессованных дрожжей (табл. 2).

Как видно из данных табл. 2, наиболее высоким содержанием тиоловых веществ обладают дрожжи штамма Л-128 «высокоактивные», промышленного культивирования, а наиболее низким — дрожжи *S. cerevisiae*, высеянные из эубиотического препарата. В «классических» дрожжах (штамм ЛВ-7) количество тиолов ниже, чем в «высокоактивных», как при культивировании в ИХиБТ (штамм №1), так и в промышленных условиях (штамм №4). По аналогии с другими живыми системами, снижение тиолдисульфидного равновесия может служить признаком меньшей стрессоустойчивости клеток штамма ЛВ-7 по сравнению со штаммом ЛВ-128 [11]. При этом существенных различий величин редокс-потенциала в дрожжевых клетках прессованных дрожжей *S. cerevisiae*, полученных из разных дрожжей, не выявлено. Рассчитанные значения находятся в диапазоне величин редокс-потенциала в окислительно-восстановительных системах низкомолекулярных тиоловых веществ.

На основании полученных данных можно предположить, что редокс-потенциал дрожжевых клеток является в большей степени видовым параметром, нежели расовым, а его численные значения зависят от физиологического состояния клеток: в более активных лабораторных культурах, выращиваемых на питательных средах, соответствующие величины оказались более высокими, чем в состоянии относительного покоя в прессованных дрожжах.

Заключение

Согласно полученным данным редокс-потенциал зависит от физиологического состояния дрожжей. Представляется вероятным, что генетические изменения, сопровождающие возникновение нового штамма дрожжей, не затрагивают участки генома, ответственные за поддержание тиол-дисульфидного равновесия. Эта область генома является, по-видимому, консервативной, потому, что антиоксидантная защита клетки относится к жизненно-важным функциям и существенные изменения в ней приводят к гибели клеток. Необходимы дальнейшие исследования для выяснения биохимических механизмов регуляции тиолдисульфидного состояния клеток в разных физиологических условиях.

Список литературы

1. *Бабьева И. П., Чернов И. Ю.* Биология дрожжей // — М.: Товарищество научных изданий КМК, 2004.
2. *Борисова С. В., Решетник О. А., Мингалеева З. Ш.* Использование дрожжей в промышленности. — СПб.: ГИОРД, 2008.
3. *Шлейкин А. Г.* Антиоксидантный механизм клеточной адаптации. Мат. НПК «Актуальные проблемы современной медицины». — СПб.: ВМА, 2002.
4. *Шлейкин А. Г., Жилинская Н. Т., Кабанов А. В.* Изучение тиоловых веществ в хлебопекарных дрожжах// Процессы и аппараты пищевых производств, 2012. №2. [Электронный ресурс]: <http://www.processes.ihbt.ifmo.ru>
5. *Дуденко Д. В., Шлейкин А. Г.* Содержание низкомолекулярных тиоловых веществ в дрожжах при старении. IV съезд Российского общества биохимиков и молекулярных биологов. — Новосибирск: Издательство «Арта», 2008.
6. *Соколовский В. В., Шлейкин А. Г.* Роль окислительно-восстановительных процессов в организме при действии повреждающих факторов. В кн.: Современные проблемы изучения и сохранения биосферы. Т. 2. Живые системы под внешним воздействием. — СПб.: Гидрометеиздат, 1992.
7. *Шлейкин А. Г.* Сопряженность антиоксидантной и иммунной систем организма при развитии аутоиммунных процессов. В кн.: Иммуноопосредованный ремитирующий рассеянный склероз. — СПб.: РИФ «Роза мира», 2003.
8. *Hall A. G.* The role of glutathione in the regulation of apoptosis. //Eur. J. Clin. Invest., 1999, Vol. 29.
9. *Джонсон Н., Лион Ф.* Статистика и планирование эксперимента в технике и науке. — М.: Наука, 1980.
10. *Ксенжек О. С., Петрова С. А.* Электрохимические свойства обратимых редокс-систем. — М.: Наука, 1984.
11. *Соколовский В. В.* Тиолдисульфидная система в реакции организма на факторы окружающей среды. — СПб.: Наука, 2008.

References

1. Bab'eva I. P., Chernov I. Ju. *Biologija drozhzhej*. — M.: Tovarishhestvo nauchnyh izdaniy KMK, 2004.
2. Borisova S. V., Reshetnik O. A., Mingaleeva Z. Sh. *Ispol'zovanie drozhzhej v promyshlennosti*. — SPb.: GIORD, 2008.
3. Shlejkin A. G. Antioksidantnyj mehanizm kletочноj adaptacii. *Mat. NPK «Aktual'nye problemy sovremennoj mediciny»*. — SPb.: VMA, 2002.
4. Shlejkin A. G., Zhilinskaja N. T., Kabanov A. V. Izuchenie tiolovyh veshhestv v hlebopekarnyh drozhzhah. *Processy i apparaty pishhevyyh proizvodstv*, 2012. No 2. [Jelektronnyj resurs]: <http://www.processes.ihbt.ifmo.ru>
5. Dudenko D. V., Shlejkin A. G. Soderzhanie nizkomolekuljarnyh tiolovyh ve-shhestv v drozhzhah pri starenii. IV s'ezd Rossijskogo obshhestva biohimikov i molekulyarnyh biologov. — Novosibirsk: Izdatel'stvo «Arta», 2008.
6. Sokolovskij V. V., Shlejkin A. G. Rol' okislitel'no-vosstanovitel'nyh pro-cessov v organizme pri dejstvii povrezhdajushhijh faktorov. V kn.: *Sovremennye problemy izuchenija i sohraneniya biosfery*. T. 2. *Zhivye sistemy pod vneshnim vozdeystviem*. — SPb.: Gidrometeoizdat, 1992.
7. Shlejkin A. G. Sopryazhennost' antioksidantnoj i immunnoj sistem organizma pri razvitii autoimmunnyh processov. V kn.: *Immunooposredovannyj remittirujushhij rassejannyj skleroz*. — SPb.: RIF «Roza mira», 2003.
8. Hall A. G. The role of glutathione in the regulation of apoptosis. *Eur. J. Clin. Invest.* 1999, Vol. 29.
9. Dzhonson N., Lion F. *Statistika i planirovanie jeksperimenta v tehnikе i nauke*. — M.: Nauka, 1980.
10. Ksenzhek O. S., Petrova S. A. *Jelektrohimicheskie svojstva obratimyh redoks-sistem*. — M.: Nauka, 1984.
11. Sokolovskij V. V. *Tioldisul'fidnaja sistema v reakcii organizma na faktory okruzhajushhej sredy*. — SPb.: Nauka, 2008.



13-я международная специализированная выставка
КРИОГЕН-ЭКСПО
Промышленные Газы

28 - 30 октября 2014 | Москва, ЦВК "Экспоцентр", пав. 5



Организатор

Проводится при содействии

- ▶ Международного института холода
- ▶ Международной академии холода
- ▶ Украинской ассоциации производителей технических газов «УА-СИГМА»



ТЕМАТИКА ВЫСТАВКИ:

- Криогенное оборудование
- Воздухоразделительные установки
- Вакуумное оборудование
- Насосное, компрессорное и теплообменное оборудование
- Метрология и средства измерения при низких температурах
- Оборудование для хранения, транспортировки, распределения и потребления промышленных газов и СПГ
- Промышленные и редкие газы, СУГ, попутный нефтяной газ
- СПГ-технологии
- Водородные технологии
- Гелиевые технологии
- Производство CO2
- Технологии генерации и использования озона
- Газовые смеси
- Микрокриогенная техника

ДЕЛОВАЯ ПРОГРАММА 28 - 30 октября 2014 (Москва, ЦВК "Экспоцентр" павильон 5, зал 2):

- 11-я международная конференция «Криогенные технологии и оборудование. Перспективы развития»
- Международная конференция «Промышленные Газы»
- Международная конференция «Сжиженный Природный Газ»
- Международная конференция «Углекислотное оборудование»
- NEW!** Международная конференция «Актуальные проблемы в сфере безопасности производства, хранения и транспортировки промышленных газов»

Информационная поддержка:



Дирекция выставки:

Москва, проспект Андропова, 22
 Тел/факс: +7 499 618 0565
 E-mail: info@cryogen-expo.ru
 Сайт: www.cryogen-expo.ru

www.cryogen-expo.ru
www.cryogen-expo.com

[@cryogeno_ru](https://twitter.com/cryogeno_ru)
[@cryogeno](https://twitter.com/cryogeno)