

**ВИЖИВАННЯ ТА АНТИОКСИДАНТНИЙ ЗАХИСТ ДРІЖДЖІВ
SACCHAROMYCES CEREVISIAE, ВИРОЩЕНИХ НА ГЛЮКОЗІ ТА
ФРУКТОЗІ****Л.М. Моргулець, Т.Р. Бабійчук, О.М. Величко**

Кафедра біохімії, Прикарпатський національний університет імені Василя Стефаника

*В роботі показано, що рівень життєздатності та окисного пошкодження білків у дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* відрізняється при їхньому рості на фруктозі та глюкозі. Знайдено тісний кореляційний зв'язок між активністю каталази та супероксиддисмутази за дії стресу, індукованого перексидом водню. Висловлене припущення про вищу інтенсивність окисних процесів у дріжджів, вирощених на фруктозі, порівняно з клітинами, які росли на глюкозі.*

Ключові слова: *Saccharomyces*, антиоксиданти, каталаза.

*Morgulets L.M., Babijchuk T.R., Velychko O.M. Survival and antioxidant defense of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* grown on glucose and fructose. It was shown that cell survival and the level of oxidized proteins in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* differs at growth on fructose and glucose. A strong relationship between activities of catalase and superoxide dismutase has been found under stress induced by hydrogen peroxide. It can be suggested that intensity of oxidizing processes is higher at growth on fructose as compared with cultivation on glucose.*

Key words: *Saccharomyces*, antioxidant, catalase.

Вступ

В останні роки тривають дискусії щодо доцільності застосування фруктози як замітника сахарози і глюкози. Дієта такого типу рекомендується людям з гіперглікеміями, серцево-судинними захворюваннями, ожирінням та діабетом обох типів. Подібно до глюкози фруктоза є шестивуглецевим моносахаридом і багатим на енергію субстратом [6, 15]. Проте особливості будови молекули фруктози забезпечують її вищу реакційну здатність. Існують дані щодо здатності фруктози до неферментативного глікозилювання білків чи ліпідів, тобто неспецифічного процесу, що порушує функціонування біомолекул і супроводжується утворенням невластивих клітині продуктів AGEs (advanced glycation end-products) [1, 3, 5, 8]. Як наслідок, можливі порушення деяких метаболічних шляхів [5, 15].

Клітини мікроскопічних еукаріотів характеризуються показниками, які дають уявлення про перебіг основних процесів, що забезпечують життєздатність. Серед них здатність до поділу та стан антиоксидантної системи, яка вказує на інтенсивність окисних процесів у клітині. Антиоксидантна система дріжджів *S. cerevisiae* представлена рядом ферментів, що детоксикують активовані форми кисню (АФК). АФК є продуктами нормального аеробного метаболізму, а також можуть утворюватися в клітині внаслідок дії зовнішніх факторів [18]. Ізоферменти супероксиддисмутази (СОД) та каталази контролюють рівень супероксид-аніоніону та перексиду водню, захищаючи тим самим молекули клітин, зокрема ДНК, білки, ліпіди, від окисної модифікації [7, 10, 12-14, 18]. Метою роботи було порівняти особливості росту дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* на глюкозі та фруктозі, як можливих джерел енергії та вуглецю, а також особливості їх антиоксидантного захисту.

Матеріали і методи

В роботі використовували штам *Saccharomyces cerevisiae* YPH250 (дикий тип, *MATa tpr1-Δ1, his3-Δ200, lys2-Δ1, ade2-101, ura3-52 leu2-Δ1*), люб'язно наданий Др. Ү. Іноуе (Кіотський університет, Японія). Дріжджі вирощували за умов аерації при 28°C у середовищі, яке містило 2% і 4% глюкози або фруктози, 2% ферментативного пептону та 1% дріжджового екстракту. Для дослідів дріжджі відбирали на 24, 72 та 120 год культивування. Відповідь на дію стресу, індукованого перексидом водню, вивчали на ранній експоненційній фазі росту дріжджів (14 год).

Життєздатність клітин оцінювали, використовуючи загальноприйнятий підхід визначення кількості колоній-утворюючих одиниць на агаризованому живильному середовищі [19]. Кількість мертвих клітин визначали за допомогою барвника метиленового синього [16]. Для цього суспензію клітин дріжджів витримували з 1% розчином барвника у співвідношенні 4:1 протягом 7 хв, після чого кількість клітин, що набували синього кольору, підраховували в камері Горяєва.

Активність ферментів визначали спектрофотометричним методом на спектрофотометрах СФ-46 і Spekol 211. Активність СОД оцінювали за ступенем інгібування в реакції окислення кверцетину супероксид-аніоном при 406 нм в суміші, яка містила 30 мМ Тріс-НСІ буферу (рН 9,0), 0,5 мМ EDTA, 0,8 мМ ТЕМЕД, 50 мкМ кверцетину [11, 12]. Активність каталази визначали при довжині хвилі 240 нм у пробі, що містила 10 мМ Н₂О₂, 0,5 мМ EDTA, 50 мМ калій-фосфатного буферу (рН 7,0). Для розрахунків використовували коефіцієнт молярного поглинання пероксиду водню 39,4 М⁻¹·см⁻¹ [11, 12]. Кількість карбонільних груп білків визначали за їх взаємодією з 2,4-динітрофенілгідразином [9]. Утворені гідрозони реєстрували спектрофотометричним методом при довжині хвилі 370 нм. Концентрацію карбонільних груп білків розраховували, використовуючи коефіцієнт молярної екстинкції 22×10³ М⁻¹·см⁻¹. Концентрацію білка визначали за методом Бредфорда з використанням кумасі яскраво-синього G-250 [2].

Результати і обговорення

Першим етапом експерименту була оптимізація умов. З цієї метою було вивчено ріст дріжджів *S. cerevisiae* на 2% чи 4% глюкозі та фруктозі. З Рис. 1 видно, що культури дріжджів переходили у стаціонарну фазу росту на 24 год культивування, незалежно від типу та концентрації моносахариду.

При визначенні рівня життєздатності клітин було показано, що кількість колоній-утворюючих одиниць дріжджів, які росли в середовищі з 2% глюкозою чи фруктозою, була вищою порівняно з ростом на 4% глюкозі та фруктозі (Рис. 2).

На Рис. 3 представлена залежність кількості мертвих клітин дріжджів від часу культивування. Цей показник був вищим в культурах, що росли на фруктозі, порівняно з глюкозою і на 168 год становив близько 25% загальної кількості клітин. Слід зауважити, що незалежно від умов культивування кількість колоній на агаризованому середовищі в дослідних культурах була нижчою (Рис. 2), ніж кількість живих клітин (Рис. 3). Отже, не всі живі клітини зберігали здатність до поділу за даних умов.

Для оцінки ступеня окисного пошкодження білків протягом росту культур дріжджів визначали рівень карбонільних груп білків [9]. Дані представлені на Рис. 4. Зауважимо, що концентрація карбонільних груп білків зростала з часом росту дріжджів як на глюкозі, так і на фруктозі. Проте при вирощуванні на фруктозі, незалежно від доби росту та концентрації, цей показник був приблизно в 1,3-2,4 рази вищим, ніж при рості на глюкозі. Отримані результати можуть свідчити про вищу інтенсивність окислення білків при культивуванні дріжджів на фруктозі.

До першої лінії антиоксидантного захисту відносять ферменти СОД та каталазу, роль яких, полягає в детоксикації АФК [4, 7, 14, 18]. З Рис. 5 видно, що активність каталази в клітинах штаму YPH250 зростала протягом росту у всіх досліджуваних культурах. Проте її абсолютні значення залежали від концентрації цукру. Нижчі величини активності каталази за концентрації 4% можна пояснити регуляторними механізмами катаболітної репресії, що спостерігаються за умов високого вмісту вуглеводів у середовищі культивування [4].

Слід зазначити, що між концентрацією карбонільних груп білків та активністю каталази виявлені кореляційні зв'язки ($R^2 = 0,56$ і $0,43$ на 2% глюкозі і фруктозі, та $R^2 = 0,72$ і $0,63$ на 4% глюкозі і фруктозі відповідно). На відміну від цього, подібної залежності між активністю супероксиддисмутази та рівнем карбонільних груп білків не знайдено (дані не представлено).

Як бачимо, ріст на фруктозі, зумовлює вищий рівень загибелі клітин дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*, що супроводжується зростанням вмісту карбонільних груп білків, незалежно від часу росту та її концентрації. Збільшення рівня окислених білків, а також зростання каталазної активності може свідчити про вищу інтенсивність окисних процесів в клітинах дріжджів, вирощених на фруктозі за даних умов.

В зв'язку з цим, було цікаво дослідити рівень виживання клітин штаму YPH250 за умов стресу, індукованого перексидом водню сублетальних концентрацій. Для цього використовували культури на експоненційній фазі росту, коли дріжджі є найчутливішими до дії оксидативного стресу [17].

З Рис. 6 видно, що в ранній експоненційній фазі росту рівень виживання дріжджів *S. cerevisiae* знижувався зі зростання концентрації пероксиду водню і падав приблизно до 6% за концентрації Н₂О₂ 10 мМ.

Наступним етапом було вивчення впливу оксидативного стресу, індукованого перексидом водню, на активність антиоксидантних ферментів у дріжджах, вирощених на глюкозі і фруктозі. Результати представлені на Рис. 7. Активність каталази в дріжджах, що росли на глюкозі та фруктозі, різним чином залежала від концентрації пероксиду водню. За дії 0,5 мМ Н₂О₂ активність каталази в клітинах, вирощених на глюкозі, зросла в 1,8 рази, а в клітинах, які росли на фруктозі, не змінилась порівняно з контролем. В той же час 1 мМ Н₂О₂ призводив до зростання активності ферменту в 1,8 разів у клітинах, вирощених на фруктозі, але не змінював її в клітинах дріжджів, що росли на глюкозі.

На Рис. 8 представлена залежність активності СОД від концентрації пероксиду водню. З нього видно, що за концентрації пероксиду водню 0,5 мМ активність СОД зросла у 1,8 рази в клітинах, вирощених як на глюкозі, так і на фруктозі. Подальше збільшення кількості Н₂О₂ до 1 мМ призвело до зниження активності СОД приблизно до вихідних величин в клітинах дріжджів, які культивували на глюкозі. Тоді як, в культурах, вирощених на фруктозі, 1 мМ Н₂О₂ спричинив подальше зростання активності ферменту у 2,7 рази. За концентрацій пероксиду водню 10 мМ СОД активності не виявлено.

Можемо припустити, що подібні ефекти є характерними при вирощуванні на фруктозі, внаслідок вищої інтенсивності окисних процесів. Клітини адаптуються до росту в умовах м'якого стресу, викликаного особливостями метаболізму фруктози, її вищою реакційною здатністю.

В дослідженнях, проведених в нашій лабораторії раніше [17], було висловлене припущення про можливий взаємозв'язок каталази та СОД за дії перексиду водню. Цікаво, що в представлений роботі також виявлено тісний кореляційний зв'язок між активностями каталази та СОД за умов стресу у дріжджів вирощених як на глюкозі так і на фруктозі (Рис. 9 і 10).

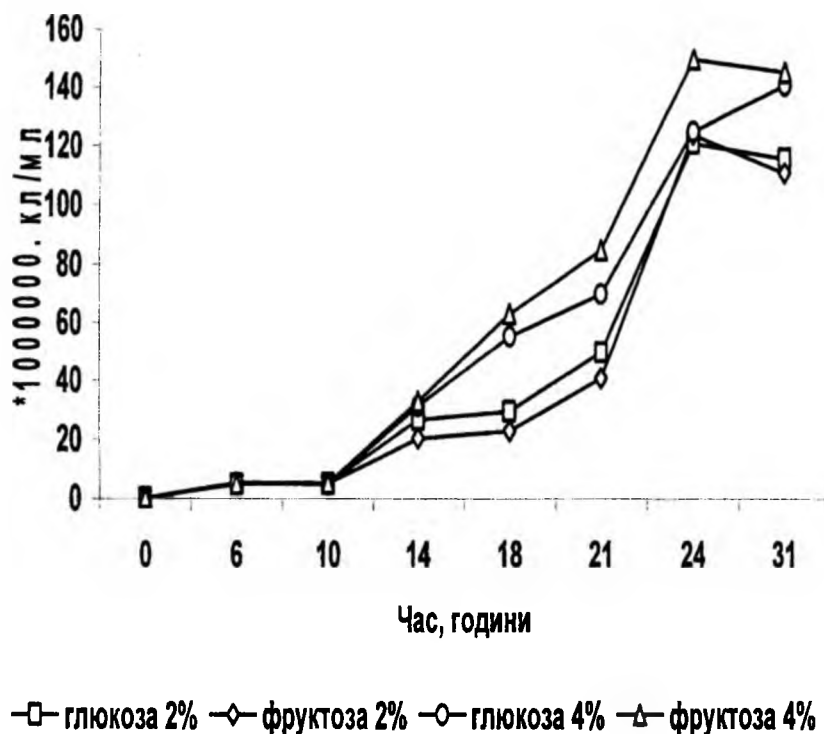


Рисунок 1. Криві росту дріжджів *S. cerevisiae* на глюкозі та фруктозі.

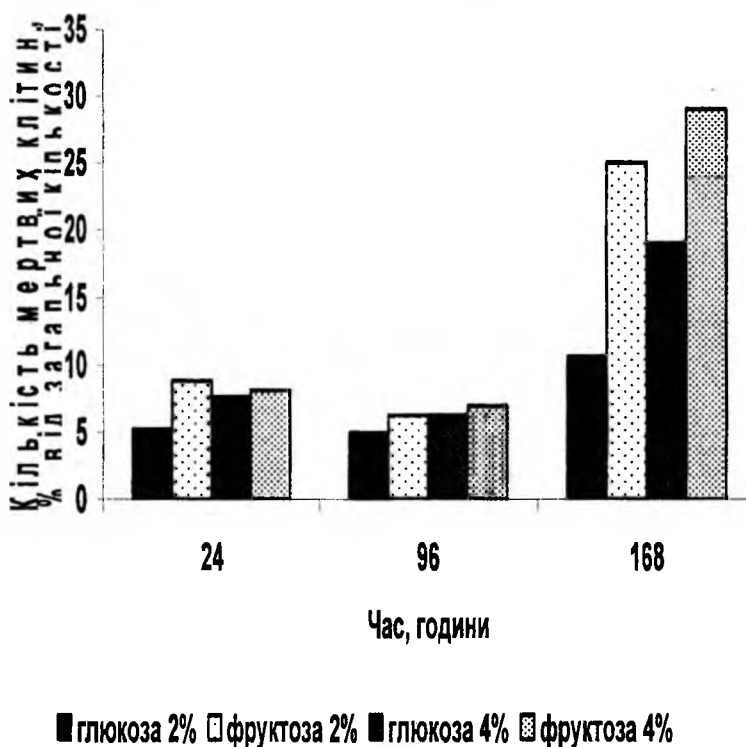


Рисунок 2. Рівень виживання дріжджів *S. cerevisiae*, вирощених на глюкозі та фруктозі.

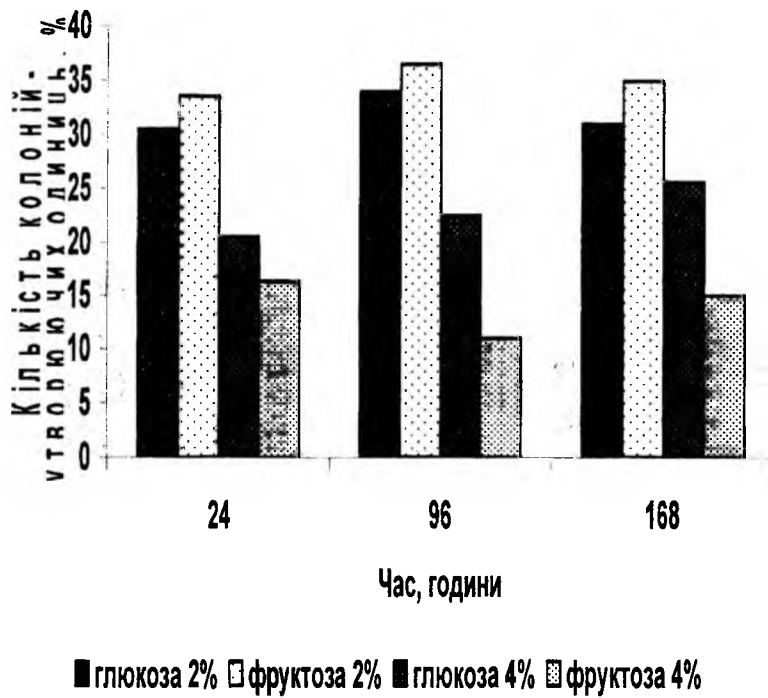


Рисунок 3. Кількість мертвих клітин в культурах дріжджів *S. cerevisiae* при рості на глюкозі та фруктозі.

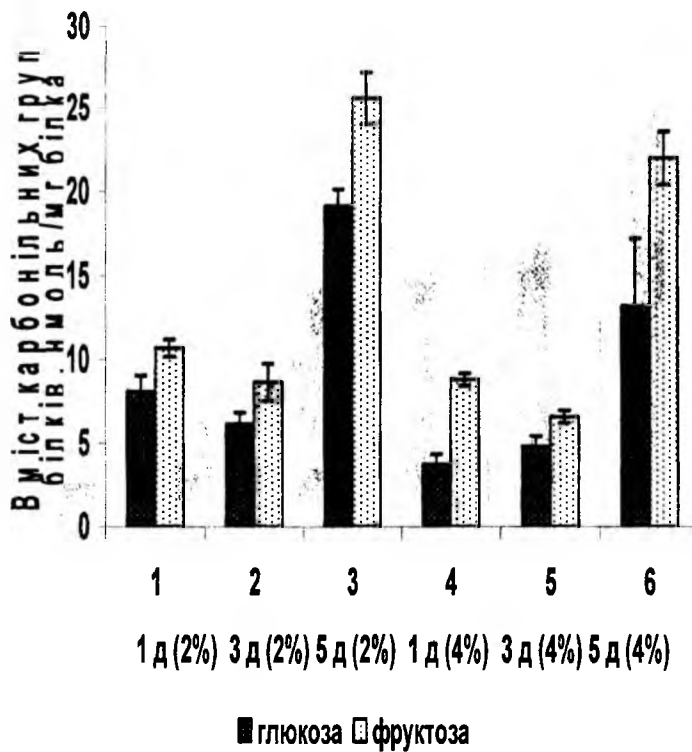


Рисунок 4. Концентрація карбонільних груп білків в клітинах *S. cerevisiae* протягом росту на глюкозі та фруктозі.

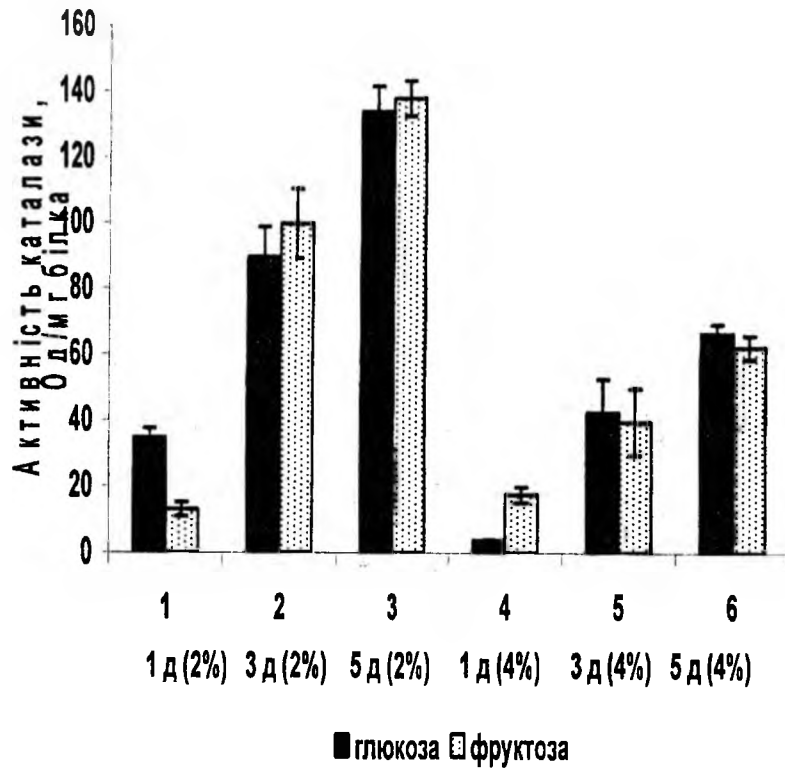


Рисунок 5. Активність каталази в клітинах дріжджів *S. cerevisiae* протягом росту на глюкозі та фруктозі.

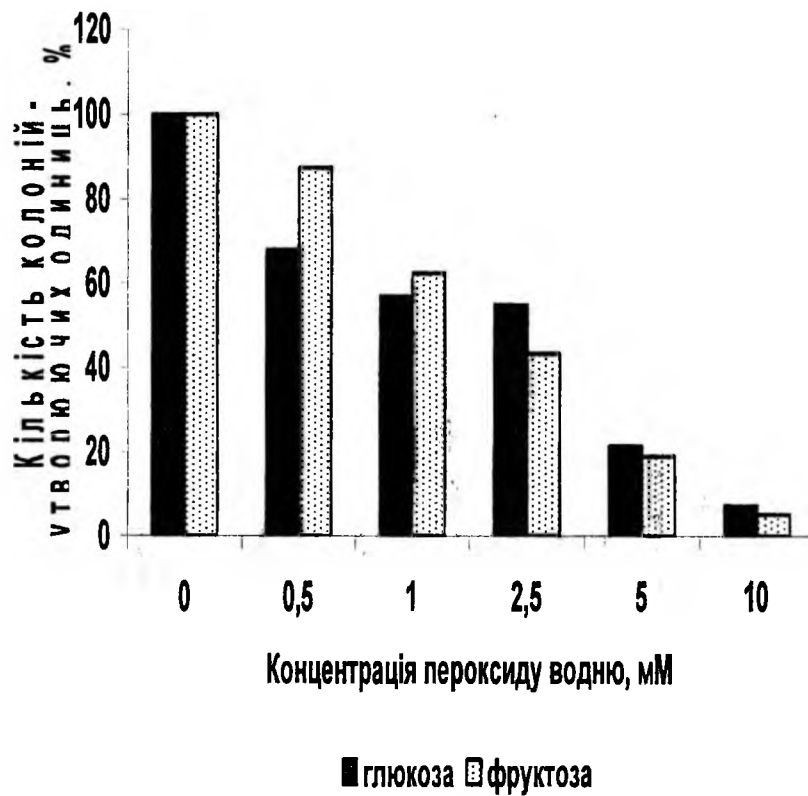


Рисунок 6. Рівень виживання клітин дріжджів *S. cerevisiae*, вирощених на 2% глюкозі та фруктозі, за дії різних концентрацій перексиду водню в середині експоненційної фази росту культур.

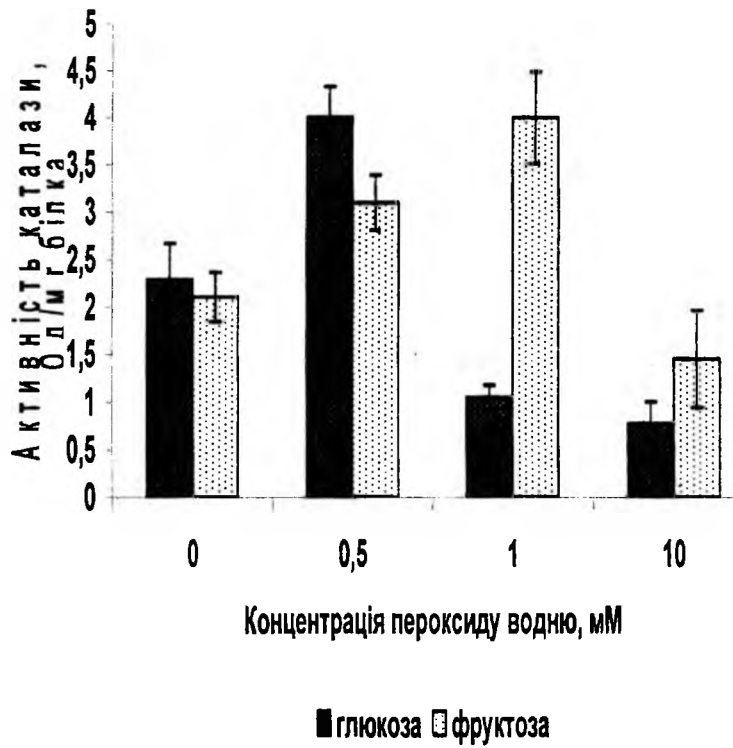


Рисунок 7. Активність каталази клітин дріжджів *S. cerevisiae*, вирощених на 2% глюкозі та фруктозі, за дії різних концентрацій пероксиду водню в середині експоненційної фази росту культур.

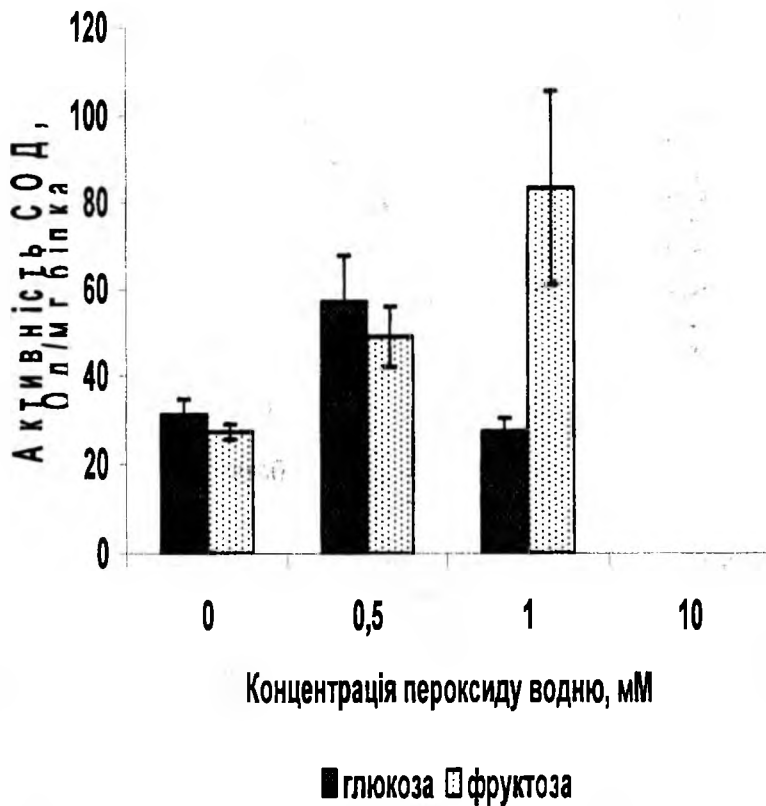


Рисунок 8. Активність супероксиддисмутази клітин дріжджів *S. cerevisiae*, вирощених на 2% глюкозі та фруктозі, за дії різних концентрацій пероксиду водню в середині експоненційної фази росту культур.

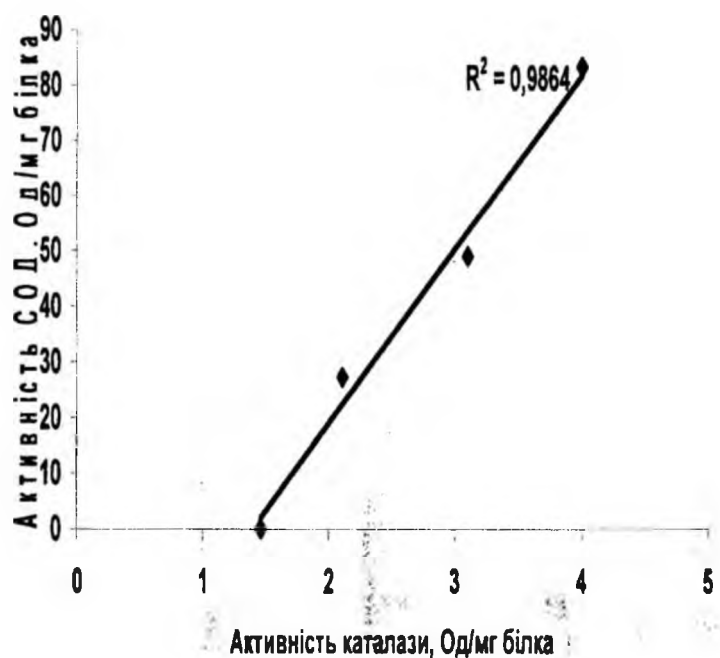
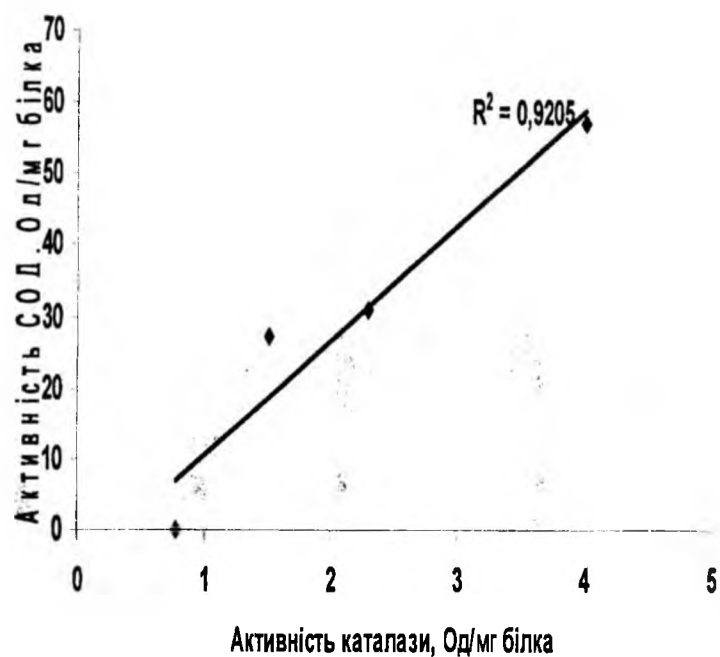


Рисунок 9. Кореляція між активностями каталази і СОД дріжджів *S. cerevisiae* вирощених на 2% глюкозі (А) та фруктозі (Б), за дії різних концентрацій пероксиду водню протягом 30 хв.

В подальшому планується продовжити порівняння особливостей виживання та антиоксидантного захисту вирощуванні клітин дріжджів *S. cerevisiae* на глюкозі та фруктозі, в умовах стресу на різних стадіях стаціонарної фази росту.

Висновки

1. Збільшення активності каталази та концентрації карбонільних груп білків в клітинах дріжджів *S. cerevisiae* зі збільшенням часу культивування може свідчити про розвиток оксидативного стресу. В той же час ріст на фруктозі зумовлює вищий вміст карбонільних груп білків порівняно з культивуванням на глюкозі, що може вказувати на вищу інтенсивність окисних процесів у клітинах, вирощених на фруктозі.

2. Відповідь дріжджів *S. cerevisiae* на стрес, індукований пероксидом водню, залежить від джерела вуглеводів у середовищі культивування.
3. Незалежно від типу моносахариду існує функціональна взаємодія між ферментами каталазою та супероксиддисмутазою в клітинах дріжджів *S. cerevisiae*, за умов стресу, спричиненого пероксидом водню.

Подяки

Автори висловлюють щиру подяку науковому керівнику к.б.н. Семчишин Г. М.

Література

1. *Abmed N., Furth A.J.* Failure of common glycation assays to detect glycation by fructose // *Clinical Chemistry*. - 1992.- Vol.38, N 7. - P. 1301-1303.
2. *Bradford M.M.* A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.* - 1976. - N 2. - P. 248-254.
3. *Burnt H.F., Higgins P.J.* Reaction of monosaccharides with proteins; possible evolutionary significance // *Science*. - 1981. - N 213. - P. 222-224.
4. *Costa V., Moradas-Ferreira P.* Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases // *Mol. Asp. Med.* - 2001. - N 22. - P. 217-246.
5. *Gaby A. R.* Adverse Effects of Dietary Fructose // *Alternative Medicine Review*. - 2005. - Vol.10, N 4. - P. 294-306.
6. *Garner J., Schutz M.* Impact of glucose-fructose-ratio on stuck fermentations: practical experiences to restart stuck fermentations // *Vitic. Enol. Sci.* - 1996. - N 51. - P. 214-218.
7. *Izawa S., Inoue Y., Kimura A.* Importance of catalase in the adaptive response to hydrogen peroxide : analysis of acatalasaemic *Saccharomyces cerevisiae* // *Biochem. J.* -1996. - N 320. - P. 61-67.
8. *Levi B., Wernan M.J.* Long-Term Fructose Consumption Accelerates Glycation and Several Age-Related Variables in Male Rats // *J. Nutr.* -1998. - № 128. - P. 1442-1449.
9. *Levine R.L., Wehr N., Williams J.A., Stradtman E.R., Shacter E.* Determination of carbonyl groups in oxidized proteins. *Methods Mol. Biol.* -2000-. 99, P. 15-24.
10. *Longo V.D., Grala E.B., Valentine J.S.* Superoxide dismutase activity is essential for stationary phase survival in *Saccharomyces cerevisiae* // *J. Biol. Chem.* - 1996.- Vol.271, № 21. - P. 12275-12280.
11. *Lushchak V., Semchyshyn H., Lushchak O., Mandryk S.* Diethyldithiocarbamate inhibits in vivo Cu,Zn-superoxide dismutase and perturbs free radical processes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* cells // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 2005. - № 338. - P. 1739-1744.
12. *Lushchak V., Semchyshyn H., Mandryk S., Lushchak O.* Possible role of superoxide dismutases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* under respiratory conditions // *Arch. Biochem. Biophys.* - 2005. - № 441. - P. 35-40.
13. *Pereira M. D., Herderio R. S., Fernandes P. N. et al.* Targets of oxidative stress in yeast *sod* mutants. *Biochem. Biophys. Acta.* - 2003. - Vol. 1620. - P. 245-251.
14. *Ruis H., Koller F.* Biochemistry, molecular and cell biology of yeast and fungal catalases. Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defences // *Scandalios J. G. (ed.)* Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press. -1997. - P. 309-342.
15. *Wylie-Rosett J., Segal-Isaacson C.J., Segal-Isaacson A.* Carbohydrates and increases in obesity: does the type of carbohydrate make a difference? // *Obes Res.* - 2004. - Vol.12. - P. 124-129.
16. *Zang T., Fang H.H.P.* Quantification of *Saccharomyces cerevisiae* viability using *Bac* // *Light. Biotechn. Let.* -2004.- N 26. - P. 989-992.
17. *Байляк М., Семчишин Г., Луцак В.* Влияние перекиси водорода на активности антиоксидантных ферментов *S. cerevisiae* зависит от особенности штаммов // *Биохимия* - 2006. - Т. 71, № 9. - С. 1243-1252.
18. *Луцак В. И.* Окислительный стресс и механизмы защиты от него у бактерий // *Биохимия.* - 2001.- Т. 66, №5. - С. 592-609.
19. *Мейнел Дж., Мейнел Э.* Экспериментальная микробиология (теория и практика). - М.: Мир, 1967. - 347 с.

Стаття поступила до редакції 29.03.2008 р.; прийнята до друку 20.04.2008 р.

Моргулець Л.М. – магістрант кафедри біохімії Прикарпатського національного університету імені Василя Стефаника.

Бабійчук Т.Р. – магістрант кафедри біохімії Прикарпатського національного університету імені Василя Стефаника.

Величко О.М. – магістрант кафедри біохімії Прикарпатського національного університету імені Василя Стефаника.

Рецензент: професор, доктор біологічних наук Стефурак В.П., професор кафедри біології та екології Прикарпатського національного університету імені Василя Стефаника