

УДК 578.222:577.1

ФУНКЦИОНАЛЬНО-БИОХИМИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ДРОЖЖЕЙ
SACCHAROMYCES CEREVISIAE КРАСНОДАРСКОЙ РАСЫ
ИНДУЦИРОВАННЫЕ АДАПТАЦИЕЙ К ПИЗАМИНУ
ПРИРОДНОМУ АНТИВИТАМИНУ ПАНТОТЕНОВОЙ КИСЛОТЫ
ИЗ ПРОРОСТКОВ ГОРОХА

Смашевский Н.Д.

Астраханский государственный университет, Астрахань, Россия

Функционально-биохимические изменения у дрожжей индуцированные адаптацией к пизамину, природному антивитамины пантотеновой кислоты из проростков гороха, закрепляются наследственно. Происходит полная резистентность к пизамину, но сохраняется неизменной потребность в экзогенном витамине, повышается ростовая активность с сокращением лаг-фазы, увеличивается накопление БАВ, в том числе и глутатиона, стимулирующих рост дрожжей и инактивирующих антивитамины. У адаптированных дрожжей повышены бродильная активность и содержание общего белка. Положительные признаки сохраняются полностью при поддержании культуры на среде без контакта с антивитамином.

Ключевые слова: пизамин, антивитамины пантотеновой кислоты, дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, биохимический стресс, адаптация, адаптивные белки, накопление БАВ, проростки гороха

При последовательных пересевах дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* краснодарской расы на стандартной питательной среде с увеличивающимися дозами олигосахарида пизамина, природного антивитаминового фактора пантотеновой кислоты (ПК) из проростков гороха [5,7], через семь пассажей приобретали полную устойчивость к концентрации антивитамина в 200 раз большей, чем до адаптации.

Приобретенная устойчивость культуры оказалась наследственно закрепленной. Такие дрожжи при четырехкратном пересеве на стандартной питательной среде, при полном исключении из неё пизамина, полностью сохраняли устойчивость к его ингибирующему действию, даже в самых высоких концентрациях, которые полностью подавляли рост исходных неадаптированных дрожжей. В опытах использовали стандартную питательную среду, которая готовилась на дистиллированной воде и в 1 литре объема содержала: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 1 г; $(NH_4)_2SO_4$ – 3 г; KH_2PO_4 – 2,5 г; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ – 1,0 г; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ – 0,1 г; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,850 г; тиамин – 4,0 мг; пиридоксин – 1,0 мг; ино-

зит – 10,0 мг; Са-пантотенат – 0,5 мг, биотин 2,0 мкг, аспарагин – 1,0 г; сахароза – 20 г. Адаптированные культуры, поддерживаемые длительное время пересевами на сусло-агаре без контакта с пизамином (около 10 лет), также не теряли устойчивости к пизамину, и полностью сохраняли потребность в экзогенном витамине (табл. 1). Их рост отсутствовал при исключении из среды ПК, и они совершенно одинаково стимулировались возрастающими концентрациями ПК, как и неадаптированные исходные, взятые для адаптации. По отношению к различным концентрациям пизамина у них наблюдалась совершенно противоположная реакция. Возрастающие концентрации антивитамина подавляли рост неадаптированных дрожжей, который при 50 и 200 мкг/мл полностью отсутствовал, тогда как у адаптированных, при полном отсутствии подавления роста, наблюдалась даже некоторая стимуляция с возрастанием его концентрации. Особенно это заметно при содержании ПК 0,01 и 0,02 мкг/мл. Адаптация дрожжей к антивитаминовому действию пизамина не изменила потребность их в экзогенном витамине, она оста-

лась на том же уровне, что и исходных дрожжей. Совершенно аналогичная адап-

тация наблюдалась и у других видов сахаромицетов.

Таблица 1

Влияние пизамин и дифференцированных доз ПК на рост адаптированных и неадаптированных дрожжей *S. Cerevisiae*

Пизамин, мкг / мл	Сухой вес дрожжей, мкг / мл							
	Дрожжи неадаптированные				Дрожжи адаптированные			
	ПК, мкг/мл				ПК, мкг/мл			
	0	0,01	0,02	1,0	0	0,01	0,02	1,0
0	7	412	718	1321	9	541	730	1256
5	-	48	76	615	-	592	918	1229
50	-	0	0	0	-	805	1096	1235
200	-	0	0	0	-	1185	1190	1302

Высокая устойчивость адаптированных дрожжей к пизамину, и сохранение ими потребности в экзогенном витамине дала возможность использовать такие дрожжи для количественного определения ПК микробиологическим способом, в растительном материале, где присутствовал антивитаминовый фактор ПК.

Если считать, что в результате адаптации был получен биохимический мутантный штамм дрожжей, устойчивый к пизамину, с закрепленными генетически новыми свойствами, то такие дрожжи должны обладать свойствами, отличительными от исходной культуры, возможно, не только в устойчивостью к пизамину. Поэтому были изучены физиолого-биохимические свойства адаптированных дрожжей.

Сравнительное изучение динамики роста адаптированных и неадаптированных дрожжей в равных стандартных условиях показало значительное различие их характера и интенсивности роста. Обе дрожжевые культуры выращивали на стандартной питательной среде, интенсивность их роста определяли после 12 часов инкубации и затем через каждые 2 часа в течение 48 часов. Было обнаружено явное сокращение периода лаг-фазы у адаптированных дрожжей. Их рост через 12 часов инкубации, совершенно в равных условиях выращивания, достиг уровня 303 мкг/мл сухого веса, и переходил в экспоненциальную фазу роста, тогда как у неадаптированных рост достигал всего 13 мкг/мл. Экспоненциальная фаза роста у адаптированных дрожжей наступила уже через 12 часов лаг-фазы, опережая контрольные

дрожжи на 4 часа, у которых вступление в фазу интенсивного роста наблюдалось только после 16 часов. Однако рост адаптированных дрожжей уже после 20 часов заметно замедлялся и после 24 часов переходил на плато, связанное с обычным явлением истощения питательной среды и общим свойством роста организмов по сигмоидальной кривой.

Было обнаружено, что в клетках адаптированных дрожжей к пизамину происходит накопление значительно больше биологически активных веществ (БАВ), стимулирующих рост дрожжей. Водные экстракты, полученные из адаптированных дрожжей, при добавлении в среду, где ПК была снижена в 2 раза от оптимальной дозы (0,25мг/л), значительно сильнее стимулировали рост дрожжей, чем водные экстракты из неадаптированных. Водные экстракты получали из дрожжей, выращенных на синтетической стандартной питательной среде в течение 48 часов. Полученная масса дрожжей отделялась от питательной среды фильтрованием через бумажный фильтр с вакуумным насосом через воронку Бюхнера, отмывались от питательной среды дистиллированной водой. Такие дрожжи заливали дистиллированной водой по весу 1:2 и экстрагировали в течение 24 часов при температуре 40 °С.

Экстракт из исходных дрожжей практически не оказывал стимулирующего действия, тогда как из адаптированных дрожжей резко усиливал рост, возрастающего с повышением количества вносимого экстракта. Добавление экстракта из адаптированных дрожжей в количестве 10 мкл/мл увеличивало нарастание массы

дрожжей почти в 3 раза больше, чем при добавлении такого же количества экстракта из неадаптированных дрожжей, а прибавка прироста экстрактом по сравнению с контролем превышала в 16 раз.

Бродильные свойства адаптированных дрожжей также оказались значительно выше, чем у неадаптированных. Это указывает на то, что вследствие адаптации к пизамину дрожжи становятся физиологически более активными. Причем адаптированная культура, использованная для проведения этих опытов, поддерживаемая пересевами на сусло-агаре без контакта с пизамином до 10 лет, давала совершенно аналогичный результат.

Таким образом, в результате адаптации дрожжей у них наблюдается изменение физиолого-биохимических процессов, приводящих к образованию стимулирующих рост веществ. Это могут быть либо вещества, образуемые *de novo*, либо имеющиеся в нормальном метаболизме исходной культуры, но образуемых в больших количествах при адаптации.

Без добавления экстрактов в присутствии 10 мкг/мл пизамина рост дрожжей полностью отсутствовал. Внесение в среду 2,5 мкл/мл экстракта из адаптированных дрожжей полностью инактивировало тормозящее действие пизамина. Рост дрожжей не только восстанавливался, но и был выше контрольного варианта. Экстракт же из исходных дрожжей, выращенных при тех же условиях, подобный эффект давал только при 10 мкл/мл, т.е. в 4,5 раза большей концентрации, а при 7,5 мкл/мл рост дрожжей достигал только уровня на контрольной среде без ингибитора. Здесь, как и в предыдущих исследованиях, экстракт из адаптированных дрожжей был 2,2 – 2,4 раза выше в стимулировании дрожжей во всех концентрациях, кроме концентрации 2,5 мкл/мл, при которой рост дрожжей при добавлении экстракта из неадаптированных дрожжей был в 11 раз ниже, так как проявлялось тормозящее действие пизамина. Точно такая же зависимость роста дрожжей была получена в опытах с применением различных концентраций пизамина и экстрактов.

Таким образом, дрожжи как адаптированные, так и неадаптированные, со-

держат какой-то фактор или факторы, специфически инактивирующие антивитаминное действие пизамина и также способствуют активации роста дрожжей. Причем эти факторы у адаптированных дрожжей либо активнее, либо накапливаются в больших количествах. Определить их можно только при выделении и идентификации. Оказалось что в экстрактах как адаптированных, так и неадаптированных дрожжей на гистограмме присутствует два активных фактора, инактивирующих биологическое действие пизамина и стимулирующих рост дрожжей с Rf-0,6 и Rf-0,85. Причем вещество с Rf-0,85 значительно активнее, чем вещество с Rf-0,6, хотя по содержанию его в экстракте меньше. Особенно важно отметить, что оба вещества адаптированных дрожжей, накапливаются в больших количествах, о чем свидетельствует более широкая зона на гистограмме инактивации пизамина, отмеченная и уровнем стимуляции роста дрожжей. Этим методом одно из этих веществ с Rf-0,6 было идентифицировано и оказалось трипептидом – глутатионом, что полностью совпадает с расположением маркера этого вещества на гистограмме. В проведенных нами опытах глутатион устранял антивитаминное действие пизамина [6]. Как известно, глутатион является основным естественным антиоксидантом, синтезируемый дрожжами, защищающим клетки от окислительного стресса. Другое вещество нам, к сожалению, идентифицировать не удалось. Инактивация пизамина глутатионом вполне обоснована. Как известно в клетках *Rhodobacter capsulatus* обнаружен комплекс глутатион-глутаредоксин, как часть комплексной регуляторной сети, контролирующей противooksидлительную защиту процесса [9]. Система глутатион-глутаредоксин участвует в защите клетки от окислительного стресса.

Общеизвестно, что любые адаптивные изменения живых организмов к различным стрессовым воздействиям неблагоприятных факторов среды, как правило, связано с образованием адаптивных белков [1]. В связи с этим возник интерес изучить возможную связь функционально-биохимических изменений дрожжей с белковым обменом. В связи с этим были про-

ведены опыты по изучению влияния пизамина на накопление общего белка в дрожжевых клетках до, и после адаптации к пизамину. Дрожжи выращивали в колбах с объемом питательной среды 200 мл, что давало возможность получения большой массы дрожжей на различных, в основном высоких, концентрациях пизамина, в которых после завершения роста определяли количественное содержание белка.

У отмытых, после прекращения роста дрожжей каждого варианта, определяли содержание белка по Лоури [10] и рассчитывали на грамм сухого веса дрожжей. Также определяли и накопление сухой массы дрожжей, и содержание белка в сухой массе дрожжей в среднем на колбу. Результаты видны в табл. 2. Дрожжи после периода торможения на среде с пизамином, возобновив рост и подвергаясь пролонгируемому действию пизамина, повышали нарастание сухой массы соответ-

ственно повышению концентрации пизамина. Однако, если нарастание массы дрожжей возрастало с повышением концентрации пизамина, то накопление белка на единицу веса дрожжей было связано только с присутствием пизамина и не зависело от количественного содержания его в среде. Такой результат, несомненно, позволяет сделать заключение, что пизамин, вызывает повышение синтеза дрожжевыми клетками белка, которое связано только с его присутствием, как фактора стресса, вызывающего подавление роста дрожжей и не зависит от количественного содержания. Подобное действие пизамина проявляется только на дрожжах, нуждающихся в экзогенной ПК и чувствительных к ингибитору. Ни усиления роста, ни повышения содержания белка в клетках дрожжей *Candida utilis*, не чувствительных к пизамину и ауксоавтотрофных в отношении ПК, не наблюдалось.

Таблица 2

Влияние пизамина на накопление биомассы дрожжей и белка в дрожжевых клетках *S. cerevisiae**

Пизамин, мкг/мл	Сухой вес дрожжей на колбу, мг (200 мл)	Содержание белка на 1 г сухого веса дрожже- вых клеток		Содержание белка на сухой вес дрожжей в колбе (200 мл)	
		мг	%	мг	%
0	105,2	25,58 ± 0,66	100	2,69 ± 0,06	100
50	158,9	31,22 ± 0,54	122,0	4,96 ± 0,15	184,31
100	179,4	30,82 ± 0,82	120,5	5,52 ± 0,18	205,2
200	200,6	30,49 ± 0,54	119,2	6,12 ± 0,23	227,5

*Рост дрожжей в контроле завершался на 2-е сутки, в присутствии пизамина после 5-ти суток задержки, завершался на 6-7-е сутки

Повышенный синтез белка у адаптированных дрожжей сохранялся как постоянное свойство и не изменяется в присутствии пизамина, так как запущенная программа синтеза белка на биохимический стресс уже реализована. Из результатов представленных в таблице 3 видно, что неадаптированные дрожжи после периода торможения роста повышали синтез и накопление белка в клетках до 32,68 мг/г сухого веса, тогда как в контроле содержание белка было на уровне 25,08 мг/г, т.е. на 30,3 % больше. Адаптированные дрожжи как на среде без пизамина, так и в его присутствии (100 мкг/мл), содержали со-

вершенно одинаковое количество белка как в контроле (32,34 мг/г), так и в опыте (32,19 мг/г сухого веса). На наш взгляд это весьма интересен факт, что содержание белка у адаптированных дрожжей было адекватно содержанию его у дрожжей не адаптированных, но выросших при пролонгированном инкубационном периоде в присутствии 100 мкг/мл пизамина (табл. 3).

Изменение белковообразовательной функции у дрожжей под действием пизамина указывает на глубокие изменения в обмене веществ, которые могут быть следствием белковосинтетической функции, которая закрепляется у них наследственно.

Таблица 3

Влияние пролонгирующего действия пизамина на накопление белка у адаптированных и неадаптированных к нему дрожжей

Дрожжи	Содержание пизамина, мкг/мл	Содержание белка, мг/г сухого веса	% к контролю
Неадаптированные	0	25,08 ± 0,61	100
	100	32,68 ± 0,80	130,3
Адаптированные	0	32,34 ± 0,91	128,5
	100	32,19 ± 0,62	128,3

Усиление белкового синтеза на различные воздействия физических и химических факторов среды, является общебиологическим свойством для всех живых организмов [2,3,8]. В многообразии реакции живых организмов на разные типы стрессовых воздействий выявляется значительная качественная аналогия. Это связано с тем, что в процессе эволюции сформировались различные генетические системы, обеспечивающие гомеостатические свойства. Образование различных белков, различаются, в основном, по эффективности и времени, необходимого для развертывания полной программы [1,4]. Адаптация к тем или иным стрессовым ситуациям основана на индуцировании синтеза специфических, адекватным характеру стрессовых условий, белков. Не исключена возможность наличия не одной, а нескольких адаптивных генетических систем, ответственных за устойчивость. Каждая из них экспрессируется через один и тот же механизм – индуцированный синтез белка.

Механизм мутационных путей, индуцируемых в ответ на изменение среды, приводящих к ответным реакциям через стрессы, индуцируют генетические изменения, что и видно при адаптации дрожжей к пизамину, как химическому стрессору.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Удовенко Г.В. Механизм адаптации растений к стрессам // Физиология и биохимия культурных растений.– 1979. – Т. 11.– вып. 2.– С. 99-107.
2. Блехман Г.И. Синтез белка в условиях стресса // Успехи современной биологии. – 1987.– т.103.–вып. 3.– с.340-353.
3. Гудкова Н.В., Касаковская И.В., Майор П.С. Синтез стрессовых белков в проростках пшеницы под действием гамма-радиации // Доп. НАН України.–2001.–№2–с.171-179.

4. Касаківська І.В., Голов'яненко І.В. Роль білків теплового шоку в адаптації рослин до стресів // Физиология. и биохимия культурных растений. –2007.– т.39 .– №3.– с.187-199.

5. Смашевский, Н.Д. Механизм адаптации дрожжей к пизамину // Ученые записки (серия химико-биологическая) т.ХІІІ. Хабаровский государственный педагогический институт. Хабаровск.1968. С. 5 -11.

6. Смашевский, Н.Д. Инактивация глутатионом пизамина антивитамина пантотеновой кислоты из проростков гороха. // Материалы междуна. научно-практич. конференции, посвященной 75 летию Астраханского государственного университета 20-25 августа 2007 г. Экология биосферы: Проблемы изучения, индикации и прогнозирования. Часть 2. – Издательский дом «Астраханский университет». 2007 г. С .222-224.

7. Смашевский Н.Д. Природный антивитамины пантотеновой кислоты в высшем растении, его физиологическая роль и механизм действия. // Материалы XVII международного симпозиума «Нетрадиционное растениеводство, селекция. Охрана природы. Эниология. Экология и здоровье» 13-21 сентября 2008 года, г. Алушта. Симферополь – 2008. – с.531-537.

8. Смашевский Н.Д. Антивитаминное действие олигосахарида пизамина из проростков гороха // Фундаментальные исследования.–2009.–№3.–с. 24-27.

9. Kirshner M., Winkekhaus S., Theifelder J., Nover L. Transient expression and heat-stress-induced co-aggregation of endogenous and heterologous small heat-stress proteins in tobacco protoplasts // Plant J.–2000.–**24**, N 3.-P. 397–411.

10. Li Kuanyn, Hein Silke, Zou Wenxin, Klug Gabiell. The glutation–gluta-redoxin sistem in Rhodobacter Capsulatus: Part of a complex against oxidative stress // Bacteriol.–2004. – V. 186. – № 20.– P. 6806–6808.

11. Lowry O.H., A.L Rosebrough, R.J Farr Randall. Protein measurement with the Folin phenol reagent //J. Biol. Chem.– 1951.– V. 193. – P. 265–275

FUNCTIONAL-BIOCHEMICAL CHANGES OF YEAST *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* THE KRASNODAR RACE INDUCED BY ADAPTATION TO PISAMIN, NATURAL ANTIVITAMIN OF PANTOTHENIC ACIDS FROM PEAS SPROUTS

Smashevsky N.D.

Astrakhan State Univesity, Astrakhan, Russia

Functional-biochemical changes of yeast induced by adaptation to pisamin, natural antivitamin pantothenic acid from peas sprouts are fixed hereditary. There is a full resistance to pisamin, but with preservation of invariable requirement in exogenous vitamin, the growing activity raises but lag-phase reduction, increased accumulation of BAS, including glutathione, stimulating the growth of yeast and inactivating antivitamin. In the adapted yeast fermentative activity and the maintenance of the general protein are increased. Positive signs remain completely after 10 years of maintenance of cultures on the nutrition environment without contact with antivitamin.

Key words: pisamin, antivitamin of pantothenic acid, yeast *Sacchamyces cerevisiae*, biochemical stress, adabtation, adaptative proteins, accumulation of BAS, peas sprouts