https://doi.org/10.18524/2077–1746.2023.1(52).284681
УДК 577.3

О. К. Будняк, к.б.н., доцент
С. С. Чернадчук, к.б.н., доцент
А. В. Сорокін, к.б.н., доцент
С. А. Петров, д.б.н., професор
Одеський національний університет імені І. І. Мечникова,
кафедра молекулярної біології, біохімії та генетики,
вул. Дворянська, 2, 65082, Україна, e-mail: biochem_bio_onu@ukr.net

ВПЛИВ ТІАМІНУ ТА ЙОГО КАТАБОЛІТІВ НА ВЕЛИЧИНУ ЕЛЕКТРОФОРЕТИЧНОЇ РУХЛИВОСТІ ТА ζ-ПОТЕНЦІАЛУ ДРІЖДЖІВ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Вивчали вплив різних концентрацій тіаміну, тіаміндисульфіду, 4-метил-5-β-оксиетилтіазолу та тіохрому на величину ζ-потенціалу та електрофоретичну рухливість у *Saccharomyces cerevisiae*. Показано, що тіаміндисульфід і тіамін підвищували рівень показників, що вивчалися, за концентрацій, відповідно 10 мкмоль та 5 і 10 мкмоль за рахунок підсилення окисних процесів у клітинах дріжджів, а тіохром і 4-метил-5β-оксиетилтіазол діяли за концентрацій, відповідно, 1 мкмоль, та 1 і 5 мкмоль, очевидно, за рахунок взаємодії з гідрофобними кишенями білків.

Ключові слова: електрофоретична рухливість; ζ-потенціал; тіамін; катаболіти; *Saccharomyces cerevisiae*

Відомо, що потенціал, який виникає на межі між дисперсною фазою і дисперсійним середовищем, внаслідок дії електричного поля, називається електрокінетичним, або ζ-потенціалом. Поява електричного заряду на поверхні частинки зумовлена властивостями цієї поверхні. Вона може мати як іоногенні групи, так і певну спорідненість з деякими іонами, які будуть адсорбуватись на її поверхні [7].

Знак і значення ζ-потенціалу широко використовуються для характеристики електричних властивостей поверхні при розгляді адсорбції, адгезії, агрегативної стійкості дисперсних систем, структуроутворенні в матеріалах та інших процесів, де існують електрокінетичні явища.

Величина ζ-потенціалу може характеризувати стан клітинних оболонок. Дріжджові клітини не є виключенням. Поверхневий заряд дріжджових клітин, як і більшість клітин інших мікроорганізмів, у нормі має негативне значення. Електричний заряд клітин, з одного боку, визначається молекулярним складом і структурою клітинної стінки, а з іншого боку, на нього істотно впливають різні фактори навколишнього середовища, а саме, pH, склад культуральної рі-

© О. К. Будняк, С. С. Чернадчук, А. В. Сорокін, С. А. Петров, 2023
Ця стаття відкритого доступу на умовах CC BY-NC 4.0

дини, наявність речовин різного хімічного складу, таких як вуглеводи, білки, ліпіди, мінеральні сполуки, росткові фактори, зокрема, вітаміни, власні продукти метаболізму, ферменти тощо [9].

З даних літератури відомо, що до основних компонентів клітинної стінки дріжджів належать глюкани, маннопротеїни та хітин [6]. Електричний заряд клітинної поверхні дріжджів зумовлений дисоціацією фосфатних та карбоксильних груп манопротеїнів, а також протонуванням аміногруп білків [4], а суспензії дріжджових клітин більш стабільні за умов збільшення негативного заряду їх клітинної поверхні, що може контролюватися рівнем ζ-потенціалу, або електрофоретичної рухливості.

Дріжджі містять велику кількість біологічно активних речовин, у тому числі і вітамінів, зокрема, тіамін, рибофлавін, нікотинову, фолієву, пантотенову кислоти, біотин, піридоксин тощо. Відомо, що тіамін є потужним стимулятором росту дріжджів [9]. Також відомо, що при значеннях pH > 7,0 молекула тіаміну може перетворюватися за деяких стадій на тіаміндисульфід та тіохром, які мають власні біохімічні властивості, у тому числі і антиокиснювальні [2], що стосується 4-метил-5-β-оксиетилтіазолу, то як тіазоловий компонент тіаміну ця сполука відіграє важливу роль у реалізації функцій тіаміну, проте даних про нього недостатньо. Таким чином, вплив вітаміну B_1 та його катаболітів, а саме, тіаміндисульфіду, 4-метил-5-β-оксиетилтіазолу та тіохрому на стан дріжджових мембран не досліджено.

Мета роботи – визначити вплив різних концентрацій тіаміну та його похідних на величину ζ-потенціалу та електрофоретичну рухливість у *Saccharomyces cerevisiae*.

Матеріали та методи дослідження

Визначення електрофоретичної рухливості та ζ-потенціалу проводили за класичною методикою [11]. Звичайні дріжджі, що знаходилися у фазі адаптації, поміщали у колбу з 8%-ним розчином сахарози на фосфорно-цитратному буфері pH 8,0. На установці для мікроелектрофорезу, за допомогою мікроскопу, спостерігали рух дріжджових клітин уздовж камери Горяєва. Визначали за який час (сек) клітини пройдуть шлях, рівний боку квадрата в камері. Параметри: напруга в ланцюзі – 100 В, відстань між електродами – 2 см, шлях, пройдений дріжджовими клітинами – 0,02 см (контрольна проба). Формування інших проб створювали додаванням за 15 хвилин до вимірів до зависі дріжджів тіаміну, тіаміндисульфіду, тіохрому або 4-метил-5-β-оксиетилтіазолу у кінцевих концентраціях 1, 5, 10 мкмоль. Статистичне опрацювання проводили за Стьюдентом [3].

Результати дослідження та їх обговорення

Згідно з отриманими даними (рис. 1, 2), додання у середовище із дріжджами тіаміну у концентраціях 5 та 10 мкмоль викликало підвищення рівню ζ – потенціалу та електрофоретичної рухливості (*~~и~~*), відповідно, у 2,75 та 1,84 рази порівняно з контролем.

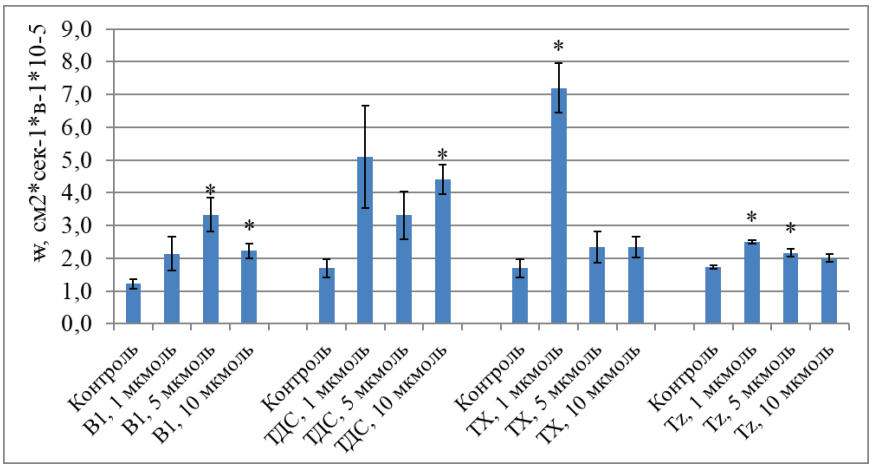

Рис. 1. Вплив тіаміну та його катаболітів на величину електрофоретичної рухливості ~~и~~ дріжджів Saccharomyces cerevisiae (n=10)

Примітки: 1. B_1 – тіамін, ТДС – тіаміндисульфід, ТХ – тіохром, Tz – 4-метил-5-β-оксиетилтіазол.
2. * – відмінності із відповідним контролем достовірні, $p \leq 0,05$.

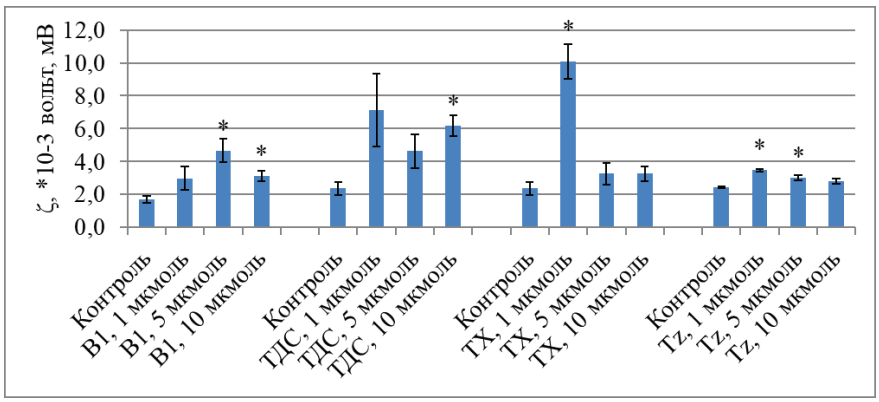

Рис. 2. Вплив тіаміну та його катаболітів на величину ζ-потенціалу дріжджів Saccharomyces cerevisiae (n=10)

Примітки: 1. B_1 – тіамін, ТДС – тіаміндисульфід, ТХ – тіохром, Tz – 4-метил-5-β-оксиетилтіазол.
2. * – відмінності із відповідним контролем достовірні, $p \leq 0,05$.

Введення тіаміндисульфіду до зависі дріжджів у концентрації 10 мкмоль максимально підвищував дослідні показники (у 2,61 рази), в порівнянні з іншими дослідженими концентраціями.

ζ-потенціал, або електрофоретична рухливість, які характеризують заряд дріжджової клітини, створюється переважно відповідними концентраціями залишків фосфорних кислот та аміногруп, які розташовані на її поверхні [5], а також незначним протонуванням аміногруп білків [4], особливо за умов лужного середовища, що має значення для наших умов дослідів.

При бродінні спостерігається зменшення pH, тому електричний заряд клітинних оболонок дріжджів стає більш позитивним. Наявність кисню у середовищі також викликає підвищення потенціалу. Можна припустити, оскільки тіамін спроможний підсилювати окисні процеси у клітині [8, 10], тому він може зменшувати накопичення кислот у середовищі, що утворюються при бродінні, і, таким чином, також має підвищувати негативний потенціал дріжджів. Подібні властивості можуть відноситися і до тіаміндисульфіду, який здатний перетворюватися на тіамін [2].

Що стосується тіохрому, то введення цього катаболіту, у концентрації 1 мкмоль, викликало вірогідне збільшення дослідних показників у 4,26 рази порівняно з контролем. Додання у середовище 4-метил-5-β-оксиетилтіазолу, у концентрації 1 та 5 мкмоль, викликало також підвищення показників, відповідно, у 1,43 та 1, 24 рази у порівнянні з контролем.

Позитивний вплив 4-метил-5β-оксиетилтіазолу та тіохрому на електрофоретичну рухливість і ζ-потенціал клітин може бути пов'язаний з таким механізмом: тіазолова частина тіаміну і трициклічна форма його – тіохром здатні зв'язуватися з, так званими, тіамінза'язуючими білками мембран. Ці зв'язки утворюються, природно, між SH-групами білків і сіркою тіазолової структури вітаміну та його похідних, а також за рахунок потрапляння цих метаболітів тіаміну в гідрофобні кишені білків [1]. Подібні взаємодії викликають зміну конформації білків поверхні дріжджових клітин, що призводить до часткового екранування позитивно заряджених груп білків і, відповідно, до збільшення негативного заряду поверхні клітин.

Слід відзначити достатньо складний і неоднозначний характер залежності показників електрофоретичної рухливості і ζ-потенціалу від концентрації тіаміну і його метаболітів.

Для тіаміндисульфіду і тіаміну встановлений позитивний ефект на досліджувані показники тільки за високих концентрацій цих метаболітів (у концентрації 5 мкмоль, а для тіаміну – ще 10 мкмоль). Очевидно, саме такі концентрації призводять до істотного прискорення окиснення органічних кислот, що збільшує pH середовища і відповідно збільшує негативний заряд. Для гідрофобних метаболітів тіохрому та 4-метил-5β-оксиетилтіазолу нами встановлений позитивний ефект за менших концентрацій цих метаболітів, відповідно, за 1 мкмоль, та 1 і 5 мкмоль. Очевидно, саме такі концентрації призводять до

насичення ними гідрофобних кишень. Збільшення концентрацій цих сполук викликає порушення таких взаємодій.

Таким чином, можна вважати, що тіамін та всі його катаболіти, по-перше, в більшості випадків збільшували величину ζ-потенціалу та електрофоретичної рухливості. По-друге, таке підвищення відбувалося специфічно для кожної сполуки.

Отримані дані можуть бути використані у створенні більш оптимальних поживних середовищ для виробництв, які мають справу із *Saccharomyces cerevisiae*, такі які пивоваріння, або інші, де використовуються процеси бродіння цих клітин.

Висновки

1. Тіамін і його метаболіти збільшують електрофоретичну рухливість і ζ-потенціал дріжджових клітин.

2. Тіамін і тіаміндисульфід очевидно призводять до прискорення утилізації органічних кислот, що підвищує негативний заряд білків.

3. 4-метил-5β-оксиетилтіазол і тіохром можуть підвищувати електрофоретичну рухливість і ζ-потенціал за рахунок взаємодії з гідрофобними кишенями білків.

Стаття надійшла до редакції 25.01.2023

Список використаної літератури

1. Меженська О. О. Нові протеїнові мішені дії тіаміну і його похідних в нервовій тканині: автореф. дис. … канд. біол. наук: 03.00.04 «Біохімія». К., 2021. 24 с.
2. Пархоменко Ю. М., Степуро І. І., Донченко Г. В., Степуро В. І. Окислені похідні тіаміну: утворення, властивості, біологічна роль. *Ukr.Biochem.J*. 2012. Т. 84. 6. С. 5–24. http://ua.ukrbiochemjournal.org/2016/05/okysleni-pohidni-tiaminu-utvorennya-vlastyvosti-biolohichna-rol.html
3. Статистичні методи в біології: підруч. / Ю. І. Прилуцький, О. В. Ільченко, О. В. Цимбалюк, С. О. Костерін. К.: Наук. думка, 2017. 216 с.
4. Bowen W. R., Sabuni H. A., Ventham T. J. Studies of the cell-wall properties of Saccharomyces cerevisiae during fermentation. *Biotechnology and Bioengineering.* 1992. Vol. 40. P. 1309–1318. https://doi.org/10.1002/bit.260401104
5. Dengis P. B., Rouxhet P. G. Surface properties of top – and bottom-fermenting yeast. *Yeast*. 1997. Vol. l(13). P. 931–943. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097–0061(199708)13:10%3C931:: AID-YEA149%3E3.0.CO;2-T
6. Klis F. M., Mol P., Hellingwerf K., Brul S. Dynamics of cell wall structure in Saccharomyces cerevisiae. // *FEMS Microbiol Rev*. 2002. Vol. 26(3). P. 239–256. https://doi.org/10.1111/j.1574–6976.2002.tb00613.x
7. Lavaisse L. M., Hollmann A., Nazareno M. A., Disalvo E. A. Zeta potential changes of *Saccharomyces cerevisiae* during fermentative and respiratory cycles. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2019. Vol. 1(174). P. 63–69. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.11.001
8. Parkhomenko Y. M., Pavlova A. S. & Mezhenskaya O. A. Mechanisms responsible for the high sensitivity of neural cells to vitamin B_1 deficiency. *Neurophysiology.* 2016. Vol. 48. P. 429–448. https://doi.org/10.1007/s11062–017–9620–3
9. Ribeiro R. A., Bourbon-Melo N., Sá-Correia I. The cell wall and the response and tolerance to stresses of biotechnological relevance in yeasts. *Front Microbiol*. 2022. Vol. 28(13). 953479. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.953479
10. Sambon M, Wins P, Bettendorff L. Neuroprotective effects of thiamine and precursors with higher bioavailability: focus on benfotiamine and dibenzoylthiamine. *Int J Mol Sci.* 2021. May 21. 22(11). 5418. https://doi.org/10.3390%2Fijms22115418
11. Serrano-Lotina A., Portela R., Baeza P., Alcolea-Rodriguez V., Villarroel M., Ávila P. Zeta potential as a tool for functional materials development. *Catalysis Today*. 2022. https://doi.org/10.1016/j.cattod.2022.08.004

О. К. Будняк, **С. С. Чернадчук**, **А. В. Сорокін, С. А. Петров**
Одеський національний університет імені І. І. Мечникова, кафедра молекулярної біології, біохімії та генетики, вул. Дворянська 2, 65082, Україна, e-mail: biochem_bio_onu@ukr.net

ВПЛИВ ТІАМІНУ ТА ЙОГО КАТАБОЛІТІВ НА ВЕЛИЧИНУ ЕЛЕКТРОФОРЕТИЧНОЇ РУХЛИВОСТІ ТА ζ–ПОТЕНЦІАЛУ ДРІЖДЖІВ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Резюме

Проблема. Вважається, що суспензії дріжджових клітин більш стабільні за умов збільшення негативного заряду їх клітинної поверхні, що може контролюватися рівнем ζ-потенціалу, або електрофоретичної рухливості. Відомо, що тіамін є стимулятором росту дріжджів, але вплив вітаміну B_1 та його катаболітів на стан дріжджових мембран не досліджено.

Мета. Визначити вплив різних концентрацій тіаміну, тіаміндисульфіду, 4-метил-5-β-оксиетилтіазолу та тіохрому на величину ζ-потенціалу та електрофоретичну рухливість у *Saccharomyces cerevisiae*.

Методика. Визначення електрофоретичної рухливості та ζ-потенціалу проводили за допомогою установки для мікроелектрофорезу, де за допомогою мікроскопу спостерігали рух дріжджових клітин уздовж камери Горяєва та визначали за який час (сек) клітини пройдуть шлях, рівний боку квадрата в камері. Параметри: напруга в ланцюзі – 100 В, відстань між електродами – 2 см, шлях, пройдений дріжджовими клітинами – 0,02 см (контрольна проба). В дослідні проби за 15 хвилин до вимірів до суспензії дріжджів додавали тіамін та його катаболіти у кінцевих концентраціях 1, 5, 10 мкмоль.

Основні результати. Інкубація дріжджів із тіаміном, який додавали в середовище у концентраціях 5 та 10 мкмоль підвищувала показники ζ-потенціалу та електрофоретичної рухливості, відповідно, у 2,75 та 1,84 рази у порівнянні з контролем. Тіаміндисульфід у концентрації 10 мкмоль підвищував показники, що вивчалися, у 2,61 рази, а тіохром у концентрації 1 мкмоль – у 4,26 рази порівняно з контролем. Додання у середовище 4-метил-5-β-оксиетилтіазолу у концентрації 1 та 5 мкмоль також викликало підвищення показників, відповідно, у 1,43 та 1,24 рази у порівнянні з контролем.

Висновки. Тіамін і його метаболіти збільшували електрофоретичну рухливість і ζ-потенціал дріжджових клітин. Тіаміндисульфід і тіамін підвищували рівень показників, що вивчалися, при концентраціях, відповідно 10 мкмоль, та 5 і 10 мкмоль за рахунок підсилення окисних процесів у клітинах дріжджів, а тіохром і 4-метил-5β-оксиетилтіазол діяли за концентрацій, відповідно, 1 мкмоль, та 1 і 5 мкмоль, очевидно, за рахунок взаємодії з гідрофобними кишенями білків.

Ключові слова: електрофоретична швидкість; ζ-потенціал; тіамін; катаболіти; *Saccharomyces cerevisiae*

O. K. Budnyak, S. S. Chernadchuk, A. V. Sorokin, S. A. Petrov
Odesa I. I. Mechnikov National University, Department of Molecular Biology, Biochemistry and Genetics, 2 Dvoryans'ka St., Odesa, 65082, Ukraine,
e-mail: biochem_bio_onu@ukr.net

THE INFLUENCE OF THIAMINE AND ITS CATABOLITES ON THE MAGNITUDE OF ELECTROPHORETIC VELOCITY AND THE ζ–POTENTIAL OF YEAST SACCHAROMYCES CEREVISIAE

Abstract
Problem: Yeast cell solutions are thought to be more stable with an increase in the negative charge of their cell surface, which can be controlled by the level of ζ-potential or electrophoretic velocity. Thiamine is known as a yeast growth stimulant, but the effect of vitamin B_1 and its catabolites on the state of yeast membranes has not been investigated.
Aim. The purpose of the work is to determine the effect of different concentrations of thiamine, thiaminedisulfide, 4-methyl-5-β-oxyethylthiazole and thiochrome on the value of the ζ-potential and electrophoretic velocity in *Saccharomyces cerevisiae*.
Methods. Determination of electrophoretic velocity and ζ-potential was carried out using a microelectrophoresis unit and a microscope, the movement of yeast cells along Hemocytometer was observed. It was determined in what time (sec) the cells will pass a path equal to the side of the square in the Hemocytometer. Parameters: voltage in the circuit – 100 V, the distance between the electrodes – 2 cm, the path traveled by the yeast cells – 0.02 cm (control test). In the test samples, thiamine and its catabolites were added to the yeast suspension 15 minutes before the measurements in final concentrations of 1, 5, 10 μmol.
The main results: Incubation of yeast with thiamine, which was added to the medium at concentrations of 5 and 10 μmol, increased the ζ-potential and electrophoretic velocity, respectively, by 2.75 and 1.84 times compared with the control. Thiaminedisulfide at a concentration of 10 μmol increased the studied indicators by 2.61 times, and thiochrome at a concentration of 1 μmol – by 4.26 times compared with the control. The introduction of 4-methyl-5-β-oxyethylthiazole into the medium at a concentration of 1 and 5 μmol also caused an increase by 1.43 and 1.24 times, respectively, compared with the control.
Conclusions. Thiamine and its metabolites increased electrophoretic velocity and ζ-potential of yeast cells. Thiaminedisulfide and thiamine increased the level of the studied indicators at concentrations, respectively 10 μmol, and 5 and 10 μmol due to enhancement of oxidation processes in yeast cells, while thiochrome and 4-methyl-5β-oxyethylthiazole acted at concentrations, 1 μmol, 1 and 5 μmol, respectively, apparently, due to the interaction with the hydrophobic pockets of proteins.

Key words: electrophoretic velocity; ζ-potential; thiamine; catabolites; *Saccharomyces cerevisiae*

References

1. Mezhenska O.O. (2021) «*Novel protein targets of thiamine and its derivates in nervous tissue»* [Novi proteinovi misheni dii tiaminu i yoho pokhidnykh v nervovii tkanyni: avtoref. dys. na zdobuttia nauk. stupenia, kand. biol. nauk: 03.00.04 «Biokhimiia], Kyiv, 24 p.
2. Parkhomenko Yu. M., Stepuro I. I., Donchenko G. V., Stsiapura V. I. (2012) Oxidized derivatives of thiamine: formation, properties, biological role, *Ukr.Biochem.J*., No 84, 6, pp. 5–24. http://ua.ukrbiochemjournal.org/2016/05/okysleni-pohidni-tiaminu-utvorennya-vlastyvosti-biolohichna-rol.html
3. Statistical methods in biology: tutorial (2017) [Statystychni metody v biolohii: pidruch. / Yu. I. Prylutskyi, O. V. Ilchenko, O. V. Tsymbaliuk, S. O. Kosterin], Kyiv: Nauk. dumka, 216 p.
4. Bowen W. R., Sabuni H. A., Ventham T. J. (1992) Studies of the Cell-Wall Properties of Saccharomyces cerevisiae during Fermentation *Biotechnology and Bioengineering.* 40, pp 1309–1318. https://doi.org/10.1002/bit.260401104
5. Dengis P. B., Rouxhet P. G. (1997) Surface Properties of Top – and Bottom-Fermenting Yeast // *Yeast*, l(13), pp. 931–943. https://doi.org/10.1002/ (SICI)1097–0061(199708)13:10%3C931:: AID-YEA149%3E3.0.CO;2-T
6. Klis F. M., Mol P., Hellingwerf K., Brul S. (2002) Dynamics of cell wall structure in Saccharomyces cerevisiae, *FEMS Microbiol Rev*., Aug;26(3), pp. 239–56. doi: 10.1111/j.1574–6976.2002.tb00613.x. PMID: 12165426.
7. Lavaisse L. M., Hollmann A., Nazareno M. A., Disalvo E. A. (2019) Zeta potential changes of Saccharomyces cerevisiae during fermentative and respiratory cycles, *Colloids Surf B Biointerfaces,* Feb 1, 174, pp. 63–69. doi: 10.1016/j.colsurfb.2018.11.001. Epub 2018 Nov 3. PMID: 30439639
8. Parkhomenko Y. M., Pavlova A. S. & Mezhenskaya O. A. (2016) Mechanisms responsible for the high sensitivity of neural cells to vitamin B_1 deficiency, *Neurophysiology,* 48, pp. 429–448. https://doi.org/10.1007/s11062–017–9620–3
9. Ribeiro R. A., Bourbon-Melo N., Sá-Correia I. (2022) The cell wall and the response and tolerance to stresses of biotechnological relevance in yeasts, *Front Microbiol*, Jul 28, 13, 953479. doi: 10.3389/fmicb.2022.953479. PMID: 35966694; PMCID: PMC9366716.
10. Sambon M., Wins P., Bettendorff L. Neuroprotective effects of thiamine and precursors with higher bioavailability: focus on benfotiamine and dibenzoylthiamine. *Int J Mol Sci.* 2021. May 21. 22(11). 5418. https://doi.org/10.3390%2Fijms22115418
11. Serrano-Lotina A., Portela R., Baeza P., Alcolea-Rodriguez V., Villarroel M., Ávila P. Zeta potential as a tool for functional materials development. *Catalysis Today*. 2022. https://doi.org/10.1016/j.cattod.2022.08.004