

УДК 579.[26:22]:546.221.1

ВПЛИВ ГІДРОГЕН СУЛЬФІДУ НА ПОГЛИНАННЯ КИСНЮ І АКТИВНІСТЬ ІЗОЦИТРАТДЕГІДРОГЕНАЗИ Й АЛКОГОЛЬДЕГІДРОГЕНАЗИ ДРІЖДЖІВ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* ТА *PICHA GUILLIERMONDII***А. Галушка, С. Гудзь**

Львівський національний університет імені Івана Франка

вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна

e-mail: a_halushka@mail.ru

Досліджено вплив гідроген сульфід на швидкість поглинання кисню і активність ізоцитратдегідрогенази й алкогольдегідрогенази дріжджів *Pichia guilliermondii* та *Saccharomyces cerevisiae*. Встановлено, що гідроген сульфід спричиняє зниження швидкості поглинання кисню клітинами *S. cerevisiae* за концентрацій від 10 мМ, а клітинами *P. guilliermondii* – за концентрацій 20 мМ і більше. Гідроген сульфід за концентрації 30 мМ викликав інгібування активності ізоцитратдегідрогенази в клітинах *P. guilliermondii* і *S. cerevisiae*. За концентрації 1 мМ H_2S підвищував, а за концентрацій 10–30 мМ – знижував активність ізоцитратдегідрогенази неклітинних екстрактів *S. cerevisiae*. Гідроген сульфід виявляв стимулювальну дію на активність алкогольдегідрогенази клітин *S. cerevisiae*. Активність алкогольдегідрогенази в неклітинних екстрактах пригнічувалася за наявності 10–30 мМ гідроген сульфід.

Ключові слова: гідроген сульфід, поглинання кисню, ізоцитратдегідрогеназа, алкогольдегідрогеназа, токсичність, *P. guilliermondii*, *S. cerevisiae*.

Гідроген сульфід – один із небезпечних забруднювачів довкілля. Він утворюється на багатьох промислових підприємствах, очисних спорудах тощо. Гідроген сульфід – токсична сполука, що справляє негативний вплив на всі живі організми [10], хоча у мікромольних концентраціях виконує регуляторну роль в організмі тварин і людини [15]. Природними джерелами гідроген сульфід є природний і вулканічні гази, гарячі джерела [10]. Особливо актуальною проблема забруднення гідроген сульфідом є у сірковидобувних регіонах, де внаслідок окиснення сірки й активації процесів дисиміляційної сульфатредукції спостерігається утворення підвищених кількостей H_2S [3].

Щодо механізму токсичної дії H_2S на живі організми існують різні гіпотези [10]. Згідно з Кханом та співавт. [13], дія гідроген сульфід в основному скерована на пригнічення активності цитохромоксидази. На думку інших авторів [17], токсичність гідроген сульфід пов'язана з комплексною дією на різні ферменти. За даними Джуліана і співавт., гідроген сульфід спричиняє деполаризацію мітохондріальних мембран [11].

Нами попередньо встановлено [1], що гідроген сульфід пригнічує ріст дріжджів *S. cerevisiae* в аеробних і анаеробних умовах. Відомо [10], що гідроген сульфід порушує структуру метало- та дисульфідвмісних білків. Немає даних про вплив гідроген сульфід на ферменти мікроорганізмів. У цій роботі представлені результати дослідження впливу гідроген сульфід на активність одного з ферментів, що беруть участь у аеробному метаболізмі *S. cerevisiae* та не містять металів (ізоцитратдегідрогенази) й одного з ферментів анаеробного метаболізму цих дріжджів (алкогольдегідрогенази). Оскільки гідроген сульфід пригнічує кінцевий фермент дихального ланцюга – цитохромоксидазу, досліджено також вплив цієї сполуки на швид-

кість поглинання кисню клітинами дріжджів. Окрім того, активність ізоцитратдегідрогенази та швидкість поглинання кисню за умов впливу H_2S визначалася і в облігатно аеробних дріжджів – *P. guilliermondii*.

Об'єктами досліджень були дріжджі *P. guilliermondii* ATCC 9058 та *S. cerevisiae* D-1-S.

Дріжджі вирощували у середовищі Беркгольдера з дріжджовим екстрактом [7] при температурі 30°C. Для аерації культур використовували качалку (150 об./хв). Для створення анаеробних умов пробірки чи колби повністю заповнювали середовищем і закривали гумовими корками.

Біомасу вимірювали турбідиметрично на КФК-3.

Концентрацію гідроген сульфід у визначали фотоелектроколориметрично [18].

Для визначення впливу гідроген сульфід на швидкість поглинання кисню клітинами дріжджів до одностодової культури додавали Na_2S у різних концентраціях і культивували протягом 1 год. Швидкість поглинання кисню клітинами визначали електрополярнографічно за допомогою закритого електрода Кларка [4].

Активність ізоцитратдегідрогенази й алкогольдегідрогенази в неклітинних екстрактах визначали після додавання до них натрій сульфід. Вплив гідроген сульфід на активність ферментів у клітинах визначали після їх вирощування в середовищі, що містило різні кількості Na_2S . Клітини відділяли і відмивали від середовища.

Щоб отримати неклітинні екстракти, клітини в кількості 50–100 мг/мл поміщали в охолоджений 50мМ калій-фосфатний буфер, рН 7,5 і руйнували на ультразвуковому дезінтеграторі УЗДН–2Т при 22 кГц протягом 5 хв (температура 0°C). Для інгібування протеаз, функціонуючих при рН, вищих за 7,0, додавали 10^{-5} М ФМСФ (фенілметилсульфонілфторид). Неклітинні екстракти центрифугували при 13 тис. об./хв протягом 30 хв (температура 4°C), осад відкидали, а супернатант використовували для визначення ферментативної активності [5, 6].

Концентрацію білків визначали за методом Лоурі [16].

Активність НАД-залежної ізоцитратдегідрогенази й алкогольдегідрогенази визначали, як описано [14, 9].

Статистичне оброблення отриманих результатів проводили з використанням програми "Origin 6.1". Вибір тактики статистичного оброблення і підготовку даних для аналізу здійснювали, базуючись на загальноприйнятих методах [2] при рівні достовірності $P < 0,05$.

Спочатку дослідили, як впливає наявність гідроген сульфід у середовищі на швидкість використання кисню клітинами дріжджів.

Виявилось, що гідроген сульфід по-різному впливає на поглинання кисню середовища клітинами дріжджів *P. guilliermondii* і *S. cerevisiae* (рис. 1). За наявності в середовищі 10 мМ гідроген сульфід швидкість поглинання кисню клітинами *S. cerevisiae* знизилася приблизно на 40%, тоді як у *P. guilliermondii* вона залишалася практично незмінною. Більш високі концентрації гідроген сульфід виявляли сильнішу інгібуючу дію на швидкість використання кисню клітинами *P. guilliermondii*, ніж *S. cerevisiae*, за концентрації гідроген сульфід 30 мМ швидкість поглинання кисню знижувалася відповідно у 13 і 4 рази.

У подальших експериментах ми дослідили вплив гідроген сульфід на активність одного з ключових ферментів циклу трикарбонових кислот – ізоцитратдегідрогенази, що здійснює перетворення ізоцитрату в α -кетоглутарат [13].

Описані НАД- та НАДФ-залежні ізоцитратдегідрогенази [8]. У еукаріотів виявлені обидва типи ферментів, а у прокаріотів – лише НАДФ-залежні. НАД-залежні

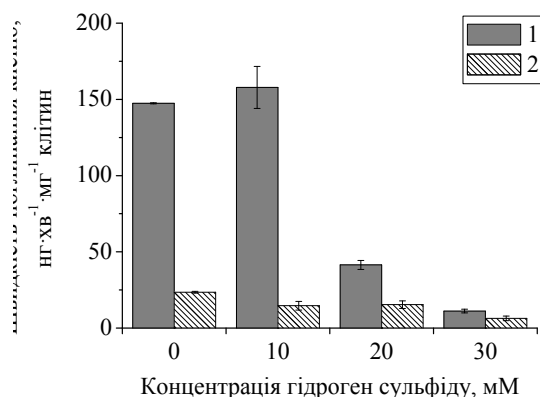


Рис. 1. Вплив гідроген сульфід на швидкість поглинання кисню клітинами дріжджів: 1 – *P. guilliermondii*, 2 – *S. cerevisiae*.

ферменти – це $\alpha_4\beta_4$ -гетерооктамери, що локалізовані в мітохондріях і функціонують у циклі трикарбонових кислот. Ми визначали вплив гідроген сульфід на активність НАД-залежної ізоцитратдегідрогенази [8, 12].

Додавання гідроген сульфід у ростове середовище не викликало помітних змін в активності ізоцитратдегідрогенази *P. guilliermondii* (рис. 2). Хоча гідроген сульфід у концентрації 30 мМ викликав зниження активності ферменту в неклітинних екстрактах у 2,5 рази порівняно з контролем. Очевидно, це пов'язано з меншою концентрацією H_2S усередині клітин, ніж у середовищі.

Ізоцитратдегідрогеназа *S. cerevisiae* виявилася більш чутливою до дії гідроген сульфід. Її активність у клітинах і неклітинних екстрактах знижувалася більш ніж у 5 разів за концентрації H_2S 10 мМ. Фермент майже повністю інактивувався в клітинах і неклітинних екстрактах за концентрації гідроген сульфід 20–30 мМ. Характерно, що активність ізоцитратдегідрогенази за концентрації гідроген сульфід 1 мМ в неклітинному екстракті достовірно зростала (більш ніж у 3 рази, рис. 3). Отже, низькі концентрації H_2S , діючи безпосередньо на фермент, викликають збільшення його активності. Більш високі концентрації гідроген сульфід знижують активність ферменту. Стимулювання активності фер-

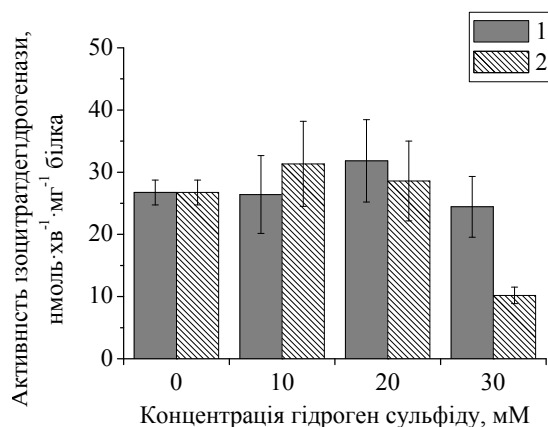


Рис. 2. Активність НАД-залежної ізоцитратдегідрогенази *P. guilliermondii*: 1 – при вирощуванні клітин за наявності гідроген сульфід; 2 – при внесенні гідроген сульфід у неклітинний екстракт.

менту за наявності гідроген сульфід у середовищі культивування, можливо, не відбувається через пригнічення інших метаболічних ферментів, що внаслідок функціонування різноманітних механізмів регуляції впливає на активність ізоцитратдегідрогенази. Для включення цих механізмів потрібен певний час, якого недостатньо при визначенні активності ферменту відразу після внесення гідроген сульфід у неклітинний екстракт.

Подібно до ізоцитратдегідрогенази *S. cerevisiae*, стимулювальний ефект гідроген сульфід виявляв на активність алкогольдегідрогенази. В аеробних умовах стимулювальний вплив спостерігався лише за концентрації H_2S 30 мМ, тоді як в анаеробних умовах активність ферменту поступово зростала зі збільшенням концентрації цієї сполуки від 1 до 30 мМ (рис. 4, А). Збільшення активності алкогольдегідрогенази в аеробних умовах за дії гідроген сульфід підтверджує думку про те, що ця сполука сприяє переходові клітин від аеробного до анаеробного метаболізму [10]. При внесенні гідроген сульфід у неклітинний екстракт зростання активності алкогольдегідрогенази спостерігалось лише за концентрації 1 мМ, а вже за концентрації 10 мМ відбувалася практично повна втрата активності ферменту (рис. 4, Б). Таким чином, стимулювальна дія гідроген сульфід на алкогольдегідрогеназу *S. cerevisiae*, очевидно, пов'язана з дією гідроген сульфід прямо на фермент. За низьких концентрацій гідроген сульфід відбувається часткова взаємодія ферменту з гідроген сульфідом, що супроводжується зростанням його активності. Високі концентрації гідроген сульфід призводять до інгібування ферменту.

Таким чином, гідроген сульфід інгібує поглинання кисню клітинами дріжджів *P. guilliermondii* та *S. cerevisiae*, що може свідчити про інгібування дихального метаболізму цією сполукою. Вплив гідроген сульфід на активність ізоцитратдегідрогенази *P. guilliermondii* та *S. cerevisiae* має різний характер і також залежить від концентрації H_2S і від способу його впливу (на клітини чи безпосередньо на фермент). У *S. cerevisiae*, очевидно, відбувається активація анаеробного метаболізму за дії гідроген сульфід як за аеробних, так і за анаеробних умов, про що свідчить збільшення активності алкогольдегідрогенази – термінального ферменту спиртового бродіння.

Робота частково виконана за рахунок коштів Державного бюджету України в рамках проекту Державного фонду фундаментальних досліджень.

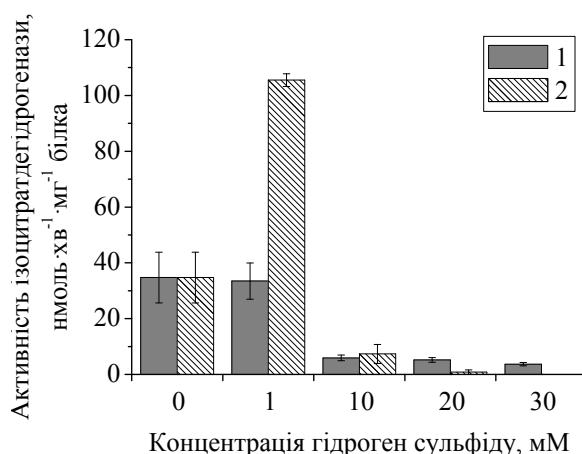


Рис. 3. Активність НАД-залежної ізоцитратдегідрогенази *S. cerevisiae*: 1 – при вирощуванні клітин за наявності гідроген сульфід; 2 – при внесенні гідроген сульфід у неклітинний екстракт.

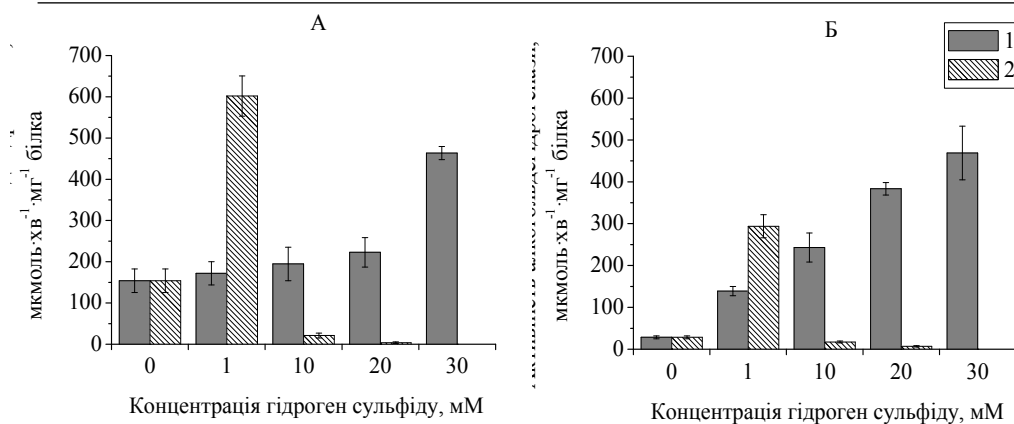


Рис. 4. Активність алкогольдегідрогенази *S. cerevisiae* в клітинах, вирощених за аеробних (А) і анаеробних (Б) умов: 1 – при вирощуванні клітин за наявності гідроген сульфїду; 2 – при внесенні гідроген сульфїду у безклітинний екстракт.

1. Галушка А. А., Перетятко Т. Б., Гудзь С. П. Вплив сірководню на *Saccharomyces cerevisiae* // Мікробіологія і біотехнологія. 2008. № 3. С. 49–57.
2. Лакін Г. Ф. Биометрия. М.: Высш. шк., 1990. 352 с.
3. Перетятко Т., Гнатуш С., Гудзь С. Сульфатвідновлювальні бактерії Яворівського сіркового родовища // Мікроб. журн. 2006. Т. 68. № 5. С. 84–91.
4. Руководство по изучению биологического окисления полярографическим методом / Под ред. Г.М. Франко. М.: Наука, 1973. 221 с.
5. Сибирный А. А., Кшеминская Г. П., Убийвовк В. М. и др. Мутанты метилотрофных дрожжей *Hansenula polymorpha* с дефектной формальдегидредуктазой // Биотехнология. 1990. № 5. С. 13–17.
6. Сибирный А. А., Титоренко В. И., Убийвовк В. М. Различия в регуляции биосинтеза цитозольной супероксиддисмутазы и ферментов окисления метанола у дрожжей // Биохимия. 1987. Т. 52. № 3. С. 469–473.
7. Burkholder P. Influence of some environmental factors upon the production of riboflavin by yeasts // Arch. Biochem. 1943. Vol. 1. N 1. P. 121–130.
8. Chen R.-D., Gadal P. Structure, functions and regulation of NAD and NADP dependent isocitrate dehydrogenases in higher plants and in other organisms // Plant Physiol. Biochem. 1990. Vol. 28. P. 411–427.
9. Chinnawirotpisan P., Matsushita K., Toyama H. et al. Purification and characterization of two NAD-dependent alcohol dehydrogenases (ADHs) induced in the quinoprotein ADH-deficient mutant of *Acetobacter pasteurianus* SKU1108 // Biosci. Biotechnol. Biochem. 2003. Vol. 67. N 5. P. 958–965.
10. Hydrogen sulfide: human health aspects [Electronic resource] / World health organization: Cicads 53. Geneva, 2003. Access mode: <http://www.inchem.org/documents/cicads/cicads/cicad53.htm>
11. Julian D., April K. L., Patel S. et al. Mitochondrial depolarization following hydrogen sulfide exposure in erythrocytes from a sulfide-tolerant marine invertebrate // J. Exp. Biol. 2005. Vol. 208. N 21. P. 4109–4122.

12. Kanao T., Kawamura M., Fukui T. et al. Characterization of isocitrate dehydrogenase from the green sulfur bacterium *Chlorobium limicola* // Eur. J. Biochem. 2002. Vol. 269. P. 1926–1931.
13. Khan A.A., Schuler M. M., Prior M. G. et al. Effects of hydrogen sulfide exposure on lung mitochondrial respiratory chain enzymes in rats // Toxicol. Appl. Pharmacol. 1990. Vol. 103. P. 482–490.
14. Lin A., McAlister L. Homologous binding sites in yeast isocitrate dehydrogenase for co-factor (NAD⁺) and allosteric activator (AMP) // J. Biol. Chem. 2003. Vol. 278. N 15. P. 12864–12872.
15. Lowicka E., Beltowski J. Hydrogen sulfide (H₂S) – the third gas of interest for pharmacologists // Pharmacol. Reports. 2007. Vol. 59. P. 4–24.
16. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. Protein determination with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. 1951. Vol. 193. P. 265–275.
17. Reiffenstein R. J., Hulbert W. C., Roth S. H. Toxicology of hydrogen sulfide // Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 1992. Vol. 32. P. 109–134.
18. Пат. 6340596 США, МКИ G 01 N 33/00. Reagent composition for measuring hydrogen sulfide and method for measuring hydrogen / Masami Sugiyama (Японія); Fujirebio Inc. N248316; Заявл. 02.11.1999; Опубл. 22.01.2002; НКИ 436/121. 9 с.

**EFFECTS OF HYDROGEN SULFIDE UPON THE OXYGEN UPTAKE AND
ACTIVITIES OF ISOCITRATE AND ALCOHOL DEHYDROGENASES IN
SACCHAROMYCES CEREVISIAE AND PICHIA GUILLIERMONDII YEASTS CELLS**

A. Halushka, S. Gudz

*Ivan Franko National University of Lviv
4, Hrushevskiyi St., Lviv 79005, Ukraine
e-mail: a_halushka@mail.ru*

Influence of hydrogen sulfide on the velocity of oxygen uptake by *Pichia guilliermondii* and *Saccharomyces cerevisiae* yeasts and on their isocitrate dehydrogenase and alcohol dehydrogenase activities is investigated. Hydrogen sulfide decreases the velocity of oxygen uptake by the cells of *S. cerevisiae* at concentrations from 10 mM, and by the cells of *P. guilliermondii* – at concentration 20 mM and higher. Hydrogen sulfide at concentration 30 mM caused the inhibition of *P. guilliermondii* and *S. cerevisiae* isocitrate dehydrogenase activity. Concentration of H₂S 1 mM increased, and 10–30 mM – decreased the activity of isocitrate dehydrogenase in the cell-free extracts of *S. cerevisiae*. Hydrogen sulfide stimulated the activity of alcohol dehydrogenase of *S. cerevisiae* cells. Activity of alcohol dehydrogenase in the cell-free extracts was inhibited at the presence of 10–30 mM of hydrogen sulfide.

Key words: hydrogen sulfide, oxygen uptake, isocitrate dehydrogenase, alcohol dehydrogenase, toxicity, *P. guilliermondii*, *S. cerevisiae*.

**ВЛИЯНИЕ СЕРОВОДОРОДА НА ПОГЛОЩЕНИЕ КИСЛОРОДА И
АКТИВНОСТЬ ИЗОЦИТРАТДЕГИДРОГЕНАЗЫ И
АЛКОГОЛЬДЕГИДРОГЕНАЗЫ ДРОЖЖЕЙ
SACCHAROMYCES CEREVISIAE И *PICHA GUILLIERMONDII***

А. Галушка, С. Гудзь

*Львовский национальный университет имени Ивана Франко
ул. Грушевского, 4, Львов, 79005, Украина
e-mail: a_halushka@mail.ru*

Исследовано влияние сероводорода на скорость поглощения кислорода и активность изоцитратдегидрогеназы и алкогольдегидрогеназы дрожжей *Pichia guilliermondii* и *Saccharomyces cerevisiae*. Обнаружено, что сероводород вызывает снижение скорости поглощения кислорода клетками *S. cerevisiae* при концентрациях от 10 мМ, а клетками *P. guilliermondii* – при концентрациях 20 мМ и больше. Сероводород при концентрации 30 мМ вызывал ингибирование активности изоцитратдегидрогеназы *P. guilliermondii* и *S. cerevisiae*, при концентрации 1 мМ H₂S повышал, а при концентрации 10–30 мМ понижал активность изоцитратдегидрогеназы неклочных экстрактов *S. cerevisiae*. Сероводород оказывал стимулирующее действие на активность алкогольдегидрогеназы клеток *S. cerevisiae*. Активность алкогольдегидрогеназы в неклочных экстрактах угнеталась в присутствии 10–30 мМ сероводорода.

Ключевые слова: сероводород, поглощение кислорода, изоцитратдегидрогеназа, алкогольдегидрогеназа, токсичность, *P. guilliermondii*, *S. cerevisiae*.

Стаття надійшла до редколегії 18.05.09
Надійшла після доопрацювання 10.09.09
Прийнята до друку 25.09.09