

УДК 582.282.23

ВЫДЕЛЕНИЕ, ОЧИСТКА И ХАРАКТЕРИСТИКА БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОГО ПОЛИПЕПТИДА ИЗ СУХИХ ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* S288C

Набиева Ф.С.

Самаркандский государственный медицинский университет, Самарканд,
e-mail: nabievafarangiz294@gmail.com

В представленной работе была разработана и апробирована комплексная методика выделения и очистки биологически активного низкомолекулярного полипептида из сухих дрожжей штамма *Saccharomyces cerevisiae* S288C. В ходе исследований экспериментально установлены оптимальные параметры экстракции белковых соединений, включающие использование 0,2% раствора NaOH при температуре 37 °C, гидромодуль 1:5 и ультразвуковую обработку с частотой 34 кГц в течение 5 мин. Эти условия способствуют эффективному разрушению клеточной стенки и обеспечивают максимальный выход целевых белков. Методика очистки представляла собой многоступенчатую схему, включающую фракционирование сульфатом аммония, гель-фильтрацию на сефадексе G25 и последующую лиофильную сушку. Общий выход очищенной полипептидной фракции составил 5,7% от исходной сухой биомассы. Спектроскопическая и электрофоретическая характеристики подтверждают наличие типичных для биологически активных веществ функциональных групп и молекулярную массу в пределах 8–40 кДа. Анализ аминокислотного состава методом высокоэффективной жидкостной хроматографии выявил преобладание аргинина, глицина и гистидина, что указывает на потенциальную антиоксидантную, иммуномодулирующую и регуляторную активность выделенного препарата. Полученные результаты подтверждают перспективность использования дрожжевых полипептидов в фармацевтике, пищевой промышленности и биотехнологии.

Ключевые слова: *Saccharomyces cerevisiae* S288C, полипептиды, экстракция, спектрофотометрия, инфракрасная спектроскопия, аминокислотный анализ, высокоэффективная жидкостная хроматография, электрофорез

ISOLATION, PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF A BIOLOGICALLY ACTIVE POLYPEPTIDE FROM DRIED YEAST *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* S288C

Nabieva F.S.

Samarkand State Medical University, Samarkand, e-mail: nabievafarangiz294@gmail.com

In this study, a comprehensive method was developed and tested for the extraction and purification of a biologically active low-molecular-weight polypeptide from dry yeast of the *Saccharomyces cerevisiae* S288C strain. Optimal parameters for protein extraction were experimentally determined, including the use of a 0.2% NaOH solution at 37 °C, a hydromodule of 1:5, and ultrasonic treatment at a frequency of 34 kHz for 5 minutes. These conditions ensured effective disruption of the cell wall and maximized the yield of target proteins. The purification method consisted of a multi-stage scheme, including ammonium sulfate fractionation, gel filtration on Sephadex G25, and subsequent lyophilization. The total yield of the purified polypeptide fraction was 5.7% of the initial dry biomass. Spectroscopic and electrophoretic analyses confirmed the presence of functional groups typical for biologically active substances and a molecular weight range of 8–40 kDa. Analysis of the amino acid composition by high-performance liquid chromatography revealed the predominance of arginine, glycine and histidine, which indicates the potential antioxidant, immunomodulatory and regulatory activity of the isolated drug. The results obtained confirm the promise of using yeast-derived polypeptides in pharmaceuticals, the food industry, and biotechnology.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae* S288C, polypeptides, extraction, spectrophotometry, amino acid analysis, infrared spectroscopy, high performance liquid chromatography, electrophoresis

Введение

В современных биотехнологических и фармакологических разработках наблюдается устойчивый интерес к использованию природных источников биоактивных веществ, обладающих низкой токсичностью, высокой биологической активностью и доступностью. Одним из перспективных объектов являются дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, которые, помимо своей традиционной роли в пищевой промышленности, рассматриваются как источник низкомоле-

кулярных полипептидов с потенциальными функциональными свойствами [1, 2].

Сухие дрожжи штамма S288C являются удобной моделью для получения полипептидных комплексов благодаря устойчивым культурологическим свойствам и генетической изученности [3]. На сегодняшний день недостаточно разработаны и стандартизированы методы получения целевых полипептидных фракций с высокой степенью чистоты и стабильным биохимическим профилем, что обуславливает актуальность настоящего исследования [4, 5].

Цель исследования – разработка и апробация оптимального метода выделения и очистки низкомолекулярных полипептидов из сухих дрожжей *S288C* с последующим анализом их аминокислотного состава и спектроскопических свойств для потенциального применения в биотехнологии и фармакологии.

Материалы и методы исследования

Объектом исследования являлись сухие дрожжи штамма *S288C*. Количественное определение белка проводилось спектрофотометрически с использованием реактива Несслера. Для экстракции использовали 0,2% раствор NaOH при оптимизированном гидромодуле (1:5) и температуре 37 °C с последующей ультразвуковой обработкой (34 кГц, 5 мин). Очистка экстрактов проводилась методом фракционирования сульфатом аммония (20 и 80%), гель-фильтрацией на сефадексе G25 и лиофильной сушкой. Характеризация полипептидов включала инфракрасную спектроскопию (ИК-спектральный анализ), электрофорез в 10% полиакриламидном геле (ПААГ) и аминокислотное секвенирование методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с использованием хроматографа Agilent Technologies 1200.

Результаты исследования и их обсуждение

Определение содержания белка в исследуемых объектах проводили после предварительной минерализации пробы с серной кислотой с последующим определением белкового азота с реактивом Несслера. Для этого использовали прибор спектрофотометр, аналитические весы с точностью до 0,0001 г, фильтровальную бумагу, конические воронки, мерные колбы на 50 мл, натрий едкий, сегнетовую соль, реактив Несслера, дистиллированную воду, серную кислоту концентрированную, перекись водорода концентрированную. От подготовленных проб отбирали навески в термостойкие колбы, приливали концентрированную серную кислоту H₂SO₄ (ρ 1,84 г/см³) и разлагали на песчаной бане или плитке, избегая бурного кипения. Окончанием процесса минерализации являлось получение абсолютно прозрачного бесцветного раствора. В подготовленных пробах определяли содержание белка колориметрическим методом с реактивом Несслера при длине волны 400 нм на спектрофотометре V-5000 Metash. Полученные результаты при двукратной повторности эксперимента представлены в табл. 1.

Таблица 1

Результаты анализа количественного содержания белка

Объект исследования	Навеска, г	Аликвот, мл	400 нм	Белок, %	Азот, %
Дрожжи	0,287	0,2	0,578	44,8	7,16

Источник: составлено автором.

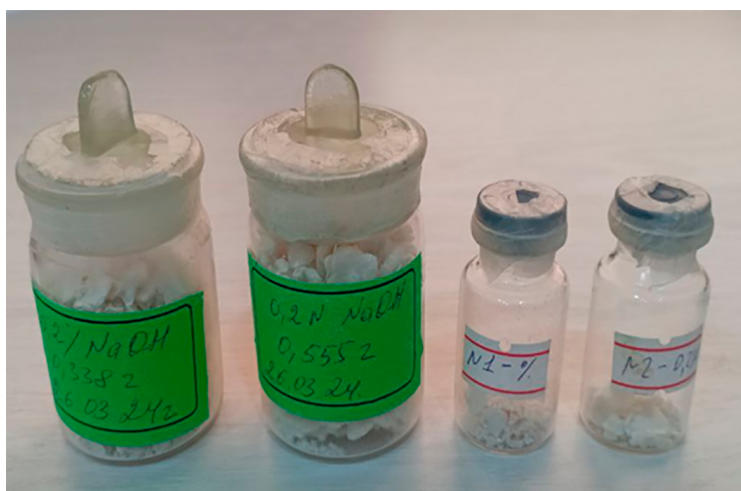


Рис. 1. Очищенные полипептиды штамма дрожжей *S288C*
Источник: составлено автором

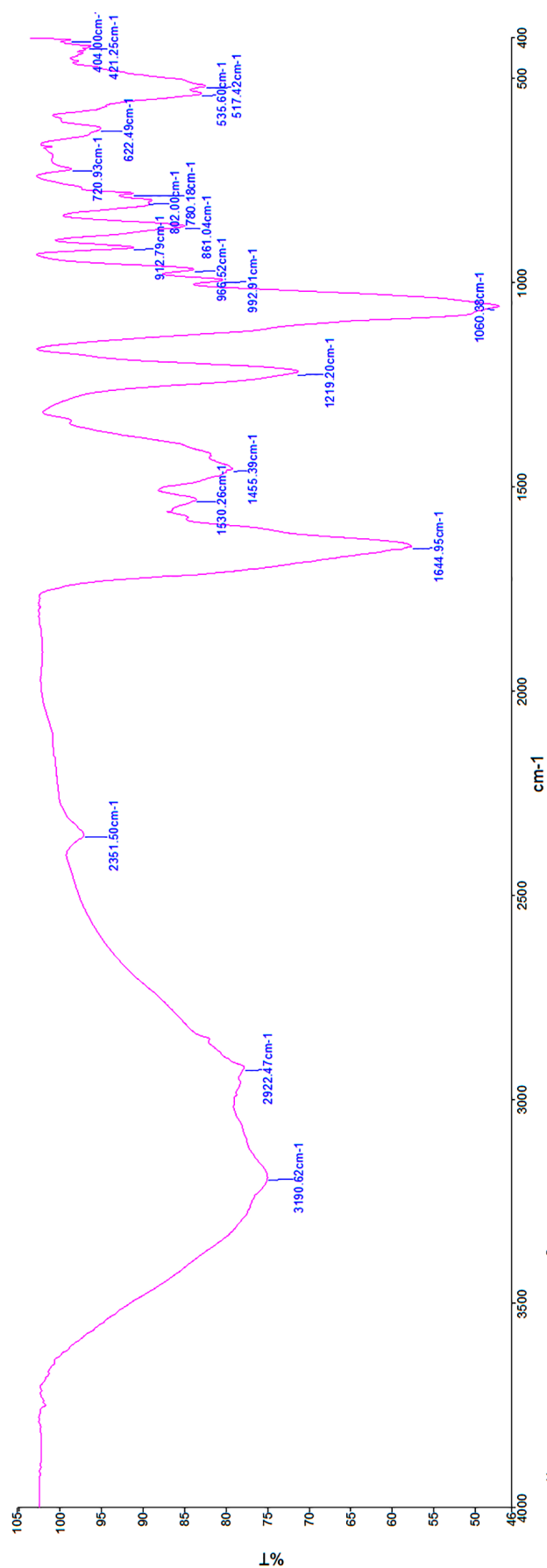


Рис. 2. Полипептид, полученный экстрагентом 0,2 N-ного NaOH
Источник: составлено автором

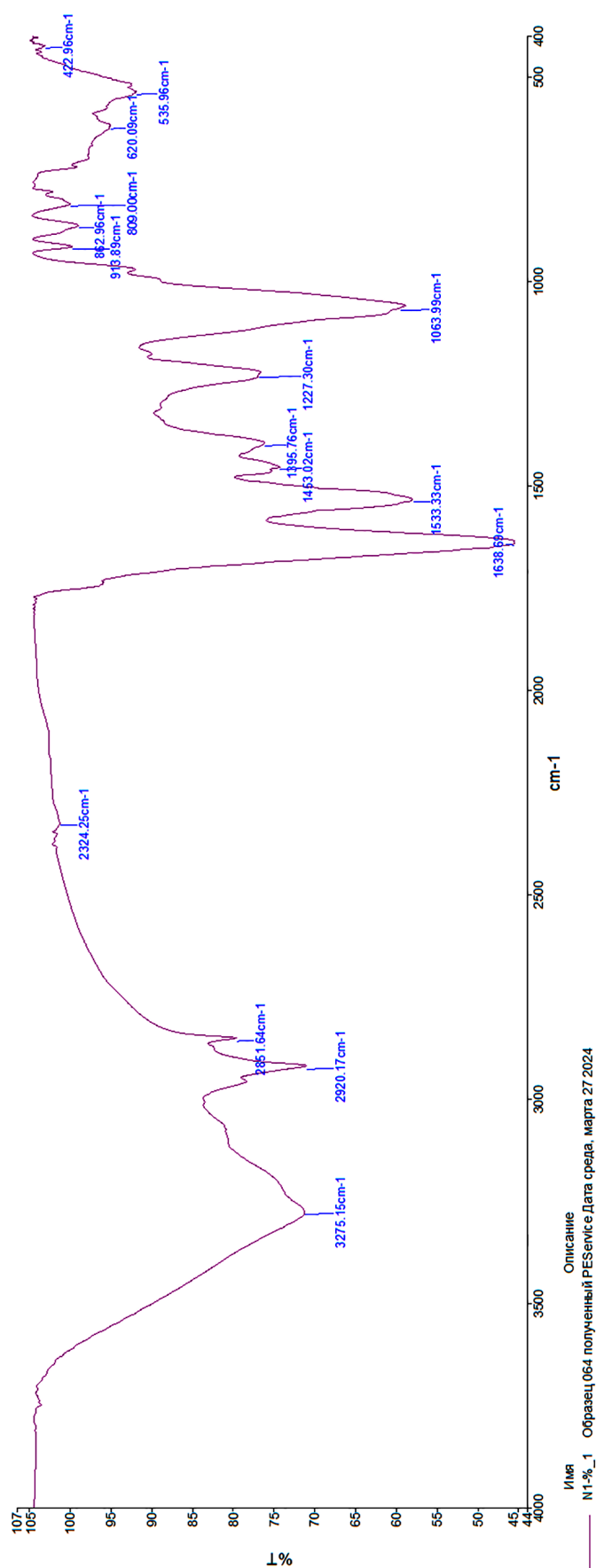


Рис. 3. Полипептид, полученный экстрагентом 0,2 %-ного NaOH
Источник: составлено автором

Затем разрабатывались оптимальные условия для экстракции белков. Экстракцию проводили 0,05 трис HCl (pH 8,5), 2% Na₂CO₃, 0,2% NaOH [3]. Подбирали гидромодуль (1:5, 1:10, 1:15), и время проведения экстракции 60, 120, 180, 240 минут, для полного разрушения клеток гомогенат обрабатывали ультразвуком (частота колебаний) 34 кГц [6, 7].

Экстракцию проводили 0,2% NaOH в течение 3 ч, 370 °С, при гидромодуле 1:5, затем обработку ультразвуком в течение 5 мин, при которых обеспечивается максимальный выход белка. После экстракции проводили центрифугирование в течение 30 мин при 8000 об/мин. На следующем этапе очистки использовали фракционирование сухим сульфатом аммония. Для удаления высокомолекулярных белков использовали сульфат аммония при 20, 40, 60%-ном осаждении. Результаты показали, что 20%-ное высаливание экстракта сульфатом аммония является наиболее, оптимальным для удаления балластных (высокомолекулярных) белков.

Затем использовали сульфат аммония при 80%-ном осаждении для получения низкомолекулярных полипептидов. Экстракт 80%-ного осаждения центрифугировали и полученный осадок низкомолекулярных полипептидов обессоливали на колонке с сефадексе G25. Гель-фильтрацию на сефадексе G25 проводили со сбором элюата по 4 мл [8]. Концентрацию полученных обессоленных белковых фракций определяли на спектрофотометре Cary 60 (Германия) при длине волны 280 и 260 нм. Полученную обессоленную белковую фракцию собирали и лиофильно сушили при высоком вакууме (-870 С) на приборе CHRIST Alpha 2-4 LSCbasic (Германия). Выход очищенных полипептидов составил 5,7% (рис. 1).

Для идентификации функциональных групп получен ИК-спектральный анализ для полипептидов. Геометрия исследуемых соединений построена с помощью программы MaSK и предварительно оптимизирована методом V3LYP1/6-31G (d,p). Расчеты проводили в пакете программ Firefly 8.0.1 ИК-спектры исследуемых полипептидов в таблетках с KBr записаны (4000–400 см⁻¹) на ИК-Фурье-спектрофотометре System 2000 фирмы Perkin-Elmer. ИК-спектры выражены в виде зависимости частот от оптической плотности (Absorbance).

Результаты приведены на рис. 2 и 3.

ИК-спектр (KBr, ν_{max}, см⁻¹): 31-96 (NH), 30-34 (CH₃), 16-46 (S=O), 14-03 сигналов, характерных для ароматического кольца, 1240, 1049 (- C-O-C -), 704 линий поглощения, характерных для аромати-

ческого кольца (S-N), группы размером 602 см⁻¹ (S-SH).

ИК-спектр (KBr, ν_{max}, см⁻¹): 3275 (NH), 2920, 2852 (CH₂), 1639 (S=O), 1533, 1453 сигналы, специфичные для ароматических колец, 1396 (CH₃), 1227, 1064 (- C-O-C -), 863, 809 (s-n), 620, 536 см⁻¹ (s-sh, -c-S-C-) группы в ароматическом кольце, демонстрирующие характерные линии поглощения.

Характеристику очищенных полипептидов проводили с помощью электрофореза в 10%-ном ПААГ [9]. В качестве маркеров использовали стандартный набор белков Novex™ Sharp pre-stained Protein Ladder (Invitrogen). Электрофорез проводили в денатурирующих условиях. Образцы наносились по 20 мкл в каждую лунку. Во время миграции образцов в концентрирующем геле (6%) напряжение поддерживали на уровне 50 В. При перемещении фронта в разделяющем геле (10%) напряжение повышали до 80 В. Электрофорез проводили до выхода бромфенолового синего из геля [10]. Гели окрашивали 0,25%-ным раствором Coomassie G250 (Sigma, USA) в смеси вода : этанол : уксусная кислота : вода (1:1:2).

По данным электрофореза очищенные полипептиды имеют идентичный фракционный состав с молекулярной массой от 8 до 40 кДа.

Выделение свободных аминокислот. Осаждение белков и пептидов водного экстракта образцов проводили в центрифужных стаканах. Для этого к 1 мл исследуемого образца добавляли по 1 мл (точный объем) 20% ТХУК. Через 10 мин осадок отделяли центрифугированием при 8000 об/мин в течение 15 мин. Отделив 0,1 мл надосадочной жидкости, лиофильно высушивали. Гидролизат упаривали, сухой остаток растворяли в смеси триэтиламин – ацетонитрил – вода (1:7:1) и высушивали. Эту операцию повторяли дважды для нейтрализации кислоты. Реакцией с фенилтиоизоцианатом получали фенилтиокарбамил-производные (ФТК) аминокислот по методу A. Steven, David Cohen [11]. Идентификацию производных аминокислот проводили методом ВЭЖХ [12]. Полученные результаты при двукратной повторности эксперимента представлены в табл. 2.

Проведенные исследования показали, что содержание общего белка в биомассе дрожжей S288C достигает 44,8%, что свидетельствует о высоком белковом потенциале штамма и его биотехнологической значимости. Оптимальные условия экстракции (0,2% NaOH, 37 °С, 3 ч, гидромодуль 1:5, ультразвуковая обработка) обеспечили эффективное разрушение клеточной стенки и высокий выход белков [13].

Таблица 2

Аминокислотный состав полипептида

Аминокислоты	Белок, мг/гр
Аспарагиновая кислота	21.18344
Глутаминовая кислота	24.64502
Серин	15.31665
Глицин	46.67304
Аспарагин	0
Глутамин	0
Цистеин	2.940984
Треонин	5.240469
Аргенин	44.39112
Аланин	1.088789
Пролин	9.861871
Тирозин	15.83588
Валин	23.9325
Метионин	2.827883
Гистидин	27.41822
Изолейцин	14.51658
Лейцин	24.88968
Триптофан	0
Фенилаланин	6.89199
Лизин	17.61042
Итог	305.2645

Источник: составлено автором.

Фракционирование сульфатом аммония позволило получить низкомолекулярные пептиды (при 80 %-ном насыщении) с выходом 5,7%, аналогично результатам, описанным в [14]. Гель-фильтрация на сефадексе G-25 обеспечила эффективное удаление солей и концентрацию целевых фракций.

ИК-спектроскопия подтвердила наличие функциональных групп, характерных для пептидов, включая алифатические и ароматические аминокислоты. Различия в спектрах указывают на влияние условий экстракции на состав фракций. По данным электрофореза в 10 %-ном полиакриламидном геле, молекулярная масса полипептидов составляет 8–40 кДа, что подтверждает их биологическую активность [15].

Аминокислотный анализ выявил высокое содержание глицина, аргинина и гистидина, обладающих потенциальной антиоксидантной активностью. Отсутствие триптофана и глутамина, вероятно, связано с условиями кислотного гидролиза.

Таким образом, разработанная комплексная методика очистки позволила получить пептидные фракции с перспектив-

ными свойствами для применения в биотехнологии, фармацевтике и пищевой промышленности.

Заключение

В результате проведенного исследования разработана и апробирована эффективная методика выделения и очистки низкомолекулярных полипептидов из сухих дрожжей *S288C*. Оптимизация условий экстракции обеспечила максимальное извлечение белков, а многоступенчатая схема очистки с использованием аммонийного сульфата, гель-фильтрации и лиофильной сушки – получение целевой фракции (5,7%) с молекулярной массой 8–40 кДа.

ИК-спектроскопия и электрофорез подтвердили наличие функциональных групп, характерных для биологически активных молекул. Установленный аминокислотный профиль с преобладанием аргинина, глицина и глутаминовой кислоты указывает на потенциальную биологическую активность полипептидов. Полученные данные могут быть использованы при разработке функциональных биопрепаратов для биотехнологии и фармакологии.

Список литературы

1. Lopes A., Ferreira C., Pereira J.O., Pintado M.E., Carvalho A.P. Peptide extract from spent yeast improves resistance of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress // *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2023. DOI: 10.1007/s00253-023-12514-3.
2. Mirzaei M., Mirdamadi S., Safavi M. Antioxidant activity and protective effects of *Saccharomyces cerevisiae* peptide fractions against H₂O₂-induced oxidative stress in Caco-2 cells // *Journal of Food Measurement and Characterization*. 2019. Vol. 13, Is. 4. P. 2654–2662. DOI: 10.1007/s11694-019-00186-5.
3. Mohanty S.P., Kumar A., Jha S., Raut A., Barman I., Sarkar D. Extraction of proteins and other intracellular bioactive compounds from baker's yeasts by pulsed electric field treatment // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2020. Vol. 8. Art. 552335. DOI: 10.3389/fbioe.2020.552335.
4. Abadias M., Aguilo-Aguayo I., Munne-Bosch S., Lopez M.L., Vinas I., Usall J. Production of *Saccharomyces cerevisiae* from agricultural and food processing wastes // *Applied Food Research*. 2025. Vol. 5, Is. 1. P. 100659. DOI: 10.1016/j.afres.2024.100659.
5. Oliveira A.S., Ferreira C., Pereira J.O., Pintado M.E., Carvalho A.P. Valorisation of protein-rich extracts from spent brewer's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*): an overview // *Biomass Conversion and Biorefinery*. 2025. № 15. P. 1771–1793. DOI: 10.1007/s13399-022-02636-5.
6. De Andrade E.W.V., Dupont S., Beney L. et al. Sonoprocessing is an effective strategy to encapsulate fisetin into *Saccharomyces cerevisiae* cells // *Appl Microbiol Biotechnol*. 2022. 106. P. 7461–7475. DOI: 10.1007/s00253-022-12214-4.
7. Berzosa A., Marin-Sanchez J., Alvarez I., Sanchez-Gimeno C., Raso J. Pulsed Electric Field Technology for the Extraction of *Saccharomyces cerevisiae* glutathione // *Foods*. 2024. Vol. 13, Is. 12. Art. 1916. DOI: 10.3390/foods13121916.
8. Thyab Gddoa Al-sahlany S., Altemimi A.B., Al-Manhel A.J.A., Niamah A.K., Lakhssassi N., Ibrahim S.A. Purification of bioactive peptide with antimicrobial properties produced

- by *Saccharomyces cerevisiae* // Foods. 2020. Vol. 9. P. 324. DOI: 10.3390/foods9030324.
9. Carranza-Oropeza M.V., Sherrill A.W., Sanders J.R. Thermal and mechanical behavior of polypeptide-based polymer systems // Journal of Applied Polymer Science. 2016. Vol. 133, Is. 40. Art. 44063. DOI: 10.1002/app.44063.
10. Santos M.F.D.S., Freitas C.S., Verissimo da Costa G.C., Pereira P.R., Paschoalin V.M.F. Identification of antibacterial peptide candidates encrypted in stress-related and metabolic *Saccharomyces cerevisiae* proteins // Pharmaceuticals (Basel). 2022. Jan 28. Vol. 15 (2). P. 163. DOI: 10.3390/ph15020163.
11. Cohen S.A., Strydom D.J. Amino acid analysis utilizing phenylisothiocyanate derivatives // Analytical Biochemistry. 1988. Vol. 174, Is. 1. P. 1–16. DOI: 10.1016/0003-2697(88)90512-X.
12. Plata M.R., Koch C., Wechselberger P., Herwig C., Lendl B. Determination of carbohydrates present in *Saccharomyces cerevisiae* using mid-infrared spectroscopy and partial least squares regression // Anal Bioanal Chem. 2013. Oct. 405 (25). P. 8241–8250. DOI: 10.1007/s00216-013-7239-9.
13. Branco P., Kemsawasd V., Santos L., Diniz M., Caldeira J., Almeida M.G., Arneborg N., Albergaria H. *Saccharomyces cerevisiae* accumulates GAPDH-derived peptides on its cell surface that induce death of non-Saccharomyces yeasts by cell-to-cell contact // FEMS Microbiology Ecology. 2017. Vol. 93, Is. 5. Art. fix055. DOI: 10.1093/femsec/fix055.
14. Dong L., Li F., Piao Y. et al. Characterization of proteinase A excretion from *Saccharomyces cerevisiae* in high sugar stress conditions // J Korean Soc Appl Biol Chem. 2015. Vol. 58. P. 203–208. DOI: 10.1007/s13765-015-0036-8.
15. Parapouli M., Vasileiadis A., Afendra A.S., Hatziloukas E. *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications // AIMS Microbiology. 2020. T. 6. № 1. P. 1–31. DOI: 10.3934/microbiol.2020001.