

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра биохимии и биофизики

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЭКСТРАКЛЕТОЧНЫХ МЕТАБОЛИТОВ
ПЕКАРСКИХ ДРОЖЖЕЙ ДЛЯ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО
СИНТЕЗА АЦЕТОАЦЕТИЛ-2Н-ХРОМЕН-2-ОНА

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

студентки 4 курса 421 группы

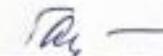
Направления подготовки бакалавриата 06.03.01

Биология Биологического факультета

Литовченко Софьи Денисовны

Научный руководитель:

доцент, канд. биол. наук


30.05.2025

А.А. Галицкая

Научный консультант:

доцент, канд. биол. наук


30.05.2025

М.В. Каневский

Заведующий кафедрой:

профессор, док. биол. наук


30.05.2025

С.А. Коннова

Саратов 2025

Введение. *Saccharomyces cerevisiae* (пекарские дрожжи) – одна из наиболее изученных и широко применяемых биокаталитических систем в биотехнологии и органическом синтезе. Их преимущества включают разнообразие секретируемых ферментов, устойчивость к различным условиям культивирования и возможность проведения процессов в водных средах при мягких условиях, что делает их перспективными для «зеленого» синтеза.

Дрожжи способны катализировать сложные многостадийные реакции, включая синтез 3,4-дигидропиримидинонов и 1,4-дигидропиридинов [1, 2]. В ряде работ сообщается о высокой эффективности дрожжей в реакциях, подобных конденсации Кневенагеля-Михаэля, с выходами до 89–92% всего за 45-60 минут [3]. Однако настолько высокая скорость протекания реакции вызывает определенные сомнения, так как существенно превышает типичные временные параметры для аналогичных ферментативных процессов. Кроме того, роль дрожжей в данной реакции не была достаточно изучена, а также не известен сам механизм катализа.

Практическая значимость работы также связана с синтезом 1-(2-оксо-2Н-хромен-3-ил)бутан-1,3-диона – прекурсора антиоксидантов. Успешное применение дрожжей в этой реакции может стать основой для разработки более экологичного и экономичного метода его получения.

Цель данной работы – исследование возможности применения *S. cerevisiae* для конденсации салицилового альдегида и 4-гидрокси-6-метил-2-пирона.

Задачи исследования:

1. Оценить динамику накопления белков и кетоновых тел в культуральной жидкости дрожжей при варьировании температуры и количества азота в среде.
2. Оценить динамику убыли глюкозы в культуральной жидкости при варьировании температуры и количества азота в среде.

3. Определить возможность проведения реакции конденсации салицилового альдегида и 4-гидрокси-6-метил-2-пирона в отсутствие дрожжевых клеток.

Бакалаврская работа включает содержание, список сокращений, введение, 3 главы (обзор литературы, материалы и методы, результаты исследований и их обсуждение), заключение, выводы и список использованных источников, включающий 43 источника на русском и английском языках. Работа изложена на 48 страницах машинописного текста. Работа проиллюстрирована 13 рисунками и 4 таблицами.

В качестве объекта исследования использовали сухие пекарские дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*. 200 мг дрожжей помещали в 5 мл PBS ((г/л) KCl – 0,2; NaCl – 8,0; K₃PO₄ – 0,4 (KH₂PO₄ – 0,24); Na₃PO₄ – 1,6; (Na₂HPO₄ – 1,44)), добавляли 300 мг глюкозы и 20 мг (NH₄)₂SO₄. В контрольный образец серноокислый аммоний не добавляли. Оба образца ставили в термостат при постоянном перемешивании при различных температурах (31°C, 35°C, 39°C).

В работе использовали следующие методы: фенол-серноокислый метод для определения общего содержания углеводов в культуральной жидкости, основанный на цветной реакции производных фурана с фенолом в присутствии серной кислоты с последующим спектрофотометрическим измерением при 490 нм; метод Бредфорда для количественного определения белка, основанный на взаимодействии белков с красителем Кумасси G-250 с измерением оптической плотности при 595 нм; пробу Легалья для определения содержания кетоновых тел по реакции с нитропруссидом натрия в щелочной среде с последующей спектрофотометрической детекцией при 415 нм. Все эксперименты проводили в трехкратной повторности, статистическую обработку данных осуществляли с использованием пакета MS Office (версия 2504).

Для подготовки культуральной жидкости дрожжи культивировали при отобранных условиях (температура и время, при которых наблюдался максимальный выход белка). В 50 мл PBS помещали 2 г сухих пекарских

дрожжей, добавляли 3 г глюкозы и 200 мг $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Центрифугировали при 7000 об/мин 15 минут. Полученную надосадочную жидкость разделили на 2 равные части. Одна часть КЖ использовалась без изменений, а с другой частью был проведен диализ против PBS (24 ч). Далее был подобран объем образцов культуральной жидкости с нормированным содержанием белка (по данным ранее проведенных экспериментов по изучению выхода белка в различных условиях) и данные объемы использовали для проведения реакции конденсации.

Основное содержание работы. Целью работы являлось изучение возможности использования дрожжевых клеток для катализа конденсации салицилового альдегида и 4-гидрокси-6-метил-2-пирона с образованием 1-(2-оксо-2Н-хромен-3-ил)бутан-1,3-диона (рисунок 1).

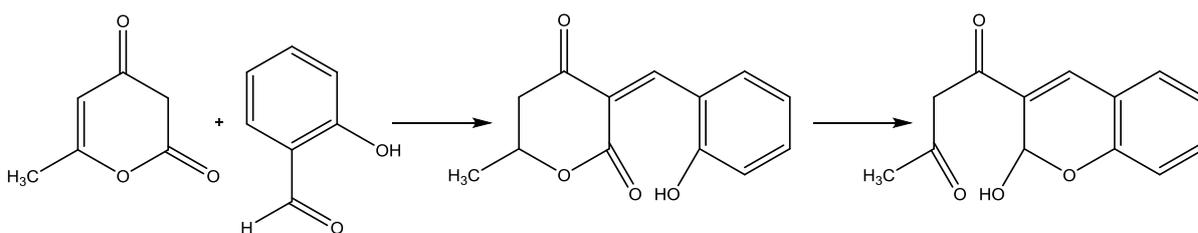


Рисунок 1 - Схема реакции образования 1-(2-оксо-2Н-хромен-3-ил)бутан-1,3-диона из салицилового альдегида и 4-гидрокси-6-метил-2-пирона [4].

Данная реакция представляет собой вариант конденсации Кневенагеля, где в качестве катализатора предположительно выступают дрожжевые экзоферменты. Для оптимизации процесса исследовали ключевые параметры: накопление экстраклеточного белка (потенциального катализатора), динамику утилизации глюкозы (возможного конкурентного субстрата) и образование кетоновых тел (потенциальных побочных метиленактивных соединений). Эксперименты проводили при различных температурах культивирования (31, 35 и 39°C), соответствующих

физиологическому диапазону дрожжей [5], что позволило оценить влияние температурного фактора на биохимические показатели культуральной жидкости и эффективность целевого процесса.

Так как глюкоза является альдегидоспиртом, она может выступать в роли субстрата, конкурирующего с салициловым альдегидом. При высоком содержании глюкозы в культуральной жидкости реакция может проходить по альтернативному пути, что усложняет и замедляет синтез целевого продукта. Поэтому необходимо было рассмотреть, как быстро дрожжи утилизируют глюкозу в ходе роста.

Исследование динамики утилизации глюкозы показало ее быстрое потребление дрожжами при всех изученных температурах (31, 35 и 39°C). Уже в первый час культивирования концентрация глюкозы снижалась более чем на 98%, достигая к 2-4 часам значений ниже 50 мкг/мл (снижение на 99,99%). Наиболее интенсивный метаболизм наблюдался в образцах с добавлением сернокислого аммония, где полная утилизация происходила на 1-2 часа раньше, чем в контроле. При 39°C глюкоза полностью потреблялась уже к третьему часу. Полученные данные свидетельствуют, что быстрое потребление глюкозы исключает ее участие в качестве конкурентного субстрата в целевой реакции конденсации. Более эффективная утилизация в присутствии азота связана с его стимулирующим действием на рост дрожжевых клеток.

Поскольку кетоновые тела являются метиленактивными соединениями, они потенциально могут выступать в качестве конкурирующих субстратов в реакции конденсации. Исследование их накопления показало следующую динамику:

При 31°C первые 2 часа кетоновые тела практически не обнаруживались, однако к 5-му часу их концентрация достигала 43,8 мг/мл в контроле и 57,5 мг/мл в образце с азотом. Более интенсивное накопление в присутствии азота свидетельствует о его стимулирующем действии на метаболизм дрожжей.

При 35°C максимальные концентрации составили 24,5 мг/мл (контроль) и 92 мг/мл (+N) к 5-му часу. Характерно, что в образце с азотом после 4-го часа наблюдался резкий скачок концентрации.

Наиболее выраженное накопление кетоновых тел отмечалось при 39°C: уже к 1-му часу их уровень достигал 25 мг/мл в образце с азотом, а к 5-му часу - 66,7 мг/мл. В контроле динамика была менее интенсивной, но также демонстрировала резкий рост на 5-м часу.

Во всех случаях к 4-му часу концентрация кетоновых тел оставалась относительно низкой (менее 20 мг/мл), что позволяет минимизировать их влияние как конкурентных субстратов. Наблюдаемое временное снижение концентрации между 2-4 часами может быть связано либо с утилизацией этих соединений дрожжами, либо с испарением летучих компонентов (например, ацетона). Таким образом, для проведения целевой реакции конденсации оптимально использовать культуральную жидкость, отобранную на 4-й час культивирования, когда содержание потенциально мешающих кетоновых тел минимально.

Поскольку предположительно реакция конденсации салицилового альдегида и пирона опосредована действием экстраклеточных ферментов дрожжей, то скорость прохождения синтеза может быть связана с количеством выделенного в КЖ фермента. Так как в процессе роста дрожжей мы не вносим изменения в условия культивирования, мы можем предположить, что наибольшее содержание необходимого фермента в КЖ будет соответствовать максимальному общему выходу белка.

Экспериментальные данные демонстрируют четкую зависимость накопления белка от условий культивирования. Максимальные концентрации экстраклеточного белка наблюдались при 35°C в присутствии сернокислого аммония, достигая 250 мкг/мл к 4-му часу культивирования. При 31°C пиковая концентрация составляла 160 мкг/мл, тогда как при 39°C не превышала 75 мкг/мл. Во всех случаях отмечалось характерное снижение концентрации белка после 4-го часа, вероятно обусловленное активацией

протеаз, началом автолиза клеток или изменением физико-химических параметров среды.

Полученные результаты подтверждают нашу гипотезу о ферментативной природе катализа и позволяют определить оптимальные условия для проведения реакции конденсации - использование культуральной жидкости, отобранной на 4-й час роста дрожжей при 35°C в присутствии азота, когда содержание потенциально каталитически активных белков максимально.

Исследование динамики рН в культуральной жидкости показало закономерное закисление среды во всех вариантах эксперимента. Уже к первому часу культивирования наблюдалось резкое снижение рН, обусловленное активной экскрецией органических кислот (уксусной, пировиноградной, янтарной) как продуктов метаболизма дрожжей. В последующие часы (1-2 час) кислотность продолжала возрастать, но менее интенсивно, после чего значения рН стабилизировались, колеблясь в незначительных пределах. Важно отметить, что температурный режим и наличие азота в среде не оказывали существенного влияния на характер изменения кислотности - во всех исследуемых вариантах динамика закисления была сходной.

Для подтверждения возможности использования дрожжевых клеток для протекания интересующей нас реакции в мягких условиях водной среды был проведен ряд экспериментов в различных температурных условиях. 200 мг дрожжей помещали в 5 мл PBS, добавляли 300 мг глюкозы, 20 мг $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 126 мг пирона и 120 мкл салицилового альдегида. Суспензию ставили в термостат при постоянном перемешивании. Результаты синтеза оценивали с помощью метода тонкослойной хроматографии. Для этого 50 $\mu\text{л}$ суспензии разбавляли в 2 раза дистиллированной водой. К полученной смеси добавляли 50 $\mu\text{л}$ этилацетата. Смесь интенсивно встряхивали, затем центрифугировали для разделения слоев, 0,5-1 мкл верхнего органического слоя подвергали разделению на пластинках Silufol в системе растворителей

(гексан : этилацетат : ацетон = 3 : 1 : 1). Проявление проводили, поместив пластинку в пары I₂.

Объединенную органическую фракцию обрабатывали дистиллированной водой, высушивали на воздухе. Целевой продукт получали перекристаллизацией из пересыщенного раствора в этиловом спирте. Кристаллический продукт промывали спиртом с использованием фильтра Шотта и высушивали не менее 7 дней после визуального высыхания спирта. По массе полученного продукта (если на ТСХ пятно одно) оценивали выход. Для этого рассчитывали молярный выход продукта по количеству субстратов, рассчитывали массу теоретического (100%) выхода продукта. Затем рассчитывали реальный выход, основываясь на полученной массе продукта. Все полученные данные заносили в таблицу 1.

Экспериментальные исследования подтвердили возможность эффективного проведения реакции конденсации салицилового альдегида и 4-гидрокси-6-метил-2-пирона с использованием дрожжевых клеток и их культуральной жидкости. Наибольший выход целевого продукта (90±3%) был достигнут при 39°C за 10 часов, тогда как при 35°C процесс протекал быстрее (8 часов), но с несколько меньшим выходом (81±4%).

Так как ранее было выяснено, что максимальный выход белка наблюдается на 4 час культивирования дрожжей при 35°C в образцах с добавлением сернокислого аммония. При данных условиях была выращена культура *Saccharomyces cerevisiae* и подготовлены образцы культуральной жидкости – диализованная и без проведения диализа. Был подобран объем образцов с нормированным содержанием белка. Так как при заданных условиях на 4 час роста дрожжей выход наблюдался выход белка равный 250 мкг/мл, для проведения реакции конденсации было отобрано 20 мл диализованной КЖ и 18 мл КЖ без проведения диализа. К образцам добавляли 126 мг пирона и 120 мл салицилового альдегида. Ставили в термостат при 35°C с постоянным перемешиванием. Определяли время протекания реакции конденсации и выход продукта.

Таблица 1 – Результаты синтеза при различных условиях

Условия среды	Температура роста, °С	Время синтеза, ч	Выход, %
PBS + глюкоза + сульфат аммония + дрожжи	31±1	10	83±2
	35±1	8	81±4
	39±1	10	90±3
КЖ после роста дрожжей (4 часа)	35±1	24	80±2
Диализованная КЖ после роста дрожжей (4 часа)	35±1	6	88±3
Казеин + PBS pH 7,0	35±1	6	83±2
Казеин + PBS pH 3,5	35±1	24	79±3
БСА + PBS pH 7,0	35±1	6	84±2
БСА + PBS pH 3,5	35±1	24	75±3
PBS pH 7,0	35±1	24	94±2
PBS + глюкоза pH 7,0	35±1	48	89±3

Использование диализованной культуральной жидкости при 35°C позволило сократить время реакции до 6 часов с выходом 88±3%, что в 4 раза

быстрее по сравнению с недиализованным образцом (24 часа, $80\pm 2\%$). Это свидетельствует о важности удаления низкомолекулярных метаболитов, которые могут выступать в качестве конкурентных субстратов или ингибиторов. Контрольные опыты с неферментными белками (казеин, БСА) показали сходные результаты в нейтральной среде (6 часов, 83-84% выхода), подтверждая предположение о преимущественно неспецифическом механизме катализа.

Кислотность среды оказала существенное влияние на скорость процесса: при pH 3.5 время реакции увеличивалось до 24 часов независимо от природы катализатора, тогда как в нейтральных условиях (pH 7.0) наблюдалось ускорение в 4 раза.

Чтобы проверить, действительно ли в катализе данной реакции участвуют белки или их фрагменты, мы провели синтез в чистом PBS и в PBS с добавлением глюкозы. В обоих образцах к 5 мл PBS мы добавляли 126 мг пирона и 120 мг салицилового альдегида, в один из образцов также добавляли 300 мг глюкозы. Ставили в термостат при 35°C с постоянным перемешиванием. Оценивали время полного протекания реакции конденсации с использованием данных растворов.

Фоновый синтез в PBS протекал значительно медленнее (24 часа), а добавление глюкозы дополнительно замедляло процесс до 48 часов, что подтверждает ее роль как конкурентного субстрата.

Во всех случаях полученный продукт имел температуру плавления $150\text{-}152^{\circ}\text{C}$, соответствующую эталонным значениям.

Заключение. Исследование показало, что дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* могут выступать в роли биокатализатора реакции Кневенагеля на примере конденсации салицилового альдегида и 4-гидрокси-6-метил-2-пирона. Оптимальные условия для максимального выхода белка (249,6 мкг/мл) достигались при 35°C на 4-й час культивирования в среде с сульфатом аммония, при этом наблюдался низкий уровень кетоновых тел (33,1 мкг/мл). Глюкоза утилизировалась дрожжами почти полностью уже в

первый час (более 98%), что исключает ее влияние как конкурирующего субстрата.

Эксперименты подтвердили возможность реакции без участия дрожжевых клеток, с наибольшей эффективностью при использовании диализованной культуральной жидкости. Однако выяснилось, что даже белки, не обладающие ферментативной активностью (БСА и казеин), катализируют реакцию с аналогичной скоростью, что указывает на неспецифический механизм. Вероятно, процесс ускоряется за счет взаимодействия субстратов с функциональными группами белков, а не благодаря специализированным ферментам.

Таким образом, биотехнологический подход не оправдал себя как перспективный в отношении данной реакции, поскольку ни один из параметров (скорость реакции, простота проведения, доступность реагентов) несравнимы со стандартной методикой.

Выводы. 1. Максимальный выход белка наблюдался в процессе культивирования дрожжей при 35°C в среде с добавлением сульфата аммония на четвертый час культивирования и был равен 249,6 мкг/мл. Количество кетоновых тел при данных условиях составило 33,1 мкг/мл.

2. Выявлено, что убыль глюкозы за первый час составляла более 98% при всех рассматриваемых условиях.

3. Не обнаружено значимых различий в закислении среды дрожжами при всех рассматриваемых условиях.

4. Реакция конденсации протекала во всех рассматриваемых условиях с высоким выходом, однако наиболее быстро она проходила в условиях нейтральной среды в присутствии белков.

Список использованных источников

1 Lee, J. H. Synthesis of Hantsch 1,4-dihydropyridines by fermenting baker's yeast / J. H. Lee // Tetrahedron Letters. – 2005. – V. 46, N. 43. – P. 7329-7330.

2 Kumar, A. An efficient bakers' yeast catalyzed synthesis of 3,4-dihydropyrimidin-2-(1H)-ones / A. Kumar, R. A. Maurya // *Tetrahedron Letters*. – 2007. – V. 48, N. 22. – P. 4569–4571.

3 Saha, M. Fermented baker's yeast: an efficient catalyst for the synthesis of pyran derivatives in water at room temperature / M. Saha, A. K. Pal // *Synthetic Communications*. – 2013. – V. 43, N. 12. – P. 1708-1713.

4 Koszelewski, D. Enzyme promiscuity as a remedy for the common problems with Knoevenagel condensation / D. Koszelewski, R. Ostaszewski // *Chemistry–a European journal*. - 2019. - V. 25, N. 43. - P. 10156-10164.

5 Жуковская, С.В. Изучение кривой роста хлебопекарных дрожжей в зависимости от параметров технологического процесса / С.В. Жуковская // *Современная наука: актуальные проблемы и пути их решения*. — 2015. - Т. 7, № 20. - С. 96-100.

