Бєлих І.А., Маренич К.П., Яремінець Н.С.,
Самойленко С.І., Ларінцева Н.В.

Національний технічний університет
«Харківський політехнічний інститут», м. Харків, Україна

ВПЛИВ БУРШТИНОВОЇ КИСЛОТИ НА БІОТЕХНОЛОГІЧНИЙ ПРОЦЕС КУЛЬТИВУВАННЯ ДРІЖДЖІВ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Культивування клітин в великій кількості є основою більшості біотехнологічних процесів. Дріжджові клітини *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) знайшли своє місце в сучасних біотехнологічних напрямах таких, як синтез біологічно активних речовин. За допомогою дріжджового синтезу одержують такі речовини, як каротиноїди, ферменти, коферменти, полісахариди, органічні кислоти, вітаміни та ін. Дріжджі використовуються як векторні системи при розробці біотехнологічних процесів виробництва білків, інсуліну, інтерферону [1 – 3].

Тому одержання високоякісних культур, які будуть мати високу проліферативну активність та резистентність, має велике значення для сучасної біотехнології. Так, активація проліферації клітин дріжджів може привести до збільшення виходу біомаси, вторинних метаболітів, які представляють інтерес для людини [1 – 3].

Метою даної роботи **є** вивчення особливостей проліферативної активності культури дріжджів *S. cerevisiae* під дією бурштинової кислоти.

Для вирішення даної мети були поставлені наступні ***задачі*:**

- провести експериментальне культивування культури дріжджів *S. cerevisiae;*
- дослідити вплив бурштинової кислоти на проліферативну активність клітин;
- провести порівняльний аналіз впливу різних концентрацій бурштинової кислоти на ріст культури дріжджів *S. cerevisiae.*

Матеріали та методи дослідження.

Об'єктом дослідження були дріжджі *S. cerevisie*, виробництва ПРаТ «Компанія Ензим», торгова марка «Львівські дріжджі», «Дріжджі швидкодіючі» 006 5 24.02.17.

Як екзогенну речовину використовували комерційний препарат бурштинової кислот, виробник Еліт-фарм Україна [3].

Created by FolderMill | www.foldermill.com

Як живильне середовище використовували 20 % розчин сахарози.

Дріжджі вирощували у лабораторних біореакторах місткістю 1 $дм^3$ фірми «BIOSTAT® A plus», при температурі 28 ^oC, протягом 180 хвилин. Відбір проб для аналізу проводили кожні 30 хвилин. Витрата повітря на аерацію становила 0,2 – 0,5 $дм^3$/ хв., частота обертання мішалки – 20 об./хв.

Підрахунок дріжджів у культуральній рідині проводили за допомогою камери Горяєва [1].

Початкова концентрація клітин становила $5 \cdot 10^6$ КУО/мл.

Зміну кінетики росту клітин дріжджів досліджували оптичними методами за допомогою фотоелектроколориметра КФК-2 [4].

Результати та їх обговорення.

Для проведення експерименту з використанням бурштинової кислоти готували наступні групи клітинних культур:

1-й флакон – контроль;

2-й флакон – додавання кислоти з концентрацією 0,001 мг/мл;

3-й флакон – додавання кислоти з концентрацією 0,0015 мг/мл;

4-й флакон – додавання кислоти з концентрацією 0,002 мг/мл;

5-й флакон – додавання кислоти з концентрацією 0,0025 мг/мл;

6-й флакон – додавання кислоти з концентрацією 0,003 мг/мл.

Проліферативну активність культури клітин дріжджів досліджували за зміною коефіцієнту пропускання світла в часі з подальшим перерахунком в оптичну густину для більш наглядної інтерпретації результатів.

Досліджування культивування клітин дріжджів проводилось з додаванням бурштинової кислоти різної концентрації (0,001мг/мл; 0,0015мг/мл; 0,002 мг/мл; 0,0025 мг/мл; 0,003 мг/мл). Під час експерименту були отримані дані коефіцієнту пропускання світла в залежності від тривалості культивування та додавання бурштинової кислоти різної концентрації, що представлені в таблиці 1.

Таблиця 1

Залежність коефіцієнта пропускання світла через культуральне середовище від різної концентрації бурштинової кислоти

Коефіцієнт пропускання світла, %								
Концентрація бурштинової кислоти, мг/мл	0,0000	14,0	14,0	14,0	10,0	14,0	15,0	20,0
	0,0010	13,0	11,8	11,0	10,0	13,0	18,0	19,0
	0,0015	14,0	13,0	11,8	8,0	8,0	17,0	20,0
	0,0020	14,0	11,6	10,0	13,0	14,2	15,0	19,0

Created by FolderMill | www.foldermill.com

	0,0025	13,0	11,6	8,0	11,0	14,0	16,0	18,0
	0,0030	14,0	15,0	17,0	19,0	22,0	22,0	22,0
Час, хв		0	30	60	90	120	150	180

Для вивчення активності проліферації клітин дріжджів була розрахована оптична густина культурального середовища, що показувала зміну кількості клітин у розчині в часі. Для підрахунку використовувалась наступна формула:

$$D = \lg \frac{1}{T},$$

де Т – коефіцієнт пропускання світла, % [4].

Отримані дані представлені в таблиці 2.

Таблиця 2

Залежність оптичної густини культурального середовища від концентрації бурштинової кислоти

Оптична густина, ум.од.								
Концентрація бурштинової кислоти, мг/мл	0,0000	0,854	0,854	0,854	1,000	0,854	0,754	0,699
	0,0010	0,886	0,928	0,959	1,000	0,886	0,744	0,721
	0,0015	0,854	0,886	1,097	1,097	0,92	0,769	0,699
	0,0020	0,854	0,911	1,000	0,886	0,866	0,769	0,720
	0,0025	0,886	0,923	1,097	0,886	0,854	0,796	0,744
	0,0030	0,854	0,823	0,769	0,723	0,623	0,623	0,623
Час, хв		0	30	60	90	120	150	180

На рис. 1 представлені кінетичні криві росту дріжджів *S. cerevisiae* на середовищі з 20 % вмістом сахарози та додаванні бурштинової кислоти різних концентрацій. Температура культивування 28 °С, тривалість 180 хв.

Created by FolderMill | www.foldermill.com

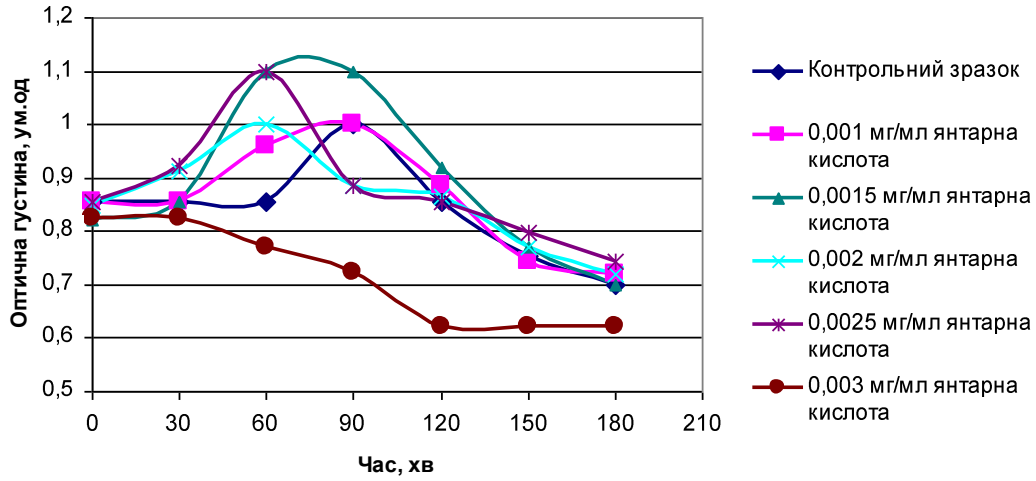

Рисунок 1 – Кінетичні криві росту періодичної культури дріжджів *S. cerevisiae* при додаванні бурштинової кислоти

Майже всі криві росту окрім шостого зразка, мають S-подібну форму, з добре вираженими лаг-фазою, експоненціальною фазою та фазою відмирання [1, 2].

У контрольному зразку активація проліферації розпочалась на 60 хв., пік активного поділу клітин був на 90 хв., після чого розпочалося відмирання клітин. Порівняно зі зразками, в які додавалась бурштинова кислота, проліферативна активність клітин дріжджів у контролі була найменш вираженою. Це можна пояснити недостатнім числом поживних речовин в середовищі. Кінетична крива росту клітин дріжджів у другому зразку має S-подібну форму, що складається з лаг-фази, фази експоненціального росту та відмирання. На відміну від контрольного зразка поділ клітин розпочався вже на 30 хв. культивування, відмирання клітин розпочалося вже після 90 хв. Таким чином, додавання бурштинової кислоти навіть в незначній кількості (0,001 мг/мл) активує майже вдвічі процес поділу клітин дріжджів. При додаванні 0,0015 мг/мл бурштинової кислоти до зразку № 3 активація проліферативної активності відбулася на 30 хв. і продовжилася до 90 хв. Саме в цьому зразку була найбільша оптична густина, це означає, що бурштинова кислота концентрації 0,0015 мг/мл має найбільший вплив на поділ клітин, як видно з графіку. Третій зразок має S-подібну криву, що складається з лаг-фази, експоненціальної фази, стаціонарної та фази відмирання. Активація проліферації клітин дріжджів також відбулась у четвертому зразку при додаванні 0,002 мг/мл бурштинової кислоти. Але на відміну від попереднього зразку активність поділу клітин була нижчою. Крива росту не має лаг-фази, а складається лише з експоненціальної фази та фази відмирання. У кривій росту п'ятого зразка також відсутня лаг-фаза, при додаванні 0,0025 мг/мл бурштинової кислоту одразу розпочався поділ клітин. В цьому зразку також найбільша густина, але на відміну від третього зразку

Created by FolderMill | www.foldermill.com

одразу після досягнення максимального поділу клітин розпочалося відмирання клітин, але воно не було різким, а мало більш плавний процес. Додавання 0,003 мг/мл бурштинової кислоти до шостого зразку привело до інгібування культури клітин дріжджів. На початку культивування ніяких процесів не відбувалось, але вже на 60 хв. культивування розпочався процес відмирання клітин, який тривав до закінчення процесу культивування клітин дріжджів [5].

Активацію проліферації клітин дріжджів можна пояснити тим, що бурштинова кислота є інтермедіатом циклу трикарбонових кислот, вона має вплив на швидкий ресинтез АТФ, що робить її стимулятором вироблення енергії. Бурштинова кислота також сприяє підвищенню активності ферменту фосфофруктокінази, цей фермент прискорює зброджування мальтози [3, 5].

Пригнічення росту клітин можна пояснити тим, що поживних речовин у вигляді сахарів не достатньо для великої концентрації бурштинової кислоти, через те, що в її присутності відбувається швидке розщеплення сахарів через деякий час клітинам немає чим живитись, тому і відбувається процес інгібування [3, 5].

Таким чином, біологічно активні речовини мають концентрації, які позитивно впливають на клітини, та критичні межі, додавання яких призводить до протилежних процесів – інгібування росту та розвитку клітин, що в кінці приводить до їх відмирання.

Висновок.

Бурштинова кислота в певній кількості є активатором проліферації клітин дріжджів *S. cerevisiae.* Але для того, щоб отримати бажаний результат необхідно використовувати відповідну концентрацію кислоти. Активація поділу клітин відбувається лише при концентраціях 0,001 мг/мл – 0,0025 мг/мл. Найбільш оптимальною концентрацією бурштинової кислоти для активації поділу клітин дріжджів (при температурі культивування 28 $^{\circ}$ С, поживне середовище з 20 % вмістом сахарози) стала 0,0015 мг/мл.

Список літератури:

1. Меледина Т.В. Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*. Морфология, химический состав, метаболизм: Учеб. пособие. / Т.В. Меледина, С.Г. Давыденко – СПб. : Университет ИТМО, 2015. – 88 с.

2. Меледина Т.В., Физиологическое состояние дрожжей: Учеб. пособие. / Меледина Т.В., Давыденко С.Г., Васильева Л.М. – СПб. : НИУ ИТМО; ИХиБТ, 2013. – 48 с.

3. Калимуллина Э.Т. Особенности роста культуры *Saccharomyces cerevisiae* в присутствии экзогенных ауторегуляторов клеточной плотности популяции. / Э.Т. Калимуллина, А.Б. Маргулис, А.И. Колпаков,

Created by FolderMill | www.foldermill.com

Ф.Г. Куприянова-Ашина – Казань : Учебные записки Казанского университета, 2015. – 12 с.

4. Булатов М.И. Практическое руководство по фотометрическим методам анализа: изд 5-е, перераб. / Булатов М.И., Калинкин И.П. – Л. : «Химия», 1986. – С. 9. – 432 с.

5. Маренич К.П. Дослідження проліферативної активності *Saccharomyces cerevisiae* під дією активаторів та інгібіторів / К.П. Маренич, І.А. Бєлих // В кн.: XI Міжнародна науково-практична конференція магістрантів та аспірантів (18–21 квітня 2017 року): матеріали конференції: у 3-х ч. – Ч. 2 / за ред. проф. Є.І. Сокола. – Харків : НТУ «ХПІ», 2017. – С. 179.

Created by FolderMill | www.foldermill.com

Бєлих І.А., Маренич К.П., Яремінець Н.С.,
Самойленко С.І., Ларінцева Н.В.

Національний технічний університет
«Харківський політехнічний інститут», м. Харків, Україна

ВПЛИВ БУРШТИНОВОЇ КИСЛОТИ НА БІОТЕХНОЛОГІЧНИЙ ПРОЦЕС КУЛЬТИВУВАННЯ ДРІЖДЖІВ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Культивування клітин в великій кількості є основою більшості біотехнологічних процесів. Дріжджові клітини *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) знайшли своє місце в сучасних біотехнологічних напрямах таких, як синтез біологічно активних речовин. За допомогою дріжджового синтезу одержують такі речовини, як каротиноїди, ферменти, коферменти, полісахариди, органічні кислоти, вітаміни та ін. Дріжджі використовуються як векторні системи при розробці біотехнологічних процесів виробництва білків, інсуліну, інтерферону [1 – 3].

Тому одержання високоякісних культур, які будуть мати високу проліферативну активність та резистентність, має велике значення для сучасної біотехнології. Так, активація проліферації клітин дріжджів може привести до збільшення виходу біомаси, вторинних метаболітів, які представляють інтерес для людини [1 – 3].

Метою даної роботи **є** вивчення особливостей проліферативної активності культури дріжджів *S. cerevisiae* під дією бурштинової кислоти.

Для вирішення даної мети були поставлені наступні ***задачі*:**

- провести експериментальне культивування культури дріжджів *S. cerevisiae;*
- дослідити вплив бурштинової кислоти на проліферативну активність клітин;
- провести порівняльний аналіз впливу різних концентрацій бурштинової кислоти на ріст культури дріжджів *S. cerevisiae.*

Матеріали та методи дослідження.

Об'єктом дослідження були дріжджі *S. cerevisie*, виробництва ПРаТ «Компанія Ензим», торгова марка «Львівські дріжджі», «Дріжджі швидкодіючі» 006 5 24.02.17.

Як екзогенну речовину використовували комерційний препарат бурштинової кислот, виробник Еліт-фарм Україна [3].

Created by FolderMill | www.foldermill.com

Як живильне середовище використовували 20 % розчин сахарози.

Дріжджі вирощували у лабораторних біореакторах місткістю 1 $дм^3$ фірми «BIOSTAT® A plus», при температурі 28 ^oC, протягом 180 хвилин. Відбір проб для аналізу проводили кожні 30 хвилин. Витрата повітря на аерацію становила 0,2 – 0,5 $дм^3$/ хв., частота обертання мішалки – 20 об./хв.

Підрахунок дріжджів у культуральній рідині проводили за допомогою камери Горяєва [1].

Початкова концентрація клітин становила $5 \cdot 10^6$ КУО/мл.

Зміну кінетики росту клітин дріжджів досліджували оптичними методами за допомогою фотоелектроколориметра КФК-2 [4].

Результати та їх обговорення.

Для проведення експерименту з використанням бурштинової кислоти готували наступні групи клітинних культур:

1-й флакон – контроль;

2-й флакон – додавання кислоти з концентрацією 0,001 мг/мл;

3-й флакон – додавання кислоти з концентрацією 0,0015 мг/мл;

4-й флакон – додавання кислоти з концентрацією 0,002 мг/мл;

5-й флакон – додавання кислоти з концентрацією 0,0025 мг/мл;

6-й флакон – додавання кислоти з концентрацією 0,003 мг/мл.

Проліферативну активність культури клітин дріжджів досліджували за зміною коефіцієнту пропускання світла в часі з подальшим перерахунком в оптичну густину для більш наглядної інтерпретації результатів.

Досліджування культивування клітин дріжджів проводилось з додаванням бурштинової кислоти різної концентрації (0,001мг/мл; 0,0015мг/мл; 0,002 мг/мл; 0,0025 мг/мл; 0,003 мг/мл). Під час експерименту були отримані дані коефіцієнту пропускання світла в залежності від тривалості культивування та додавання бурштинової кислоти різної концентрації, що представлені в таблиці 1.

Таблиця 1

Залежність коефіцієнта пропускання світла через культуральне середовище від різної концентрації бурштинової кислоти

Коефіцієнт пропускання світла, %								
Концентрація бурштинової кислоти, мг/мл	0,0000	14,0	14,0	14,0	10,0	14,0	15,0	20,0
	0,0010	13,0	11,8	11,0	10,0	13,0	18,0	19,0
	0,0015	14,0	13,0	11,8	8,0	8,0	17,0	20,0
	0,0020	14,0	11,6	10,0	13,0	14,2	15,0	19,0

Created by FolderMill | www.foldermill.com

	0,0025	13,0	11,6	8,0	11,0	14,0	16,0	18,0
	0,0030	14,0	15,0	17,0	19,0	22,0	22,0	22,0
Час, хв		0	30	60	90	120	150	180

Для вивчення активності проліферації клітин дріжджів була розрахована оптична густина культурального середовища, що показувала зміну кількості клітин у розчині в часі. Для підрахунку використовувалась наступна формула:

$$D = \lg \frac{1}{T},$$

де Т – коефіцієнт пропускання світла, % [4].

Отримані дані представлені в таблиці 2.

Таблиця 2

Залежність оптичної густини культурального середовища від концентрації бурштинової кислоти

Оптична густина, ум.од.								
Концентрація бурштинової кислоти, мг/мл	0,0000	0,854	0,854	0,854	1,000	0,854	0,754	0,699
	0,0010	0,886	0,928	0,959	1,000	0,886	0,744	0,721
	0,0015	0,854	0,886	1,097	1,097	0,92	0,769	0,699
	0,0020	0,854	0,911	1,000	0,886	0,866	0,769	0,720
	0,0025	0,886	0,923	1,097	0,886	0,854	0,796	0,744
	0,0030	0,854	0,823	0,769	0,723	0,623	0,623	0,623
Час, хв		0	30	60	90	120	150	180

На рис. 1 представлені кінетичні криві росту дріжджів *S. cerevisiae* на середовищі з 20 % вмістом сахарози та додаванні бурштинової кислоти різних концентрацій. Температура культивування 28 °С, тривалість 180 хв.

Created by FolderMill | www.foldermill.com

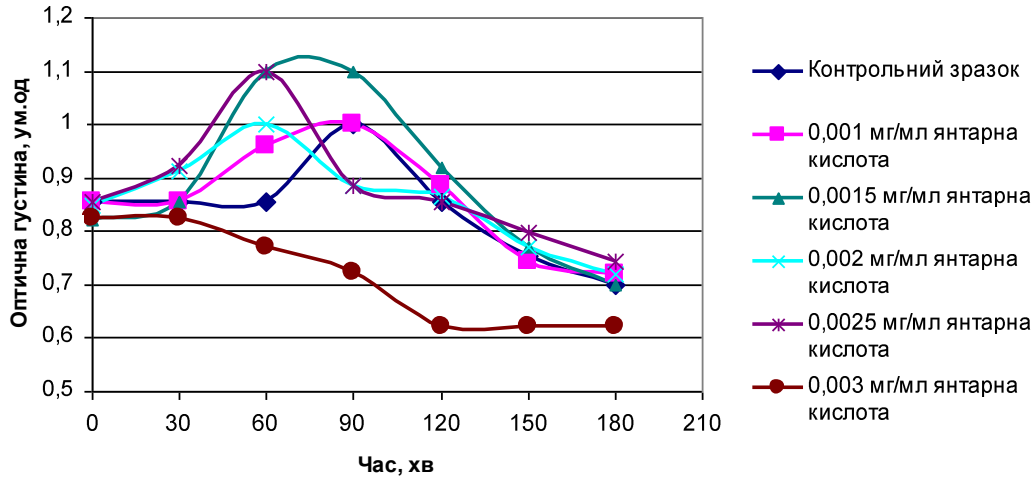

Рисунок 1 – Кінетичні криві росту періодичної культури дріжджів *S. cerevisiae* при додаванні бурштинової кислоти

Майже всі криві росту окрім шостого зразка, мають S-подібну форму, з добре вираженими лаг-фазою, експоненціальною фазою та фазою відмирання [1, 2].

У контрольному зразку активація проліферації розпочалась на 60 хв., пік активного поділу клітин був на 90 хв., після чого розпочалося відмирання клітин. Порівняно зі зразками, в які додавалась бурштинова кислота, проліферативна активність клітин дріжджів у контролі була найменш вираженою. Це можна пояснити недостатнім числом поживних речовин в середовищі. Кінетична крива росту клітин дріжджів у другому зразку має S-подібну форму, що складається з лаг-фази, фази експоненціального росту та відмирання. На відміну від контрольного зразка поділ клітин розпочався вже на 30 хв. культивування, відмирання клітин розпочалося вже після 90 хв. Таким чином, додавання бурштинової кислоти навіть в незначній кількості (0,001 мг/мл) активує майже вдвічі процес поділу клітин дріжджів. При додаванні 0,0015 мг/мл бурштинової кислоти до зразку № 3 активація проліферативної активності відбулася на 30 хв. і продовжилася до 90 хв. Саме в цьому зразку була найбільша оптична густина, це означає, що бурштинова кислота концентрації 0,0015 мг/мл має найбільший вплив на поділ клітин, як видно з графіку. Третій зразок має S-подібну криву, що складається з лаг-фази, експоненціальної фази, стаціонарної та фази відмирання. Активація проліферації клітин дріжджів також відбулась у четвертому зразку при додаванні 0,002 мг/мл бурштинової кислоти. Але на відміну від попереднього зразку активність поділу клітин була нижчою. Крива росту не має лаг-фази, а складається лише з експоненціальної фази та фази відмирання. У кривій росту п'ятого зразка також відсутня лаг-фаза, при додаванні 0,0025 мг/мл бурштинової кислоту одразу розпочався поділ клітин. В цьому зразку також найбільша густина, але на відміну від третього зразку

Created by FolderMill | www.foldermill.com

одразу після досягнення максимального поділу клітин розпочалося відмирання клітин, але воно не було різким, а мало більш плавний процес. Додавання 0,003 мг/мл бурштинової кислоти до шостого зразку привело до інгібування культури клітин дріжджів. На початку культивування ніяких процесів не відбувалось, але вже на 60 хв. культивування розпочався процес відмирання клітин, який тривав до закінчення процесу культивування клітин дріжджів [5].

Активацію проліферації клітин дріжджів можна пояснити тим, що бурштинова кислота є інтермедіатом циклу трикарбонових кислот, вона має вплив на швидкий ресинтез АТФ, що робить її стимулятором вироблення енергії. Бурштинова кислота також сприяє підвищенню активності ферменту фосфофруктокінази, цей фермент прискорює зброджування мальтози [3, 5].

Пригнічення росту клітин можна пояснити тим, що поживних речовин у вигляді сахарів не достатньо для великої концентрації бурштинової кислоти, через те, що в її присутності відбувається швидке розщеплення сахарів через деякий час клітинам немає чим живитись, тому і відбувається процес інгібування [3, 5].

Таким чином, біологічно активні речовини мають концентрації, які позитивно впливають на клітини, та критичні межі, додавання яких призводить до протилежних процесів – інгібування росту та розвитку клітин, що в кінці приводить до їх відмирання.

Висновок.

Бурштинова кислота в певній кількості є активатором проліферації клітин дріжджів *S. cerevisiae.* Але для того, щоб отримати бажаний результат необхідно використовувати відповідну концентрацію кислоти. Активація поділу клітин відбувається лише при концентраціях 0,001 мг/мл – 0,0025 мг/мл. Найбільш оптимальною концентрацією бурштинової кислоти для активації поділу клітин дріжджів (при температурі культивування 28 $^{\circ}$ С, поживне середовище з 20 % вмістом сахарози) стала 0,0015 мг/мл.

Список літератури:

1. Меледина Т.В. Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*. Морфология, химический состав, метаболизм: Учеб. пособие. / Т.В. Меледина, С.Г. Давыденко – СПб. : Университет ИТМО, 2015. – 88 с.

2. Меледина Т.В., Физиологическое состояние дрожжей: Учеб. пособие. / Меледина Т.В., Давыденко С.Г., Васильева Л.М. – СПб. : НИУ ИТМО; ИХиБТ, 2013. – 48 с.

3. Калимуллина Э.Т. Особенности роста культуры *Saccharomyces cerevisiae* в присутствии экзогенных ауторегуляторов клеточной плотности популяции. / Э.Т. Калимуллина, А.Б. Маргулис, А.И. Колпаков,

Created by FolderMill | www.foldermill.com

Ф.Г. Куприянова-Ашина – Казань : Учебные записки Казанского университета, 2015. – 12 с.

4. Булатов М.И. Практическое руководство по фотометрическим методам анализа: изд 5-е, перераб. / Булатов М.И., Калинкин И.П. – Л. : «Химия», 1986. – С. 9. – 432 с.

5. Маренич К.П. Дослідження проліферативної активності *Saccharomyces cerevisiae* під дією активаторів та інгібіторів / К.П. Маренич, І.А. Бєлих // В кн.: XI Міжнародна науково-практична конференція магістрантів та аспірантів (18–21 квітня 2017 року): матеріали конференції: у 3-х ч. – Ч. 2 / за ред. проф. Є.І. Сокола. – Харків : НТУ «ХПІ», 2017. – С. 179.

Created by FolderMill | www.foldermill.com