

СОНОХИМИЧЕСКИЙ ПОДХОД ПОЛУЧЕНИЯ БИОМАССЫ ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* С ВЫСОКИМ СОДЕРЖАНИЕМ ЭРГОСТЕРОЛА

Р.И. Фаткуллин¹, fatkullinri@susu.ru

И.В. Калинина¹, kalininaiv@susu.ru

Н.В. Попова¹, nvporova@susu.ru

Д.С. Степанова², ds-ilenka@mail.ru

¹ Южно-Уральский государственный университет, Челябинск, Россия

² Университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия

Аннотация. Химический синтез витаминов D2, важного нутриента для организма человека, является сложным из-за асимметричного строения молекулы этого витамина. По этой причине колоссальны перспективы развития биотехнологических подходов синтеза эргостерола как предшественника этого витамина, что составляет основу данной работы. В качестве продуцента предложено использование дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Эти микроорганизмы наиболее хорошо изучены, широко применяются в пищевой отрасли, являются безопасными, достаточно легко культивируются. В качестве питательной среды использовали среду YPD, содержащую дрожжевой экстракт, пептон и декстрозу. В рамках исследования изучали возможность использования ультразвукового воздействия как фактора интенсификации процесса биосинтеза эргостерола дрожжевой клеткой. Ультразвук, с одной стороны, рассматривался как фактор, интенсифицирующий содержание растворенного кислорода в питательной среде, с другой стороны – как фактор стрессового воздействия на сами клетки дрожжей. Культивирование и оценку содержания искомого метаболита вели в сравнении с контрольной питательной средой. В совокупности исследований оценивали физиологическое состояние дрожжей на основе микроскопии и содержание эргостерола в биомассе дрожжей на начало и конец культивирования в двух видах питательных сред (YPD и YPD-УЗВ). Полученные результаты показали жизнеспособность предложенного подхода к культивированию дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* с применением ультразвукового воздействия. Установлено, что обработка ультразвуком приводит к накоплению растворенного кислорода, были установлены оптимальные режимы воздействия – мощность 122 Вт и время 2 мин. Прирост содержания эргостерола в биомассе дрожжей, культивируемой в питательной среде после обработки ультразвуком, составил 13,2 мг %, что 1,21 раза больше, чем в биомассе дрожжей, культивируемых в контрольной питательной среде. Вместе с тем понимание механизма ультразвуковой стимуляции синтеза эргостерола дрожжами еще предстоит изучать.

Ключевые слова: биосинтез эргостерола, дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, ультразвуковое воздействие

Благодарности. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (РНФ) в рамках проекта 25-26-00278.

Для цитирования: Сонохимический подход получения биомассы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* с высоким содержанием эргостерола / Р.И. Фаткуллин, И.В. Калинина, Н.В. Попова, Д.С. Степанова // Вестник ЮУрГУ. Серия «Пищевые и биотехнологии». 2025. Т. 13, № 2. С. 44–51. DOI: 10.14529/food250205

Original article
DOI: 10.14529/food250205

SONOCHEMICAL APPROACH TO OBTAIN BIOMASS OF YEAST *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* WITH HIGH ERGOSTEROL CONTENT

R.I. Fatkullin¹, fatkullinri@susu.ru
I.V. Kalinina¹, kalininaiv@susu.ru
N.V. Popova¹, nvpopova@susu.ru
D.S. Stepanova², ds-ilenka@mail.ru

¹ South Ural State University, Chelyabinsk, Russia

² ITMO University, St. Petersburg, Russia

Abstract. Chemical synthesis of vitamin D2, an important nutrient for the human body, is difficult due to the asymmetric structure of the molecule of this vitamin. For this reason, the prospects for the development of biotechnological approaches for the synthesis of ergosterol as a precursor of this vitamin are enormous, which is the basis of this work. The use of yeast *Saccharomyces cerevisiae* was proposed as a producer. These microorganisms are the most well studied, widely used in the food industry, are safe, easy enough to cultivate. YPD medium containing yeast extract, peptone and dextrose was used as nutrient medium. The study investigated the possibility of using ultrasound as a factor of intensification of the process of ergosterol biosynthesis by yeast cell. Ultrasound, on the one hand, was considered as a factor intensifying the dissolved oxygen content in the nutrient medium, on the other hand, as a factor of stress effect on the yeast cells themselves. Cultivation and evaluation of the content of the desired metabolite were carried out in comparison with the control nutrient medium. The physiological state of yeast was evaluated by microscopy and the content of ergosterol in yeast biomass at the beginning and end of cultivation in two types of nutrient media (YPD and YPD-US). The results obtained showed the viability of the proposed approach for culturing *Saccharomyces cerevisiae* yeast using ultrasound treatment. It was found that ultrasound treatment leads to the accumulation of dissolved oxygen, the optimal modes of exposure were established - power 122 W and time 2 min. The increment of ergosterol content in yeast biomass cultured in nutrient medium after ultrasound treatment amounted to 13.2 mg %, which is 1.21 times more than in yeast biomass cultured in control nutrient medium. At the same time, the understanding of the mechanism of ultrasonic stimulation of ergosterol synthesis by yeast remains to be studied.

Keywords: ergosterol biosynthesis, yeast *Saccharomyces cerevisiae*, ultrasound exposure

Acknowledgments. This work was financially supported by a grant from the Russian Science Foundation (RSF) under project 25-26-00278.

For citation: Fatkullin R.I., Kalinina I.V., Popova N.V., Stepanova D.S. Sonochemical approach to obtain biomass of yeast *Saccharomyces Cerevisiae* with high ergosterol content. *Bulletin of the South Ural State University. Ser. Food and Biotechnology*, 2025, vol. 13, no. 2, pp. 44–51. (In Russ.) DOI: 10.14529/food250205

Введение

Эргостерол – самый распространенный природный липидный компонент в мембранах грибов. Эргостерол играет важную биологическую роль в росте клеток, поддержании и регуляции мембран, контроле клеточного цикла. Для организма человека эргостерол важен тем, что является предшественником витамина D2, который играет ключевую роль в регуляции обмена кальция и фосфора, в поддержании здоровья костей [2–4, 7, 9, 11, 15, 18, 19].

Одним из потенциальных источников эргостерола могут выступать микроорганизмы, активно используемые в пищевых производствах. Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* являются наиболее изученными и востребованными в пищевой отрасли микроорганизмами. Многие первичные и вторичные метаболиты клеток дрожжей могут представлять интерес с точки зрения их полезности для организма человека, что делает биомассу дрожжей привлекательным ингредиентом для производства продуктов питания с улучшенной пищевой

ценностью. Дрожжи относительно легко культивировать и концентрировать из-за достаточного большого размера их клеток, а производство их биомассы является экологически чистым, не требуя значительных затрат воды и не выделяя много парниковых газов, особенно при условии аэробного культивирования [12].

В литературе имеются исследования, подтверждающие, что под воздействием ультрафиолетового света в диапазоне длин волн 248–260 нм эргостерол в биомассе дрожжей способен превращается в витамин D₂ [2, 7, 18].

Важно отметить, что интенсивность биосинтеза эргостерола дрожжами *Saccharomyces cerevisiae* во многом зависит от штамма дрожжей, условий культивирования и способов дополнительных воздействий, включая стрессовые факторы. При получении биологически активных веществ с применением биотехнологических подходов в коммерческих целях приоритет направлен на минимизацию затрат культивирования при условии высокой эффективности и устойчивости процесса [3–5].

Известно, что дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* являются факультативно-анаэробными организмами. Они способны реагировать на наличие кислорода во внешней среде, используя как окислительный, так и ферментативный метаболический режим, и могут давать существенный прирост биомассы, даже когда аэробное дыхание ограничено или полностью отсутствует [1, 19].

Вместе с тем метаболическая реакция на наличие кислорода ведет к изменениям внутриклеточных потоков, которые в целом опосредованы транскрипционной, белковой и метаболической регуляцией, а сами внутриклеточные потоки являются интегрированной сетевой реакцией на регулируемые взаимодействия между ферментами и метаболитами [7, 9].

Научные исследования, представленные в литературе, показывают, что кислород является ключевым фактором, определяющим синтез эргостерола в дрожжевой клетке, который включает три ключевых этапа: биосинтез мевалоната, биосинтез фарнезилпирофосфата и биосинтез эргостерола. Известно, что одна из важнейших функций эргостерола в клетке дрожжей – это участие в формировании механических свойств мембраны, обеспечивая за-

щитные свойства от внешних факторов. Поэтому одним из направлений интенсификации процессов биосинтеза эргостерола дрожжами является использование различных видов стрессовых воздействий.

В качестве фактора, формирующего стрессовые условия для дрожжей и потенциально способствующего увеличению содержания растворенного кислорода в питательной среде, в настоящем исследовании использовалось ультразвуковое воздействие частотой (22 ± 2) кГц.

Цель исследования – это оценка возможности использования сонохимической стимуляции синтеза эргостерола дрожжами *Saccharomyces cerevisiae*.

Материалы и методы исследования

Для экспериментальных исследований был взят коммерчески доступный штамм дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* – дрожжи WB-1015.

Для культивирования дрожжей использовалась питательная среда YPD: дрожжевой экстракт (5 г/л), пептон (10 г/л) и декстроза (20 г/л). Стерилизация 30 мин.

Культивирование всех образцов вели в строго аэробных условиях в течение 8 часов в минибиореакторе пробирочного RTS-1 при температуре 33 °С, скорости перемешивания 1000 об/мин и реверсе 10 с. Дрожжи вносили в сухом виде в количестве 1 об. % к объему питательной среды.

На первом этапе исследований был проведен общий скрининг дрожжевых культур с использованием микроскопических методов анализа и приготовления неокрашенного препарата дрожжевой культуры и окрашенных препаратов (раствором Люголя и метиленовым синим).

Для установления влияния ультразвукового воздействия (УЗВ) на количество растворенного кислорода питательную среду обрабатывали в 9 разных режимах сочетания мощности и времени воздействия:

- мощность: 120, 240 и 360 Вт;
- время: 1, 5 и 9 мин.

Содержание кислорода определяли с помощью анализатора растворенного кислорода Leminfu-2. По результатам анализа была проведена процедура оптимизации режимов УЗВ с применением двухфакторного регрессионного анализа.

Дрожжи культивировали в контрольной питательной среде (без использования каких-

либо видов обработки) и в питательной среде после обработки ультразвуком в установленном режиме (обработку вели после внесения дрожжевой культуры). В исходной биомассе дрожжей и полученных при культивировании в среде YPD и YPD-УЗВ определяли содержание эргостерина спектрофотометрически.

Экстракцию стеринов проводили с использованием 70 % раствора этанола. Расчет количественного содержания искомого вещества определяли по оптической плотности в концентрированной серной кислоте при аналитической длине волны спектрофотометра 328 нм. Пересчет проводили на эргостерол. Оптическую плотность измеряли сразу после приготовления раствора.

Все исследования проводились в трехкратной повторности. Статистическую обработку результатов экспериментальных исследований проводили по методу Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

Для эффективного протекания процессов биосинтеза к состоянию дрожжевой культуры предъявляется ряд требований, в том числе контролируется физиологическое состояние клеток дрожжей: количество почкующихся клеток, мертвых клеток, содержание в дрожжах запасных питательных веществ (гликогена и волютина), а также наличие посторонних микроорганизмов [1, 3, 13].

Результаты микроскопии исследуемых образцов дрожжей наглядно отражены на рис. 1.

Оценка жизнеспособности и физиологического состояния исследуемых образцов

дрожжей показала, что культура дрожжей имеет характерный вид клеток овальной формы. В полях зрения просматриваются почкующиеся клетки и клетки с родовыми шрамами. Окраска раствором Люголя показала, что процент зрелых клеток достаточно высок. Микроскопия с окраской метиленовым синим позволила установить достаточно высокое количество мертвых клеток в образце дрожжей – около 16 %. В совокупности же можно отметить, что исследуемый образец дрожжей является приемлемым для культивирования.

На следующем этапе исследований оценивали влияние ультразвуковой обработки питательной среды на количество растворенного кислорода (результаты представлены в таблице).

При проведении оптимизации режимов УЗВ была получена поверхность отклика и установлены оптимальные режимы УЗВ (рис. 2), позволяющие увеличить количество растворенного кислорода в питательной среде в 1,3 раза в сравнении с контролем.

Содержание растворенного кислорода
в питательной среде, мг/л

Время обработки, мин	Мощность воздействия, Вт		
	120	240	360
1	7,9	7,6	5,4
3	7,4	8,7	4,5
5	7,1	4,0	4,2

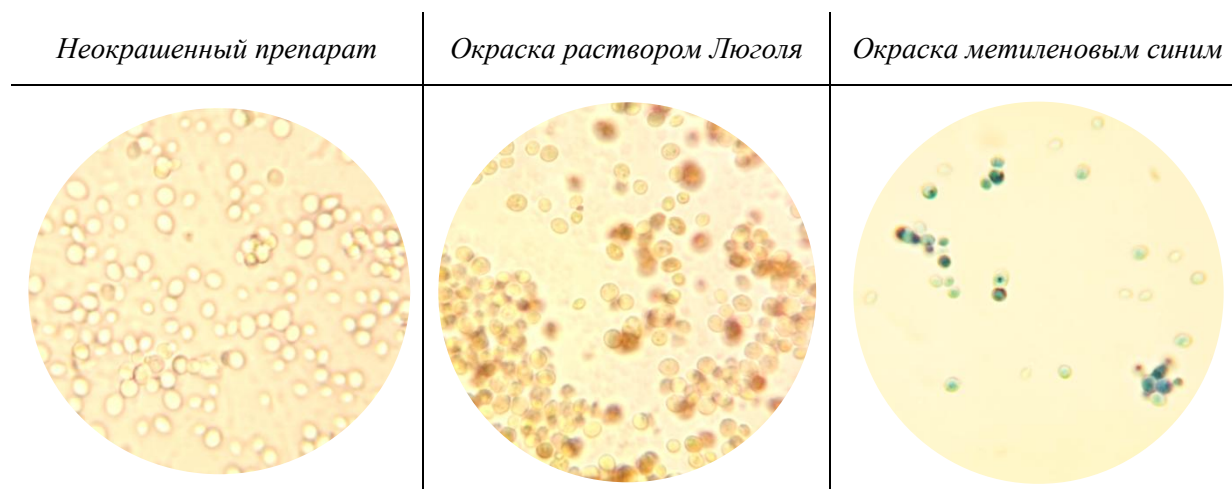
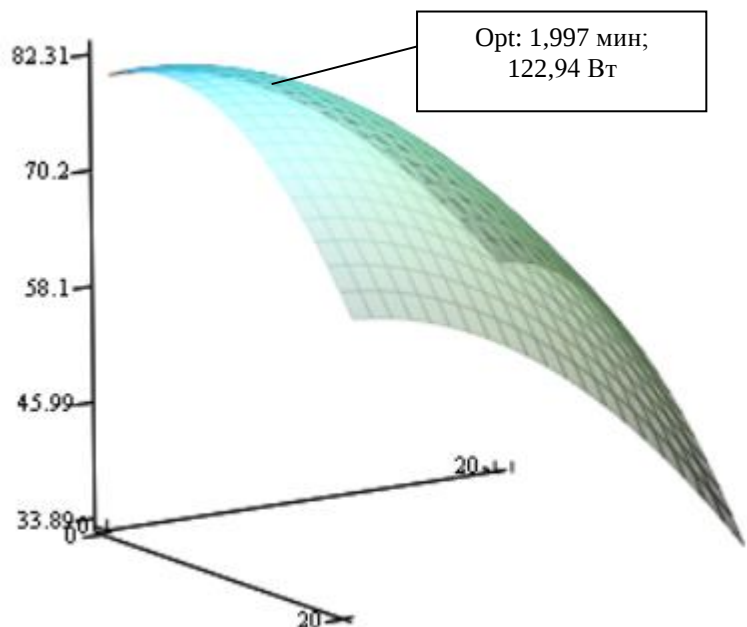


Рис. 1. Результаты микроскопии дрожжей (препарат «раздавленная капля», увеличение $\times 720$)

На основании полученных результатов с применением программного продукта MathCad была получена зависимость количества растворенного кислорода от режимов обработки ультразвуком (рис. 2).

вировании в питательной среде без обработки ультразвуком.

Зависимость распределения метаболических процессов *Saccharomyces cerevisiae* от наличия и концентрации кислорода представ-



$$Y = 2,61X_1^2 + 7,249 \times 10^{-4} X_2^2 + 0,031 X_1 X_2 + 17,571 X_1 + 0,363 X_2 + 14,762$$

Рис. 2. Зависимость количества растворенного кислорода от режимов обработки ультразвуком

Культуры дрожжей в питательной среде YPD были обработаны в течение 2 мин при мощности воздействия 120 Вт, что наиболее близко к оптимальным режимам с учетом технической возможности прибора.

Результаты определения эргостерола в исследуемых образцах дрожжей перед началом культивирования и после культивирования в течение 8 часов в обработанной ультразвуком питательной среде и в необработанной представлены на рис. 3. Установлено, что исследуемые образцы дрожжей в исходном виде содержат эргостерол в количествах, достигающих $(9,4 \pm 0,2)$ мг% в пересчете на сухое вещество.

После культивирования в биомассе дрожжей, подвергнутой УЗ-воздействию, значение содержания эргостерола достигало 10,9 и 13,2 мг%, что в 1,21 выше, чем при культи-

рует большой интерес для многих биотехнологических применений *Saccharomyces cerevisiae* [2, 8, 13, 17].

При аэробном росте кислород служит конечным акцептором электронов при дыхании. Когда доступность кислорода ограничена, клеткам нужны альтернативные акцепторы электронов НАДН и ФАДН₂ для поддержания окислительно-восстановительного баланса. В аэробных условиях ассимиляционный НАДН окисляется в основном внешними НАДН-дегидрогеназами или транспортируется в митохондрии с помощью глицерол-3-фосфатного челнока, тогда как в отсутствие кислорода *Saccharomyces cerevisiae* производит глицерин в качестве окислительно-восстановительного стока [6, 8, 10]. Окислительный стресс, которому подвергаются клетки при высокой концентрации кислорода во

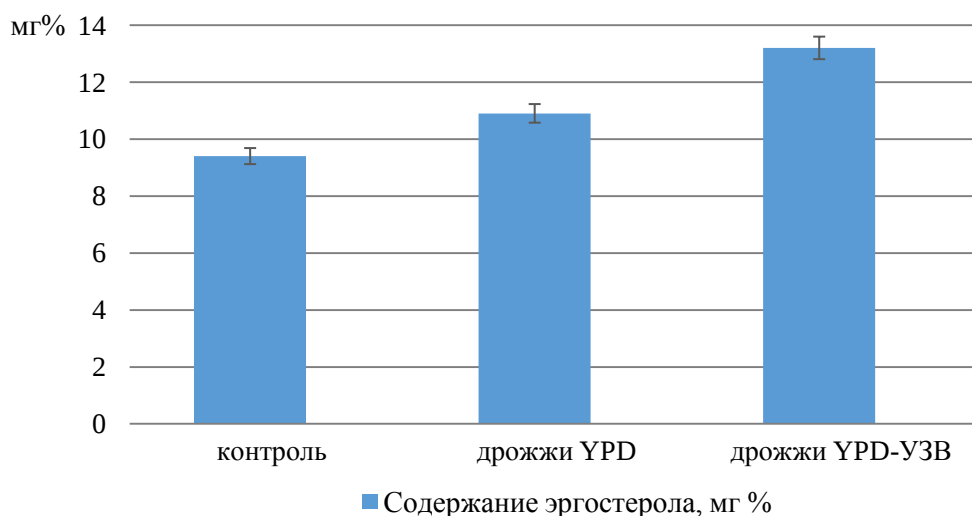


Рис. 3. Содержание эргостерола в биомассе образцов дрожжей
в пересчете на сухое вещество, %

внешней среде, создаёт другие проблемы, связанные с окислительно-восстановительными реакциями. Ключевым для наших исследований является понимание того, что кислород – это важный реагент в биосинтезе стеролов и реакциях анаболической десатурации [14, 16].

Выводы

Таким образом, проведенные исследования показали пригодность использования дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* для полу-

чения эргостерола. Однако этот процесс требует существенной доработки для интенсификации биосинтеза этого метаболита, например, с применением ультразвукового воздействия. В отношении ультразвука следует продолжить исследования для более глубокого понимания возможных механизмов его влияния на накопление эргостерола дрожжевой клеткой. Эти направления и составляют основу будущих исследований.

Список литературы / References

1. Оценка эффективности процесса биосинтеза этанола дрожжами рода *Saccharomyces* / И.В. Калинина, Р.И. Фаткуллин, Н.В. Попова, А.Р. Шарипова // Вестник ЮУрГУ. Серия «Пищевые и биотехнологии». 2018. Т. 6, № 4. С. 74–82. [Kalinina I.V., Fatkullin R.I., Popova N.V., Sharipova A.R. The analysis on efficiency of ethanol biosynthesis by *Saccharomyces* yeast. Bulletin of the South Ural State University. Ser. Food and Biotechnology, 2018, vol. 6, no. 4, pp. 74–82. (In Russ.)] DOI: 10.14529/food180410
2. Blaga A.C., Ciobanu C., Cașcaval D., Galaction A. Enhancement of ergosterol production by *Saccharomyces cerevisiae* in batch and fed-batch fermentation processes using ndodecane as oxygen-vector. *Biochemical Engineering Journal*, 2018, vol. 131, pp. 70–76. DOI: 10.1016/j.bej.2017.12.010
3. Celia Bautista-Crescencio, Arturo Casimiro-Ramos, M. Jonathan Frago-Vázquez et. al. *Streptomyces albidoflavus* Q antifungal metabolites inhibit the ergosterol biosynthesis pathway and yeast growth in fluconazole-resistant *Candida glabrata*: phylogenomic and metabolomic analyses [J]. *Microbiology Spectrum*, 2023, vol. 11, iss. 5. DOI: 10.1128/spectrum.01271-23
4. Franks Kamgang Nzekoue, Yue Sun, Giovanni Caprioli, Sauro Vittori, Gianni Sagratini. Effect of the ultrasound-assisted extraction parameters on the determination of ergosterol and vitamin D2 in *Agaricus bisporus*, *A. bisporus* Portobello, and *Pleurotus ostreatus* mushrooms. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2022, vol. 109, 104476. DOI: 10.1016/j.jfca.2022.104476

5. He X., Guo X., Liu N. et al. Ergosterol production from molasses by genetically modified *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, vol. 75, pp. 55–60. DOI: 10.1007/s00253-006-0807-6
6. Horenkamp F.A., Valverde D.P., Nunnari J., and Reinisch K.M. Molecular basis for sterol transport by StART-like lipid transfer domains. *EMBO J.*, 2018, vol. 37. DOI: 10.15252/embj.201798002
7. Jiang Hongwen, Zhang Yi, Li Na, et al. Optimization of fermentation conditions for ergosterol production by yeast strains [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2009, vol. 25(07):800-803+824.
8. John K., Kubelt J., Muller P., Wustner D., Herrmann A. Rapid transbilayer movement of the fluorescent sterol dehydroergosterol in lipid membranes. *Biophys J.*, 2002, vol. 83, pp. 1525–1534. DOI: 10.1016/s0006-3495(02)73922-2
9. Lees N.D., Skaggs B., Kirsch D.R., Bard M. Cloning of the late genes in the ergosterol biosynthetic pathway of *Saccharomyces cerevisiae* – a review. *Lipids*, 1995, vol. 30, pp. 221–226. DOI: 10.1007/bf02537824
10. Liu G., Chen Y., Faergeman N.J., and Nielsen J. Elimination of the last reactions in ergosterol biosynthesis alters the resistance of *Saccharomyces cerevisiae* to multiple stresses. *FEMS Yeast Res.*, 2017, vol. 17. DOI: 10.1093/femsyr/fox063
11. Liu Qi, Mao Yufeng, Liao Xiaoping, et al. New progress in the study of ergothioneine biosynthesis [J]. *Journal of Biotechnology*, 2022, vol. 38(04), pp. 1408–1420.
12. Ma Binxiang. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* to synthesize key intermediate cholesta-5,7,24-trienol[D]. Zhejiang University of Technology, 2020.
13. Maxfield F.R., Mondal M. Sterol and lipid trafficking in mammalian cells. *Biochem Soc Trans*, 2006, vol. 34, pp. 335–339. DOI: 10.1042/bst0340335
14. Novotny C., Flieger M., Panos J., Karst F. Effect of 5,7-unsaturated sterols on ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 1992, vol. 15, pp. 314–320. DOI: 10.1111/j.1470-8744.1992.tb00211.x
15. Parks L.W., Casey W.M. Physiological implications of sterol biosynthesis in yeast. *Annu. Rev. Microbiol.* 1995, vol. 49, pp. 95–116. DOI: 10.1146/annurev.mi.49.100195.000523
16. Parks L.W., J.H. Crowley, F.W. Leak, S.J. Smith, M.E. Tomeo, Use of sterol mutants as probes for sterol functions in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 1999, vol. 34, pp. 399–404. DOI: 10.1080/10409239991209381
17. Schulz T.A., Prinz W.A. Sterol transport in yeast and the oxysterol binding protein homologue (OSH) family. *Biochim Biophys Acta*, 2007, vol. 1771, pp. 769–780. DOI: 10.1016/j.bbalip.2007.03.003
18. Sun Zhijiao. Metabolic engineering of industrial strains of brewer's yeast to increase ergosterol production [D]. Zhejiang University, 2021.
19. Wei Yunping. Metabolic engineering research on ergosterol synthesis by brewer's yeast [D]. Huazhong University of Science and Technology, 2023.

Информация об авторах

Фаткуллин Ринат Ильгидарович, кандидат технических наук, доцент кафедры «Пищевые и биотехнологии», Южно-Уральский государственный университет, Челябинск, Россия; fatkullinri@susu.ru

Калинина Ирина Валерьевна, доктор технических наук, профессор кафедры «Пищевые и биотехнологии», Южно-Уральский государственный университет, Челябинск, Россия; kalininaiv@susu.ru

Попова Наталия Викторовна, кандидат технических наук, доцент, доцент кафедры «Пищевые и биотехнологии», Южно-Уральский государственный университет, Челябинск, Россия; npopova@susu.ru

Степанова Дарья Сергеевна, аспирант, Университет ИТМО, Санкт-Петербург, Россия; ds-ilenka@mail.ru

Information about the authors

Rinat I. Fatkullin, Candidate of Sciences (Engineering), Associate Professor of the Department of Food Technology and Biotechnology, South Ural State University, Chelyabinsk, Russia; fatkul-linri@susu.ru

Irina V. Kalinina, Doctor of Sciences (Engineering), Associate Professor of the Department of Food Technology and Biotechnology, South Ural State University, Chelyabinsk, Russia; kalininaiv@susu.ru

Natalia V. Popova, Candidate of Technical Sciences, Associate Professor of the Department of Food and Biotechnology, South Ural State University, Chelyabinsk, Russia; nvpopova@susu.ru

Daria S. Stepanova, graduate student, ITMO University, St. Petersburg, Russia; ds-ilenka@mail.ru

Статья поступила в редакцию 20.04.2025

The article was submitted 20.04.2025