

## БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ШТАММА *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* В УСЛОВИЯХ СПИРТОВОГО БРОЖЕНИЯ

© 2010 С.Ц. Котенко, Э.А. Халилова, Э.А. Исламмагомедова

Прикаспийский институт биологических ресурсов ДНЦ РАН, г. Махачкала

Поступила в редакцию 09.04.2010

Представлены результаты положительного влияния многофункциональных компонентов геотермальной воды в среде культивирования на биосинтез этанола с меньшим содержанием примесных соединений, улучшение биологической ценности дрожжей за счет витаминов, минеральных веществ и свободных аминокислот.

Ключевые слова: *геотермальная вода, дрожжи, этанол*

Нами впервые разработана высокоэффективная биотехнология активного синтеза этанола, которая позволила увеличить выход спирта в обрабатываемой среде на 25% [1, 2]. Сущность новой технологии заключается в том, что для интенсификации синтеза этанола используется питательная среда, где источником дополнительного минерального и органического питания служит геотермальная вода нефенольного класса с общей минерализацией 5.4 г/л. Технологический процесс осуществлялся на лабораторной установке глубинным методом в периодическом режиме по 48-часовой технологической схеме на меласной питательной среде с геотермальной водой и по традиционной технологии с содержанием углеводов 18.6 г/100 мл при pH 5.0 и температуре 30°C в анаэробных условиях [1].

Установлено, что при культивировании дрожжей в меласной питательной среде с геотермальной водой, обогащенной минеральными и органическими веществами, клетки содержали несколько пониженное содержание белка (22,5:28,0%, опыт: контроль), что обусловлено, на наш взгляд, значительным ускорением синтеза ферментов, определяющих формирование клеток с большим числом генерации. Известно, что даже небольшое количество неорганического фосфата в клетке обеспечивает на должном уровне распад глюкозы до образования спирта и CO<sub>2</sub>. Количественное содержание фосфора в опытных образцах существенно выше по сравнению с контролем (1,8:1,1 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> %, опыт: контроль). Вероятно, этому способствовало присутствие в геотермальной воде таких минеральных элементов, как калий, обладающий двухсторонней проницаемостью, и цинк, входящий в состав многих металлоферментов и играющий важную роль в фосфорном обмене дрожжей. Редуцирующих сахаров, служащих внутриклеточными запасными веществами в клетке, необходимых для интенсификации спиртового

брожения и ассимиляции углекислоты в среде, в опытном образце несколько выше (0,6:0,53, опыт: контроль). Показано, что интенсификация углеводного обмена и накопление популяции дрожжей наблюдались на всех этапах получения инокулята на питательной среде с использованием геотермальной воды. Установлено, что ресурсы углеводного питания на среде с геотермальной водой были востребованы на 89%, тогда как аналогичный показатель в контроле составлял 75%. Наряду с более полным усвоением углеводов (2,1:4,7 г/100 см<sup>3</sup>, опыт: контроль) обнаружено повышенное образование этанола (9,9: 7,9%, опыт: контроль) [3].

В результате морфологических исследований на 48 ч культивирования обнаружено, что общее количество клеток, однородных как по форме, так и по возрасту, в опытной популяции дрожжей возросло по сравнению с контролем в 1,5 раза. Установлено интенсивное проявление бродильной функции дрожжей на питательной среде с геотермальной водой, обусловленное, на наш взгляд, лучшим физиологическим состоянием клеток и, в том числе, более крупными размерами клеток (на ОПС 85% - 6-7×7-9 мкм, округлые достигают 9×9 мкм; на КПС 70% - 4-5×6-9 мкм, округлые - до 5×5 мкм).

Исследования также показали, что биологически активные компоненты геотермальной воды повышали активность ферментов, участвующих в углеводном обмене дрожжей и процессе образования этанола [5]. Так, фермент β-фруктофуранозиды катализирует реакцию гидролиза сахарозы, являющейся составной частью сахаров мелассы, на глюкозу и фруктозу. Установлено, что опытный вариант имел более высокий уровень активности данного фермента по сравнению со штаммом, выращенным на контрольной питательной среде (32,6:29,3 Е/мг, опыт: контроль). При этом активность альдозазы опытного варианта несколько превышала контрольный показатель (0,35:0,33 Е/мг, опыт: контроль). Известно, что ключевым веществом анаэробного расщепления глюкозы и метаболизма сахаров является пировиноградная кислота, разложение которой на ацетальдегид и CO<sub>2</sub> катализируется ферментом пируватдекарбоксилазой. Именно благодаря ее действию образуется значительная часть углекислого газа, выделяющегося

*Котенко Светлана Цалистиновна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник. E-mail pibrdncran@iwt.ru*

*Халилова Эсланда Абдурахмановна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник*

*Исламмагомедова Эльвира Ахмедовна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник*

при брожении. Полученные нами данные позволяли сказать о более высокой активности фермента в дрожжевой биомассе, выращенной на питательной среде с использованием геотермальной воды (19,4:15,2 Е/мг, опыт: контроль). Заключительный этап брожения катализирует алкогольдегидрогеназа, имеющая особое значение, поскольку этот фермент катализирует окислительно-восстановительные реакции, в результате которых дрожжевая клетка вырабатывает спирт и необходимую для жизнедеятельности энергию. Активность данного фермента в клетках *S. cerevisiae* Y-503 опытного варианта несколько превышала данный показатель в контроле (0,69:0,55 Е/мг, опыт: контроль). Известно, что активность пируватдекарбоксилазы зависит от ее важнейшей составной части-кофермента витамина В<sub>1</sub>, вернее, его пиррофосфатного эфира – тиаминпиррофосфата. На питательной среде с геотермальной водой штамм Y-503 оказался более продуктивным по синтезу тиаминна, рибофлавина и никотиновой кислоты (48:31; 92:49; 271:226 мкг/г, опыт: контроль), в то время как фолиевой кислоты больше образовалось в контрольной биомассе – 198 против 179 мкг/г в опыте. Повышенная концентрация тиаминна, как известно, способствует более высокой активности пируватдекарбоксилазы, что подтверждено экспериментом.

Результаты исследований четко обозначили способность синтезировать витамины в зависимости от состава питательной среды. Известно, что в процессе биосинтеза этанола значительное усиление броидильной активности клеток, цитологическая перестройка, азотный обмен коррелируют с накоплением дрожжами тиаминна. Указанный витамин, на фоне богатой минеральными и органическими веществами подземной воды в составе питательной среды, выступает как один из важных биологически активных факторов спиртового брожения, регулирующий формирование клеточной структуры, влияет на процесс роста. Как показали морфологические исследования, опытные дрожжевые клетки, содержащие этот витамин в большем количестве, чем в контроле, более жизнеспособны и достаточно устойчиво противостоят неблагоприятным условиям, в частности, концентрации спирта в сбрасываемой среде. Значительное увеличение в опытной биомассе концентрации рибофлавина и никотиновой кислоты является фактором, имеющим большое значение в регулировании ферментативной деятельности клетки и интенсификации спиртового брожения. Возможно, органические соединения, входящие в состав геотермальной воды, определяли условия для использования дрожжевой клеткой дополнительных источников азота в легкоусвояемой форме и в синтезе витаминов в качестве предшественников, увеличивая их содержание в клетках [6].

Следует отметить, что содержащиеся в природной воде минеральные вещества в сочетании с аналогичными макро- и микроэлементами мелассы, вероятно, создавали наиболее оптимальные концентрации Na, K, Ca, Mn, Mg, Zn в питательной среде [7]. Отмечено, что суммарное содержание макроэлементов в опытной биомассе на 1,95% выше по сравнению с контролем, при равном

количестве микроэлементов. В опытном варианте обнаружено высокое содержание натрия (на 5,1%), кальция (28,9%), магния (18,8%), марганца (20,6%) и кобальта (10,5%) по сравнению с контролем. Кальций играет роль активатора в микробной клетке и способен, наряду с ионами магния и марганца, стимулировать энергетический обмен, оказывать влияние на ферментативное расщепление органических и неорганических полифосфатов. Марганец влияет на витаминобразование, накопление белка, некоторых незаменимых аминокислот, а также как и магний, активизирует ферменты спиртового брожения. Оптимальное содержание ионов калия в опытной питательной среде способствует накоплению триозофосфатов, что в конечном итоге может ускорять процесс спиртового брожения.

Интересная закономерность наблюдается при анализе данных, полученных в результате определения минеральных веществ в фугатах обеих сред. Установлено активное потребление дрожжевыми организмами минеральных веществ в опытной питательной среде (% потребления макроэлементов 36,9:31,7; микроэлементов 68,8:63,6; опыт: контроль). Наиболее востребованными (97%) оказались ионы цинка, которые играют важную роль в углеводном, фосфорном и белковом обмене живой клетки, входя в состав ферментов или активируя их. На процесс образования этанола ионы цинка оказывают существенное влияние, так как входят в состав важнейших ферментов спиртового брожения – алкогольдегидрогеназы и альдозазы. Очевидно, такая востребованность минеральных ресурсов связана с содержащимися в геотермальной воде биологически активными веществами, оказывающими влияние на ферментативную активность дрожжей, и как следствие, на степень потребления макро- и микроэлементов. Характер и скорость течения основных метаболических процессов зависит также от изменений функциональной активности мембран, так как известно, что катионы кальция и натрия, наряду с гуминовыми веществами, входящими в состав геотермальной воды, вызывают конформационные изменения мембранных и внутриклеточных белков.

В результате изучения качественного и количественного состава свободных аминокислот идентифицировано по 15 свободных аминокислот, в том числе 10 незаменимых. Обнаружено увеличение на 22% суммарного содержания идентифицированных аминокислот в биомассе дрожжей, выращенных на опытной среде по сравнению с контролем. Лидирующее положение занимал аланин (0,513 мг/г), оказывающий наибольший протекторный эффект на клеточные мембраны. Кроме аланина, в исследуемых дрожжах преобладали глутаминовая кислота, валин, лейцин, тирозин, серин, изолейцин, глицин, важные не только для синтеза белков, ферментов, но и являющиеся исходным продуктом синтеза РНК, пуриновых и пиримидиновых оснований, липидов, углеводов и других аминокислот, наличие которых необходимо для протекания активного спиртового брожения. Содержание глутаминовой кислоты составляло 0,373 мг/г, что значительно выше по сравнению

с контролем. Дрожжевые микроорганизмы, культивируемые на среде с геотермальной водой, отличались биологической ценностью за счет таких дефицитных аминокислот как лейцин, тирозин, изолейцин, метионин, треонин, усиливающих функциональную деятельность организма, активный транспорт химических веществ на клеточном уровне, образование структурных белков, усиление гликогенеза [4].

Особый интерес также представляло исследование спиртовых отгонов сброженных субстратов на образование побочных метаболитов. Концентрация этанола в культивируемой жидкости не коррелирует с образованием побочных продуктов обмена дрожжей. Анализ летучих примесей в отгонах сброженных субстратов выявил идентичный качественный состав, за исключением бутанола-2, причем контроль существенно отличался количеством синтезируемых побочных метаболитов [8]. Обнаружено, что на питательной среде с геотермальной водой, несмотря на повышенный выход спирта, синтезировалось почти вдвое меньше примесных соединений ( $4903,82:9076,75$  мг/дм<sup>3</sup>, опыт: контроль), в основном за счет снижения образования высших спиртов и альдегидов. Высшие спирты представлены в исследуемых образцах следующими компонентами: пропанол-1, пропанол-2, бутанол-1, бутанол-2, изобутанол, изоамилол, гексанол, которые сами по себе и, тем более, присутствуя вместе, отрицательно влияли на конечный продукт. Сивушные масла в бродильной среде опытного варианта составляли  $2409,48$  мг/дм<sup>3</sup>, тогда как в контроле –  $4585,97$  мг/дм<sup>3</sup>. Как показывают результаты эксперимента, биосинтез побочных продуктов на фоне различного состава среды может определяться как результат регуляторных функций клетки. Использование геотермальной воды в качестве биологически активного стимулятора в составе питательной среды, позволяло не только интенсифицировать процесс брожения, но и улучшить качество целевого продукта. Однако примеси в контрольной бражке находились в более высоких объемных долях, что в конечном итоге снижало качество конечного продукта.

**Выводы:** установлена возможность интенсификации биосинтеза этанола с повышенной степенью чистоты сброженного субстрата, улучшением биологической ценности дрожжей за счет витаминов, минеральных веществ, свободных аминокислот в результате изменения метаболизма дрожжей *S. cerevisiae* Y-503 на основе влияния многофункциональных компонентов геотермальной воды.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Патент РФ № 2329302 Способ сбраживания мелассного суслу / Ш.А. Абрамов, Э.А. Халилова // Б.И. № 20, 2008.
2. Абрамов, Ш.А. Новые технологии пищевых продуктов на основе использования геотермальных вод Юга России. // Юг России: Экология, развитие. – 2008. - №2. – С. 6-9.
3. Абрамов, Ш.А. Новое в биотехнологии синтеза этанола в сбраживаемой среде / Ш.А. Абрамов, Э.А. Халилова, С.А. Магадова // Хранение и переработка сельхозсырья. – 2006. - № 12. – С.46-48.
4. Халилова, Э.А. Изучение физиолого-биохимических и ультраструктурных особенностей культуры *Saccharomyces cerevisiae* // Хранение и переработка сельхозсырья. – 2008. - №6. – С. 54-57.
5. Абрамов, Ш.А. Активность ферментов углеводного обмена штамма *Saccharomyces cerevisiae* Y-503 в анаэробных условиях культивирования / Ш.А. Абрамов, С.Ц. Котенко, Э.А. Исламмагомедова // Хранение и переработка сельхозсырья. – 2007. - №10. – С. 49-51.
6. Котенко, С.Ц. Влияние условий спиртового брожения на содержание витаминов в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* // Хранение и переработка сельхозсырья. – 2008. - №7. – С. 54-57.
7. Исламмагомедова, Э.А. Влияние минеральных веществ на физиологические функции дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // Хранение и переработка сельхозсырья. – 2008. - №7. – С. 59-61.
8. Халилова, Э.А. Образование побочных метаболитов дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* в зависимости от условий спиртового брожения / Э.А. Халилова, Ш.А. Абрамов // Хранение и переработка сельхозсырья. – 2007. - № 9. – С. 64-66.

## BIOCHEMICAL FEATURES OF YEAST STRAIN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* IN CONDITIONS OF SPIRIT FERMENTATIONS

© 2010 S.T. Kotenko, E.A. Khalilova, E.A. Islammagomedova

Pri-Caspian Institute of Biological Resources DSC RAS, Makhachkala

Results of positive influence of geothermal water multipurpose ingredients in cultivating medium on ethanol biosynthesis with smaller maintenance of impurity connections, improvement of yeast biological value due to vitamins, mineral substances and free amino acids are presented.

Key words: *geothermal water, yeast, ethanol*

Svetlana Kotenko, Candidate of Biology, Leading Research Fellow.  
E-mail [pibrnrcran@iwt.ru](mailto:pibrnrcran@iwt.ru)

Eslanda Khalilova, Candidate of Biology, Leading Research Fellow  
Ehvira Islammagomedova, Candidate of Biology, Senior Research Fellow