

ОБРАЗОВАНИЕ СВОБОДНЫХ АМИНОКИСЛОТ В ДРОЖЖАХ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE Y-503* В ПРОЦЕССЕ БИОСИНТЕЗА ЭТАНОЛА

© 2011 Э.А. Халилова, С.Ц. Котенко, Э.А. Исламмагомедова

Прикаспийский институт биологических ресурсов ДНЦ РАН, г.Махачкала

Поступила в редакцию 16.02.2011

Представлены результаты исследований фонда свободных аминокислот штамма *Saccharomyces cerevisiae Y-503* в зависимости от состава питательной среды в процессе биосинтеза этанола. Обнаружено, что дрожжи, культивируемые на питательной среде с геотермальной водой фенольного класса, отличаются повышенным содержанием свободных аминокислот, в том числе, незаменимых, играющих важную роль в спиртовом брожении.

Ключевые слова: геотермальная вода, дрожжи, этанол, свободные аминокислоты

Аминокислотам отведена важная роль в метаболизме дрожжевых микроорганизмов, где кроме строительных функций они могут оказывать влияние на разные функциональные системы клетки, стимулируя или угнетая их деятельность. Известно значение их как регуляторов стабильности мембран, активности ряда ферментов, перекисного окисления липидов и многих других процессов в клетках живых организмов всех уровней эволюционного развития. Существует гипотеза, что система, контролирующая биосинтез аминокислот (GC-система у дрожжей) и сходная регуляторная у высших эукариотов, необходима для выживания клеток в условиях стрессов различного типа. Поддержание азотистого баланса – одного из основополагающих свойств живых организмов, определяется формированием адаптивных изменений метаболизма дрожжей, взаимодействующих с условиями внешней среды. В ранних публикациях [1-3] показано, что дрожжи, культивируемые на мелассной среде с геотермальной водой нефенольного класса, содержат существенно больше свободных внутриклеточных аминокислот, чем выращенные по традиционной технологии в условиях спиртового брожения. Кроме того, установлено, что накопление аминокислот коррелирует не только с активной жизнедеятельностью дрожжей, но и интенсификацией синтеза этанола [4]. В этой связи определенный интерес представляет изучение биосинтеза свободных аминокислот дрожжами *Saccharomyces cerevisiae Y-503*, культивируемых на питательных средах с использованием геотермальной воды фенольного класса.

Объектами исследования являлись: штамм *S.cerevisiae Y-503* (а.с. СССР № 1284998), который хранится в коллекции дрожжей Прикаспийского института биологических ресурсов Дагестанского научного центра РАН и геотермальная вода фенольного класса из скважины №7-Т Кизлярского месторождения. Подземная вода характеризуется как низкоминерализованная, гидрокарбонатно-хлоридная натриевая следующего состава (г/л): аммоний – 0,0015, натрий – 0,6211, калий – 0,0129, магний – 0,0033, кальций – 0,0092, стронций – 0,0003, железо – 0,0009, марганец – 0,000207, цинк – 0,000044, медь – 0,000014, никель – 0,000001, фтор – 0,0005, хлор – 0,4487, бром – 0,0030, йод – 0,0009, сульфат – 0,0905, гидрокарбонат – 0,8059, гидрофосфат – 0,000019, борная – 0,0135 и кремниевая – 0,0726 кислоты; содержит органические компоненты, в том числе (мг/л): битумы нейтральные – 2,0, битумы кислые – 1,4, гумусовые вещества – 4,6, фенолы – 0,54. Для культивирования дрожжей применялась мелассные питательные среды с использованием геотермальной воды фенольного класса (МПСГВ) и по традиционной технологии (МПС) [5].

Результаты настоящего эксперимента показали, что ресурсы углеводного питания штаммом *S.cerevisiae Y-503* на МПС с геотермальной водой фенольного класса были востребованы на 96,3%, в то время как на МПС – 89,5%. Несомненно, что наличие в геотермальной воде фенольного класса таких важных биологически активных веществ, необходимых для жизнедеятельности живых организмов, как К, Na, Mg, Ca, Fe, Mn, борная, кремниевая кислоты, органические вещества, в частности, гумусовые, являющиеся стимуляторами физиолого-биохимических процессов и активаторами мембранных перестроек в живой клетке, создает благоприятные условия для интенсификации спиртового брожения с образованием более высокого содержания этилового спирта. Согласно этому, в

Халилова Эсланда Абдурахмановна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник. E-mail pibrndncran@iwt.ru

Котенко Светлана Цалистиновна, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник

Исламмагомедова Эльвира Ахмедовна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник

сброженном субстрате на опытной среде наблюдалось более активное спиртовое брожение (на 16,7%) и, соответственно, повышенная скорость метаболических процессов в клетках.

В результате исследований качественного и количественного состава свободных аминокислот биомассы дрожжей *S.cerevisiae* Y-503, выращенных на опытной (с геотермальной водой) и традиционной средах, идентифицировано по 22 свободной аминокислоты, в том числе 12 незаменимых (см. рис.). Вместе с тем, суммарное содержание фонда аминокислот опытной биомассы составляет 28,4 мг/г, что на 21% выше по сравнению с контролем. В обоих вариантах дрожжей обнаружены следы фосфотаноламина (EA) – соединения, влияющего на рост дрожжевой популяции, что вполне объяснимо показателями высокой биохимической активности дрожжей в процессе биосинтеза этанола. Так, к концу спиртового брожения общее содержание опытной дрожжевой популяции возросло, по сравнению с контролем, почти в 2,5 раза, что позволило более полно сбраживать сахара и синтезировать этанол [4].

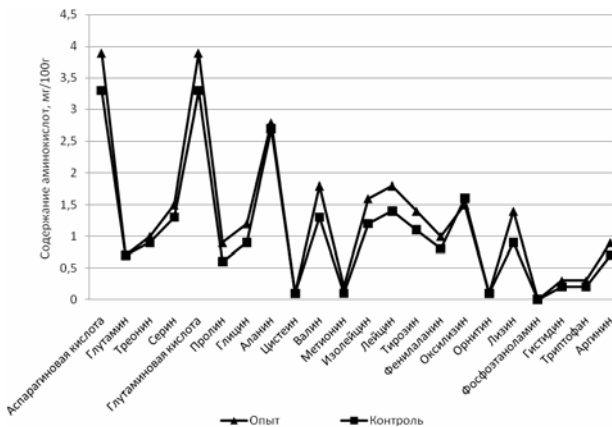


Рис. Содержание свободных аминокислот в биомассе штамма *S. cerevisiae* Y-503, культивируемого на питательных средах с геотермальной водой фенольного класса (опыт) и традиционной (контроль)

Рассмотрим накопление отдельных аминокислот в обоих вариантах дрожжей. Так, аспарагиновая и глутаминовая кислоты, аланин, пролин, треонин, аргинин, глутамин, серин оказывают максимально протекторное действие на белково-липидные компоненты клеток. Содержание в дрожжевой биомассе глутамина, проявляющего специфические коферментные функции, идентично как в опыте, так и в контроле. Вместе с тем, остальные идентифицированные аминокислоты обнаружены в повышенном количестве в опытном варианте. Образование глутаминовой и аспарагиновой кислот, аланина обычно на порядок выше, чем других аминокислот. Фактически эти аминокислоты вовлекают в метаболизм клеток почти весь азот, что обуславливает поддержание азотистого баланса живых организмов. Многообразие функций определило их

высокую концентрацию в клетке. Обнаружена интересная особенность – независимо от состава питательной среды содержание указанных кислот в аминокислотном пуле всегда значительное [2], причем в наших исследованиях составляет 40%. Очевидна их регуляторная роль, которая проявляется в сопряжении путей метаболизма азотсодержащих соединений, передающих азот аминных и амидных групп для синтеза аминокислот, аминокислот, нуклеотидов, азотсодержащих липидов. Именно глутаминовая и аспарагиновая кислоты сопрягают анаэробный энергетический метаболизм, перенося в челночных механизмах атомы водорода из цитоплазмы в митохондрии. Показано, что содержание глутаминовой и аспарагиновой кислот, имеющих фундаментальное значение в биосинтезе всех аминокислот и формировании комплексов металлозависимых ферментов у микроорганизмов, в опыте составляло по 3,9 мг/100 г, что на 18,2% выше по сравнению с контролем. Аланин (2,8:2,7 мг/100 г, МПСГВ:МПС) является составной частью витамина – пантотеновой кислоты, оказывает наибольший протекторный эффект на клеточные мембраны. Серин (1,5:1,3 мг/100 г, МПСГВ:МПС) тесно связан с обменом пировиноградной кислоты и из него, как из аланина, могут синтезироваться углеводы. Известна роль глицина (1,2:0,9 мг/100 г, МПСГВ:МПС) в качестве конформационного «шарнира» в формировании и подвижности активного центра ферментов при синтезе заменимых аминокислот. Пролин (0,9:0,6 мг/100 г, МПСГВ:МПС) – важнейший белковый строительный материал клетки, действующий как аллостерический ингибитор. Накопление орнитина (0,1:0,1 мг/100 г, МПСГВ:МПС), участвующего в обезвреживании избыточного количества аммиака, поступающего в организм, идентично в обоих вариантах.

Вместе с тем содержание незаменимых аминокислот составляло 13,3 мг/100 г, в то время как в контроле на 26,7% ниже. Обнаружено, что накопление всех незаменимых аминокислот в опытном варианте несколько выше, кроме цистеина. Причем наибольшее их количество в опыте приходится на валин, лейцин, изолейцин, тирозин, лизин (1,8:1,3, 1,8:1,4, 1,6:1,2, 1,4:1,1, 1,4:0,9 мг/100 г, МПСГВ:МПС). Валин, лейцин и изолейцин, действующие совместно в химических реакциях, входящие в комплекс ВСАА (от англ. branched chain amino) клетки, в обоих вариантах дрожжей составляют около 54% от общего содержания незаменимых аминокислот. Они участвуют в регуляции калиевого обмена, выполняют важнейшие биохимические функции в метаболизме углеводов, необходимые для протекания активного спиртового брожения. Изолейцин, лейцин осуществляют важную роль в процессе деления дрожжевых клеток, вызывая усиление гликогенеза. Лизин является мощным источником энергии, ускоряя расщепление липидов. Оксилизин (1,5:1,6 мг/100 г, МПСГВ:МПС), оксипроизводное лизина, единственная незаменимая кислота,

содержание которой в опыте ниже на 6%. Остальные незаменимые аминокислоты играют не менее важную роль в метаболизме дрожжевых клеток. Гистидин – суперкатализатор (0,3:0,2 мг/100 г, МПСГВ:МПС), входящий в активные центры гормонов и большого числа ферментов, регулирующих защитные функции организма. В присутствии фенилаланина (1,0:0,8 мг/100 г, МПСГВ:МПС) и тирозина (1,4:1,1 мг/100 г, МПСГВ:МПС) происходит значительное усиление метаболизма клеток и резкий функционально-морфологический эффект. Обнаруженный вдвое больше в опытных дрожжах метионин (0,2:0,1 мг/100 г, МПСГВ:МПС) участвует в синтезе белка и формировании таких жизненно важных веществ, как холин и метилированные формы нуклеиновых кислот; и также, как треонин (1,0:0,9 мг/100 г, МПСГВ:МПС) значительно увеличивает количество выделяющегося глутамата. Содержание цистеина (0,1:0,1 мг/100 г, МПСГВ:МПС) идентично в обоих вариантах. Цистеин и метионин, как серасодержащие аминокислоты, являются антиоксидантами, обладают протекторными свойствами. Особая роль указанных аминокислот в обмене веществ связана с тем, что они участвуют в биосинтезе большого числа биологических активных веществ. Широкий спектр регуляторного влияния аргинина (0,9:0,7 мг/100 г, МПСГВ: МПС) на обмен веществ сопряжен с необходимостью поддержания его в определенной концентрации в организме. Высокая реакционная способность аргинина определила его важную роль в активации ряда ферментов и адаптации дрожжевой клетки к экстремальным условиям, детоксикации вредных веществ. Триптофан (0,3:0,2 мг/100 г, МПСГВ: МПС) стимулирует выработку гормонов роста и витаминов группы В. Следует отметить, что содержание триптофана, аргинина, аспарагиновой кислоты, серина, треонина и аланина, значительно активирующее спиртовое брожение (относящихся к фактору Z), выше в опытном варианте на 50,0%, 28,6%, 18,2%, 15,4%, 11,1% и 3,7% соответственно. Можно предположить, что высокое

содержание свободных аминокислот способствует физиолого-биохимической активности опытного штамма дрожжей *S. cerevisiae* Y-503, участвующего в процессе синтеза этанола [4].

Выводы: дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* Y-503, выращенные на меласной питательной среде с геотермальной водой фенольного класса, накапливают больше свободных аминокислот, чем полученные по традиционной технологии, что позволяет в большей мере интенсифицировать процесс спиртового брожения.

Работа выполнена в рамках гранта РФФИ № 09 – 05 – 96514 « Новый биологически активный стимулятор для интенсификации синтеза этанола в интересах агропромышленного комплекса на основе использования геотермальных ресурсов Дагестана » регионального конкурса « Юг России ».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Халилова, Э.А. Изучение физиолого-биохимических и ультраструктурных особенностей культуры *S. cerevisiae* в условиях спиртового брожения // Хранение и переработка сельхозсырья. 2008. № 6. С. 54-57.
2. Халилова, Э.А. Содержание свободных аминокислот и витаминов группы В в дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* Y-503 в аэробных и анаэробных условиях культивирования / Э.А. Халилова, С.Ц. Котенко, Э.А. Исламгагомедова // Производство спирта и ликероводочных изделий. 2010. №3. С. 9-11.
3. Котенко, С.Ц. Биохимические особенности штамма *Saccharomyces cerevisiae* в условиях спиртового брожения / С.Ц. Котенко, Э.А. Халилова, Э.А. Исламгагомедова // Известия Самарского научного центра РАН. Т.12 (33). №1(3). 2010. С. 721-723.
4. Котенко, С.Ц. Использование геотермальной воды фенольного класса в технологии биосинтеза этанола / С.Ц. Котенко, Э.А. Халилова, Э.А. Исламгагомедова // Производство спирта и ликероводочных изделий. 2010. № 3. С. 27-29.
5. Абрамов, Ш.А. Способ сбраживания меласного суслу / Ш.А. Абрамов, Э.А. Халилова // Патент РФ 2329302. Б.И. № 20. 2008.

FORMATION OF FREE AMINO ACIDS IN YEAST *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* Y-503 IN PROCESS OF ETHANOL BIOSYNTHESIS

© 2011 E.A. Khalilova, S.T. Kotenko, E.A. Islammagomedova
Pri-Caspian Institute of Biological Resources DSC RAS, Makhachkala

Results of researches the fund of free amino acids *Saccharomyces cerevisiae* Y-503 strain, depending on structure of nutrient medium in process of ethanol biosynthesis are presented. It is revealed that the yeast cultivated on nutrient medium with geothermal water from phenolic class, differs the raised maintenance of free amino acids, including irreplaceable, playing an important role in spirit fermentation.

Key words: *geothermal water, yeast, ethanol, free amino acids*

Eslanda Khalilova, Candidate of Biology, Leading Research Fellow.
E-mail pibrdncran@iwt.ru
Svetlana Kotenko, Candidate of Biology, Leading Research Fellow
Elvira Islammagomedova, Candidate of Biology, Senior Research Fellow