

УДК 663:550.36 (470.67)

ГЕОТЕРМАЛЬНАЯ ВОДА ФЕНОЛЬНОГО КЛАССА И НЕКОТОРЫЕ ОСОБЕННОСТИ МЕТАБОЛИЗМА ДРОЖЖЕЙ *S. CEREVISIAE* Y-503 В ПРОЦЕССЕ СИНТЕЗА БИОЭТАНОЛА

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

Прикаспийский институт биологических ресурсов ДНЦ РАН

Изучено влияние геотермальной воды фенольного класса в составе среды культивирования на жизнеспособность дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* Y-503 и синтез биоэтанола. Сравнительный анализ некоторых физиолого-биохимических свойств штамма позволил определить синтез большего количества свободных аминокислот, минеральных веществ, что способствовало интенсификации процесса спиртового брожения. Более низкое содержание в сброженном субстрате побочных продуктов метаболизма характеризует экологическую чистоту этанола как альтернативного вида биотоплива.

Influence of geothermal water of phenol class in the structure of the medium of cultivation on viability of *Saccharomyces cerevisiae* Y-503 yeast and synthesis of bioethanol has been studied. Comparative analysis of some physiologo-biochemical properties of the strain allowed to identify the synthesis of a bigger number of free amino acids, mineral substances. It intensified the process of spirit fermentation. Lower contents of the by-products of metabolism in the fermentation substrate points at ecological purity of ethanol as an alternative type of biofuel.

Ключевые слова: мелассная питательная среда; геотермальная вода фенольного класса; *Saccharomyces cerevisiae* Y-503; этанол; морфология; биохимия

Keywords: molasses nutrient medium; geothermal water of the phenol class; *Saccharomyces cerevisiae* Y-503; ethanol; morphology; biochemistry.

Введение

В результате фундаментальных исследований коллективом лаборатории ЭБОРИБР под руководством проф. Ш.А. Абрамова создано новое научное направление «Геотермальные воды в биотехнологических процессах». Благодаря наличию в составе подземной воды биологически активных веществ, ее доступности в использовании геотермальная вода перспективна для применения в микробиологических процессах [1–6]. Накоплен большой экспериментальный материал относительно влияния природного биостимулятора – подземной воды нефенольного класса в составе среды культивирования на метаболизм дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* Y-503 (а.с. РФ № 1730140, патенты РФ № 2084519, 2151795). Установлена возможность интенсификации синтеза этанола (патент РФ № 2329302). В настоящее время определенный интерес представляют работы с использованием в технологии синтеза этанола подземных вод фенольного класса. Известно, что фенольные соединения, присутствующие в подземных водах, образуются в результате процессов жизнедеятельности растительных и животных организмов. Биогенные фенолы в водах могут вступать в реакции конденсации и полимеризации, образуя сложные гумусоподобные и другие довольно устойчивые соединения. Полифункциональность этих соединений приводит к высокой биологической активности и многообразию химических превращений; среди биосферных функций фенолов важная – физиологическая. Имеются данные по использованию низких концентраций динитрофенола для повышения бродильной активности при выращивании дрожжей с целью получения спирта [7].

Цель настоящей работы – изучение некоторых особенностей метаболизма дрожжей *S. cerevisiae* Y-503 и возможность применения геотермальной воды фенольного класса в процессе синтеза биоэтанола.

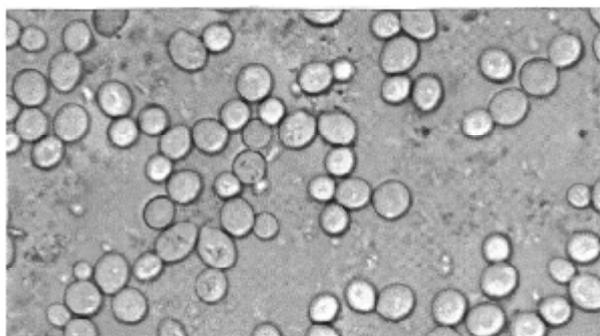
Объекты и методы исследований

Объектами исследования являлись: штамм *Saccharomyces cerevisiae* Y-503 (а.с. СССР

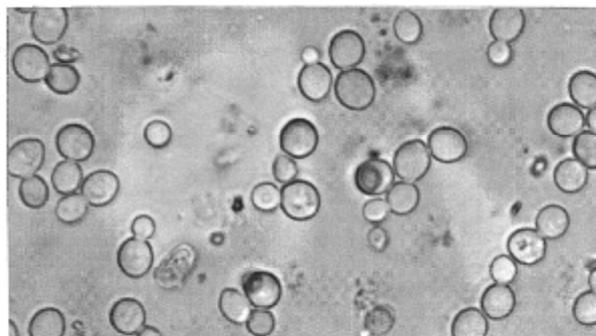
№ 1284998), который хранится в коллекции дрожжей Прикаспийского института биологических ресурсов ДНЦ РАН, и геотермальная вода фенольного класса из скважины № 7-Т Кизлярского месторождения. Подземная вода характеризуется как низкоминерализованная, гидрокарбонатно-хлоридная – натриевая следующего состава (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. Выращивание дрожжей проводили анаэробно при температуре 30°C, как описано ранее [8]. На всех этапах исследований осуществляли контроль за функциональной морфологией дрожжевой культуры [9]. Спиртообразующая способность *S. cerevisiae* Y-503, технологические показатели сброженного субстрата, содержание микропримесей, свободные аминокислоты, элементный состав изучались по известным методикам [10–13]. Статистический анализ результатов исследований проводили по *t*-критерию Стьюдента. Достоверными данными считались отличия при $p \leq 0.05$.

Результаты исследований и их обсуждение

Для проведения лабораторных испытаний технологического процесса синтеза этанола штамм *S. cerevisiae* Y-503 предварительно адаптировали многократными пересевами к периодически обновляемым меласным питательным средам с использованием геотермальной воды фенольного класса различной концентрации [14]. Проведение адаптации обеспечило получение дрожжей с повышенной физиолого-биохимической активностью, жизнеспособностью и устойчивостью к неблагоприятным факторам среды в процессе получения этанола. При исследовании морфологических свойств клеток, выращенных на питательной среде с геотермальной водой (МПСГВ), в инокуляте насчитывалось 84.7 млн/мл клеток округло-овальной (80–90%) и округлой (10%) формы; размерами 6–7×7–8, 6×8–8.5, 9×9 мкм; с содержанием почкующихся – 35%, мертвых – 0.05%. Клетки, выращенные на традиционной питательной среде (МПС), отличались: формой (круглые, овальные, яйцевидные), размерами 6×6, 5–6×7–8, 2–2.5×6–8 мкм, количеством – 57.9 млн/мл, содержанием почкующихся – 24.5% и мертвых – 0.1% (рис. 1). 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. При этом ресурсы углеводного питания на опытной среде востребованы на 87%, тогда как аналогичный показатель в контроле составлял 75%. На опытной питательной среде лучше проявлялась бродильная функция дрожжей по сравнению с традиционной технологией: синтез этанола – 11.40:9.7 об% (МПСГВ:МПС), остаточный сахар – 0.75 г/100:2.1 г/100 см³ (МПСГВ:МПС).



(а)



(б)

Рис. 1. Морфология клеток штамма *S. cerevisiae* Y-503 в процессе получения инокулята

Известно, что интенсификация синтеза этанола коррелирует не только с активной жизнедеятельностью дрожжей, но и с накоплением аминокислот [15, 16]. Так, ресурсы свободных аминокислот на МПСГВ были востребованы дрожжевыми клетками на 73%, тогда как на МПС – 44%. При этом активное потребление отдельных аминокислот на МПСГВ находилось в пределах 49–89%, а на МПС – 38–85%. Самыми востребованными из них оказались глутаминовая кислота, аланин, глицин, цистеин, изолейцин; затем следуют аспарагиновая кислота, треонин, валин, тирозин, триптофан (см. таблицу).

Содержание свободных аминокислот в питательных средах и сброженных субстратах в условиях спиртового брожения

Аминокислоты, (мг/л)	Мелассная питательная среда с использованием геотермальной воды фенольного класса (опыт)		Мелассная питательная среда по традиционной технологии (контроль)	
	Питательная среда	Сброженный субстрат	Питательная среда	Сброженный субстрат
Аспарагиновая кислота	1.5±0.12	0.45±0.01	1.5±0.12	0.78±0.04
Глутамин	следы	следы	0.2±0.01	следы
Треонин	0.2±0.01	0.06±0.01	0.1±0.01	0.05±0.01
Серин	0.6±0.01	0.30±0.01	0.8±0.03	0.32±0.01
Глутаминовая кислота	1.7±0.03	0.18±0.01	2.1±0.06	0.50±0.01
Пролин	0.4±0.01	0.17±0.01	0.4±0.01	0.25±0.01
Глицин	0.4±0.01	0.06±0.01	0.5±0.02	0.10±0.01
Аланин	1.5±0.03	0.18±0.01	2.1±0.07	0.83±0.05
Цистеин	0.1±0.01	следы	0.1±0.01	0.04±0.01
Валин	0.8±0.04	0.24±0.01	1.2±0.11	0.50±0.02
Метионин	следы	следы	следы	следы
Изолейцин	1.0±0.02	следы	1.3±0.12	0.03±0.01
Лейцин	0.7±0.02	0.28±0.01	1.0±0.08	0.50±0.02
Тирозин	0.8±0.03	0.21±0.01	1.2±0.09	0.35±0.12
Фенилаланин	0.2±0.01	0.10±0.01	0.2±0.01	0.08±0.12
Гидроксилизин	1.9±0.11	0.93±0.04	2.3±0.05	1.24±0.09
Орнитин	следы	0.01±0.01	следы	0.01±0.01
Лизин	следы	0.02±0.01	0.1±0.01	0.05±0.01
Фосфоэтаноламин	следы	0.01±0.01	следы	0.02±0.01
Гистидин	следы	0.01±0.01	следы	0.01±0.01
Триптофан	0.1±0.01	0.03±0.01	0.1±0.01	0.04±0.01
Аргинин	0.1±0.01	0.04±0.01	0.1±0.01	0.05±0.01
Сумма аминокислот	12.00±1.10	3.28±0.12	15.30±1.13	8.59±0.54

Исследование свободных аминокислот в биомассе штамма *S. cerevisiae* Y-503 показало идентификацию 22 аминокислот в обоих вариантах, в том числе 12 незаменимых. Суммарное содержание фонда аминокислот в опытном варианте дрожжей составило 28.4 против 23.4 мг/г в контроле. Содержание глутамина (0.7:0.7мг/г, МПСГВ:МПС), участвующего в биосинтезе незаменимых аминокислот и витаминов группы В; орнитина (0.1:0.1 мг/г, МПСГВ:МПС), обезвреживающего избыточное количество аммиака; и цистеина (0.1:0.1 мг/г, МПСГВ:МПС) идентично в обоих вариантах. Увеличение фонда происходит в основном за счет глутаминовой, аспарагиновой кислот (по 3.9:3.3 мг/г, МПСГВ:МПС), имеющих фундаментальное значение в биосинтезе всех аминокислот; аланина (2.8:2.7 мг/г, МПСГВ:МПС) как составной части витамина В₅ и оказывающего наибольший

протекторный эффект на клеточные мембраны. Остальные аминокислоты обнаружены также в несколько большем количестве: серин (1.5:1.3 мг/г, МПСГВ:МПС), тесно связанный с обменом пировиноградной кислоты, глицин (1.2:0.9 мг/г, МПСГВ:МПС) – с подвижностью активного центра ферментов при синтезе заменимых аминокислот, пролин (0.9:0.6 мг/г, МПСГВ:МПС), действующий как аллостерический ингибитор.

Накопление всех незаменимых аминокислот в опытном варианте несколько выше – 13.3 мг/г против 9.8 мг/г в контроле, за исключением гидроксизина (1.5:1.6 мг/г, МПСГВ:МПС). Наибольшее количество незаменимых аминокислот 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/г, МПСГВ:МПС). Важную роль в метаболизме дрожжевых клеток играют гистидин – суперкатализатор (0.3:0.2 мг/г, МПСГВ:МПС), входящий в активные центры большого числа ферментов; фенилаланин (1.0:0.8 мг/г, МПСГВ:МПС) и тирозин (1.4:1.1 мг/г, МПСГВ:МПС), значительно усиливающие функционально-морфологический эффект. Обнаруженный вдвое больший в опытных дрожжах метионин (0.2:0.1 мг/г, МПСГВ:МПС) участвует в синтезе белка и так же, как треонин (1.0:0.9 мг/г, МПСГВ:МПС), значительно увеличивает количество выделяющегося глутатиона; аргинин (0.9:0.7 мг/г, МПСГВ:МПС) влияет на активацию ряда ферментов, адаптацию дрожжевой клетки к экстремальным условиям; триптофан (0.3:0.2 мг/г, МПСГВ:МПС) стимулирует выработку витаминов группы В. Это позволило предположить, что меньшее содержание свободных аминокислот в составе питательной среды оптимально для благоприятного течения метаболических процессов в клетке, накопления в биомассе свободных аминокислот.

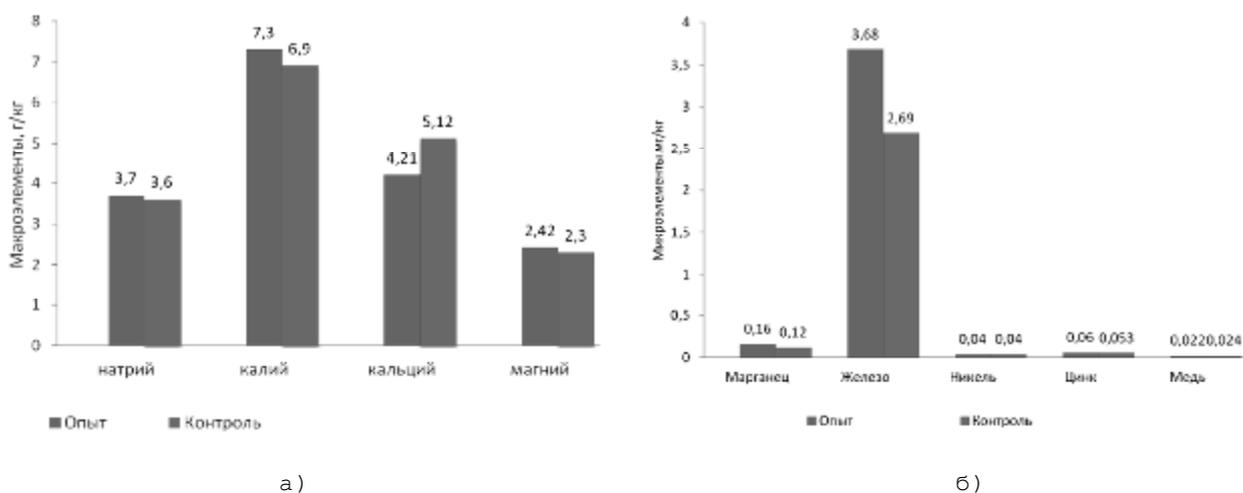


Рис 2. Содержание отдельных элементов (а – макроэлементы, б – микроэлементы) в биомассе штамма *S. cerevisiae* Y-503, культивируемого в меласных питательных средах с геотермальной водой (опыт) и традиционной (контроль)

Исследования минерального состава питательных сред показали, что процесс брожения в обеих средах активировался почти идентичным содержанием К, Mg, Mn, Zn и Cu. Определенный интерес при этом представляют условные показатели интенсивности метаболизма клеток микроорганизмов [17, 18]. Соотношение в средах Ca/Mg (38.64:35.34, МПСГВ:МПС) указывает на увеличение периода осаждения дрожжей вследствие медленного потребления мальтозы, мелитриозы; Mg/Ca (0.03:0.03, МПСГВ:МПС) – возможное увеличение скорости брожения, накопление спирта, жизнеспособность дрожжей; K/Ca (2.17:2.39, МПСГВ:МПС) – более замедленный рост клеток.

Как видно из данных рис. 2, наибольшее накопление минеральных веществ в опытной биомассе по сравнению с контролем приходилось на макроэлементы К, Mg, Na (на 5.8%, 5.2%, 2.8%) и микроэлементы Fe, Mn, Zn (на 36.8%, 33.3%, 13.2%); содержание никеля идентично. Однако исключение составляли Ca и Cu, содержание

которых меньше по сравнению с контролем на 17.8 и 8.3%, но достаточно, как следует из экспериментальных данных, для стимуляции бродительной активности дрожжей. Большее соотношение К/Са в опытном варианте (1.73:1.35, МПСГВ:МПС) определяло активный метаболизм клеток при относительном уровне стабильности их в конце брожения; Mg/Ca (0.57:0.045, МПСГВ:МПС) указывало на увеличение скорости брожения, накопление спирта и жизнеспособность опытных дрожжей в процессе брожения. Более низкое содержание Са в опытном варианте компенсировалось Mg или Mn и указывало на некоторую защищенность клеточных мембран от стрессов. Марганец, содержание которого больше на 33%, выступает в роли неспецифического активатора металлоферментных комплексов. Известно, что потребность в железе у дрожжей высока. Большее накопление его в опытном варианте на 37% может способствовать, вероятно, усилению синтеза ферментов, выполняющих окислительно-восстановительные функции в клетке. Zn, как K и Mn, влияет на активность ключевых ферментов углеводного обмена, проницаемость мембран, стабилизацию клеточных компонентов у микроорганизмов. Соотношение Zn/Fe в биомассе дрожжей (0.016:0.020, МПСГВ:МПС) отражает активацию митохондриальной дыхательной цепи.

В связи с тем, что существует тесная связь между образованием аминокислот и накоплением продуктов обмена, характеризующих качество сброженного субстрата, особый интерес представляет изучение примесных соединений. Известно, что этанол, отличающийся экологической чистотой за счет низкого содержания примесных соединений, является перспективным компонентом биотоплива, повышающим антидетонационную стойкость и октановые характеристики бензина. Сопоставление сравнительных профилей качественных показателей сброженных субстратов выявило идентичный качественный состав, за исключением бензалкоголя в опыте, причем контроль отличался количеством синтезируемых побочных метаболитов (22099.91:29710.71 мг/дм³, МПСГВ:МПС) (рис. 3). Обнаружено, что, несмотря на повышенный выход спирта, на МПСГВ синтезировалось на 26% меньше примесных соединений, в основном за счет снижения образования альдегидов, ароматических спиртов и кетонов, по сравнению с традиционной технологией. Альдегиды представлены ацетальдегидом (7007.65:13917 мг/дм³, МПСГВ:МПС) и кротоноальдегидом (43.88:95.29 мг/дм³, МПСГВ:МПС), ухудшающих пробу спирта на окисляемость. Накопление ацетона составляло 101.72 мг/дм³, что на 30% меньше, чем на МПС; содержание этилового эфира уксусной кислоты – 737.44:747.54 мг/дм³, МПСГВ:МПС. Идентифицированы также фенилэтанол (1074.72:1191.68 мг/дм³, МПСГВ:МПС) и бензалкоголь (0.00:44.57 мг/дм³, МПСГВ:МПС), которые даже при ничтожно малом количестве отрицательно влияют на запах спирта. Содержание сивушных масел, как и эфиров, в бродительной среде обоих вариантов почти идентично (13124.39:13548.75 мг/дм³, МПСГВ:МПС). Они представлены в исследуемых образцах следующими компонентами: пропанол-1 (5603.27:5939.00 мг/дм³, МПСГВ:МПС), пропанол-2 (10.50:12.56 мг/дм³, МПСГВ:МПС), бутанол-1 (145.38:207.17 мг/дм³, МПСГВ:МПС), изобутанол (1320.93:1205.34 мг/дм³, МПСГВ:МПС), изоамилол (6006.16:6114.74 мг/дм³, МПСГВ:МПС), гексанол (38.16:69.95 мг/дм³, МПСГВ:МПС). Содержание метилового спирта (0.011:0.021 об.%, МПСГВ:МПС), обладающего высокой токсичностью, в опытном варианте вдвое меньше. Энергичное брожение с выделением большого количества углекислого газа увеличивало накопление β-фенилэтилового спирта (1074.72:1191.68 мг/дм³, МПСГВ:МПС). Результаты исследований побочных продуктов спиртового брожения отразили характер метаболических процессов в дрожжевой клетке и качество этанола.

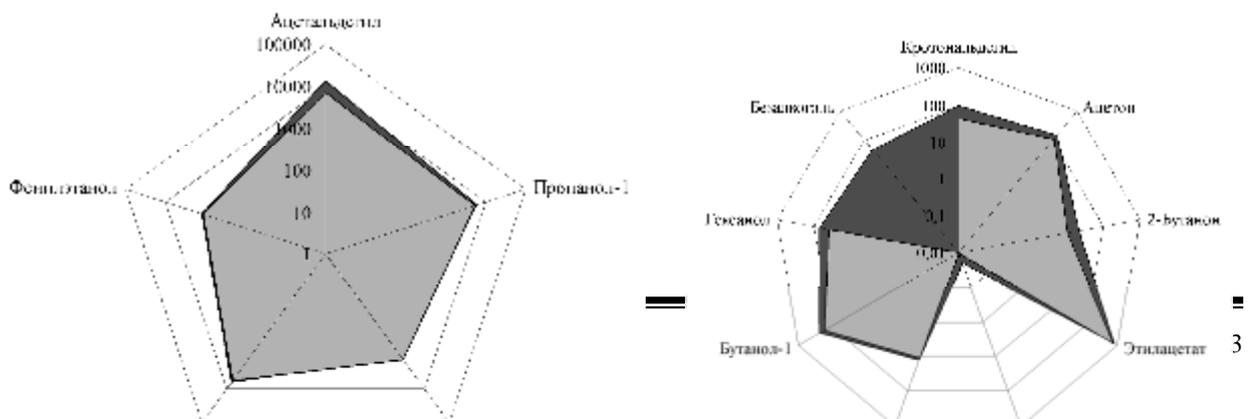


Рис. 3. Сравнительные профили качественных показателей спирта-сырца, полученного по новой технологии с использованием геотермальной воды фенольного класса (опыт) и традиционной (контроль)

Выводы

Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* Y-503, выращенные на мелассной питательной среде с геотермальной водой фенольного класса, синтезируют больше свободных аминокислот, минеральных веществ, что позволяет интенсифицировать процесс спиртового брожения. Перспективность исследований заключается в разработке технологии синтеза этанола как альтернативного вида биотоплива с меньшим содержанием побочных продуктов метаболизма.

Работа выполнена на оборудовании Аналитического центра коллективного пользования ДНЦ РАН при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (ГК № 16.552.11.7092).

ЛИТЕРАТУРА

1. Новая питательная среда для выращивания дрожжей / Ш.А. Абрамов, С.Ц. Котенко, Д.А. Эфендиева, Э.А. Халилова, Э.А. Исламмагомедова, С.М. Даунова // Прикладная биохимия и микробиология. 1995. Т. 31, № 2. С. 232-233.
2. Халилова Э.А., Абрамов Ш.А. Свободные аминокислоты в биомассе и сушеных дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* в зависимости от состава питательной среды // Прикладная биохимия и микробиология. 2001. Т. 37, № 5. С. 578-581.
3. Абрамов Ш.А., Котенко С.Ц., Исламмагомедова Э.А. Активность ферментов углеводного обмена штамма *Saccharomyces cerevisiae* Y-503 в анаэробных условиях культивирования // Хранение и переработка сельхозсырья. 2007. № 10. С. 49-51.
4. Содержание витаминов в дрожжах рода *Saccharomyces* в зависимости от состава питательной среды / Ш.А. Абрамов, С.Ц. Котенко, А.Ш. Рамазанов, Ф.И. Исламова // Прикладная биохимия и микробиология. 2003. Т. 39, № 4. С. 438-440.
5. Халилова Э.А. Геотермальная вода как новый источник питания в биотехнологии сушеных дрожжей: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Махачкала, 2000. 24 с.
6. Исламмагомедова Э.А. Биохимические особенности нового штамма дрожжей *Saccharomyces oviformis* Y-2635 в зависимости от условий культивирования: автореф. дис. ... канд. биол. наук. Махачкала, 2005. 24 с.
7. Лукерченко В.Н. Активация роста дрожжей в производстве спирта // Пищ. пром-сть. 2000. № 10. С. 77.
8. Биотехнология активного синтеза этанола в сбраживаемой среде на основе использования геотермальной воды нефенольного класса / Ш.А. Абрамов, Э.А. Халилова, Э.А. Исламмагомедова, С.Ц. Котенко, С.А. Магадова // Вестн. Дагест. науч. центра. 2009. № 34. С. 21-28.
9. Руководство к практическим занятиям по микробиологии. М: Изд-во МГУ, 1983. 209 с.
10. Методы теххимического и микробиологического контроля в виноделии. М.: Пищ. пром-сть, 1980. С. 49-59.
11. Colorimetric method for determination of sugars and related substances / M. Du-bois, K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers, F.Smith // Anal. Chem. 1956. Vol. 28, N 2. P. 350-356.
12. Moore S., Spackman D., Staelin W. Chromatography of amino acids on sulfonated polystyrene resins // Anal. Chem. 1958. Vol. 30, N 6. P. 1185-1190.
13. Лурье Ю.Ю. Аналитическая химия промышленных сточных вод. М.: Химия, 1984. С. 21-229.

14. Котенко С.Ц., Халилова Э.А., Исламмагомедова Э.А. Использование геотермальной воды фенольного класса в технологии биосинтеза этанола // Производство спирта и ликероводочных изделий. 2010. № 3. С. 27–29.
15. Безбородов А.М. Биохимические основы микробиологического синтеза. М.: Пищ. пром-сть, 1984. С. 84–135.
16. Коновалов С.А. Биохимия дрожжей. М.: Пищ. пром-сть, 1980. 271 с.
17. Никитин Д.И., Сорокин В.В., Питрюк И.А. Элементный состав клеток бактерий из разных таксонов // Прикладная биохимия и микробиология. 1998. Т. 34, № 2. С. 180–182.
18. Williams Robert J.P. The mineral elements in homocostatis and morphogenesis // Biachem. Sis. Traus. 1990. N 18. P. 689–705.

Поступила в редакцию 12.10.2011 г.
Принята к печати 26.06.2013 г.