

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

УНИВЕРСИТЕТ ИТМО

Т.В. Меледина, С.Г. Давыденко

**ДРОЖЖИ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE***  
**МОРФОЛОГИЯ, ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ,**  
**МЕТАБОЛИЗМ**

УЧЕБНОЕ ПОСОБИЕ

 УНИВЕРСИТЕТ ИТМО

Санкт-Петербург

2015

УДК 663.4  
ББК 36.87  
М 47

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

Рассматривается морфология дрожжей и ее изменение в зависимости от условий культивирования. Приведены сведения по регулированию метаболизма дрожжей относительно синтеза биомассы и ее химического состава. Даны методические указания к проведению лабораторных работ по оценке влияния внешних факторов на морфологию клеток и их физиологическое состояние.

Предназначено для магистрантов, обучающихся по направлению 19.04.02 Продукты питания из растительного сырья всех форм обучения.

**Рецензенты:** доктор техн. наук Л.И. Кузнецова (директор СПб филиала ГОСНИИ хлебопекарной промышленности); Н.Е. Худошина – менеджер по обучению (ООО «Пивоваренная компания “Балтика”»)

**Рекомендовано к печати Советом факультета пищевых технологий, протокол № 1 от 30.10.2014 г.**



**Университет ИТМО** – ведущий вуз России в области информационных и фотонных технологий, один из немногих российских вузов, получивших в 2009 году статус национального исследовательского университета. С 2013 года Университет ИТМО – участник программы повышения конкурентоспособности российских университетов среди ведущих мировых научно-образовательных центров, известной как проект «5 в 100». Цель Университета ИТМО – становление исследовательского университета мирового уровня, предпринимательского по типу, ориентированного на интернационализацию всех направлений деятельности.

© Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, 2015

© Меледина Т.В., Давыденко С.Г., 2015

## ВВЕДЕНИЕ

Среди биологических объектов, изучение которых послужило основанием для развития современной биотехнологии, лидируют дрожжи-сахаромицеты. Исключительный интерес к ним связан с особенностями их метаболизма. Наличие двух путей энергетического обмена у дрожжей – анаэробного (гликолиза) и оксидативного, – каждый из которых может быть реализован в отдельности, а также протекать одновременно, легло в основу получения продуктов брожения, в частности пива, и биомассы хлебопекарных дрожжей.

Для создания высокоэффективных пищевых технологий, основанных на культивировании дрожжей, необходимо знать особенности их метаболизма и физиологии. На основании этих знаний можно реализовать потенцию дрожжей в целях повышения эффективности процесса накопления биомассы в любой отрасли биотехнологии, где используются дрожжи сахаромицеты, в частности в производстве пекарских дрожжей, пивоварении, виноделии и биосинтезе этанола.

### 1. СИСТЕМАТИКА ДРОЖЖЕЙ, ПРИМЕНЯЕМЫХ В БРОДИЛЬНЫХ ПРОИЗВОДСТВАХ

Систематика включает в себя классификацию, номенклатуру и идентификацию.

Большинство микологов в своей работе используют современную классификацию Крегер-ван Рэя, согласно которой дрожжи, применяемые в хлебопечении, пивоварении, виноделии и производстве спирта, относятся к царству грибов – *Mycota*, к отделу – *Eumycota*, к классу – *Ascomycetes*, семейству – *Saccharomycetaceae*, к роду – *Saccharomyces*, виду – *cerevisiae*.

Хансен применил специфическое название *S. cerevisiae* к верховым пивным дрожжам, использовавшимся в британской и германской пивоваренной промышленности. В табл. 1.1. приведены данные по изменению систематического положения дрожжей, из которых видно, что дрожжи *S. carlsbergensis* (пивные дрожжи), *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus* и *S. oviformis* (применяемые в виноделии) и *S. cerevisiae* (пекарские дрожжи) объединены и слиты в один вид *S. cerevisiae*. В табл. 1.1. также сравнивается классификация по *Lodder & Kreger-van Rij*, *Lodder* и *Kreger-van Rij* относительно этих видов.

**Номенклатура дрожжей**

Классификация		
Lodder & Kreger-van Rij, 1952	Lodder, 1970	Kreger-van Rij, 1984
<i>Saccharomyces bayanus</i>	<i>S. bayanus</i>	<i>S. cerevisiae</i>
<i>S. oviformis</i>		
<i>S. pastorianus</i>		
<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>	
<i>S. cerevisiae</i> var. <i>ellipsoideus</i>		
<i>S. willianus</i>		
<i>S. carlsbergensis</i>	<i>S. uvarum</i>	
<i>S. logos</i>		
<i>S. uvarum</i>		
<i>S. chevalieri</i>	<i>S. chevalieri</i>	
<i>S. italicus</i>	<i>S. italicus</i>	
	<i>S. aceti</i>	
	<i>S. diastaticus</i>	
<i>S. marxianus</i>	—	

Тот факт, что дрожжи, используемые в бродильных производствах, относятся к одному роду и виду, исключает необходимость рассматривать их в отдельности при изучении закономерностей роста и размножения.

**2. РАЗМНОЖЕНИЕ ДРОЖЖЕЙ**

Дрожжи представляют собой одноклеточные организмы, которые размножаются почкованием. При этом дочерняя клетка возникает в виде маленькой почки, которая растет в течение большей части клеточного цикла. По достижении почкой размера материнской клетки между ними появляется перегородка сложного состава. После отделения почки на материнской клетке образуется рубец – дочерний шрам, а на дочерней клетке – родовой шрам (рис. 2.1).

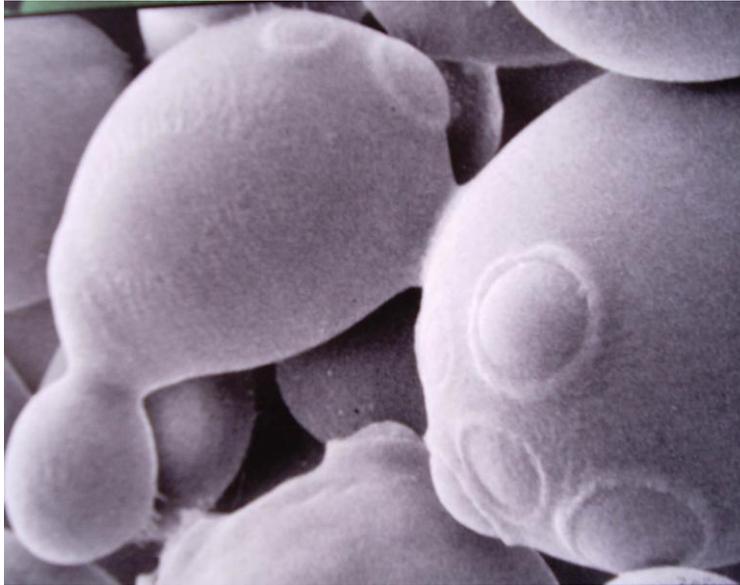


Рис. 2.1. Почкующиеся дрожжевые клетки и родовые рубцы

На одном и том же месте клеточной стенки никогда не появляются две почки. Следовательно, каждый раз почка оставляет новый дочерний шрам на стенке материнской клетки. Подсчитав число таких шрамов, можно определить, сколько почек образовала данная клетка и таким образом оценить ее возраст.

Любая популяция дрожжей на 50 % состоит из клеток, образовавшихся во время последнего акта деления. На поверхности таких клеток имеется только один родовой шрам. Из остальных 50 % клеток у 25 % обнаруживается один дочерний шрам, у 12,5 % – два и у других 12,5 % – больше двух дочерних шрамов. Одной из причин снижения физиологического состояния дрожжей является увеличение доли старых клеток в популяции.

## 2.1. КЛЕТочный цикл

Время, за которое клетка образует себе подобную, составляет клеточный цикл (КЦ). Он включает в себя четыре основных фазы, длительность которых примерно одинакова. Рассмотрим их подробнее:

**G<sub>1</sub>** – предсинтетическая фаза. Начинается с синтеза ферментов, необходимых для образования почки и дубликации ДНК. Заканчивается появлением – «наклеиванием» почки. Инициация образования почки сопровождается ослаблением клеточной стенки, вызванным

действием литических ферментов. Если по какой-то причине (неблагоприятные условия культивирования) размер отделившейся дочерней клетки не достиг размера материнской, то длительность этой фазы увеличивается за счет времени, необходимого для достижения некоторого критического размера.

Реализовать стартовую программу могут только те клетки, которые достигли определенного размера, т.е. существует некий механизм, который регулирует начало клеточного деления, являющегося гарантией того, что только клетки, обладающие достаточными для завершения всего КЦ ресурсами, начнут последовательный ряд реакций, ведущих к делению клеток.

**S** – синтетическая фаза. Эта фаза заканчивается, когда почка достигает размера около  $1/3$  материнской. На этой стадии происходит удвоение ДНК.

**G<sub>2</sub>** – постсинтетическая фаза. Происходит дальнейшее увеличение размера клетки. Идет распределение ядерного материала между материнской и дочерней клеткой.

**M** – митоз, включающий кариокинез (**K**) – деление ядра и цитокинез (**Ц**) – деление клетки. В период митоза размер почки продолжает увеличиваться вплоть до размера материнской.

### **Регуляция клеточного цикла**

Регуляция клеточного цикла может осуществляться, по крайней мере, на двух различных уровнях:

первый – это цикл деления ДНК, который связан с репликацией ДНК и митозом;

второй – цикл роста, связанный с увеличением размера клетки.

Обычно они функционируют вместе, поэтому средний размер клеток любого штамма, при наличии некоторых колебаний, остается постоянным в широком диапазоне условий выращивания, за исключением стрессовых ситуаций.

Установлено, что в сахаромикетах размер клеток регулируется изменением длительности клеточного цикла, а не скорости роста. Причем изменения в клеточном цикле касаются, главным образом, продолжительности фазы **G<sub>1</sub>**.

Поведение популяции клеток в закрытой системе (периодическая культура) описывается кривой роста, включающей в себя несколько фаз.

**Начальная фаза (лаг-фаза).** Видимые признаки размножения дрожжей отсутствуют, однако обменные процессы в клетках протекают активно: синтезируются ферменты, необходимые для переноса и расщепления высокомолекулярных питательных веществ, внутри клеток синтезируются нуклеиновые кислоты и ферменты, необходимые для дальнейшего активного роста. За счет биосинтеза новых компонентов масса клеток увеличивается. Продолжительность фазы зависит от количества посевного материала, его возраста и физиологического состояния. Большое значение также имеет состав питательной среды и физико-химические параметры процесса (рН, температура, осмоляльность и т.п.). В этот период клетки наиболее уязвимы к различным стрессам.

**Фаза ускорения роста** – начало почкования, сопровождающееся дальнейшим увеличением количества биомассы в культуре.

**Экспоненциальная (логарифмическая, лог-фаза).** Характеризуется максимальной скоростью размножения. Численность клеток и их биомасса возрастают в геометрической прогрессии. Из-за быстрого размножения возможно уменьшение размеров клеток.

**Фаза замедления роста.** В этот период концентрация питательных веществ в среде снижается, накапливаются токсичные продукты метаболизма, возрастает концентрация биомассы. В клетках происходит накопление резервных углеводов, в первую очередь гликогена. Это приводит к замедлению роста клеток и их размножения и даже к частичной гибели клеток. Потребление кислорода постепенно снижается. Понижается активность дыхательных ферментов.

**Стационарная фаза.** В первой половине фазы прирост дрожжей продолжается с небольшой скоростью, при этом размеры клеток вновь увеличиваются. Оставшиеся в среде сбраживаемые углеводы используются клеткой в биосинтезе резервных углеводов (гликоген и трегалоза).

**Фаза затухания (отмирания)** – период, когда в результате истощения питательной среды и максимального накопления продуктов обмена скорость отмирания и автолиза клеток превышает скорость их размножения. Автолитические процессы приводят к уменьшению общей численности клеток и изменению состава среды, в которой они находятся.

### 3. МОРФОЛОГИЯ ДРОЖЖЕЙ

Клетки *S. cerevisiae* имеют округлую, яйцевидную или эллипсоидную форму; размер их колеблется от 2,5 до 10 мкм в поперечнике и от 4,5 до 21 мкм в длину. Размер и форма клеток одного и того же штамма определяются генетически и могут варьироваться в определенных пределах в зависимости от условий культивирования и последующих операций получения коммерческих дрожжей (обезвоживание).

Клетки состоят из микроскопических (видимых в обычном микроскопе при увеличении в 600–900 раз) и субмикроскопических, видимых только в электронном микроскопе (увеличение от 15–20 тыс. раз), структур. Эти структуры можно подразделить на постоянно присутствующие и периодически обнаруживаемые в клетке. К первым относятся различные **органеллы** – клеточные структуры, выполняющие определенные функции. Это ядро с ядрышком, митохондрии, рибосомы, клеточная стенка, цитоплазматическая мембрана, эндоплазматический ретикулум (сеть), аппарат Гольджи, лизосомы, хитосомы, гликосомы и целый ряд других мембранных структур (рис. 3.1). Все клеточные органеллы окружены мембранами. В состав мембран входит большое количество фосфолипидов, причем их содержание как в количественном, так и в качественном составе определяется природой органеллы.

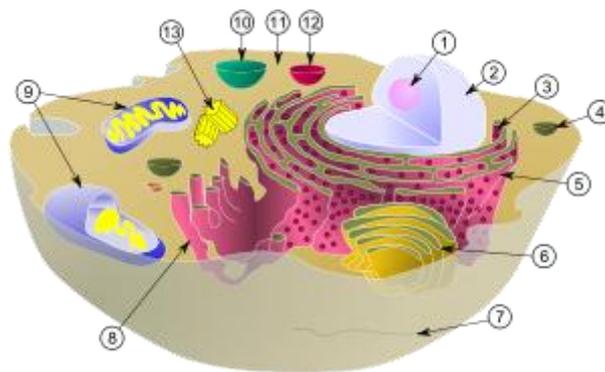


Рис. 3.1. Органеллы дрожжевой клетки:

- 1 – ядрышко; 2 – ядро; 3 – рибосома (маленькие точки); 4 – везикула;  
5 – шероховатый эндоплазматический ретикулум (ER); 6 – аппарат Гольджи;  
7 – цитоскелет; 8 – гладкий эндоплазматический ретикулум; 9 – митохондрия;  
10 – вакуоль; 11 – цитоплазма; 12 – лизосома; 13 – центриоль и centrosома

Мембраны органелл имеют трехслойную структуру. Они состоят из липидов, белков и небольшого количества углеводов. Липиды представлены в основном моно-, ди- и триглицеридами, глицерофосфатидами и стеролами – эргостеролом и зимостеролом. Каждая молекула фосфолипида состоит из гидрофобной, т. е. отталкивающей воду, и гидрофильной, притягивающей воду, частей. Гидрофильные части молекулы находятся на внешней стороне мембраны, а гидрофобные – на внутренней. Молекулы белка размещаются на поверхности мембраны или проникают внутрь нее (рис. 3.2).

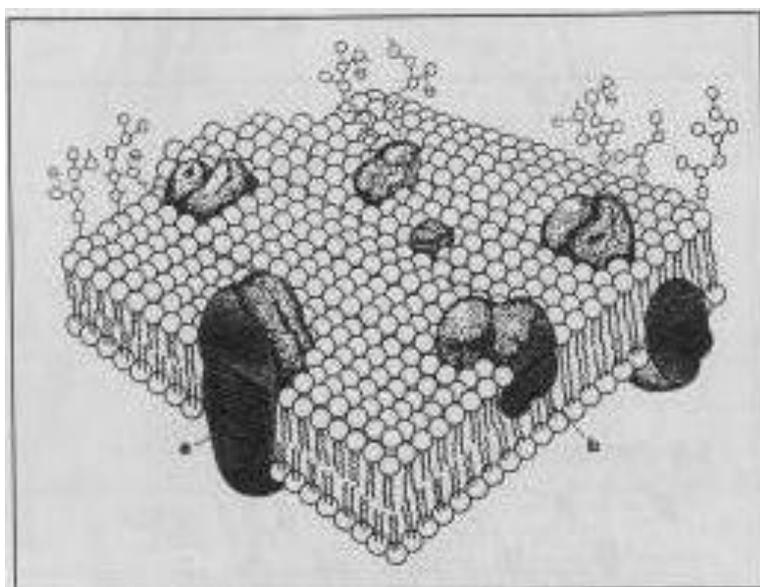


Рис. 3.2. Модель клеточной мембраны (фосфолипиды и транспортные протеины)

Непостоянные структуры – **включения** – в отличие от органелл то возникают, то исчезают в процессе жизнедеятельности клеток. Будучи продуктами метаболизма клетки, включения отражают различные стороны и этапы ее физиологической активности. Этими непостоянными структурами являются внутриклеточные запасные соединения: жиры, гликоген и полифосфаты.

Включения могут быть представлены в виде более или менее плотных частиц – гранул, кристаллов или капель. Они обычно представляют собой скопления, видимые под микроскопом, либо без специальной обработки, либо после обработки различными красителями. Так, низкомолекулярные полифосфаты обнаруживаются в виде гра-

нул в вакуолях (волютин), жиры – в виде капель, гликоген выявляется при окрашивании клеток раствором Люголя.

### 3.1. КЛЕТочНАЯ СТЕНКА

Клеточная стенка является частью клеточной оболочки, в состав которой входит также периплазматическое пространство.

**Клеточная стенка (КС)** выполняет следующие основные функции:

1. Защита от воздействия окружающей среды.
2. Сохранение формы.
3. Участие в обменных процессах: регуляция поступления питательных веществ и выделение метаболитов.
4. Опосредованно участвует в процессах размножения.

Клеточная стенка представляет собой слоистую структуру толщиной около 25 нм (рис. 3.3):

- 1-й (наружный) слой – это тонкая липопротеиновая мембрана;
- 2-й слой – значительно более толстый слой – представляет собой маннано-протеиновый комплекс;
- 3-й слой состоит из глюкана, он имеет слоистую структуру.

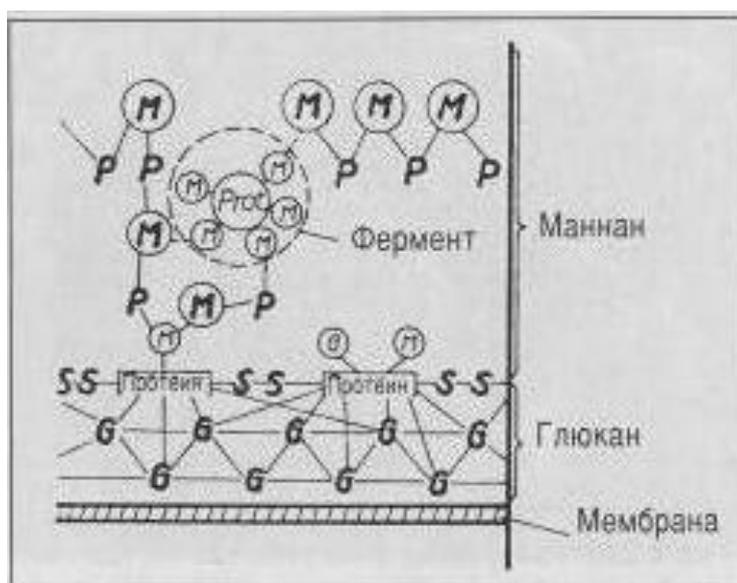


Рис. 3.3. Модель клеточной стенки

При оптимальных условиях роста число слоев – три, но иногда их количество увеличивается в основном за счет глюканового слоя, толщина которого может возрасти с 20 до 200 нм, и клеточная стенка утолщается. Возникновение почки происходит быстрее в тех клетках, которые содержат больше маннана. При увеличении доли глюкана в КС последняя становится менее эластичной и образование почки затрудняется. От соотношения между глюканом и маннаном зависит форма клеток (при увеличении содержания глюкана наблюдается удлинение клетки). Возраст клетки, условия культивирования могут существенно повлиять на соотношение между этими компонентами. Например, при отсутствии инозитола (витамина В<sub>8</sub>) клеточная оболочка содержит меньше маннана, белка и фосфора, но больше глюкана и глюкозамина, чем в нормальных условиях культивирования.

На долю клеточной стенки приходится от 6 до 25 % сухой массы клетки. Химический анализ клеточной стенки показывает, что она состоит в основном из глюкана и маннана; наряду с этими компонентами в стенке присутствуют хитин и белок.

В пересчете на сухие вещества (% СВ) клеточные стенки хлебопекарных дрожжей в среднем содержат: глюкана – 29, маннана – 31, белков – от 6 до 13 %, липидов – от 2 до 9, хитина – от 3 до 5 %, минеральных веществ – 3 %. Почечные рубцы, изолированные из клеточных оболочек дрожжей, содержат около 85 % маннозы, 4 % глюкозы и 2,7 % глюкозамина. В рубцах и примыкающих к ним зонах, кроме того, локализуется хитин.

### 3.1.1. ГЛЮКАН

Глюкан – это сложный полимер глюкозы (молекулы глюкозы соединены между собой  $\beta$ -1,6 и  $\beta$ -1,3 связями), располагающийся во внутреннем слое клеточной стенки, прилежащем к плазмалемме, или клеточной мембране. Глюкан — основной структурный компонент клеточной стенки, поскольку при его удалении она полностью разрушается.

Стенки сахаромицетов содержат, по крайней мере, три типа  $\beta$ -глюкановых полимеров, молекулярная масса которых составляет около 250 кДа (табл. 3.1). Соотношение между фракциями зависит от условий культивирования.

## Глюканы клеточной стенки

Фракции глюкана	Содержание в КС, %	Доля $\beta$ -1,6 связей	Функция
Щелочерастворимый	20 %	8–12	Аморфный матрикс, связан с маннаном
Щелоче-кислото-нерастворимый $\beta$ -1,3-глюкан	30–35 %	До 3	Неразветвленный. Определяет форму клетки, прочностные свойства стенки. Формирует фибриллярную сеть
Щелоче-кислото-растворимый $\beta$ -1,3-глюкан	5 %	65	Высокоразветвленный. Аморфный матрикс, связан с маннаном, рецептор для киллер-токсинов

Синтез глюкана практически заканчивается с завершением формирования почки. При этом участвует фермент глюкансинтаза. Она в мало- или неактивной форме доставляется в везикулах к плазмолемме, где активируется и синтезирует полисахарид.

Установлено, что синтез глюкана, так же как и маннана, зависит от условий культивирования: режима подачи углеводного и азотного питания, температуры культивирования, аэрации и т.п.

## 3.1.2. МАННАН

Маннан – разветвленный полимер маннозы, находится главным образом во внешних слоях клеточной стенки. Маннозные звенья в маннани соединены между собой  $\alpha$ -1,6 связями, а боковые ответвления образованы за счет  $\alpha$ -1,2 и  $\alpha$ -1,3 связей. Удаление маннана не изменяет общую форму клетки.

Третий углеводный компонент стенки, хитин, представляет собой полимер N-ацетилглюкозамина; он обнаруживается в участках клеточной стенки, ассоциированных с дочерними шрамами. В свою очередь глюканы и хитин образуют каркас, придающий КС необходимую форму. Известно, что рецепторами киллер-токсинов являются  $\beta$ -1-6-глюканы.

Белок составляет 10 % сухого веса клеточной стенки. Между глюканом и маннаном находятся структурные белки, связанные с по-

лисахаридами дисульфидными мостиками, содержание которых варьирует в зависимости от условий культивирования и физиологического состояния дрожжей. Эти белки образуют на поверхности КС осмиофильный белковый слой толщиной до 10 нм.

Часть белка клеточных стенок связана с ферментами. В основном это маннанопротеины, которые содержат в качестве составной части молекулы до 50 % маннана. Также имеется небольшое количество глюканопротеинов.

Роль маннанопротеинов (МП) заключается в следующем:

1. Они выполняют функции рецепторов, воспринимающих многочисленные сигналы, поступающие в клетку из среды.
2. Участвуют в осуществлении контактов между организмами (входят в состав аглютининов).
3. Определяют иммунологические свойства дрожжей.
4. Многие из ферментов, находящихся в КС и периплазматическом пространстве, представляют собой маннанопротеины (инвертаза, кислая фосфатаза, аспарагиназа,  $\beta$ -глюканаза,  $\alpha$ -галактозидаза, хитиназа и др., всего их около 18).
5. На ранних стадиях своего созревания входят в состав киллер-токсинов и феромонов.
6. Связаны с процессами полового размножения дрожжей.
7. МП, располагающиеся на поверхности клеточной стенки, являются цементирующими компонентами, связывающими остальные составные части КС в единую структуру.

**Биосинтез МП** протекает в различных клеточных структурах. Он начинается в эндоплазматическом ретикуле (ЭПР), продолжается в мембранных структурах типа аппарата Гольджи и секреторных везикулах, а завершается в цитоплазматической мембране (ЦПМ). При слиянии везикул с плазмолеммой важную роль играют такие элементы, как Са, Mg, Mn.

Из ферментов, в состав которых входят гликопротеины, следует обратить внимание на инвертазу, кислую фосфатазу и трегалазу. Эти ферменты находятся как в КС, так и в периплазматическом пространстве (ППП) и могут секретироваться дрожжевыми клетками наружу в окружающую среду.

Инвертаза, или фосфофруктозидаза, гидролизует сахарозу – основной углевод мелассы – на глюкозу и фруктозу.

Известны щелочная и кислая фосфатазы. Максимальная активность наблюдается именно у кислой фосфатазы, так как процессы жизнедеятельности дрожжей в бродильных производствах происходят при рН менее 5,5, в то время как оптимум рН для щелочной фосфатазы составляет 7,0. Кислая фосфатаза гидролизует различные эфирные связи фосфорной кислоты, в частности освобождая ортофосфат из молекул АТФ. Дрожжи имеют две основные формы кислой фосфатазы – репресслируемую, синтез которой ингибируется ортофосфатом среды, и конститутивную, ее уровень не зависит от концентрации  $\text{PO}_4^{-3}$  в питательной среде.

Трегаллаза – фермент, гидролизующий запасной дисахарид трегалозу с образованием двух гликозидных остатков.

### 3.1.3. ХИТИН

Хитин – линейный полисахарид, построенный из остатков N-ацетилглюкозамина, соединенных между собой  $\beta$ -1,4 связями. Хитиновые цепи упакованы в фибриллы, нерастворимые в воде. Он выполняет функцию целлюлозы, которая входит в состав клеточных стенок растений. Отличие заключается в том, что гидроксильные группы при втором углеводном атоме остатков глюкозы замещены на ацетилированные аминогруппы.

Содержание хитина зависит от вида дрожжей и условий культивирования. Локализован он исключительно в первичной септе (перегородке), образующейся при делении клетки, и только около 10 % хитина распределяется по поверхности дрожжей.

Возникновение почки начинается с образования хитинового кольца, которое затем разрастается, образуя септу. Хитин первичной септы окружен другими углеводами –  $\beta$ -глюканом и маннанопротеином, составляющими вторичную септу. Хитин синтезируется из Г-6-Ф при участии хитинсинтазы. Биосинтез хитина не только сконцентрирован в определенном месте на поверхности клетки, но и осуществляется в определенный период клеточного цикла, включающий возникновение и формирование почки. Скорость синтеза хитина возрастает у клетки, достигшей 25 % от размера материнской, а затем падает.

Хитинсинтаза (ХС) в клетках находится в двух формах – неактивной, или малоактивной (зимогенной), и высокоактивной. Кофак-

торами фермента являются Mg, Mn, Co. Почти вся хитинсинтаза находится у сахаромикетов в плазмолемме (2/3). Небольшая активность проявляется в клеточных мембранах, в том числе мембранах эндоплазматического ретикулума (ЭПР). Синтез фермента находится под строгим метаболическим контролем. Контроль осуществляется как на субстратном, так и на энергетическом уровнях. Высокие концентрации АТФ в клетке на первых этапах цикла почкования стимулируют ХС и начало синтеза хитина.

У дрожжей найдены специальные образования (органеллы) – хитосомы, содержащие хитинсинтазу в зимогенной форме. Предполагается, что хитосомы транспортируют фермент от места его синтеза, который осуществляется в ЭПР, в цитоплазматическую мембрану (ЦПМ).

#### **3.1.4. ЗАПАСНЫЕ ВЕЩЕСТВА КЛЕТОЧНОЙ ОБОЛОЧКИ**

В клеточной стенке содержится некоторое количество свободных аминокислот, гликогена и полифосфатов, поэтому ее можно рассматривать как специальный компартмент, где клетка сосредоточивает в полимерной форме в качестве резерва полисахариды и активированные полифосфаты. Гликоген используется дрожжами как запасной углевод.

Неорганические полифосфаты представляют собой линейный полимер, в котором остатки ортофосфорной кислоты соединены макроэргическими фосфоангидридными связями. При гидролизе этих связей высвобождается столько же энергии, сколько при отщеплении P от АТФ. Высокомолекулярные полифосфаты участвуют при росте дрожжей в анаэробных условиях в транспорте сахаров через ПМ. Это легко утилизируемый резерв фосфора и энергии. Наибольшее содержание ПФ приходится на клеточную мембрану.

### **3.2. ПЕРИПЛАЗМАТИЧЕСКОЕ ПРОСТРАНСТВО (ПЕРИПЛАЗМА)**

Периплазматическое пространство (ППП) находится между клеточной стенкой и цитоплазматической мембраной. Это активно функционирующая область органоидного типа.

Периплазма выполняет роль:

- барьера проницаемости;
- контроля транспорта растворенных веществ внутрь клетки и из нее;

- гидролиза некоторых компонентов среды (углеводов, белков и липидов) до структур, которые затем транспортируются через цитоплазматическую мембрану (ЦПМ) ферментами, связанными с этой мембраной. Так, в ППП находятся гидролазы, гидролизующие углеводы, белки и липиды. Например, инвертаза ( $\beta$ -фруктофуранозидаза), которая расщепляет сахарозу до глюкозы и фруктозы; мелибиаза, гидролизующая дисахарид мелибиозу до галактозы и глюкозы; кислая фосфатаза, катализирующая отщепление двух остатков фосфорной кислоты от аденозинтрифосфата (АТФ); транслоказы; нуклеозиддифосфатазы;

- регулятора биосинтеза клеточной стенки у дрожжей. В частности, с участием полимераз происходит синтез олигосахаридов, которые затем используются в биосинтезе полисахаридов клеточной стенки маннана и глюкана.

В ППП происходит расщепление удаленных из клетки продуктов обмена. В этом пространстве с помощью электронного микроскопа даже можно увидеть остатки органоидов.

Объем периплазматического пространства зависит от фазы развития клетки и условий культивирования; он может увеличиваться при содержании в среде трудноусвояемых компонентов или повышении проницаемости клеточной стенки. Увеличение ширины ППП происходит также при увеличении концентрации субстрата, например мальтозы, которую клетка не успевает транспортировать посредством ферментов транспорта пермеаз в цитоплазму. Увеличение ППП наблюдается при регидратации сухих дрожжей. В этом случае в клетки активно входит вода, а из цитоплазмы удаляются поврежденные при дегидратации (обезвоживании) органоиды и их части.

### **3.3. ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКАЯ МЕМБРАНА**

Цитоплазматическая мембрана (ЦПМ), или плазмалемма, следует за ППП.

ЦПМ выполняет следующие функции:

- отделяет клеточную стенку и периплазматическое пространство от содержимого клетки (протопласта);

- создает осмотический барьер для поступления веществ в клетку и выхода из нее;
- участвует в транспорте веществ, энергии и информации внутрь клетки и из нее;
- регулирует биосинтез клеточной стенки, в частности, участвует в синтезе полисахаридов КС;
- содержит ферменты, расположенные с внешней поверхности мембраны, которые участвуют в усвоении сахаров, аминокислот и т.д.

ЦПМ клетки представляет собой типичную трехслойную структуру (см. рис. 3.2), состоящую из липопротеидов. Внутренние слои состоят из липидов, которые представлены, в основном, моно-, ди- и триглицеридами. Гидрофильные полярные части фосфолипидов, расположенные на поверхности мембран, соединены с белками электростатическими связями. Толщина мембраны обычно составляет около 8 нм.

В зависимости от возраста и физиологического состояния дрожжей ЦПМ может быть гладкой или складчатой, в последнем случае она образует инвагинации, обращенные внутрь цитоплазмы. Складчатость (фистончатость) мембраны увеличивается при дегидратации дрожжей, а также при внесении их в плотные среды с высокой осмоляльностью питательных компонентов. Размер клетки уменьшается (плазмолиз). Складчатость увеличивается также и при старении клеток.

Цитоплазматическая мембрана дрожжей может осуществлять пиноцитоз, фагоцитоз и экзоцитоз. Пиноцитоз заключается в способности захватывать из среды капли белковых растворов, растворов липидов и углеводов. Фагоцитоз – захват твердых частиц, экзоцитоз – удаление шлаков из клетки в периплазматическое пространство.

Цитоплазматическая мембрана содержит от 5,4 до 6,4 % фосфолипидов и 26 % эргостерола от общего количества липидов. Для сравнения мембраны вакуолей содержат до 40 % фосфолипидов и только 6 % эргостерола от общего количества липидов в дрожжах. Соотношение между белками и липидами в вакуолярной мембране составляет 0,66.

Имеются данные, что при увеличении содержания стеролов и непредельных жирных кислот в дрожжах возрастают барьерные



2) матричная РНК (м-РНК) отвечает за перенос закодированной в ДНК генетической информации в цитоплазму, где она служит матрицей для синтеза белка (м-РНК образуется в ядре);

3) транспортная РНК (т-РНК). В клетке много различных т-РНК, каждая обладает специфичностью по отношению к одной из двадцати аминокислот.

Ядро дрожжевой клетки отличается по химическому составу от цитоплазмы: 60 % сухого вещества ядра составляют нуклеиновые кислоты (НК), главным образом ДНК, 35 % – белки и 5 % – другие вещества, в том числе жиры, минеральные соединения и углеводы.

### 3.5. ЦИТОПЛАЗМАТИЧЕСКИЕ СТРУКТУРЫ

Цитоплазма, заполняющая клетку, представляет собой сложную коллоидную систему. Матрикс (цитозоль) цитоплазмы состоит из белков и РНК (коллоидная часть), а также аминокислот, жирных кислот, сахаров, органических и неорганических веществ, нуклеотидов, которые образуют истинные растворы. Ионный состав этих соединений определяет буферные и осмотические свойства матрикса. В цитоплазме протекают различные биохимические процессы: гликолиз, синтез жирных кислот, нуклеотидов, некоторых аминокислот и т.д. В матриксе располагаются все органоиды, которые связаны в единую систему.

**Рибосомы** – самые маленькие по размеру структуры (диаметр до 20 нм), содержат до 50 % РНК клетки. Некоторая их часть связана с поверхностью мембран эндоплазматического ретикулума. Функция рибосом состоит в биосинтезе белка.

Рибосомы состоят из белка (50 %) и РНК (42–50 %). На их долю приходится около 15 % сухой массы цитоплазмы.

**Митохондрия (М)** – полуавтономная клеточная структура, окруженная двойной трехслойной липопротеидной мембраной толщиной 6–10 нм каждая. Между ними находится перимитохондриальное пространство, приближающееся к 10 нм. Внутренняя мембрана образует складки – кристы. Внутри митохондрии находится матрикс, в котором сосредоточены ферменты ЦТК (рис. 3.4).

Чем более интенсивно протекают биосинтетические процессы в митохондрии, тем больше крист, за счет которых увеличивается ак-

тивная поверхность М, на которой локализуются дыхательные ферменты, поэтому митохондрии называют «легкими» клетки.

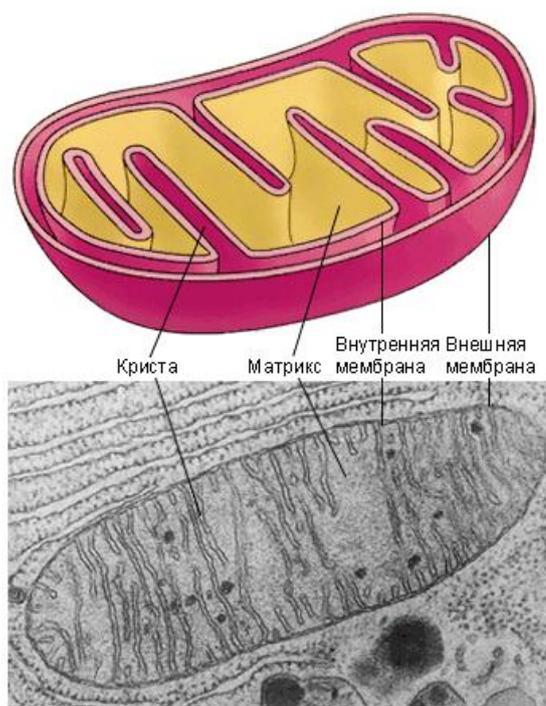


Рис. 3.4. Схематическое изображение строения митохондрии

В анаэробных условиях митохондрии деградируют, при этом уменьшается число этих структур, увеличивается их размер, но снижается количество крист. Эти деградирующие митохондрии называют промитохондриями. Однако при внесении дрожжей в среду с растворенным в ней кислородом происходит активное деление промитохондрий – изменение их структуры, т.е. увеличение числа крист. При этом важно, что скорость деления митохондрий превышает скорость деления ядра. Это объясняется тем, что данная структура обладает собственным генетическим аппаратом.

ДНК дрожжевых митохондрий, которая составляет 15–23 % всей ДНК клетки, представляет собой кольцевую молекулу с молекулярной массой (ММ), в 5 раз большей, чем ММ ДНК в митохондриях высших животных. Своей кольцевой формой митохондриальные хромосомы напоминают хромосому бактерий, причем размножаются митохондрии подобно бактериям. Однако М – не обособленная от клетки структура: в митохондриях синтезируется толь-

ко 1/4 митохондриальных белков. Основная часть белков митохондрий синтезируется на цитоплазматических рибосомах.

В митохондриях проходят важнейшие биохимические процессы, связанные с дыханием. Большая часть ферментов цикла трикарбоновых кислот (ЦТК) находится в матриксе митохондрии. Ферменты, участвующие в транспорте электронов и окислительном фосфорилировании, локализованы на внутренней мембране митохондрии, в том числе и на кристах.

На развитие митохондрий влияют не только физико-химические условия культивирования (рН, температура, концентрация кислорода и т.д.), но и состав питательной среды. Так, добавление липидов, например олеиновой кислоты или эргостерола, приводит к образованию крист. На развитие митохондрии оказывает влияние также концентрация глюкозы в среде, которая вызывает проявление эффекта Кребтри. Активность митохондрий, связанная с ферментами ЦТК, зависит от наличия в среде культивирования факторов роста, макро- и микроэлементов и стимуляторов биосинтетических процессов. Так, при отсутствии в среде биотина снижается интенсивность процесса образования оксалоацетата, в результате чего замедляется работа цикла и уменьшается потребность в дыхательных ферментах, следовательно, снижается потребность в развитых мембранных структурах, на которых они локализуются. Поэтому снижается скорость деления митохондрий и уменьшается содержание в них крист.

**Эндоплазматическая сеть (ЭПС)**, или эндоплазматический ретикулум (ЭПР), – это система канальцев, цистерн и пузырьков, которые пронизывают всю протоплазму клетки и соединены друг с другом и другими органеллами, в частности с ядром и рибосомами (рис. 3.5). От степени разветвленности этой сети зависит активность многих метаболических процессов, в частности синтез белков, жиров и углеводов. ЭПР развита больше в аэробных дрожжах, чем в анаэробных, а также в молодых клетках больше, чем в старых.

ЭПР представляет собой трехслойную липопротеидную мембрану, на которой находятся многочисленные ферменты (рис. 3.6). ЭПР обеспечивает синтез и передвижение различных метаболитов в клетке и играет роль временных хранилищ выработанных продуктов. Например, белки, синтезированные в рибосомах, проходят в каналы ЭПР и по ним переносятся в те участки клетки, для которых они

предназначены. Во время перемещения белок может фосфорилироваться или превращаться в гликопротеид.



Рис. 3.5. Связь ЭПР с другими органеллами клеток

Таким образом, основными функциями ЭПР являются синтез белка, модификация белков, а также синтез липидов.

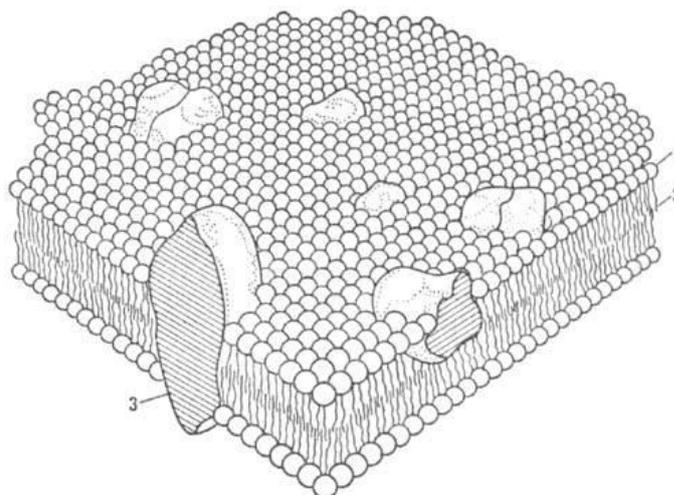


Рис. 3.6. Схема липопротеидной мембраны:  
1, 2 – мембрана; 3 – белок

Эндоплазматический ретикулум у дрожжей делится на шероховатый и гладкий. В первом случае на поверхности мембраны, обращенной к цитоплазме, находятся рибосомы, на которых идет синтез белка. Гладкий ретикулум (ГР) является производным от шероховатого. Он участвует в синтезе липидов, необходимых для формирования всех клеточных мембран, а также углеводов. Кроме того, ГР связывает шероховатый ретикулум с аппаратом Гольджи.

Морфология ЭПР зависит от условий культивирования, фазы роста дрожжей и физиологического состояния клеток. Интенсивно растущие клетки имеют хорошо развитый ретикулум, поэтому его можно обнаружить только с помощью электронного микроскопа. Однако по мере снижения метаболической активности дрожжей происходит уменьшение поверхности мембран и их разветвленности, в результате появляются вакуоли. Таким образом, наблюдается взаимосвязь между структурой ЭПР и физиологическим состоянием дрожжей.

Процесс возникновения вакуолей представляется следующим образом: каналцы и микроцистерны ЭПР утолщаются, соединяются друг с другом, образуя более крупные полости (пузырчатая вакуоль), которые постепенно становятся все крупнее (рис. 3.7).

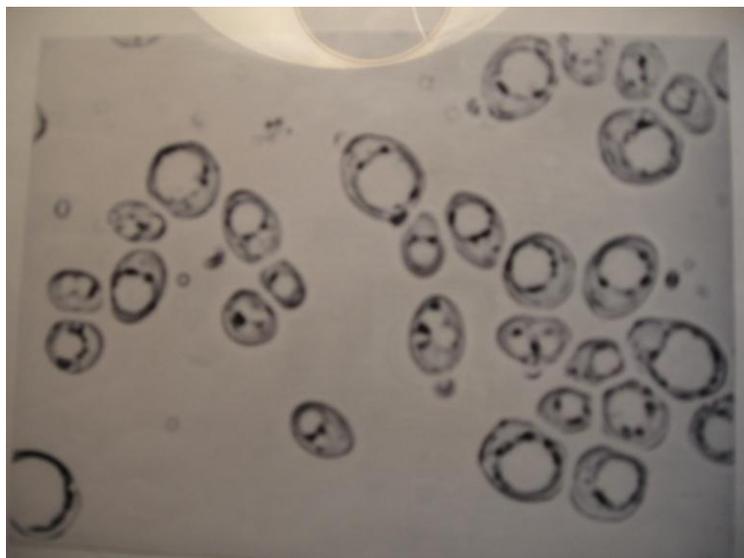


Рис. 3.7. Фотография дрожжей, содержащих вакуоли различного размера (увеличение 900 X). Темные гранулы, локализованные на поверхности вакуолей, – это жировые включения

Представление о том, что вакуоли являются производными других мембранных систем клетки, подтверждается фактом их возрастного образования в клетках. При внесении дрожжей в свежую питательную среду эти вакуоли исчезают, а содержащиеся в них вещества используются в биосинтетических процессах. Ввиду активизации обмена веществ в клетках вновь возникает необходимость в хорошо развитой ЭПР сети, необходимой для синтеза и транспорта новых компонентов к различным органоидам клетки. Поэтому уже в конце лаг-фазы роста популяции эта сеть развита и имеет значительную протяженность. Контролирует синтез новых мембран ядро. В фазе замедления роста вновь происходят морфологические изменения ЭПР, и в стационарной фазе уже можно наблюдать появление вакуоли.

Роль вакуоли, прежде всего, заключается в поддержании внутриклеточного давления. Осмотическая регуляция в клетке происходит постоянно, только в молодом возрасте ее осуществляют эндоплазматическая сеть и аппарат Гольджи, а в зрелом – вакуоль.

В вакуоли скапливаются низкомолекулярные продукты гидролиза, например свободные аминокислоты, липиды, волютин, минеральные вещества

**Аппарат Гольджи.** Значительная часть гладких мембран отделена от ЭПР и организована в самостоятельные структурные образования, которые называются комплексом Гольджи, состоящим из системы пузырьков и дисков, соединенных друг с другом (см. рис. 3.5).

Основными функциями аппарата Гольджи являются модификация, накопление, сортировка и направление различных веществ в соответствующие внутриклеточные компартменты (отделения), а также за пределы клетки.

Аппарат Гольджи принимает участие в построении клеточной мембраны, в формировании лизосом, вакуолей и хитосом, он имеет непосредственное отношение к секреции белков и полисахаридов, а также выполняет функции транспорта секретируемых веществ в другие участки клетки и к ее поверхности.

**Лизосомы** – органеллы, окруженные однослойной мембраной, осуществляют «пищеварительные» функции. Они являются производными ЭПР и аппарата Гольджи. Различают первичные и вторичные лизосомы. В первичных лизосомах, локализованных в цитоплазме, ферменты находятся в неактивной форме. Их активность прояв-

ляется только тогда, когда они внедряются в вакуоль, образуя вторичную вакуоль.

**Хитосомы** грибов содержат фермент хитинсинтазу, которая катализирует синтез микрофибрилл хитина. Хитосомы переносят микрофибриллы к клеточной стенке, где происходит биосинтез рубцов.

**Пероксисомы** – органеллы, в которых аккумулированы окислительно-восстановительные ферменты, например, каталаза, которая восстанавливает пероксид водорода до воды. Эти структуры имеют функционально-морфологическую связь с митохондриями, так как ферменты, содержащиеся в митохондриях и пероксисомах, дополняют друг друга в метаболизме дрожжей. Прослежена связь этих органелл также с ЭПР, аппаратом Гольджи, ядром и др.

### 3.6. ЗАПАСНЫЕ ВЕЩЕСТВА

Помимо органелл в цитоплазме находятся запасные вещества – включения. Это волютин, липиды, гликоген, белки.

**Волютин**, или метахроматин. Название метахроматин связано с тем, что он вызывает характерное изменение цвета у красителя метиленового синего.

Волютин у дрожжей локализован в вакуолях. Это кислоторастворимое соединение, состоящее из полифосфата, белка, РНК, ионов  $Mg^{+2}$  и  $Ca^{+2}$ . Волютин является резервом фосфора в клетке. Он накапливается при замедлении роста клеток, вызванного нехваткой питательных компонентов. Микроскопирование в обычном световом микроскопе не позволяет обнаружить волютин, так как он находится в вакуоли в аморфном состоянии, поэтому его определяют цитохимическим методом.

Помимо волютина в клетках содержатся **высокополимерные полифосфаты (ПФ)**, локализованные на ЦПМ или вблизи от нее и обладающие большой метаболической активностью. Некоторое количество ПФ находится в клеточной оболочке. Именно эти ПФ принимают непосредственное участие в активном транспорте сахаров из окружающей среды в клетку и участвуют в синтезе маннана. Вакулярная фракция ПФ метаболически малоактивна, и ее можно рас-

смаатривать только как запас фосфора, который используется в случае его недостатка в среде культивирования.

**Липиды** могут при определенных условиях культивирования накапливаться в дрожжевых клетках. В клетке липиды находятся как в свободном состоянии в виде капелек и частичек, видимых в обычном световом микроскопе при увеличении в 600–900 раз, так и в виде комплексов, которые входят в состав мембран.

Свободные липиды рассматривают в качестве запасных веществ клеток. В этом случае они вместе с фосфатами и белками образуют видимые под микроскопом гранулы (см. рис. 3.7).

Для *S. cerevisiae* нехарактерно большое накопление в клетках резервных липидов, поэтому в них обычно отсутствуют видимые капли жира. Однако при нарушениях в обмене веществ, вызванных, например, отсутствием биотина в среде культивирования, липиды могут накапливаться в протоплазме. Нарушение баланса между углеводами и усвояемого азота в питательной среде также может привести к образованию липидных гранул. Поэтому наличие липидов и их местоположение в клетке может служить показателем физиологической активности дрожжей.

Однако только небольшая часть липидов выявляется морфологически в виде различных клеточных включений. Большее их количество остается невидимым под микроскопом. Только с применением особой окраски они становятся видимыми.

**Гликоген** – полисахарид с молекулярной массой около 10 тыс. кДа. Для него характерна ветвящаяся структура за счет присоединения к основной цепи, в которой гликозидные остатки связаны между собой  $\alpha$ -1,4 связями, и боковых гликозидных остатков, связанных между собой  $\alpha$ -1,6 связями. Таким образом, он напоминает амилопектин ячменя и других злаков.

Морфологически он представляет собой гранулы размером до 9 нм. В обычном световом микроскопе после обработки клеток раствором Люголя эти гранулы окрашиваются в буро-коричневый цвет и воспринимаются под микроскопом не в виде отдельных образований, а в виде аморфной однородно окрашенной массы.

Биосинтез гликогена наиболее интенсивно происходит при культивировании клеток на средах, содержащих избыток сахаров, а также при брожении. Даже незначительная аэрация вызывает заметное снижение содержания гликогена в дрожжах.

Содержание гликогена в клетке подвержено значительным колебаниям в зависимости от условий культивирования. Гликоген активно используется дрожжами в лаг-фазе развития популяции и накапливается в фазе замедления ее роста.

Запасные белки обычно связаны с липидами и полисахаридами, однако при нарушении обмена веществ они могут выглядеть как кристаллы и занимать значительный объем в клетке.

Запасные вещества играют значительную роль в преодолении стрессов, вызываемых различными физико-химическими и механическими воздействиями при культивировании дрожжей.

## **3.7. Стрессы**

### **3.7.1. Осмотический стресс**

Осмотическое давление возникает из-за стремления воды проникнуть через полупроницаемую мембрану в сторону более концентрированного из двух разделенных этой мембраной растворов. Такое давление прямо пропорционально концентрации молекул, которые не могут пройти через мембрану. Цитоплазматическая мембрана дрожжевых клеток характеризуется полупроницаемостью относительно воды и гидрофильных соединений с высокой молекулярной массой.

В настоящее время широко используется технология культивирования клеток в среде с высокой концентрацией углеводов. В этих условиях клетки испытывают гиперосмотический стресс. При этом дрожжи приобретают округлую форму и их поверхность становится морщинистой из-за утечки воды из клеток.

Реакция клеток на осмотический стресс зависит от плотности среды и ее углеводного состава, физиологического состояния дрожжей и стадии роста клеток. Размножающиеся клетки (лог-фаза роста) более чувствительны к стрессу, чем клетки, находящиеся в стационарной фазе роста. Это объясняется разным химическим составом дрожжей, в частности содержанием в них резервных углеводов гликогена и трегалозы.

В связи с гиперосмотическим стрессом, который испытывают клетки в момент их внесения в питательную среду, требуется некоторое время для адаптации их к данным условиям, прежде чем

дрожжи начнут размножаться. Эта стадия в развитии клеток называется лаг-фазой. В этот период существенно возрастает синтез глицерол-3-фосфатдегидрогеназы, что приводит к увеличению внутриклеточной концентрации глицерина. Однако может пройти несколько часов до регистрации существенного увеличения содержания внутриклеточного глицерина.

В обычных условиях глицерин может проникнуть через цитоплазматическую мембрану, но при гиперосмотическом стрессе поры, через которые он выходит, закрываются и глицерин в период лаг-фазы не выделяется в среду. В процессе брожения стресс снимается и внутриклеточная концентрация глицерина уменьшается.

### 3.7.2. Этанольный стресс

Спирт образуется в процессе брожения, и влияние его на дрожжи определяется как этанольный стресс.

Токсическое свойство этанола – увеличение проницаемости и пористости клеточной мембраны, что приводит к проблемам с транспортом питательных веществ. Кроме того, наблюдается дефицит доступной воды в цитоплазме. Реакция клеток на воздействие этилового спирта в лабораторных условиях проявляется в увеличении степени ненасыщенности имеющихся в цитоплазматической мембране жирных кислот, в росте содержания эргостерина, синтезе трегалозы и продуцировании специфических белков термошока.

При содержании этанола в среде выше 1,2 % происходит снижение удельной скорости роста дрожжей. Концентрация спирта в среде 2 % и более приводит к уменьшению выхода биомассы. Полностью рост дрожжей подавляется при 8–9,5 %-м содержании этанола.

Этанол влияет на продолжительность времени генерации дрожжевой клетки. Повышение концентрации этанола с 0 до 1 % повышает время генерации примерно с 2,3 до 3,5 часов, а при концентрации этанола 3,8 % она составляет уже 6,9 ч.

Промышленные дрожжи в случае плотного пивоварения подвергаются воздействию высоких концентраций этанола. При экстрактивности начального сусла 23 % объемная доля спирта состав-

ляет более 9,0 %. Образующийся спирт угнетает как скорость размножения дрожжей, так и процесс брожения.

### 3.7.3. Стресс, вызванный двуокисью углерода

При концентрациях, эквивалентных давлению газа выше 0,2 атм, данное соединение стимулирует рост клеток. При давлении около 0,5 атм цикл трикарбонных кислот ингибируется, но спиртовое брожение продолжается вплоть до давления в 4,0 атм. Деление клеток прекращается при давлении около 2,5–3,0 атм. При этом клетки проходят через S-фазу (фазу синтеза ДНК), но не почкуются, и поэтому они характеризуются двойным составом ДНК и большими, чем обычно, размерами. При концентрациях двуокиси углерода, позволяющих клеткам расти, отмечается явное его влияние на формирование сенсорных характеристик пива.

Исследователи до сих пор не пришли к единому мнению о биохимическом механизме действия двуокиси углерода.

### 3.7.4. Окислительный стресс

Относительно способности дрожжей противостоять окислительному стрессу проведено большое количество исследований. У клеток имеются защитные механизмы: например, на субстратном уровне – глутатион, полиамины, ионы металлов и др., а на ферментном уровне – это каталаза, супероксиддизмутаза, глутатионпероксидаза, тиоредоксинпероксидаза, а также редуктаза, метионинредуктаза и ДНК-восстанавливающие ферменты. В пивном брожении значение кислородного стресса не так велико, так как клетки подвергаются воздействию кислорода в течение короткого периода времени лишь в начале брожения, поэтому в ходе реакций, протекающих в митохондриях, в клетки поступает очень небольшое количество активного кислорода, способного отрицательно повлиять на жизнедеятельность дрожжей.

Как субстрат кислород очень важен для биосинтеза ненасыщенных жирных кислот и эргостерина, необходимых для роста клеток.

### 3.7.5. Температурный стресс

Температура оказывает значительное влияние на энергетический и конструктивный обмен клеток и, следовательно, воздействует на удельную скорость роста дрожжей и время генерации.

В определенных производственных условиях клетки могут испытывать температурный стресс (шок). Этот эффект проявляется, если дрожжи на короткий период времени подвергнуть воздействию достаточно высокой, но не губительной температуры. Устойчивость дрожжей к негативным внешним воздействиям связана с трегалозой, содержание которой в клетке определяется штаммовыми особенностями дрожжей и условиями культивирования.

Установлено, что клетки, пережившие воздействие высоких температур, приобретают не только термоустойчивость, но и спирто- и осмоустойчивость.

### 3.7.6. Другие виды стресса

На жизнедеятельности дрожжевых клеток отрицательно сказываются резкие колебания величины рН, гидростатический стресс, а также механический стресс в результате действия больших касательных напряжений (насосы, мешалки, регулировочные вентили).

**Величина рН** влияет на систему транспорта питательных веществ, на степень диссоциации компонентов среды, дисперсность, пространственную организацию и активность ферментных белков, на флокуляцию дрожжей.

Оптимальной величиной рН для размножения клеток пивных дрожжей является 4,8, так как при этом значении рН фермент транспорта мальтозы в клетку – мальтозопермеазы – имеет максимальную активность. При более низких значениях рН ускоряется потребление аминного азота.

По мере подкисления среды уменьшается заряд клетки и наблюдается ослабление взаимного отталкивания клеток и усиление флокуляции. В целом, дрожжи живут и размножаются в широком диапазоне рН от 2 до 6. Однако резкие колебания этого параметра также могут сказаться на активности ферментов, нарушении биосин-

тетической активности дрожжей и увеличении количества мертвых клеток.

**Гидростатический стресс** наблюдается при сбраживании сусла в высоких бродильных аппаратах (цилиндрикоконических танках – ЦКТ), высота которых может достигать 17–22 м. При этом происходит изменение проницаемости клеточных мембран и ферментной активности клеток.

**Механический стресс** возникает в результате действия больших касательных напряжений во время перемешивания дрожжей, перекачивания их из одной емкости в другую с помощью насосов. Эти механические операции могут «обдирать» поверхностный слой клеточной оболочки дрожжей, что приводит к изменению поверхностного потенциала клеточной стенки.

## 4. ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ ДРОЖЖЕЙ

Наиболее существенными компонентами дрожжевой клетки являются вода, азотсодержащие соединения, углеводы, жиры и минеральные вещества.

### 4.1. Вода

В клетках вода образует дисперсную систему сложных растворов неорганических и органических веществ, концентрация которых может достигать от 15 до 25 %.

Массовая доля воды в дрожжевой клетке составляет от 65 до 80 %. Различают внеклеточную и внутриклеточную фракцию воды. Внутриклеточная вода, в свою очередь, может находиться в свободном и связанном состоянии.

Свободная вода служит средой, в которой протекают биохимические реакции. Эта вода принимает непосредственное участие в процессах дыхания и гидролиза (например, гидролиз сахарозы с образованием фруктозы и глюкозы).

Связанная вода входит в клеточные структуры (биомембраны) и клеточные компоненты, например, ДНК. Она трудно удаляется при сушке или замораживании дрожжей. В прессованных дрожжах содержится до 20 % связанной воды, больше всего воды связывают

белки (0,2–0,6 г/г белка), фосфолипиды (0,3 г/г фосфолипидов), нуклеиновые кислоты и углеводы (0,3 г/г).

Соотношение между свободной и связанной водой определяется технологическими режимами культивирования дрожжей, а также техникой сепарирования и прессования готовой продукции.

#### **4.2. АЗОТСОДЕРЖАЩИЕ КОМПОНЕНТЫ ДРОЖЖЕВОЙ КЛЕТКИ**

Азотсодержащие компоненты дрожжевой клетки представлены белками, свободными аминокислотами и нуклеиновыми кислотами.

Белки, входящие в состав дрожжей, делятся на четыре фракции:

- альбумины, растворимые в воде;
- глобулины солерастворимые;
- фракция белка, растворимая в этаноле;
- фракция белка, растворимая в щелочи.

Наиболее известными белками дрожжей являются зимоказеин (фосфоглобулин) и церевизин.

Существуют два понятия при оценке количества белка в клетке – истинный белок и сырой протеин.

Истинный белок определяют спектрофотометрически по методу Лоури. «Сырой» протеин рассчитывают путем умножения на коэффициент 6,25 показателя общего азота в клетках, определяемого методом сжигания пробы по Кьельдалю. Этот показатель всегда будет выше, чем содержание истинного белка, так как общий азот в клетке представлен азотом белка, аминокислот, нуклеиновых кислот, аммиачным азотом (табл. 4.1).

Содержание белка в клетках зависит от многих факторов и прежде всего от концентрации азота в среде культивирования и величины засева.

Фракционный состав дрожжевого белка также определяется источником углерода. У дрожжей, выращенных на этаноле, в отличие от дрожжей, выращенных на мелассе, общее содержание белков выше, главным образом, за счет увеличения солерастворимой фракции.

Таблица 4.1

**Сравнение истинного содержания белка и сырого протеина  
в пекарских дрожжах**

Образец дрожжей	Истинный белок, % от СВ	Азот (N), % от СВ	«Сырой» протеин (N·6.25), %
1	33,7	6,0	37,5
2	35,7	8,0	50,0

В табл. 4.2 приведен перечень аминокислот (АК), входящих в состав дрожжевого белка, и их количество в клетках. Колебания в количественном содержании аминокислот в дрожжах объясняются неодинаковыми условиями культивирования дрожжей.

Таблица. 4.2

**Аминокислотный состав дрожжевого белка**

Аминокислоты	Аминокислоты, г/100 г СВ белка
<b>Незаменимые АК</b>	18,5–35,7
Лизин	3,5–9,8
Треонин	2,5–6,0
Валин	2,7–5,9
Метионин	0,9–2,8
Триптофан	0,7–1,5
Изолейцин	2,9–6,2
Лейцин	3,5–8,5
Фенилаланин	1,9–4,6
<b>Заменимые АК</b>	Около 22,3
Тирозин	0,7–6,0
Гистидин	0,6–3,3
Аргинин	1,1–5,4
Аспарагиновая кислота	Около 1,0
Глутаминовая кислота	8,7–14,0
Серин	Около 1,4
Пролин	Около 2,7
Цистин	0,5–2,3
Глицин	1,0–4,2
Аланин	Около 1,0

**Нуклеиновые кислоты.** Дрожжи богаты нуклеиновыми кислотами (НК): дезоксирибонуклеиновая (ДНК) и рибонуклеиновые кислоты (РНК). Соотношение РНК/ДНК в клетках составляет обычно около 25. В фазе интенсивного роста дрожжей количество РНК в клетках достигает 30 %, коммерческие пекарские дрожжи содержат 26 % от содержания белка в клетках.

Примерно 10 % от общего азота клеток составляет азот пуриновых (аденин и гуанин) и 4 % – азот пиримидиновых оснований (цитозин и тимин), входящих в нуклеиновые кислоты. Содержание ДНК в клетках, за исключением периода деления, достаточно постоянно, а количество РНК изменяется в зависимости от фазы роста.

Концентрация белков и НК в дрожжах зависит от температуры роста. При снижении температуры культивирования ниже оптимальной (30 °С) наблюдается увеличение содержания белка и РНК.

На примере хлебопекарных дрожжей показано, что во время хранения количество нуклеиновых кислот в дрожжах сначала возрастает, а затем уменьшается, что совпадает с началом автолиза клеток.

При дегидратации дрожжей также происходит уменьшение содержания НК, но при этом увеличивается количество нуклеотидов. Так, при дегидратации может разрушиться до 40 % клеточных РНК, причем этот процесс идет более интенсивно у дрожжей, выращенных на солодовом сусле, чем у дрожжей, культивируемых на мелассе.

**Свободные аминокислоты.** Дрожжевые клетки имеют два внутриклеточных фонда (пула) свободных аминокислот (АК). Фонд, способный к увеличению, в котором происходит накопление АК. Эти аминокислоты могут выходить из клеток в результате осмотического шока, что довольно часто наблюдается при внесении клеток в свежую питательную среду, содержащую высокую концентрацию питательных веществ. Это явление чаще всего наблюдается при культивировании дрожжей по способу «простая периодическая культура».

Так называемый «внутренний» резервный фонд является более постоянным. АК этого фонда непосредственно участвуют в биосинтезе белков. В период интенсивного размножения на долю этих АК приходится более 10 % от общего азота клеток.

Во внутриклеточном фонде преобладают глутаминовая кислота, аланин, лизин и аспарагиновая кислота.

На содержание свободных аминокислот в дрожжах влияют:

- количество утилизируемого азота в среде;
- источник углевода и его концентрация;
- концентрация биотина в среде;
- температура процесса;
- режим подачи питательных компонентов и т.п.

Обычно содержание свободных аминокислот в пекарских коммерческих дрожжах колеблется в пределах от 6 до 9 %.

### 4.3. УГЛЕВОДЫ

Углеводы составляют от 30 до 50 % от массы сухих веществ дрожжей. Они представлены трегалозой, гликогеном, глюканом, маннаном и хитином.

**Трегалоза** – запасной углевод, который находится в цитоплазме дрожжей. Трегалоза состоит из двух D-гликозидных остатков, связанных между собой  $\alpha$ -1,1 гликозидной связью.

**Гликоген** находится в цитоплазме в дисперсном состоянии в виде гранул. Гликоген – высокомолекулярный полисахарид, в котором D-гликозидные остатки связаны  $\alpha$ -1,4- и  $\alpha$ -1,6 связями.

Различают две фракции гликогена – щелоче- и кислоторастворимые. Щелочерастворимая фракция гликогена входит в состав протеинового комплекса, ответственного за гидролиз сахарозы и перенос глюкозы и фруктозы в цитоплазму. Кислоторастворимая фракция гликогена – это запасной углевод клетки.

**Маннан** – полимер маннозы, входит в состав клеточной стенки дрожжей, где он связан ковалентной связью с белками. Маннан, связанный с белком (маннанопротеин), обнаружен также в цитоплазматической мембране.

**Глюкан** содержится в клеточной стенке дрожжей. Он состоит из D-гликозидных остатков, связанных между собой  $\beta$ -связями.

**Хитин** входит в состав клеточных рубцов. Молекула хитина состоит из остатков N-ацетилглюкозамина. Он обладает высокой устойчивостью и растворим только в минеральных кислотах.

#### 4.4. Липиды

Дрожжевые клетки содержат связанные и свободные липиды. Связанные липиды входят в состав клеточных структур, свободные откладываются в клетке в виде жировых включений.

Количество липидов в дрожжах обычно не превышает 12 %, в том числе массовая доля свободных жирных кислот составляет 1–2 % от сухих веществ клетки. Свободные жирные кислоты являются запасными веществами. В клетках дрожжей имеются также другие компоненты, относящиеся к липидам: например, фосфолипиды, сквален и др. Их содержание невелико, но тем не менее они важны для жизнедеятельности дрожжей.

Условия культивирования, состав питательной среды и видовые особенности дрожжей во многом определяют их липидный состав в качественном и количественном отношении. Так, снижение температуры с 30 до 15 °С приводит к увеличению количества липидов в дрожжах до 14,5 %, при этом возрастает доля непредельных жирных кислот и фосфолипидов.

Основная часть дрожжевых липидов представлена триглицеридами (20–50 %) и фосфолипидами (15–60 % от содержания липидов в клетке). В меньшем количестве в дрожжах представлены свободные жирные кислоты (1–20 %), моно- и диглицериды (1–15 %). В табл. 4.3 даны сведения относительно липидного состава хлебопекарных дрожжей.

Линолевая, линоленовая, лауриновая, стеринавая и целый ряд других кислот составляют следы от общего количества жиров дрожжевой клетки. Неомыляемая часть общих липидов представлена стеринами; установлено, что из общего количества стерина (80 %) составляет эргостерин.

Таблица 4.3

##### Липиды хлебопекарных дрожжей

Компоненты	Липиды, % от общего количества липидов
Сложные эфиры стерина	4,7
Свободные жирные кислоты	2,9
1,3-диацилглицеролы	2,3

Компоненты	Липиды, % от общего количества липидов
Триацилглицеролы	3,9
1,2-диацилглицеролы	1,3
Свободные стеринны	17,8
Моноацилглицеролы	5,8
Фосфолипиды	61
В том числе:	
фосфатидилхолин	39,2
фосфатидилэтаноламин	27,1
фосфатидилсерин	3,8
фосфатидилинозитол	10,6

#### 4.5. МИНЕРАЛЬНЫЕ ВЕЩЕСТВА

Массовая доля минеральных веществ (золы) в дрожжах *S. cerevisiae* колеблется от 2 до 10 % СВ клетки. В основном они представлены фосфором, калием, магнием, кальцием и серой. Эти минеральные компоненты относятся к макроэлементам. Кроме этих элементов клетки содержат большое количество микроэлементов, среди которых следует обратить внимание на цинк, марганец, железо, медь, кобальт (табл. 4.4).

Таблица 4.4

#### Элементарный состав золы

Элементы	Содержание, % от СВ
Фосфор ( $P_2O_5$ )	1,9–5,5
Натрий ( $Na_2O$ )	До 0,1
Калий ( $K_2O$ )	1,4–4,3
Кальций ( $CaO$ )	0,005–0,2
Магний ( $MgO$ )	0,1–0,7
Алюминий ( $Al_2O_3$ )	0,002–0,02
Серя ( $SO_3^{-2}$ )	0,01–0,05
Хлор	0,004–0,1
Железо ( $Fe_2O_3$ )	0,005–0,012
Кремний ( $SiO_2$ )	0,02–0,2
Молибден	0,0007
Медь	0,003
Цинк	0,0039

## 4.6. ВИТАМИНЫ

Витамины – это биологически активные соединения, которые играют важную роль в метаболизме дрожжей. Основная их роль заключается в том, что они являются кофакторами или простетическими группами ферментов.

Дрожжи содержат водорастворимые витамины группы В, эргостерол, который под влиянием УФ лучей превращается в витамин D<sub>2</sub> (жирорастворимый). Содержание эргостерола в дрожжах превышает 2 % от СВ биомассы.

Количество витаминов в дрожжах зависит от их генетических особенностей, от состава питательной среды и типа энергетического обмена. Аэробные дрожжи содержат больше витамина В<sub>5</sub> (витамин РР) и В<sub>3</sub> (пантотеновая кислота), анаэробные – В<sub>1</sub> (тиамин) и эргостерол. В литературных источниках приводятся разноречивые сведения относительно содержания витаминов в дрожжах. Это, вероятно, связано с различными условиями культивирования клеток, в которых определяют витамины.

## 5. МЕТАБОЛИЗМ ДРОЖЖЕЙ

Метаболизм объединяет все ферментативные реакции, которые протекают в клетке, а также организацию и регуляцию этих реакций. С биохимической точки зрения обычно рассматриваются отдельные метаболические пути, однако в действительности они не существуют изолированно, а являются частью единого процесса.

Каждый биохимический путь состоит из ряда химических реакций, катализируемых ферментами. Фермент повышает скорость химической реакции и дает ей возможность протекать при физиологическом уровне температуры и рН. Экстремальные температура и/или рН инактивируют молекулу фермента, вызывая денатурацию белка.

Биохимические пути объединяют катаболические, анаболические, амфиболические и анаплеротические пути. Катаболические пути осуществляют распад более сложных соединений на менее сложные, при этом освобождается энергия в виде молекул АТФ. Анаболические (биосинтетические) пути потребляют энергию и синтези-

руют (обычно в процессе восстановления) простые молекулы, которые в дальнейшем участвуют в синтезе макромолекул. Амфиболические пути имеют как катаболические, так и анаболические функции: они являются центральными метаболическими путями, доставляющими от последовательных катаболических реакций промежуточные продукты, которые являются субстратами анаболических реакций. Когда во время действия катаболического ряда амфиболического пути промежуточные продукты удаляются для биосинтетических целей, катаболизм прекращается, пока снова не потребуются продукты для действия анаболических реакций. Функция анаболических реакций заключается в возмещении тех промежуточных продуктов, которые связывают катаболизм и анаболизм, таким образом обеспечивая продолжение действия амфиболических путей.

Энергия, образуемая в процессе окисления углеводов и потребляемая в биосинтетических реакциях, запасается в форме аденозинтрифосфата (АТФ). При гидролизе АТФ до аденозиндифосфата (АДФ) и неорганического фосфора освобождается при стандартных условиях около 30,5 кДж/моль. Эта величина является функцией рН, температуры и концентраций АТФ, АДФ и фосфора. Окислительные катаболические реакции включают перенос электронов от промежуточных продуктов. Этот процесс контролируется дегидрогеназами и часто включает участие кофактора – никотинамидадениндинуклеотида (НАД<sup>+</sup>). Электроны переносятся к НАД<sup>+</sup> в форме водородного иона [H<sup>+</sup>] с образованием НАДН<sub>2</sub>:



Биосинтетические реакции проходят при участии энергии АТФ.

Регуляция метаболизма осуществляется, прежде всего, за счет того, что биохимические реакции проходят в различных органеллах, которые локализованы в определенных местах клетки. Кроме того, контроль биохимических путей осуществляется с помощью других механизмов, таких как:

- регуляция количества синтезируемого фермента;
- регуляция деградации фермента;
- изменение скорости ферментативной активности с помощью аллостерического торможения или активации;

– использование ферментов при проведении одних и тех же реакций для разных целей. Например, алкогольдегидрогеназа (АДН) существует в виде двух форм: АДН1 используется, когда клетки растут на этаноле, превращая спирт в ацетальдегид, в то время как АДН2 используется клетками при росте на глюкозе и превращает ацетальдегид в этанол.

Далее будут обсуждены только основные аспекты метаболизма дрожжей, имеющих значение в технологии дрожжей.

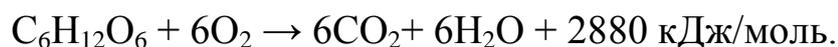
## 5.1. Гликолиз

Дрожжи сахаромицеты относятся к факультативным анаэробам, поэтому катаболизм глюкозы в клетке может проходить как в аэробных, так и в анаэробных условиях, его основная функция – это синтез АТФ.

В обоих случаях глюкоза через ряд ферментативных реакций расщепляется с образованием двух молекул пировиноградной кислоты (пирувата). Этот процесс носит название гликолиза, или «путь Эмбдена – Мейергофа – Парнаса (ЭМП)».

### Аэробное окисление глюкозы

В аэробных условиях глюкоза окисляется до  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$ . Суммарное уравнение:



Этот процесс включает несколько стадий:

– аэробный гликолиз. В нем происходит окисление 1 молекулы глюкозы до 2 молекул пировиноградной кислоты (ПВК), с образованием 2 молекул АТФ (сначала 2 АТФ затрачиваются, затем 4 образуются) и 2 молекул НАДН<sub>2</sub>;

– превращение 2 ПВК в 2 ацетил-КоА с выделением 2  $\text{CO}_2$  и образованием 2 НАДН<sub>2</sub>;

– цикл трикарбоновых кислот. В нем происходит окисление 2 молекул ацетил-КоА с выделением 4 молекул  $\text{CO}_2$ , образованием 2 ГТФ (дают 2 АТФ), 6 НАДН<sub>2</sub> и 2 ФАДН<sub>2</sub>.

Кроме того, после предварительного гидролиза до моносахаров дрожжи утилизируют сахарозу, мальтозу, мальтотриозу, а также внутренние углеводные резервы трегалозу и гликоген.

Гликолиз (рис. 5.1) начинается с фосфорилирования глюкозы и образования за счет макроэргической связи АТФ глюкозо-6-фосфата (Гл-6-Ф).

Источником D-глюкозы также служит гликоген, который является субстратом для фермента, отщепляющего гликозидные остатки с концов полисахаридных цепей гликогена. Следующая реакция на этом пути – изомеризация Гл-6-Ф во фруктозо-6-фосфат (Ф-6-Ф), осуществляемая глюкозофосфат изомеразой (ЕС 5.3.1.9). Эта реакция обратима.

Фр-6-Ф также образуется из фруктозы, поступающей непосредственно из питательной среды, а также при гидролизе сахарозы.

Третий фермент гликолитического пути, 6-фосфофруктокиназа, осуществляет образование Фр-1,6-дифосфата (Ф-1,6-Ф) из Фр-6-Ф и АТФ.

При этом на каждую молекулу глюкозы, вошедшую в цепь, потребляется две молекулы АТФ. Затем фруктозо-дифосфат-альдолаза – фермент, **содержащий цинк**, катализирует обратимое расщепление шестиуглеродной молекулы на две трехуглеродные – дегидроацетонфосфат и D-глицеральдегид-3-фосфат. Только последняя молекула подвергается дальнейшим превращениям по пути ЭМП, и равновесие между двумя триозофосфатами поддерживается триозофосфатизомеразой.

Далее D-глицеральдегид-3-фосфат идет на образование 1,3-дифосфоглицерата при участии фермента глицеральдегид-фосфат дегидрогеназы. Для этой реакции требуется источник неорганического фосфата. Это первая реакция в гликолитической цепи, которая включает окисление субстрата. Более того, это первая реакция, в которой образуется макроэргическая связь и свободная энергия окислительного процесса запасается в этой связи. На следующей ступени происходит перенос энергии этой связи на АДФ, так что образуется АТФ и 3-фосфо-D-глицерат, реакция катализируется фосфоглицерат-киназой. На этом участке цепи из каждой вошедшей в нее молекулы D-глюкозы или D-фруктозы образуются две молекулы АТФ и две молекулы НАДН<sub>2</sub>.

Метаболизм глюкозы в анаэробных условиях

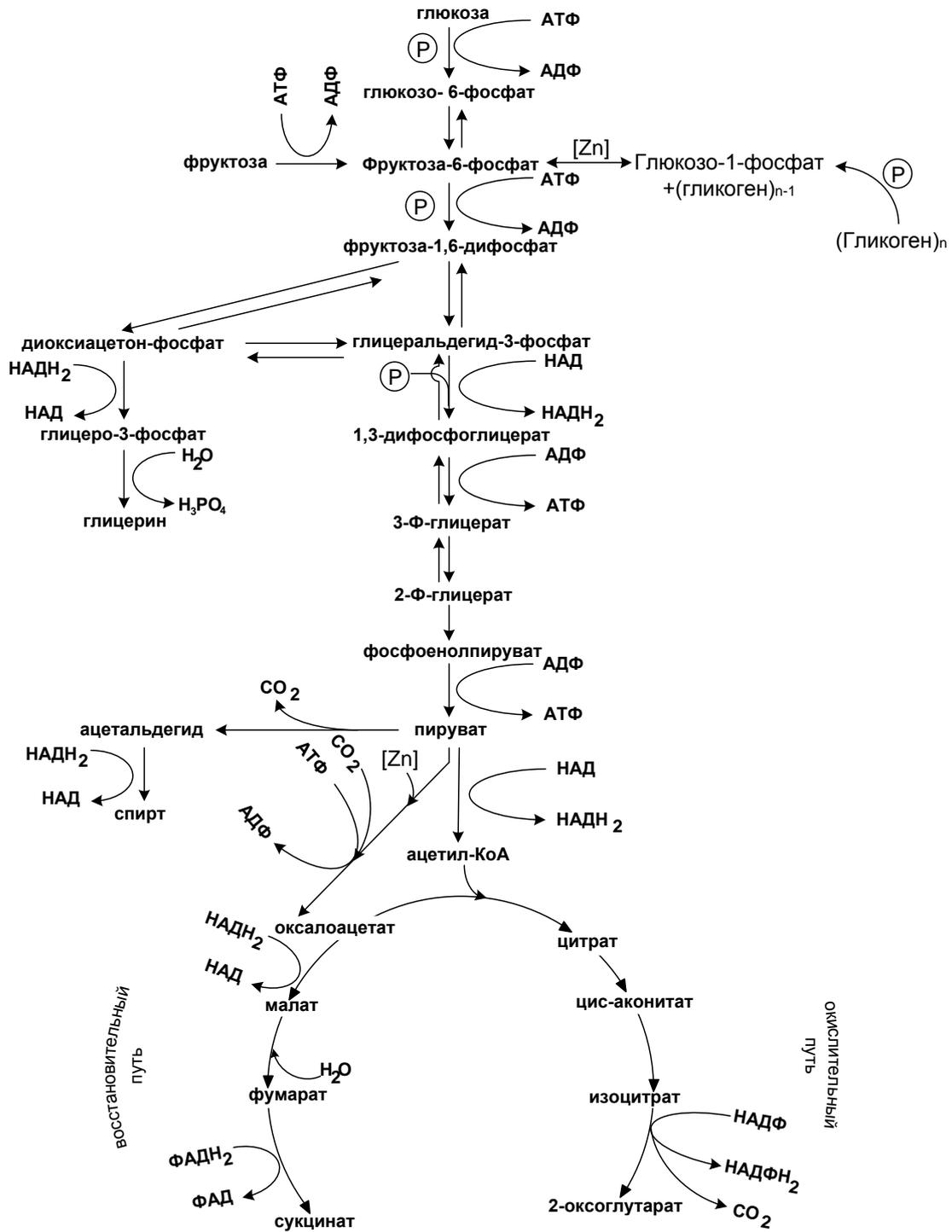


Рис. 5.1. Метаболизм этанола и глицерина

С помощью фосфоглицеромутазы 3-фосфо-D-глицерат превращается в 2-фосфо-D-глицерат. Затем энолаза (ЕС 4.2.1.11) в качестве посредника способствует удалению воды из 2-фосфо-D-глицерата, что приводит к образованию фосфоэнолпировиноградной кислоты (ФЕП). Богатая энергией связь в фосфоэнолпировате (до  $= - 61,9$  кДж/моль) используется затем для фосфорилирования АДФ, в результате чего образуются АТФ и пировиноградная кислота. В этой точке на каждую молекулу включенной в метаболизм глюкозы возникают две молекулы АТФ и 2 молекулы НАДН<sub>2</sub>.

Таким образом, в результате прохождения гликолитического пути образуется запас энергии в виде двух молекул АТФ.



В табл. 5.1 указаны ферменты, принимающие участие в гликолизе, их коферменты, активаторы и ингибиторы. Эти данные можно использовать для регулирования гликолиза при разработке технологии дрожжей, а также в других производствах, где используются дрожжи.

Таблица 5.1

#### Активаторы и ингибиторы гликолиза

Фермент	Кофермент, кофактор	Активатор, стимулятор	Ингибитор
Гексокиназа	$\text{Mg}^{+2}$	$\text{Mg}^{+2}$ , АДФ	Г-6-Ф, ацетил-КоА, ФЕП, ЖК*
Глюкозофосфат изомераза	$\text{Mg}^{+2}$	–	АТФ, цитрат, ЖК*
6-фосфофруктокиназа	$\text{Mg}^{+2}$	АДФ, АМФ, $\text{K}^+$ , $\text{NH}_4^+$	ФЕП, НАДН
Фруктозо-дифосфат-альдолаза	–	$\text{Zn}^{+2}$ , $\text{Co}^{+2}$ , $\text{Fe}^{+2}$ , $\text{K}^+$	Цистеин
Триозофосфат-изомераза	$\text{Mg}^{+2}$	–	$\text{Hg}^{+2}$
Глицеральдегид-фосфатдегидрогеназа	$\text{Zn}^{+2}$ , $\text{НАД}^+$	–	Иодацетат, $\text{Mg}^+$

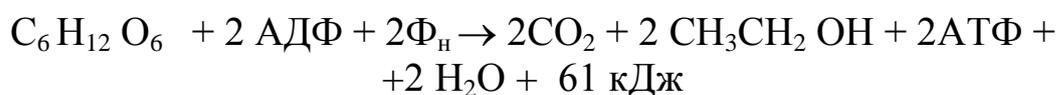
Фермент	Кофермент, кофактор	Активатор, стимулятор	Ингибитор
Фосфоглицерат-киназа	–	Mg <sup>+2</sup>	–
Фосфоглицеромутаза	Mg <sup>+2</sup> , 2,3-диф- глицерат	–	–
Енолаза	Mg <sup>+2</sup> , Mn <sup>+2</sup>	–	F <sup>-</sup> , Ca <sup>+2</sup>
Пируватдекарбоксилаза	K <sup>+</sup> , Mg <sup>+2</sup> или Mn <sup>+2</sup>	Фр-1,6-Ф, Г-6-Ф	Ca <sup>+2</sup> АТФ, НАДН, ЖК*, ацетальдегид
Гликогенфосфорилаза	P (неорганический) пиридоксаль- фосфат	Фосфосерин	
Фосфоглюкомутаза	Zn <sup>+2</sup> , Гл-1,6-Ф	Серин	

\*ЖК – жирные кислоты.

## 5.2. СПИРТОВОЕ БРОЖЕНИЕ

Гликолиз является первым этапом спиртового брожения. Образовавшаяся пировиноградная кислота декарбоксилируется при участии декарбоксилазы в ацетальдегид, который затем восстанавливается до этанола. Эта реакция осуществляется алкогольдегидрогеназой с участием НАДН<sub>2</sub> (табл. 5.2). В ходе этой реакции НАДН<sub>2</sub> окисляется до НАД<sup>+</sup> (см. рис. 5.1), который далее вновь участвует в гликолизе. Именно за счет использования ацетальдегида в качестве конечного акцептора электронов клетка обеспечивает дальнейшее функционирование гликолитического пути и вследствие этого – дальнейшее образование АТФ для использования в биосинтетических реакциях.

Энергетический и химический баланс брожения:



Таким образом, выход АТФ в пути ЭМП составляет 2 молекулы на молекулу глюкозы. Эффективность брожения составляет 26 %; 74 % энергии не удерживается клеткой и в основном рассеивается в виде тепла, поэтому следует применять охлаждение аппаратов. Скорость брожения непостоянна, и наибольшая активность наблюдается первые 24–36 ч. Затем ввиду ингибирования клеток этанолом этот процесс замедляется.

Таблица 5. 2

### Активаторы и ингибиторы спиртового брожения

Фермент	Кофермент, кофактор	Активатор, стимулятор	Ингибитор
Пируватдекарбоксилаза	Тиаминпирофосфат	Тиамин, $Mg^{+2}$ , $Mn^{+2}$ или $Co^{+2}$	Ацетальдегид, $O_2$
Алкогольдегидрогеназа	НАДН, $Zn^{+2}$	–	–

Для протекания спиртового брожения в питательной среде должны присутствовать тиамин (витамин  $B_1$ ), а также ионы  $Zn^{+2}$ ,  $Co^{+2}$ ,  $Mg^{+2}$  и  $Mn^{+2}$  (см. табл. 5.2). Например, увеличение концентрации ацетальдегида вследствие замедления его восстановления в этанол происходит из-за недостатка ионов  $Zn^{+2}$  в среде, в результате Ф-1,6-Ф идет на биосинтез глицерина (см. рис. 5.1). Кислород является ингибитором брожения (эффект Пастера), механизм этого процесса будет рассмотрен ниже.

Гликолитическая последовательность реакций является примером амфиболического пути, в ходе которого в биосинтетических реакциях клеткой используются различные промежуточные продукты:

- фосфорилированная глюкоза (Гл-1-Ф) является предшественником в синтезе полимеров клеточной стенки и резервных углеводов;
- триозофосфаты используются в синтезе жиров;
- фосфоенолпируват и пируват являются предшественниками некоторых аминокислот (рис. 5.2).

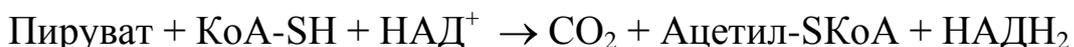


Однако размножающиеся клетки требуют значительно больше промежуточных продуктов для биосинтетических реакций, чем может предоставить путь ЭМП. Это такие вещества, как сукцинат, 2-оксоглутарат, оксалоацетат, которые являются предшественниками в синтезе восьми аминокислот. У дышащих дрожжевых клеток, т. е. таких, которые используют молекулярный кислород в качестве акцептора водорода и полностью окисляют глюкозу, синтез предшественников аминокислот протекает в цикле Кребса (ЦТК).

В анаэробных условиях активность ферментов цикла Кребса низкая. В результате из-за недостатка ключевого фермента 2-оксоглутаратдегидрогеназы, активность которого определяется концентрацией растворенного в среде кислорода, на участке сукцинат – 2-оксоглутарат ЦТК разомкнут (см. рис. 5.1).

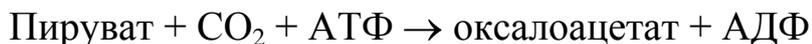
При недостатке в среде растворенного кислорода у дрожжей функционируют два механизма, которые обеспечивают клетку необходимыми метаболитами: первый предусматривает образование сукцината, фумарата, малата и оксалоацетата в окислительном процессе, в то время как второй включает синтез дополнительных ферментов для образования 2-оксоглутарата по восстановительному пути (см. рис. 5.1). Согласно обоим механизмам, пируват превращается в ацетил-КоА в реакции, включающей пируватдегидрогеназный комплекс, в состав которого входит пируватдегидрогеназа, дигидроамид-ацетилтрансфераза, дигидроамидредуктаза. В качестве коферментов комплекс содержит  $Mg^{+2}$ , тиаминпирофосфат, флавинадениндинуклеотид (ФАД) и никотинамиддинуклеотид (НАД).

Суммарная реакция имеет следующий вид:



Таким образом, обмен глюкозы при недостатке кислорода в среде соответствует ЦТК в аэробном метаболизме: окислительный путь ведет от оксалоацетата к 2-оксоглутарату, восстановительный – к сукцинату.

Вовлечение оксалоацетата в разорванный ЦТК предполагает дополнительный синтез оксалоацетата за счет протекания анаплеротической (восполняющей) реакции:



Катализирует эту реакцию АТФ и пируваткарбоксилаза – фермент, в котором биотин является простетической группой, а цинк – коферментом. Это единственная реакция, которую можно рассматривать как анаплеротическую в ходе ЦТК, которая восполняет недостаток оксалоацетата, расходуемого для биосинтетических реакций.

### **5.3. АЭРОБНЫЙ МЕТАБОЛИЗМ УГЛЕВОДОВ**

Аэробный метаболизм углеводов так же, как и анаэробный, имеет одинаковый механизм вплоть до образования пирувата (см. рис 5.1). Особое внимание в этой последовательности реакций следует уделить ЦТК, который выполняет следующие функции:

- энергетическую;
- биосинтетическую;
- регуляторную.

#### **Энергетическая функция**

В аэробных условиях пируват поступает в ЦТК (см. рис. 5.2), в котором, пройдя ряд превращений, полностью окисляется в последовательном процессе реакций дыхательной цепи. Энергетическая значимость ЦТК заключается в том, что при утилизации одной молекулы глюкозы образуются 36 молекул АТФ:



## Биосинтетическая функция

Соединения, участвующие в цикле, образуют резерв промежуточных веществ, которые дают начало обратимым процессам в дрожжах. Эти процессы метаболизма связывают в единое целое различные реакции синтеза и распада. С этой точки зрения отдельные реакции ЦТК занимают центральное место. Это прежде всего биосинтез оксоглутарата, оксалоацетата и сукцинил-КоА.

Оксоглутарат является самым важным акцептором аминогрупп в реакциях переаминирования. В результате получается глутамат, далее глутамин, который является предшественником в синтезе пролина, орнитина, аргинина и других метаболитов. Кроме того, из глутамата образуется лейцин и  $\gamma$ -аминомасляная кислота, которая затем окисляется в яблочную.

Оксалоацетат является ключевым соединением в процессе гликонеогенеза (превращения жиров в сахараиды). Обратимое переаминирование оксалоацетата приводит к образованию аспартата, который служит исходным соединением для синтеза других аминокислот (метионин, треонин и изолейцин) и пиримидиновых нуклеотидов (см. рис. 5.2).

Большинство реакций переаминирования протекает в цитоплазме и лишь немногие в митохондриях.

Сукцинил-КоА играет большую роль в дыхательном метаболизме, так как способствует замыканию ЦТК. Производные сукцинил-КоА входят в состав окислительно-восстановительных ферментов (пероксидаза, каталаза) и цитохромы, которые переносят электроны от дегидрогеназ к кислороду, в результате выделяется энергия, которая запасается в АТФ.

## Регуляторная функция

Вхождение в ЦТК соединений, находящихся на перекрестке важных метаболических путей, делает его существенным регуляторным фактором митохондриального и всего клеточного обмена.

Регулирование ЦТК осуществляется на двух уровнях – энергетическом и субстратном.

*Регулирование ЦТК на энергетическом уровне.* Вхождение в цикл Ац-КоА контролируется концентрацией АТФ в дрожжевой

клетке. При высокой величине отношения АТФ/АМФ тормозится вхождение Ац-КоА в ЦТК, при этом в зависимости от наличия в среде факторов роста и интенсивности аэрации увеличивается синтез либо жиров, либо углеводов.

Уменьшение величины отношения АТФ/АМФ свидетельствует о высокой биосинтетической деятельности дрожжей. При этом наблюдается стимуляция реакций ЦТК через активирование таких ферментов, как цитратсинтаза, изоцитратдегидрогеназа и малатдегидрогеназа, в результате чего от соответствующих субстратов отщепляется  $H^+$ .

*Регулирование ЦТК на субстратном уровне.* Оно заключается в изменении биосинтеза цитрата и Ац-КоА. Концентрация цитрата в клетке определяет пастеровский эффект у дрожжей и регулирует начальный этап биосинтеза жиров. В тех случаях, когда скорость окисления в ЦТК ограничена концентрацией оксалоацетата, накопление Ац-КоА ведет к образованию оксалоацетата путем активации пируваткарбоксилазы. При высокой концентрации АТФ, когда цитратсинтаза ингибируется, накопление пирувата и Ац-КоА стимулирует синтез оксалоацетата, а так как синтез цитрата заторможен, оксалоацетат при участии фосфопируваткарбоксикиназы превращается в ФЭП (фосфоенолпируват) и далее в углеводы (рис. 5.3). При этом важно отсутствие лимита по витамину  $B_7$  (биотин).

#### **5.4. ПАСТЕРОВСКИЙ ЭФФЕКТ И МЕХАНИЗМЫ ЕГО РЕГУЛИРОВАНИЯ**

В присутствии кислорода дрожжи сравнительно быстро к нему адаптируются. Эту способность впервые обнаружил Пастер, и явление было названо пастеровским эффектом (ПЭ). Суть ПЭ заключается в подавлении брожения дыханием, снижении скорости потребления субстрата (глюкозы) и увеличении доли сахара, идущего на синтез биомассы.

Регулирование эффекта Пастера проходит на двух уровнях – энергетическом и субстратном.

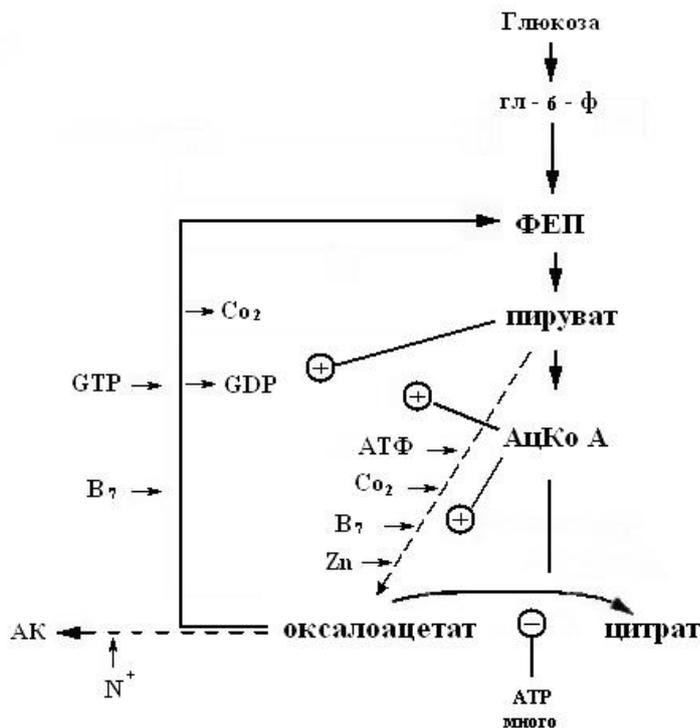


Рис. 5.3. Образование фосфоенолпирувата

*Регулирование эффекта Пастера на энергетическом уровне* заключается в повышении содержания АТФ в клетках, что приводит к замедлению скорости реакции превращения Фр-6-Ф во Фр-1,6-дифосфат, катализируемой ферментом фосфофруктокиназой, и, наоборот, АМФ интенсифицирует скорость этой реакции.

*Регулирование эффекта Пастера на субстратном уровне* можно рассматривать с точки зрения влияния ацетил-КоА и оксалоацетата, с одной стороны, и цитрата – с другой.

Так при недостатке в питательной среде биотина и ионов  $Zn^{+2}$  резко уменьшается скорость образования оксалоацетата, в результате чего работа цикла замедляется, следовательно, снижается выход биомассы и увеличивается синтез этанола. К такому же эффекту приводит недостаточное снабжение клеток витаминами  $B_1$  (тиамин) и  $B_3$  (пантотеновая кислота). Это приводит к снижению скорости синтеза ацетил-КоА, в результате чего уменьшается образование цитрата – исходного компонента ЦТК.

**Цитрат** представляет собой **второй аллостерический** (по принципу обратной связи) регулятор активности фосфофруктокиназы

(ФФК): увеличение содержания цитрата в дрожжах приводит к торможению активности ФФК.

Еще одним активатором ПЭ является кислород. Так, в присутствии  $O_2$  пируват преимущественно превращается в Ац-КоА, так как пируватдегидрогеназа имеет более выраженное сродство к пирувату, чем пируватдекарбоксилаза.

## 5.5. ЭФФЕКТ КРЕБТРИ

Особенность метаболизма сахаромикетов заключается в наличии у них эффекта Кребтри (либо глюкозный эффект, либо катаболитная репрессия), суть которого состоит в том, что, несмотря на интенсивную аэрацию в среде с высокой концентрацией сахара, часть субстрата сбрасывается на спирт, т.е. имеет место «аэробное брожение».

Для эффекта Кребтри характерно действие одновременно двух энергетических путей – аэробного и анаэробного. При этом выход биомассы изменяется в широких пределах в зависимости от массовой доли и природы углевода в среде.

Для *S.cerevisiae* установлено, что при концентрации глюкозы (фруктозы) в среде более 0,1 % наблюдается репрессия синтеза ферментов ЦТК, цитохромов и ферментов дыхательной цепи даже при отсутствии лимита по кислороду. Эффект Кребтри при использовании в качестве углеводного питания глюкозы и фруктозы выражен значительно сильнее, чем на мальтозе, мальтотриозе или галактозе.

Мальтоза и мальтотриоза не вызывают репрессивного действия на дыхание у штаммов дрожжей низового брожения.

В отсутствие репрессирующей концентрации глюкозы и при наличии в среде достаточного количества растворенного молекулярного кислорода дрожжи метаболизируют глюкозу дыхательным путем. В этом случае глюкоза полностью окисляется до  $CO_2$  и воды. Это достигается через деятельность гликолитического пути и ЦТК. Образованный НАДН<sub>2</sub> окисляется до НАД<sup>+</sup> с помощью цепи электронного транспорта с использованием кислорода в качестве акцептора водорода (таким путем образуется вода) и в процессе синтеза АТФ. Следовательно, именно массовая доля углевода в среде определяет преобладающий тип энергетического обмена в клетках, а зна-

чит, и выход биомассы. Во время катаболической репрессии наблюдается деградация митохондрий, количество их уменьшается в 3–5 раз, кроме того, изменяется их морфология: увеличивается размер и исчезают кристы.

## **5.6. КОНСТРУКТИВНЫЙ ОБМЕН ДРОЖЖЕЙ**

Метаболизм, или обмен веществ, включает в себя такие процессы, как:

- катаболизм – распад веществ до соединений с меньшей молекулярной массой;
- амфиболизм – синтез промежуточных веществ из этих соединений;
- анаболизм – образование из промежуточных соединений сложных веществ, например, белков, жиров и углеводов.

С целью регулирования химического состава дрожжей рассмотрим механизмы образования некоторых соединений: структурных, запасных углеводов, аминокислот, которые идут на синтез белка, и жиров.

### **5.6.1. СИНТЕЗ РЕЗЕРВНЫХ УГЛЕВОДОВ**

Резервные углеводы представлены в клетках дрожжей тремя фракциями: трегалозой, гликогеном, растворимым в уксусной кислоте, и гликогеном, растворимым в хлорной кислоте.

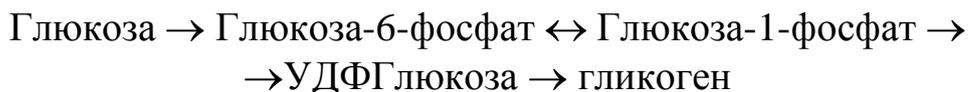
Метаболически активные фракции накапливаются не одновременно. Содержание гликогена растет в фазе замедления роста, в то время как трегалоза аккумулируется при переходе культуры к стационарной фазе.

#### **Гликоген**

Гликоген находится в цитоплазме в виде гранул, некоторое его количество обнаружено в клеточной оболочке. Это осмотически неактивный полисахарид, способный быстро использоваться в процессе метаболизма дрожжей.

Молекула гликогена представляет собой разветвленную структуру, в которой гликозидные остатки связаны между собой  $\alpha$ -1,4 и  $\alpha$ -1,6 связями.

Синтез гликогена начинается с образования уридиндифосфат-глюкозы (УДФГл), катализируемого ферментом глюкозо-1-фосфатуридилтрансферазой. Гликоген-синтаза-Д-фосфатаза катализирует последовательное присоединение глюкозного остатка УДФГл к полисахаридному акцептору:



Гликоген потребляется дрожжами как первичный источник энергии, поэтому его количество значительно уменьшается в первые 10–12 часов после введения дрожжей в питательную среду, а потом вновь возрастает. Масса гликогена может составлять до 30 % массы клетки (в пересчете на сухое вещество). Во время хранения дрожжей содержание гликогена в клетках уменьшается в связи с его использованием для поддержания их жизнедеятельности (эндогенного дыхания). Чем выше температура, при которой хранятся дрожжи, тем интенсивнее снижается в них количество гликогена.

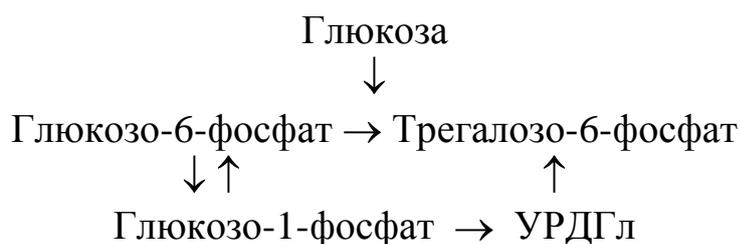
Гликогенолиз (распад гликогена) начинается с деградации гликогена под действием фосфорилазы. В присутствии фосфата от гликогена отщепляется глюкозо-1-фосфат, который превращается фосфоглюкомутазой в глюкозо-6-фосфат. Энергетический выход гликогенолиза выражается в синтезе трех молекул АТФ в расчете на одно звено глюкозы молекулы гликогена.

## Трегалоза

Трегалоза – резервный дисахарид, состоящий из двух гликозидных остатков. Трегалоза находится в цитоплазме дрожжевой клетки; часть трегалозы связана с клеточной стенкой и защищает ее от внешнего воздействия. В отличие от гликогена трегалоза, наряду с ее энергетической функцией, участвует в поддержании структуры цитозоля, а также может служить осмотическим барьером для выхода из клеток воды в стрессовых условиях.

Содержание трегалозы варьирует в зависимости от степени аэробно-анаэробного брожения, в бродящих дрожжах ее может накопиться до 6 %, в дышащих – до 18 %.

Синтез трегалозы так же, как и гликогена, начинается с образования УДФГл, при этом трегалозо-6-фосфат синтезируется как из УДФГл, так и из Гл-6-Ф при участии  $\alpha, \alpha$ -трегалозофосфатсинтазы. Трегалоза образуется под действием трегалозофосфатазы по следующей схеме:



Направление потока Гл-6-Ф на синтез того или другого углевода регулируется его концентрацией внутри клетки. При высокой концентрации образуется гликоген, при низкой – трегалоза.

### **Роль трегалозы и гликогена в метаболизме дрожжей**

Первичным резервным веществом дрожжевой клетки является гликоген, так как во время хранения именно он используется в качестве эндогенного источника углеводного питания. Освободившаяся при этом энергия используется клеткой для поддержания собственных структур, при этом предотвращается распад структурных полисахаридов и ферментных белков, т.е. лизис дрожжей. Предполагается, что энергетические потребности клетки в процессе обезвоживания также удовлетворяются за счет гликогена. В период лаг-фазы метаболизм гликогена дает энергию и, вероятно, субстрат для синтеза стеролов, необходимых в процессе роста дрожжей. Следовательно, продолжительное хранение дрожжей может привести к истощению запаса гликогена без сопутствующего образования стеролов. В результате наблюдается ухудшение физиологического состояния дрожжей, а следовательно, снижение скорости роста клеток и выхода биомассы.

В отличие от гликогена роль трегалозы как резервного вещества подвергается сомнению, так как в отсутствие источников углеводов

ного и азотного питания она не метаболизируется. Однако неоспорима ее роль в лаг-фазе роста дрожжей. При наличии в среде необходимых для размножения субстратов трегалоза исчезает из клеток за 45 мин, после чего начинает утилизироваться глюкоза.

### **Влияние условий культивирования на синтез резервных углеводов**

Синтез гликогена и трегалозы активизируется при переходе культуры из логарифмической фазы в фазу замедления роста, т.е. во время снижения удельной скорости роста дрожжей.

Скорость роста можно регулировать:

– путем ограничения размножения культуры дрожжей различными компонентами питательной среды (С, N, P, S и т.п.). Чаще всего эта цель достигается снижением дозировки либо азотного, либо углеводного питания, либо того и другого одновременно. Установлено, что при одной и той же скорости роста клетки, выращенные в условиях лимита глюкозы, содержат больше резервных углеводов, чем при недостатке азота;

– путем направления энергетического обмена дрожжей. Так, для преимущественного накопления трегалозы необходима высокая степень аэробности культуры, а главное – исключение катаболитной репрессии;

– путем создания определенных физико-химических условий культивирования (температуры, рН, осмотического давления). Увеличению содержания трегалозы в растущей культуре способствует повышение температуры. Можно также дифференцированно управлять синтезом гликогена и трегалозы в покоящихся дрожжах с помощью температуры. Оптимум температуры для накопления гликогена 30 °С, для трегалозы 45 °С. При такой температуре накапливается до 20 % трегалозы от абсолютно сухой массы клеток.

#### **5.6.2. СТРУКТУРНЫЕ ПОЛИСАХАРИДЫ**

Клеточная стенка, состоящая из глюкана и маннанопротеидов, является активно функционирующей органеллой. Маннанопротеиды

и глюканы синтезируются разными путями. Первые синтезируются внутри клетки и по мере синтеза экскретируются и откладываются на поверхности. Глюкан, вероятно, синтезируется при участии цитоплазматической мембраны. Отмечается высокая подвижность компонентов, входящих в клеточную стенку. Так, при пересеве в свежую среду количество глюкана и маннанопротеидов сначала снижается, а затем стремительно возрастает. При этом наблюдается четкая корреляция между динамикой глюкана и резервного гликогена. Когда снижается количество глюкана, накапливается гликоген и, наоборот, накоплению глюкана сопутствует падение уровня гликогена в клетках.

Во время обезвоживания снижается содержание в дрожжах гликогена и маннана, тогда как доля трегалозы и глюкана возрастает. Это согласуется также с представлением о том, что соотношение между маннаном и глюканом определяет форму клетки. Если величина этого отношения меньше единицы, то клетки приобретают округлую форму, вероятно, в результате их обезвоживания.

### 5.6.3. БИОСИНТЕЗ АМИНОКИСЛОТ

В состав белков дрожжей входят алифатические (глицин, аланин, серин, треонин, валин, лейцин, изолейцин, аспарагин, глутамин, лизин, аргинин, цистин и метианин), ароматические (тиразин, фенилаланин) и гетероциклические (пролин, гистидин и триптофан) аминокислоты.

Аминокислоты (АК) играют большую роль в процессе синтеза биомассы, а также в биосинтезе вторичных метаболитов, в частности высших спиртов и дикетонов.

Уровень ассимилируемого азота в среде определяет:

- скорость роста дрожжей;
- выход биомассы;
- скорость утилизации сахара;
- скорость брожения.

При наличии в среде утилизируемого азота дрожжи способны синтезировать все двадцать аминокислот, из которых строятся белки. **Дрожжи утилизируют аминокислоты, ди- и трипептиды, аммиачный азот.** Нитраты, нитриты, аминокислоты белков дрожжами не

ассимилируются. При этом в качестве источника азота дрожжевые клетки предпочтительно используют аминокислоты, присутствующие в питательной среде или составляющие **аминокислотный пул**. В последнем случае аминокислоты находятся в вакуолях.

Состав аминокислот и их количество в аминокислотном пуле постоянно изменяется и зависит от внешних факторов, особенно концентрации ассимилируемого азота на предыдущих стадиях культивирования. Отсутствие лимита по азоту способствует повышению концентрации АК в посевном материале. Это тормозит приток их из внешней среды и предполагает выделение АК из клетки. Таким образом, даже при отсутствии в среде ассимилируемого азота могут происходить процессы, связанные с синтезом биомассы и вторичных метаболитов, однако эти процессы быстро завершаются. Второй причиной увеличения АК в дрожжах может быть автолиз клеток, который происходит при исчерпании экзогенного утилизируемого азота сула. Например, увеличение содержания свободных АК в клетках связано с активацией внутриклеточных протеолитических ферментов. Обычно это происходит при попадании гидролитических ферментов, содержащихся в лизосомах, и образовании так называемых вторичных вакуолей, которые занимают более 2/3 объема клеток (см. рис. 3.7). Во избежание автолиза дрожжей питательную среду наряду с другими источниками питания необходимо дополнить утилизируемыми источниками азота в виде аминокислот и аммиачного азота.

Свободные аминокислоты, находящиеся в питательной среде, иногда не подвергаются изменениям и в небольшом количестве используются непосредственно в биосинтезе белка. Последовательность аминокислотной ассимиляции может значительно меняться от условий культивирования. Например, подъем давления приводит к снижению потребления валина, метионина, изолейцина, лейцина и гистидина. Однако большинство поступающих в клетку аминокислот подвергается действию трансаминазы, которая удаляет их аминокислотные группы, оставляя углеводный скелет, который метаболизируется. Основное место в системе трансаминирования у дрожжей занимает 2-оксоглутарат как акцептор аминокислотных групп; образующийся при этом глутамат может быть использован в качестве донора аминокислотной группы для построения других аминокислот из остатков, образованных при протекании анаболических путей.

**Биосинтез нуклеотидов.** Пуриновые и пиримидиновые нуклеотиды участвуют в синтезе нуклеиновых кислот, они входят в состав многих коферментов и участвуют в активации и переносе аминосугаров, аминокислот, компонентов клеточной стенки и липидов. Исходным метаболитом для их синтеза служит рибозо-5 фосфат.

#### 5.6.4. ЖИРОВОЙ ОБМЕН

**Липиды** дрожжей представлены триацилглицеридами, фосфолипидами и стеринами. Триацилглицериды являются предшественниками длинноцепочечных жирных кислот и глицерина. Дрожжевые липиды содержат преимущественно жирные кислоты с 16 и 18 углеродными атомами.

**Жирные кислоты** могут быть насыщенными и ненасыщенными (с одной или двумя связями). В дрожжах преобладает содержание таких ненасыщенных аминокислот, как пальмитиновая (C 16:0) и стеариновая (C 18:0). Ненасыщенные жирные кислоты в основном представлены пальмитолеиновой (16:1), олеиновой (C 18:1) и линолевой (C 18:2) кислотами.

**Фосфолипиды** являются замещенными диацилглицерофосфатами, наиболее обычные заместители – холин, этаноламин, серин или инозит.

Липиды участвуют в регулировании окислительно-восстановительных процессов при дыхании клеток, входят в состав мембран всех органоидов клетки, в том числе мембран митохондрий, образуют липопротеиновый комплекс с белками, входящими в состав протоплазмы и т.д. При гидролизе одной молекулы АТФ в дрожжевой клетке может освободиться до 52 кДж.

Кроме того, липиды выполняют **роль запасных** веществ клеток дрожжей. Распад нейтральных липидов и фосфолипидов происходит за счет гидролитического действия липаз, в результате образуются глицерин и жирные кислоты. Глицерин далее фосфорилируется до глицеро-1-фосфата, дегидрируется до диоксиацетон-фосфата, который участвует в процессе гликолиза. Жирные кислоты подвергаются  $\beta$ -окислению в матриксе митохондрий. Жирные кислоты с короткой углеродной цепочкой, содержащей от 4 до 10 атомов углерода (ЖКК), проникают в митохондрию. Для длинноцепочечных жирных кислот (ЖКД) внутренняя мембрана непроницаема, они переходят в

матрикс в виде ацилкарнитинов, которые образуются во внутримембранном пространстве. В результате полного окисления пальмитиновой кислоты образуется 8 молекул Ац-КоА, которые далее поступают в ЦТК. Общий выход АТФ составляет 17 молекул на каждый фрагмент из двух углеродных атомов.

Преобладающие стеринны – эргостерин и зимостерин, обнаружены и другие стеринны и их эфиры. Все три вида липидов являются важными компонентами клеточной мембраны дрожжей. Так как клеточная мембрана контролирует проникновение в клетку питательных веществ и выделение метаболитов из клетки, её функция необходима для роста и размножения клетки. Синтез стериннов также включает участие НАДФ<sup>+</sup>-зависимой смешанно-функциональной оксидазы. Потребность дрожжей в молекулярном кислороде более актуальна для синтеза стериннов, чем для образования жирных кислот. Недостаточная концентрация растворенного в среде кислорода уменьшает выход биомассы и снижает их жизнеспособность, так как клетки в этом случае не могут синтезировать ненасыщенные жиры для построения клеточной мембраны.

### Синтез жирных кислот

Дрожжи могут усваивать жирные кислоты из питательной среды либо синтезировать их самостоятельно.

Исходным метаболитом в синтезе насыщенных жирных кислот является цитоплазматический Ацетил-КоА и диоксид углерода, которые под действием фермента Ацетил-КоА-карбоксилазы, содержащего простетическую группу биотин, превращаются в малонин-КоА – непосредственного предшественника 14 из 16 атомов углерода молекулы пальмитиновой кислоты. Коферментом ацетил-КоА-карбоксилазы является  $Mn^{+2}$ .

Реакция, катализируемая Ацетил-КоА-карбоксилазой, является лимитирующей стадией всего процесса синтеза жирных кислот. Биотин служит переносчиком молекулы  $CO_2$  в двухступенчатой реакции.

*Первая ступень:*

$CO_2 + АТФ + Биотин-фермент \rightarrow Карбоксибиотин-фермент + АДФ + Ф$   
Реакция катализируется также ионами марганца ( $Mn^{+2}$ ).

*Вторая ступень:*



Ацетил-КоА образуется в митохондриях либо из пирувата (реакции 1 и 2), либо при окислении жирных кислот, содержащих в углеродной цепи от 4 до 10 атомов углерода. Эти низкомолекулярные жирные кислоты свободно проходят через мембрану митохондрий (перенос облегчается соединением их с карнитином). Исходными метаболитами в образовании Ац-КоА могут быть также аминокислоты (рис. 5.4).



Рис. 5.4. Биосинтез жирных кислот

Следует обратить внимание, что синтез жиров происходит в цитоплазме. Между тем внутренняя мембрана митохондрий непроницаема для ацетил-КоА. Поэтому он сначала конденсируется с оксалоацетатом с образованием цитрата, который легко проникает в цитоплазму. В цитоплазме цитрат при участии АТФ распадается под дей-

ствием цитрат омыляющего фермента на оксалоацетат и исходный ацетил-КоА. Именно в этом заключается регуляторная роль цитрата в синтезе жиров (см. рис. 5.4).

Метаболизм жиров тесно связан с кислородом, поэтому хорошее и достаточное аэрирование питательной среды имеет решающее значение для синтеза жирных кислот. Кроме того, в среде должно быть достаточное количество витамина В<sub>1</sub>, В<sub>3</sub>, а также ионов Mg и Mn (см. рис. 5.4).

При недостатке кислорода и несбалансированности питательной среды наблюдаются нарушения в процессах метаболизма клеток. Так, например, при возрастании концентрации Ацетил-КоА в дрожжах происходит накопление кетосоединений (ацетоацетата, β-оксибутирата и ацетона). Ацетил-КоА также служит донором ацетильной группы в синтезе различных эфиров. Поэтому появление запаха этих соединений свидетельствует о нарушении технологических процессов с участием дрожжей.

**Ненасыщенные** жирные кислоты образуются из насыщенных в ходе ферментативной реакции, в которой молекулярный кислород действует в качестве акцептора водорода. Эта реакция осуществляется оксидазой со смешанной функцией, использующей в качестве акцептора НАДФ<sup>+</sup>.

Если у дрожжевых клеток слишком мало длинноцепочечных ненасыщенных жирных кислот, то способность клеточной мембраны пропускать вещества из окружающей среды сильно уменьшается, а потребление аминокислот может вообще прекратиться. В результате снижается не только выход биомассы, но и ухудшается физиологическое состояние дрожжей.

## Биосинтез стерина

Синтез зимостерина тесно связан с ростом и размножением дрожжей. В аэробно выращенной дрожжевой биомассе содержится до 5 мг/г СВ. При этом следует учитывать, что с использованием 1 мг стерина может образоваться 1000 мг дрожжей в пересчете на 100 % СВ.

Исходным метаболитом в синтезе стерина является ацетил-КоА, из которого образуется сначала сквален. Далее сквален в присутствии кислорода окисляется в сквален-2,3-эпоксид, который затем

циклизируется в эргостерин. Синтез стерина идет при участии НАДФ<sup>+</sup>-зависимой смешанно-функциональной оксидазы. Потребность дрожжей в молекулярном кислороде для синтеза стерина больше, чем для образования жирных кислот. Отсутствие в питательной среде витамина В<sub>3</sub> также отрицательно влияет на синтез эргостерина в дрожжах.

Существует связь синтеза стерина с метаболизмом гликогена. Гликоген расходуется в первые часы после внесения дрожжей в питательную среду. На каждый грамм израсходованного гликогена образуется 69 мг стерина.

## 6. ПИТАНИЕ ДРОЖЖЕЙ

Жизнедеятельность дрожжей заключается в процессах питания, дыхания, роста и размножения. Одновременно с этими процессами идет синтез вторичных метаболитов, которые представляют большой интерес для пивоварения и виноделия, так как они обуславливают вкус и аромат напитков.

Источники питания, необходимые любому организму, в том числе и дрожжам, можно разделить на следующие группы:

- основные элементы: С, Н, О и N;
- элементы, требующиеся в небольших количествах (макроэлементы): Р, К, S, Mg;
- микроэлементы (Zn, Mn, Co, Ca, Fe, Cu и др.);
- витамины.

Потребность дрожжей в питательных компонентах может различаться качественно и количественно в зависимости от условий культивирования, в частности может изменяться потребность в факторах роста при изменении температуры, рН и осмоляльности среды. Известно, что при небольшом количестве посевного материала требуется более богатая среда, чем для начала роста популяции с высокой плотностью. Это связано с тем, что многие элементы и витамины могут накапливаться в клетках при их культивировании в средах с высоким содержанием элементов и затем использоваться в биосинтезе. Использование такого посевного материала приводит к снижению требований к питательной среде, в которую он вносится. Например, биосорбция ионов цинка в среде, содержащей 800 мг

$Zn^{+2}$ /л, может составлять 52,5 мг/г абсолютно сухой биомассы (АСБ), в то время как обычно дрожжи содержат всего 0,039 мг/г АСБ. В дрожжах также могут накапливаться витамины. Например, содержание биотина в клетках может достигать 0,6 мкг/г АСБ.

Дрожжи потребляют только растворенные в воде компоненты. Поступление веществ в клетки осуществляется путем пассивной диффузии, облегченной диффузии при участии специальных систем переноса, состоящих из белков – переносчиков (пермеаз), и путем активного транспорта при участии специфических пермеаз и затрате энергии в виде молекул АТФ.

Химический состав питательных веществ должен соответствовать химическому составу организма. Химический состав дрожжей приведен в разделе 4.

## 6.1. Источники углерода. Углеводы

По типу питания дрожжи относятся к гетеротрофным организмам, усваивающим углерод из органических соединений.

Углерод используется для синтеза клеточных компонентов, дыхания и образования вторичных метаболитов.

Источники углерода включают моносахариды, такие, как D-глюкоза, D-манноза, D-фруктоза, D-галактоза, из пентоз – D-ксилоза. Дисахариды сахароза и мальтоза и трисахарид мальтотриоза утилизируются дрожжами, в то время как лактоза (молочный сахар) – нет.

Сахароза гидролизуется инвертазой ( $\beta$ -D-фрукто-фуранозидазой). Обнаружены две основные формы инвертазы, одна репрессуемая, синтез которой ингибируется глюкозой (она локализована в ППП). Вторая лишена углеводной части, расположена внутри клетки, и ее синтез протекает независимо от содержания глюкозы в среде.

Под действием инвертазы сахароза расщепляется на глюкозу и фруктозу, которые поступают в клетку (рис. 6.1). Транспорт облегчается благодаря ферменту переносчику (пермеазе), который находится в цитоплазматической мембране. Скорость переноса глюкозы в клетку при участии пермеазы в миллион раз быстрее, чем это могло бы произойти путем простой диффузии через мембрану.

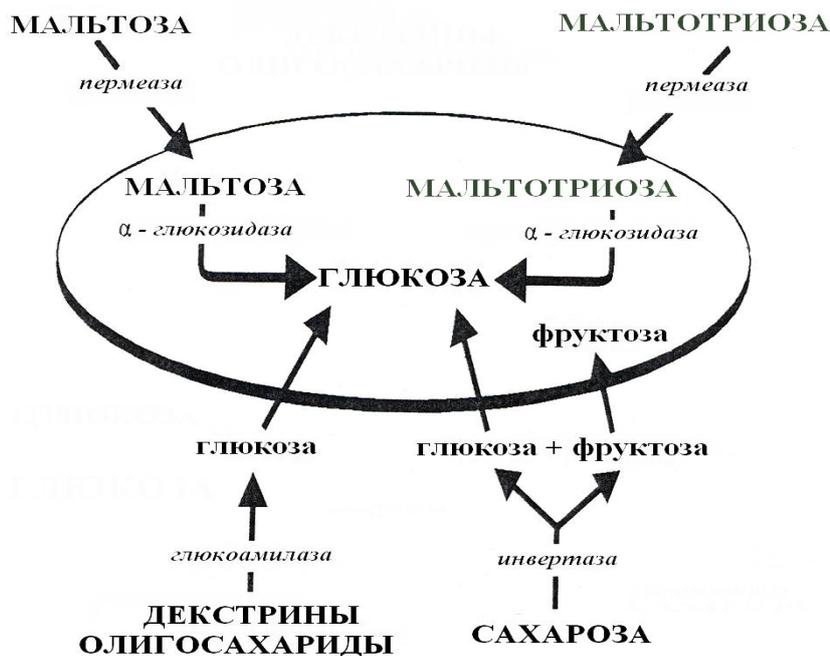


Рис. 6.1. Схема потребления сахаридов дрожжами *S. Cerevisiae*

Мальтоза сначала поступает в клетку при участии специфических индуцибельных пермеаз. И только в клетке происходит гидролиз этого дисахарида ферментом  $\alpha$ -глюкозидаза (мальтаза), который индуцируется одновременно с пермеазами и гидролизует мальтозу до глюкозы внутри клетки. По такой же схеме происходит потребление трисахарида мальтотриозы (см. рис. 6.1).

Трисахарид раффиноза в зависимости от штаммовых особенностей дрожжей либо сбраживается полностью (штаммы пивных дрожжей низового брожения), либо на 1/3 (пекарские дрожжи и пивные дрожжи верхового брожения).

Присутствующие в питательной среде глюкоза, фруктоза и сахароза используются дрожжами в первую очередь, затем потребляется мальтоза и далее мальтотриоза, олигосахариды с числом гликозидных остатков более трех и декстрины дрожжами не утилизируются (рис. 6.2).

Такие органические соединения, как глицерин, этанол и лактат, не сбраживаются, но в аэробных условиях ассимилируются дрожжами.

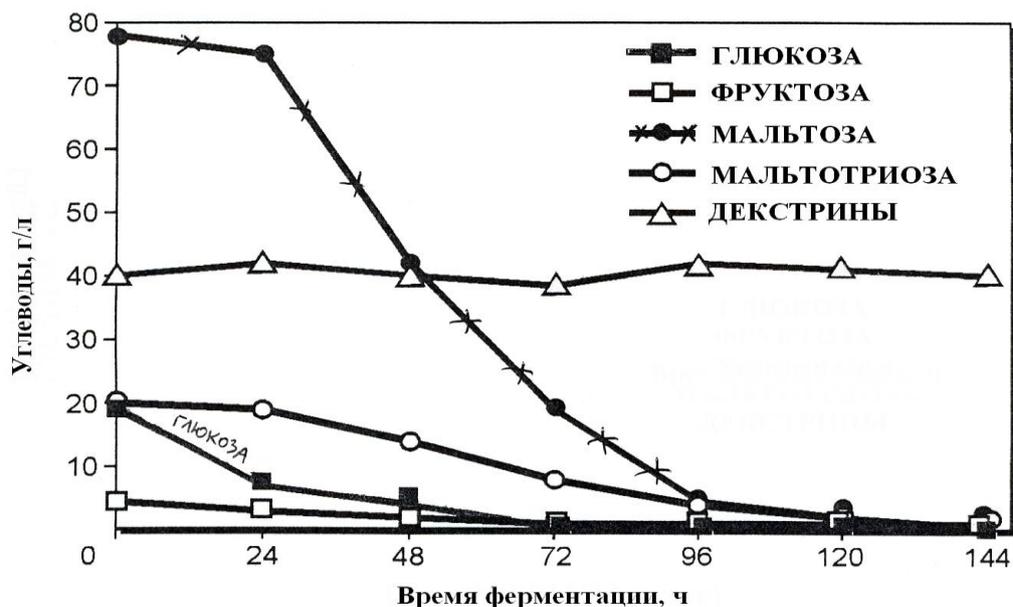


Рис. 6.2. Последовательность сбраживания сахаридов

## 6.2. ИСТОЧНИКИ АЗОТА

Содержание азота в клетках может достигать 10 % на СВ. Источниками азота для синтеза белка являются ионы аммония и аминокислоты. Однако рост клеток происходит быстрее, если в питательной среде содержатся аминокислоты, а не ионы аммония. Аминокислоты в процессе брожения потребляются последовательно. Это определяется свойствами и специфичностью пермеаз, локализованных в клеточной мембране дрожжей. Большинство поступающих в клетку аминокислот сначала подвергается действию трансминаз, отщепляющих аминогруппы, при этом остается углеводный скелет, который далее метаболизируется.

Дрожжи не могут ассимилировать азот из органических соединений (кроме мочевины), нитратов и нитритов.

В дрожжевой промышленности и в виноделии в качестве источника азотного питания используют сульфат аммония (ГОСТ 10873–73), диаммонийфосфат марок А и Б (ГОСТ 8515–75) и раствор аммиака (ГОСТ 9–77). Очень редко в качестве источника азотного питания используется мочевина (ГОСТ 2081–75).

### 6.3. МИНЕРАЛЬНЫЕ КОМПОНЕНТЫ. МАКРО- И МИКРОЭЛЕМЕНТЫ

Активность некоторых ферментов может зависеть только от структуры самого белка, для других требуется также присутствие определенных групп небелковой природы – **кофакторов**. В роли кофакторов могут выступать ионы металлов или сложные органические соединения, называемые **коферментами**. Иногда для проявления активности фермента необходимо присутствие как тех, так и других.

Ниже приведены сведения о некоторых ферментах, коферментами в которых являются ионы металлов:

$Zn^{+2}$  – кофермент алкогольдегидрогеназы, карбоксипептидазы;

$Mg^{+2}$  – кофермент пируватфосфокиназы, фосфогидролазы и фосфотрансферазы;

$Mn^{+2}$  – кофермент фосфотрансферазы;

$Fe^{+2}$  и  $Fe^{+3}$  – коферменты каталазы, пероксидазы и цитохромов;

$Cu^{+2}$  и  $Cu^{+}$  – коферменты тирозиназы и цитохромоксидазы;

$K^{+}$  – кофермент пируватфосфокиназы;

$Na^{+}$  – кофермент плазматической АТФ-азы.

#### 6.3.1. МАКРОЭЛЕМЕНТЫ

К макроэлементам относятся фосфор, калий, магний, натрий и сера.

**Потребность дрожжей в фосфоре.** Фосфор входит в состав нуклеиновых кислот, АТФ, фосфолипидов, полимеров клеточной стенки, в мембраны органоидов клеток. Он способствует поддержанию буферности, препятствующей сдвигу рН в цитоплазме клеток. Нехватка фосфора проявляется в замедлении скорости брожения и роста клеток.

Количество  $P_2O_5$  в клетках определяется условиями культивирования, содержанием солей фосфора в среде и может достигать 5,5 % от СВ дрожжей.

**Потребность дрожжей в калии.** В хлебопекарных дрожжах содержание калия в пересчете на  $K_2O$  в пределах от 1,4 до 4,3 % от АСБ, в пивных дрожжах – в среднем 2,4 % от СВ.

Калий активирует около 40 различных ферментов, в том числе оксидазы и дегидрогеназы. Ионы калия выполняют роль не только коферментов, но также входят в состав некоторых структур клетки, в частности, рибосом. Калий также участвует в регуляции транспорта ионов через клеточную стенку и через митохондриальную мембрану. В связи с увеличением скорости роста дрожжей потребность в калии увеличивается.

Ионы  $K^+$  определяют транспорт в клетки ортофосфата, играющего большую роль в энергетическом обмене дрожжей. Скорость этого процесса зависит как от вида микроорганизма, так и от условий культивирования. При энергетическом обмене, стимулируемом глюкозой, экзогенный калий поступает в клетку одновременно с фосфатом, при этом происходит отток ионов  $H^+$  из дрожжей. Этот процесс является энергозависимым и происходит при участии фермента АТФ-азы.

Следует обратить внимание на обмен ионов  $K^+$  и  $H^+$  через митохондриальную мембрану. В данном случае, помимо  $K^+$ , в этом обмене участвуют также ионы  $Na^+$  и ионы двухвалентных металлов  $Ca^{+2}$ ,  $Mn^{+2}$  и  $Sr^{+2}$ . Переход этих ионов в митохондрию сопровождается выбросом эквивалентного количества  $H^+$ .

Для дрожжей экономический коэффициент по калию равен 54. Это означает, что 1 г элемента входит в состав 54 г АСБ.

**Потребность дрожжей в магнии.** Магний необходим как для энергетического, так и конструктивного обмена дрожжей, так как он является кофактором многих ферментов (см. раздел 5). Он стимулирует утилизацию мальтозы и мальтотриозы.

Экономический коэффициент в расчете на ионы потребленного магния составляет 540 г сухой биомассы на 1 г магния и обратно пропорционален количеству РНК в биомассе.

При составлении питательных сред следует учесть следующее соотношение между макроэлементами в пересчете на их оксиды:  $MgO:K_2O:P_2O_5$ , которое равняется 1:10:20.

**Потребность дрожжей в сере.** Сера необходима, главным образом, для синтеза серосодержащих аминокислот цистеина и метионина. Кроме того, небольшое количество серы требуется для образования сульфогрупп в некоторых коферментах, таких как биотин, кофермент А, липоевая кислота, тиамин и пиридоксин.

Было установлено, что в дрожжах при недостатке этого компонента в среде культивирования наблюдается снижение дыхательной активности клеток, как и при ингибировании роста дрожжей недостатком железа. Сера усваивается дрожжами из неорганических сульфатов, из серосодержащих аминокислот. Экономический коэффициент в расчете на ионы  $SO_4^{-2}$  для пекарских дрожжей составляет 100 г сухой биомассы на 1 г.

### 6.3.2. МИКРОЭЛЕМЕНТЫ

Микроэлементы участвуют в метаболизме дрожжей и влияют на их химический состав, рост и размножение.

К микроэлементам, которые в первую очередь необходимы для роста дрожжей, относятся Zn, Cu, Ca, Mn, Fe, Co.

Элементы, редко требуемые для роста: B, Na, Al, Si, Cl, V, Cr, Ni, As, Se, Mo, Sn, I.

Приблизительные значения экономического коэффициента прироста биомассы в расчете на некоторые элементы приведены в табл. 6.1.

Таблица 6.1

#### Экономический коэффициент выхода биомассы

Экономический коэффициент выхода биомассы , кг/г элемента						
Ca	Fe	Mn	Zn	Cu	Co	Mo
1,0	6,7	20,0	20,0	100	100	100

В связи с тем что многие питательные ингредиенты среды также могут содержать микроэлементы и их количество не учитывается в расчете экономического коэффициента, данные, приведенные в табл. 6.1, приближительны.

Потребность в микроэлементах может увеличиваться в несколько раз, когда культура испытывает стресс, например, при увеличении температуры выше оптимальной.

Микроэлементы могут накапливаться в клетках при культивировании их в среде с высокой концентрацией элементов. Так, биосорбция цинка в среде содержащей 0,8 мг  $Zn^{+2}$ /мл, составляет 52,5 мг/г СВ.

**Цинк** входит в состав около 70 ферментов дрожжей. Он является кофактором ферментов клеточной стенки, стимулирует дыхательный метаболизм дрожжей, биосинтез белка, обмен нуклеиновых кислот, углеводов, вследствие этого он влияет на рост и размножение клеток. Ввиду участия цинка в высвобождении глюкозы (в виде гл-1-Ф) из гликогена увеличивается стрессоустойчивость дрожжей при их внесении в плотные питательные среды, в результате чего сокращается длительность лаг-фазы роста клеток.

В связи с тем что солодовое сусло, которое используется в технологии как хлебопекарных, так и пивных и спиртовых дрожжей, содержит недостаточное количество солей цинка, следует обратить внимание на факторы, влияющие на концентрацию этого микроэлемента в солоде, используемом для приготовления сусла. На содержание цинка в сусле влияют:

- степень растворения солода. Чем выше степень растворения солода, тем выше содержание цинка в горячем охмеленном сусле (без дробины);
- температура затирания. При 50 °С количество растворимого в сусле цинка больше, чем при затирании солода при 60 °С;
- гидромодуль затора. Жидкие заторы приводят к увеличению содержания цинка в сусле;
- рН затора. Биологическое подкисление способствует увеличению растворимости цинка.

Содержание ионов цинка в клетках должно быть на уровне 6 мг/100 г. Для получения этого количества в сусле должно содержаться не менее 0,08 мг цинка в литре. Ввиду того что цинк может аккумулироваться в клетках, дополнительное внесение этого элемента на этапе получения посевного материала гарантирует хорошие результаты при последующем размножении дрожжей в бедных питательных средах.

Расчет дополнительного внесения цинка можно сделать исходя из того, что экономический коэффициент для него составляет приблизительно 20 мг/г АСБ дрожжей (см. табл.6.1), или для прироста 100 г АСБ требуется 0,005 г цинка.

**Медь** является коферментом оксидаз и влияет на дыхательный метаболизм дрожжей. Коферментами пептидаз могут являться ионы меди или ионы цинка.

Экономический коэффициент прироста биомассы в расчете на медь составляет 100 кг АСБ/г, т.е. для прироста 100 г АСБ требуется 0,001 г меди.

**Марганец** активизирует целый ряд ферментов: декарбоксилазы, дегидрогеназы, оксидазы, пероксидазы, пептидазы, киназу. Вместе с железом, цинком и молибденом ионы марганца могут нивелировать вредное действие меди. Этот микроэлемент стимулирует процесс брожения даже в том случае, когда в сусле содержится недостаточное количество ионов цинка. Для биосинтеза 100 г АСБ требуется 0,005 г  $Mn^{+2}$ .

### 6.3.3. ФАКТОРЫ РОСТА ДРОЖЖЕЙ

Помимо элементов минерального питания, источников углерода и кислорода дрожжи нуждаются в некоторых дополнительных веществах, называемых факторами роста, или ростовыми веществами.

Организмы, нуждающиеся в факторах роста, называют ауксотрофными. Им противопоставляют организмы, которые не зависят от факторов роста, – это прототрофы.

К факторам роста относятся такие соединения, как аминокислоты, пурины и пиримидины, а также витамины. Аминокислоты, пурины и пиримидины – составные части белков и нуклеиновых кислот; витамины входят в состав коферментов, как правило, это простетические группы фермента, т.е. коферменты, прочно связанные с ферментом.

В состав коферментов дрожжей входят многие витамины группы В, а также не относящаяся к витаминам липоевая кислота.

Витамины по растворимости можно объединить в две группы – водорастворимые и жирорастворимые. Водорастворимые: В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub>, В<sub>3</sub>, В<sub>5</sub>, В<sub>7</sub>, В<sub>8</sub>, В<sub>9</sub>, В<sub>12</sub>, С; жирорастворимые: А, D, Е, К.

Витамин В<sub>8</sub> (инозит, или мезоинозит, для дрожжей) не относится к витаминам, хотя его роль и очень велика в росте и размножении клеток.

В метаболизме дрожжей не участвуют витамины С и В<sub>12</sub>, дрожжи также не нуждаются в жирорастворимых витаминах.

В табл. 6.2. указано, в какие коферменты и простетические группы входят некоторые витамины.

Таблица 6.2

**Участие витаминов в метаболизме дрожжей**

Витамин	Функция	Кофермент или простетическая группа фермента
Тиамин (В <sub>1</sub> )	Перенос альдегидных групп	Тиаминпирофосфат (ТПФ)
Рибофлавин (В <sub>2</sub> )	Перенос Н <sup>+</sup> и е <sup>-1</sup>	ФМН, ФАД
Пантотеновая кислота (В <sub>3</sub> )	Перенос ацильных групп	Кофермент А
Никотиновая кислота (В <sub>5</sub> )	Перенос Н, е <sup>-1</sup>	НАД (Ф)
Пиридоксин (В <sub>6</sub> )	Перенос аминогрупп	Пиридоксальфосфат
Биотин (В <sub>7</sub> )	Перенос карбоксильных групп	Биоцитин
Фолиевая кислота	Перенос формильных, метильных, метиленовых групп	Тетрогидрофолиевая кислота
Инозит (В <sub>8</sub> )	Участвует в синтезе липидов	–

Рост в отсутствие витаминов указывает на тот факт, что витамин синтезируется самими клетками.

В табл. 6.3 указано количественное содержание витаминов в дрожжах.

Таблица 6.3

**Содержание витаминов в дрожжах сахаромецетах**

Витамин	Содержание витаминов, мг/100 г АСБ	
	Пекарские	Пивные
В <sub>1</sub>	0,75 – 8,5	8–15
В <sub>2</sub>	1,6–6,5	2 –8
В <sub>3</sub>	20 –70	2–20
В <sub>5</sub>	300–500	30 –100
В <sub>7</sub>	0,05 –3,6	0,1–1,0
В <sub>8</sub>	200 –500	–
В <sub>9</sub>	210 –510	2–10

Рассмотрим роль отдельных витаминов, представляющих наибольший интерес с точки зрения влияния на дыхательный и бродильный метаболизм дрожжей *S.cerevisiae*.

#### 6.3.4. ВИТАМИНЫ В МЕТАБОЛИЗМЕ ДРОЖЖЕЙ

Аэробный метаболизм дрожжей, при котором имеет место максимальное накопление биомассы и отсутствие синтеза этилового спирта, не может протекать в отсутствие или недостатке таких витаминов, как В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub>, В<sub>7</sub> и В<sub>8</sub>. Эти же витамины необходимы дрожжам в условиях брожения, когда часть глюкозы идет на синтез биомассы, а другая часть – на образование спирта и других продуктов брожения.

**Тиамин (В<sub>1</sub>)** входит в состав пируватдекарбоксилазы и играет положительную роль в процессах, связанных с образованием спирта. Вместе с тем этот витамин необходим в аэробном метаболизме дрожжей. Это связано с тем, что он входит в состав пируваткарбоксилазного комплекса, который контролирует синтез ацетил-S-КоА, исходного компонента дыхательного метаболизма дрожжей. Кроме того, тиамин необходим для работы ЦТК, он является одним из факторов, способствующих замыканию этого цикла, т.е. превращения 2-оксоглутарата в сукцинат, благодаря чему возможен аэробный обмен у дрожжей и высокий выход энергии, необходимой для синтеза биомассы.

**Пантотеновая кислота (В<sub>3</sub>)** входит в состав Ко-А-SH (кофермента ацелирования). Этот кофермент участвует во многих ферментативных реакциях, в которые вовлечены не только ацетильные, но и любые другие ацильные группы, при этом Ко-А-SH выполняет функции промежуточного переносчика ацильных групп. Большинство штаммов пекарских, винных и пивных дрожжей являются ауксотрофами по витамину В<sub>3</sub>.

##### ***Роль витамина В<sub>3</sub> в ЦТК***

Прежде всего следует остановиться на двух практически необратимых, выполняющих регуляторную функцию, реакциях, в которых участвует КоА-SH.

*Первая реакция.* Реакция декарбоксилирования пирувата с образованием ацетил-S-КоА, который является исходным наряду с окса-

лоацетатом и субстратом в цепи реакций ЦТК. Этот процесс идет под контролем сложной полиферментной системы, носящей название пируватдегидрогеназный комплекс, который содержит пируватдегидрогеназу с простетической группой – тиаминпирофосфатом и коферментом –  $Mg^{+2}$ ; дигидролипоилтрансацилазу с простетической группой – липоевая кислота и дигидролипоилтрансацилаза, которая содержит флавиновый кофермент. Кроме того, в этой реакции участвует НАД. Таким образом, для осуществления этой реакции необходимы витамины  $B_1$ ,  $B_2$ ,  $B_3$  и  $B_5$ , а также  $Mg^{+2}$ . Активатором является кислород, т.е. недостаток кислорода приводит к образованию неактивной формы фермента.

*Вторая реакция.* Это декарбоксилирование 2-оксоглутарата с образованием сукцинил-S-КоА, замыкающая ЦТК в условиях аэробноза. Этот процесс проходит при участии полиферментной системы 2-оксоглутаратдегидрогеназы, которая по составу входящих в него коферментов и простетических групп напоминает пируватдегидрогеназный комплекс.

Система состоит из трех ферментов:  $\alpha$ -кетоглутаратдекарбоксилазы дигидролипоилтрансацилазы и дигидролипоилдегидрогеназы.

В этой реакции так же, как и в первой, помимо ферментных белков участвуют тиаминпирофосфат, липоевая кислота, флавин, КоА-SH,  $Mg^{+2}$  и НАД.

### ***Роль витамина $B_3$ в биосинтезе жиров***

Участие витамина  $B_3$  в биосинтезе жиров связано с ацетил-КоА (см. рис. 5.4). Ацетил-КоА является исходным соединением для синтеза жирных кислот и, следовательно, жиров. Особенно важны непредельные жирные кислоты, которые входят в состав всех мембран органоидов клетки, следовательно, они определяют интенсивность процесса роста и размножения дрожжей.

Для синтеза жиров из ацетил-КоА необходим также глицерофосфат, образующийся в процессе метаболизма сахаров. Кроме того, ацетил-КоА участвует в образовании стероидов.

В синтезе непредельных жиров также необходимы витамин  $B_7$  и ионы марганца  $Mn^{+2}$ .

Следует отметить, что отсутствие в питательной среде витамина  $B_3$  отрицательно влияет на синтез эргостерина в дрожжах, который используется для получения витамина D.

В производственных питательных средах содержание пантотеновой кислоты не всегда достаточно для синтеза биомассы, особенно это касается солодового сусла.

## Биотин

Практически все штаммы пекарских, винных и пивных дрожжей являются абсолютными ауксотрофами по биотину, т.е. неспособны расти и размножаться в его отсутствие.

Биотин входит в состав шести карбоксилаз. Он играет роль переносчика карбоксильных (-COO-) групп во многих реакциях ферментативного карбоксилирования, протекающих с участием АТФ.

Наибольший интерес с точки зрения регулирования обмена в дрожжах представляют пируваткарбоксилаза, ацетил-КоА-карбоксилаза.

### *Роль биотина в аэробном метаболизме дрожжей*

Биотин является активным компонентом биоцитина – простетической группы пируваткарбоксилазы – фермента, катализирующего реакцию превращения пирувата в оксалоацетат. Помимо биотина для протекания этой реакции необходим  $Zn^{+2}$ , который является коферментом. Это наиболее важная реакция, которая обеспечивает работу ЦТК, она носит название анаплеротической (возмещающей) (см. рис. 5.1).

Пируваткарбоксилаза – аллостерический фермент. Скорость катализируемой ею реакции образования оксалоацетата в отсутствие ацетил-КоА очень низка, когда же ацетил-КоА имеется в избытке, стимулируется синтез оксалоацетата. Поэтому при дефиците биотина наиболее уязвим именно этот участок метаболизма, однако это не влияет на скорость гликолиза. В результате в клетках накапливается пируват, который частично выделяется в среду даже при наличии достаточного количества растворенного в среде  $O_2$ . Если же концентрация растворенного кислорода невелика, идет образование спирта.

### *Роль биотина в синтезе углеводов*

Пируваткарбоксилаза участвует и в другом процессе – образовании фосфоенолпирувата (см. рис. 5.3). В этом случае она действует в комплексе с другими ферментами, в частности с карбоксикиназой. Карбоксикиназная активность зависит от многих причин, в том числе

от содержания сахарозы в среде: чем выше ее концентрация, тем ниже активность фермента.

### ***Роль биотина в синтезе жиров***

Биотин играет большую роль в синтезе длинноцепочечных жирных кислот, входящих в клеточные мембраны. Исходным метаболитом в синтезе жирных кислот являются цитоплазматический Ац-КоА и диоксид углерода, которые под действием ацетил-КоА-карбоксилазы, содержащей в качестве простетической группы биотин, превращаются в малонин-КоА – непосредственного предшественника 14 из 16 атомов углерода молекулы пальмитиновой кислоты.

Таким образом, недостаток биотина в среде культивирования влечет за собой нарушение всех видов обмена – белкового, жирового, углеводного, а также синтеза нуклеиновых кислот.

Нарушение синтеза жирных кислот приводит к увеличению проницаемости клеток и выходу жизненно важных метаболитов в среду культивирования. Также меняется химический состав запасных веществ дрожжевой клетки: вместо гранул гликогена откладываются гранулы низкомолекулярных липидов из короткоцепочечных жирных кислот. В результате снижаются интенсивность размножения дрожжей и выход биомассы.

Обычно для возмещения недостатка биотина в сложные питательные среды, такие как меласса и солодовое сусло, этот витамин вносят из расчета 0,25 мг на прирост 1 кг дрожжей с массовой долей сухих веществ 25 %. При этом следует иметь в виду, что дрожжи обладают способностью накапливать внутриклеточные запасы биотина, однако в ферментах количество связанного биотина всегда постоянно. В связи с этим имеющийся резерв витамина может быть использован дрожжами на следующих стадиях культивирования.

Избыток биотина также нежелателен, так как при этом наблюдается замедление его транспорта в клетку, поэтому при количественном расчете биотина на осуществление процесса культивирования следует учитывать его содержание в среде и в самих дрожжах.

### **Инозит (В<sub>8</sub>)**

Для дрожжей только один из изомеров – мезоинозит (миоинозит) – является фактором роста. Содержание этого витамина в дрожжах может колебаться в пределах от 200 до 500 мг/100 г АСБ.

Установлено, что мезоинозит играет важную роль в жировом обмене сахаромицетов, в частности, клеточные мембраны дрожжей содержат до 20 % фосфотидилинозита – фосфолипида, в состав которого входит инозит. При его недостатке нарушается синтез фосфолипидов, а также РНК белка, и происходят изменения в структуре клеточных мембран (они становятся более хрупкими), при этом увеличивается содержание низкомолекулярных липидов в клетках. При недостатке В<sub>8</sub> в клетках содержание жиров может достичь 4,5 %, в то время как в обычных условиях – 1,6 % . Все это приводит к снижению интенсивности размножения клеток, нарушению обмена, задержке цитокинеза (почки не отделяются от материнских клеток), в результате падает выход биомассы и снижается их бродильная активность.

Содержание этого витамина в производственных средах достаточно велико, поэтому он не является лимитирующим рост дрожжей фактором.

В связи с большим значением витаминов при составлении питательных сред следует рассчитывать количество витаминов, лимитирующих рост дрожжей, учитывая потребность клеток в факторах роста (табл. 6.4).

Таблица 6.4

#### Потребность дрожжей в факторах роста

Витамин	Мг/кг СВ (Бекер)	Мг/ кг СВ (Уайт)
Пантотенат Са	176	176
Биотин	0,75–2,5	1,0
Мезоинозит	2000 –5000	4000

Сведения о потребности дрожжей в витамине В<sub>1</sub> отсутствуют, однако для культивирования винных дрожжей рекомендуется вносить тиамин из расчета 0,5 мг/л сусла.

## 7. СТИМУЛЯТОРЫ РОСТА ДРОЖЖЕЙ

Стимуляторы роста условно подразделяются на физические, химические и биологические. Общим для них является характер на-

блюдаемых эффектов: увеличение концентрации биомассы или синтеза вторичных метаболитов при использовании стимуляторов в малых дозах.

### **7.1. ФИЗИЧЕСКИЕ СТИМУЛЯТОРЫ РОСТА МИКРООРГАНИЗМОВ**

В настоящее время в микробиологии используют ряд факторов физической природы, оказывающие влияние на репродуктивные и метаболические функции. Это прежде всего температура, давление, ультразвук, электрический ток, электрические и магнитные поля, различное физическое состояние воды в питательных средах, малые дозы радиации.

Наиболее изученным фактором является температура. Значительно реже для ускорения процессов биосинтеза используют давление.

Как правило, позитивный эффект от факторов физического характера наблюдается либо после кратковременного воздействия на микробные клетки, либо после их воздействия в умеренных дозах. Так, под влиянием ультразвука (УЗ) средней интенсивности накопление биомассы и скорость размножения дрожжей рода *Saccharomyces* заметно повышается. Подобная обработка культуральной жидкости сопровождалась заметным повышением бродильных свойств хлебопекарных дрожжей и увеличением выхода конечного продукта.

Достаточно глубоко изучено действие электрического тока на рост и размножение микроорганизмов. Выявлены зависимости между силой тока и скоростью размножения, электропроводимостью среды культивирования и воздействующим напряжением.

Стимулирующим действием обладает также импульсное электрическое поле. Причем и здесь параметры ростовых эффектов полностью зависят от вида микроорганизмов и условий их культивирования. Активно воздействует на рост и размножение клеток магнитное поле различной мощности. При этом биохимическая активность микроорганизмов зависит от величины и направленности потока.

Привлекает внимание исследователей и электромагнитное поле, также способствующее ускоренному росту микроорганизмов и изменению их ферментативной активности. Так, после обработки дрожжей в поле СВЧ их бродильная активность возросла в 6,6 раз. В то же

время увеличение диапазона электромагнитного поля губительно влияет на микроорганизмы.

Имеются сведения о стимулирующем влиянии УФ излучения, которое, по мнению некоторых авторов, ускоряет биосинтетические процессы. Однако следует иметь в виду, что УФ лучи оказывают и мутагенное действие на микроорганизмы.

Стимулируют рост микроорганизмов и малые дозы радиации. Эксперименты на вирусах, бактериях, водорослях и грибах показали стимулирующую роль облучения, которое выражалось в ускорении митоза, сокращении времени генерации и увеличении биомассы.

## **7.2. БИОЛОГИЧЕСКИЕ СТИМУЛЯТОРЫ РОСТА МИКРООРГАНИЗМОВ**

Стимуляторы роста биологической природы, как правило, являются сложными соединениями с широким спектром действия. К ним относятся вещества, содержащиеся в растительных и животных экстрактах, а также в автолизатах микроорганизмов. Природа их воздействия на микроорганизмы во многом остается неизвестной. Доказано, что лишь в некоторых из них стимулирующая активность обусловлена одним из факторов – либо содержанием витаминов, либо низкомолекулярными соединениями небелковой природы. Хорошими стимуляторами роста являются экзогенные нуклеазы. Имеются также сведения о стимулирующем эффекте различных отходов сельскохозяйственного, пищевого, микробиологического и других производств. С этой точки зрения интересны разработки по использованию отходов пивоваренного производства: белкового отстоя, который подвергают гидролизу серной кислотой, вытяжки из ростков ячменя, автолизатов остаточных пивных дрожжей.

В качестве стимулятора роста дрожжей может применяться отход производства белка из соевого шрота.

## **7.3. ХИМИЧЕСКИЕ СТИМУЛЯТОРЫ РОСТА МИКРООРГАНИЗМОВ**

Среди стимуляторов химической природы можно выделить:  
– предшественников синтеза макромолекул и вторичных метаболитов;

– химические соединения, не являющиеся метаболитами, но способные стимулировать синтетическую и репродуктивную активность клеток.

К первой группе относятся некоторые аминокислоты. Стимулируют рост и синтез ферментов гистидин, глутаминовая кислота, цистин, аланин и другие.

Ко второй группе можно отнести гиббереллины и ауксины. Стимулирующий эффект гиббереллинов наблюдается не только в растениях, но и в микроорганизмах. Так, в концентрации 0,01 % они стимулируют выход кормовых дрожжей и сокращают время накопления биомассы на 17–27 % в зависимости от состава среды. Эффект гиббереллина зависит от концентрации соединения и величины засева, причем зависимость эта носит обратно пропорциональный характер.

Индолилуксусная кислота (ИУК), или гетероауксин, образуется в результате жизнедеятельности дрожжей, грибов и бактерий. Ранее ИУК использовали только в сельском хозяйстве. Сейчас установлено стимулирующее влияние ИУК на целый ряд микроорганизмов, в том числе на сахаромицеты. Механизм действия ИУК пока не выяснен, доказано только, что кислота связывается с ДНК и РНК, причем количество связанного материала зависит от скорости роста клеток.

Для повышения скорости роста и выхода дрожжевых культур, в частности сахаромицетов, используют карнитин, либо его производные. Это соединение является переносчиком ацетильных групп из цитоплазмы в митохондрии и в то же время способствует синтезу соединений, являющихся предшественниками в образовании биотина.

Высокой стимулирующей активностью обладает *p*-аминобензойная кислота (ПАБК). Это соединение является предшественником тетрагидрофолиевой кислоты, которая служит коферментом, участвующим в переносе одноуглеродных единиц, и является предшественником цитохромов.

С начала 70-х годов интенсивно изучается влияние на микроорганизмы поверхностно-активных соединений (ПАВ), способных оказывать воздействие на энергетический обмен клеток через изменение мембранного механизма проницаемости, что в конечном счете приводит к стимулирующей рост активности.

Повышения выхода биомассы можно добиться путем применения водорастворимых каротиноидов, в частности, кроцетина или

кроцина. Предполагается, что действие этих химических стимуляторов роста, являющихся активными переносчиками кислорода, обусловлено их участием в окислительно-восстановительных процессах.

Химические и биологические стимуляторы применяются более широко, чем физическое воздействие на клетки.

#### 7.4. ИСТОЧНИКИ СТИМУЛЯТОРОВ РОСТА ДРОЖЖЕЙ

Стимуляторами роста дрожжей, по аналогии со стимуляторами роста растений, можно считать природные или синтетические вещества, стимулирующие либо рост, либо размножение клеток.

Поскольку дрожжи являются ауксотрофами по биотину, пантотеновой кислоте, рассмотрим источники этих витаминов, которые могут быть использованы в дрожжевой промышленности.

**Кукурузный экстракт** является отходом крахмалопаточной промышленности. Он является источником биотина. В табл. 7.1 приведен его состав.

**Гидролизаты дрожжей.** Для стимуляции роста пекарских дрожжей подходят гидролизаты дрожжей, полученные на субстратах гидролизно-дрожжевых, спиртовых, пивоваренных, ацетонобутиловых и сульфитно-щелочных производств. Гидролизаты дрожжей содержат до 5,54 мг биотина/кг и 1,4 г инозита/кг СВ кормовых дрожжей.

Таблица 7.1

Состав кукурузного экстракта

Компоненты	Содержание, % от АСБ
Белки	40
Аминный азот	3,0
Крахмал	0,5
Углеводы	22–27
Зола	15–25
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	0,5–0,6
Молочная кислота	До 0,7
Биотин	1–2 г/т

**Детиобiotин.** Биотин является дорогим препаратом, который получают путем микробиологического синтеза. Поэтому в качестве источника биотина используют детиобiotин – предшественник биотина, который при наличии в питательной среде источника серы достраивается до биотина.

Несмотря на кажущийся простым химизм реакции достройки молекулы детиобiotина в биотин, биохимия процесса неизвестна. Пока обнаружено наличие только ферментной системы, катализирующей этот процесс, а также условия, при которых проявляется ее максимальная активность:  $pH = 8,0$ ,  $t = 35\text{ }^{\circ}C$ , интенсивная аэрация. Кроме того, стимулирующий эффект от детиобiotина зависит от активности препарата, которая уменьшается во время хранения.

В анаэробных условиях активность детиобiotина составляет от 40 до 50 % активности биотина. В условиях интенсивной аэрации – 100 %.

## **8. ВЛИЯНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ НА ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ МЕТАБОЛИЗМ ДРОЖЖЕЙ И СИНТЕЗ КЛЕТОЧНЫХ КОМПОНЕНТОВ**

### **8.1. ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ**

Температура влияет на скорость клеточных реакций, природу метаболизма, пищевые потребности и состав биомассы, на уровень РНК, белка, липидный и углеводный состав клеток, например, при одной и той же скорости роста содержание РНК в дрожжах при снижении температуры увеличивается в несколько раз. В зависимости от температуры также колеблется содержание белка в дрожжах. Эти изменения обусловлены природой лимитирующего субстрата. При повышении температуры снижается содержание ненасыщенных жирных кислот (ННЖК). Поэтому при переходе на новые технологии перед началом процесса главного «теплого» брожения возникла необходимость изменения технологии получения ЧК и аэрирования суслу.

Изменение температуры роста может оказать влияние на условия превращения глюкозы, т.е. на химический состав культуральной

жидкости. Отмечалось, что с уменьшением температуры снижается экономический коэффициент, рассчитанный по магнию, калию и фосфатам, что объясняется увеличением содержанием РНК в биомассе. Изменение температуры часто сопровождается изменениями потребности микроорганизмов в факторах роста, которые являются, как правило, активной частью ферментов.

Установлено, что для *S.cerevisiae* при температуре 38 °С потребность клеток в пантотеновой кислоте значительно превышает потребность дрожжей в этом витамине, чем при температуре 30 °С.

Температура влияет также на синтез вторичных метаболитов, что особенно важно в пивоварении и виноделии, причем этот процесс может отличаться от влияния температуры на рост и размножение дрожжей.

Скорость химических реакций связана с температурой, что отражено в уравнении Аррениуса, которое после логарифмирования имеет следующий вид:

$$\ln K = \ln A - E/RT,$$

где  $K$  – скорость реакции;  $R$  – газовая постоянная;  $T$  – абсолютная температура;  $A$  – константа, зависящая от частоты образования активированных комплексов реагирующих соединений;  $E$  – константа, называемая энергией активации.

Ввиду того что скорость протекания реакций в дрожжевой клетке прежде всего отражается на удельной скорости их роста, а величины  $A$ ,  $E$  и  $R$  постоянные, можно считать, что  $\ln \mu = f(1/T)$ . Очень важным является показатель энергии активации, значение которого постоянно в пределах оптимальной температуры роста для каждого вида микроорганизма, но увеличивается при переходе к низким и высоким температурам. Показано, что температурный диапазон роста грибов, к которым относятся и дрожжи, составит около 30 °С.

## 8.2. ДЕЙСТВИЕ КОНЦЕНТРАЦИИ ВОДОРОДНЫХ ИОНОВ

Как и температура, величина рН оказывает влияние на метаболизм дрожжей, что отражается на выходе биомассы, скорости роста клеток и синтезе вторичных метаболитов. Значение рН влияет на

природу конечного продукта сбраживания сахаров: при кислых значениях pH образуется этиловый спирт, при щелочных – глицерин и уксусная кислота. При оксидативном метаболизме, так же как и при гликолизе, на среде с сахарозой оптимальным значением pH можно считать то, которое способствует проявлению максимальной активности фруктофуранозидазы 4,6. В солодовом сусле эта величина должна соответствовать значению pH для ферментов пермеаз, осуществляющих перенос мальтозы и мальтотриозы в клетку.

Величина pH влияет на диссоциацию кислот и оснований, следовательно, она оказывает влияние на перенос питательных веществ внутрь клетки, а также на степень токсичности ингибиторов роста. Недиссоциированные вещества, например, органические кислоты, обладают более высокой растворимостью в липидах, чем ионизированные формы, и поэтому снижение pH способствует большему проникновению кислот в клетку. Следовательно, увеличение содержания летучих кислот, которые являются показателем качества мелассы, отрицательно сказывается на интенсивности размножения дрожжей. Величина pH также может воздействовать на конформацию молекул ферментов и изменять как первичный, так и вторичный метаболизм дрожжей.

Показатель концентрации водородных ионов может существенно изменяться в процессе культивирования, что определяется буферностью питательных сред: она максимальна для мелассного сусле стандартного качества, затем идет солодовое сусле, очень сложно поддерживать уровень pH при культивировании на синтетической среде. Снижение pH и увеличение титруемой кислотности наиболее интенсивно происходит при аэробном культивировании дрожжей. Для того чтобы этого избежать, необходимо в процессе культивирования дозировать вещества, которые могут стабилизировать уровень изменения pH в желаемых границах. Обычно для этой цели при производстве хлебопекарных дрожжей используется аммиачная вода (раствор  $\text{NH}_4\text{OH}$ ) и ортофосфорная кислота, а при производстве пива – молочная кислота.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Бекер М.Е., Дамберг Б.Э., Рапопорт А.И.** Анабиоз микроорганизмов. – Рига.: Зинатне, 1981. – 253 с.
2. **Бирюзова В.И.** Ультраструктурная организация дрожжевой клетки. – М.: Наука, 1993. – 224 с.
3. **Ленинджер А.** Биохимия. Молекулярные основы структуры и функций клетки. – М.: Мир, 1976. – 957 с.
4. **Котык А., Яначек К.** Мембранный транспорт. – М.: Мир, 1980. – 341с.
5. **Кретович В.Л.** Биохимия растений. – М.: Высш. шк., 1986. – 503 с.
6. **Перт С. Дж.** Основы культивирования микроорганизмов и клеток. – М.: Мир, 1978. – 331с.
7. **Шлегель Г.** Общая микробиология. – М.: Мир, 1987. – 567 с.
8. **Reed G., Peppier H.** Yeast technology // J.N.C. 1973. Part 5. P. 53 –102.
9. **Suomalainen H., Oura E.** Yeast nutrition and solute uptake//Jn: The Yeast. Helsinki. 1971. V. 2. P. 3–74.

## СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	3
1. СИСТЕМАТИКА ДРОЖЖЕЙ, ПРИМЕНЯЕМЫХ В БРОДИЛЬНЫХ ПРОИЗВОДСТВАХ.....	3
2. РАЗМНОЖЕНИЕ ДРОЖЖЕЙ.....	4
2.1. Клеточный цикл.....	5
3. МОРФОЛОГИЯ ДРОЖЖЕЙ.....	8
3.1. Клеточная стенка.....	10
3.1.1. Глюкан.....	11
3.1.2. Маннан.....	12
3.1.3. Хитин.....	14
3.1.4. Запасные вещества клеточной оболочки.....	15
3.2. Периплазматическое пространство (периплазма).....	15
3.3. Цитоплазматическая мембрана.....	16
3.4. Ядро.....	18
3.5. Цитоплазматические структуры.....	19
3.6. Запасные вещества.....	25
3.7. Стрессы.....	27
3.7.1. Осмотический стресс.....	27
3.7.2. Этанольный стресс.....	28
3.7.3. Стресс, вызванный двуокисью углерода.....	29
3.7.4. Окислительный стресс.....	29
3.7.5. Температурный стресс.....	30
3.7.6. Другие виды стресса.....	30
4. ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ ДРОЖЖЕЙ.....	31
4.1. Вода.....	31
4.2. Азотсодержащие компоненты дрожжевой клетки.....	32
4.3. Углеводы.....	35
4.4. Липиды.....	36
4.5. Минеральные вещества.....	37
4.6. Витамины.....	38
5. МЕТАБОЛИЗМ ДРОЖЖЕЙ.....	38
5.1. Гликолиз.....	40
5.2. Спиртовое брожение.....	44
5.3. Аэробный метаболизм углеводов.....	48
5.4. Пастеровский эффект и механизмы его регулирования...	50
5.5. Эффект Кребтри.....	52

5.6.	Конструктивный обмен дрожжей.....	53
5.6.1.	Синтез резервных углеводов.....	53
5.6.2.	Структурные полисахариды.....	56
5.6.3.	Биосинтез аминокислот.....	57
5.6.4.	Жировой обмен.....	59
6.	ПИТАНИЕ ДРОЖЖЕЙ.....	63
6.1.	Источники углерода. Углеводы.....	64
6.2.	Источники азота.....	66
6.3.	Минеральные компоненты. Макро- и микроэлементы.....	67
6.3.1.	Макроэлементы.....	67
6.3.2.	Микроэлементы.....	69
6.3.3.	Факторы роста дрожжей.....	71
6.3.4.	Витамины в метаболизме дрожжей.....	73
7.	СТИМУЛЯТОРЫ РОСТА ДРОЖЖЕЙ.....	77
7.1.	Физические стимуляторы роста микроорганизмов.....	78
7.2.	Биологические стимуляторы роста микроорганизмов.....	79
7.3.	Химические стимуляторы роста микроорганизмов.....	79
7.4.	Источники стимуляторов роста дрожжей.....	81
8.	ВЛИЯНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ ВНЕШНЕЙ СРЕДЫ НА ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ МЕТАБОЛИЗМ ДРОЖЖЕЙ И СИНТЕЗ КЛЕТОЧНЫХ КОМПОНЕНТОВ.....	82
8.1.	Влияние температуры.....	82
8.2.	Действие концентрации водородных ионов.....	83
	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	85

Меледина Татьяна Викторовна  
Давыденко Светлана Геннадьевна

**ДРОЖЖИ *Saccharomyces cerevisiae***  
**МОРФОЛОГИЯ, ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ,**  
**МЕТАБОЛИЗМ**

**Учебное пособие**

*Ответственный редактор*  
Т.Г. Смирнова

*Редактор*  
Р.А. Сафарова

*Компьютерная верстка*  
И.В. Гришко

*Дизайн обложки*  
Н.А. Потехина

---

Подписано в печать 24.12.2015. Формат 60×84 1/16

Усл. печ. л. 5,12. Печ. л. 5,5. Уч.-изд. л. 5,38

Тираж 50 экз. Заказ № С 74

---

Университет ИТМО. 197101, Санкт-Петербург, Кронверкский пр., 49

Издательско-информационный комплекс  
191002, Санкт-Петербург, ул. Ломоносова, 9



В 2009 году Университет стал победителем многоэтапного конкурса, в результате которого определены 12 ведущих университетов России, которым присвоена категория «Национальный исследовательский университет». Министерством образования и науки Российской Федерации была утверждена программа его развития **на 2009–2018 годы**. В 2011 году Университет получил наименование «Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики».

## ИНСТИТУТ ХОЛОДА И БИОТЕХНОЛОГИЙ



Институт холода и биотехнологий является преемником Санкт-Петербургского государственного университета низкотемпературных и пищевых технологий (СПбГУНиПТ), который в ходе реорганизации (приказ Министерства образования и науки Российской Федерации № 2209 от 17 августа 2011 г.) в январе 2012 года был присоединен к Санкт-Петербургскому национальному исследовательскому университету информационных технологий, механики и оптики.

Созданный 31 мая 1931 года институт стал крупнейшим образовательным и научным центром, одним из ведущих вузов страны в области холодильной, криогенной техники, технологий и в экономике пищевых производств.

В институте обучается более 6500 студентов и аспирантов. Коллектив преподавателей и сотрудников составляет около 900 человек, из них 82 доктора наук, профессора; реализуется более 40 образовательных программ.

Действуют 6 факультетов:

- холодильной техники;

- пищевой инженерии и автоматизации;
- пищевых технологий;
- криогенной техники и кондиционирования;
- экономики и экологического менеджмента;
- заочного обучения.

За годы существования вуза сформировались известные во всем мире научные и педагогические школы. В настоящее время фундаментальные и прикладные исследования проводятся по 20 основным научным направлениям: научные основы холодильных машин и термотрансформаторов; повышение эффективности холодильных установок; газодинамика и компрессоростроение; совершенствование процессов, машин и аппаратов криогенной техники; теплофизика; теплофизическое приборостроение; машины, аппараты и системы кондиционирования; хладостойкие стали; проблемы прочности при низких температурах; твердотельные преобразователи энергии; холодильная обработка и хранение пищевых продуктов; тепломассоперенос в пищевой промышленности; технология молока и молочных продуктов; физико-химические, биохимические и микробиологические основы переработки пищевого сырья; пищевая технология продуктов из растительного сырья; физико-химическая механика и тепло-и массообмен; методы управления технологическими процессами; техника пищевых производств и торговли; промышленная экология; от экологической теории к практике инновационного управления предприятием.

В институте создан информационно-технологический комплекс, включающий в себя технопарк, инжиниринговый центр, проектно-конструкторское бюро, центр компетенции «Холодильщик», научно-образовательную лабораторию инновационных технологий. На предприятиях холодильной, пищевых отраслей реализовано около тысячи крупных проектов, разработанных учеными и преподавателями института.

Ежегодно проводятся международные научные конференции, семинары, конференции научно-технического творчества молодежи.

Издаются журнал «Вестник Международной академии холода» и электронные научные журналы «Холодильная техника и кондиционирование», «Процессы и аппараты пищевых производств», «Экономика и экологический менеджмент».

В вузе ведется подготовка кадров высшей квалификации в аспирантуре и докторантуре по 11 специальностям.

Действуют два диссертационных совета, которые принимают к защите докторские и кандидатские диссертации.

Вуз является активным участником мирового рынка образовательных и научных услуг.

**[www.ihbt.edu.ru](http://www.ihbt.edu.ru)**

