

С. А. КОНОВАЛОВ

БИОХИМИЯ ДРОЖЖЕЙ

Издание второе, переработанное и дополненное

МОСКВА «ПИЩЕВАЯ ПРОМЫШЛЕННОСТЬ» 1980

ББК 36.87
К64
УДК 663.12 : 577.1.001

Коновалов С. А.

Биохимия дрожжей. — М.: Пищевая пром-сть, 1980.—271 с.

Книга представляет собой систематизированное обобщение отечественных и зарубежных научно-исследовательских работ в области биохимии дрожжей. Во 2-м издании значительно обновлены и расширены разделы, посвященные биохимии, физиологии и молекулярной биологии.

В центре внимания находится клетка, которая рассматривается в книге как система взаимосвязанных структур и протекающих в них химических процессов. Поэтому важные вопросы метаболизма — обмена веществ — рассматриваются как на клеточном, так и на субклеточном уровне и на уровне молекулярных структур. Это позволило автору более полно объяснить многие вопросы регуляции обмена веществ.

Одновременно уделено внимание и другому важному типу регуляции скорости биосинтетических реакций, осуществляемому по принципу отрицательной обратной связи, когда продукт синтетической цепи подавляет активность фермента, катализирующего первую стадию. Следовательно, показано, что активность фермента непосредственно контролируется метаболитами.

В книге подробно описывается азотный и фосфорный обмен у дрожжей. Эти виды обмена тесно переплетаются между собой и определяют лицо современной биохимической науки. Обмен нуклеиновых кислот, например, связан с синтезом белков.

Характеризуются биохимические особенности дрожжей при размножении их в проточной среде.

Заключительная глава книги посвящена обобщению наиболее важных исследований в области биохимии дрожжей и практическому использованию их для интенсификации производства. В частности, повышения продуктивности дрожжей наиболее эффективно можно достигнуть в условиях проточной среды и многократного использования клеток. Кроме того, показана возможность ускорения созревания вина и пива благодаря применению ферментов лизированных дрожжей и повышения качества готовой продукции. В книге впервые рассматривается возможность получения из дрожжей белковых изолятов пищевого достоинства.

Таблиц 23. Иллюстраций 124. Список литературы — 393 названия.

Рецензенты: д-р биол. наук., проф. Л. Г. ЛОГИНОВА, д-р техн. наук, проф. Б. А. УСТИННИКОВ.

К $\frac{31702-038}{044(01)-80}$ 38—80 2908000000

© Издательство «Пищевая промышленность», 1980 г.

ВВЕДЕНИЕ

Одна из задач, вытекающих из решений XXV съезда КПСС, состоит в глубоком изучении и широком использовании микроорганизмов в народном хозяйстве, в том числе для производства пищевых и кормовых продуктов, ферментов и других физиологически активных и ценных веществ. В связи с этим одной из важнейших проблем современной биохимии микроорганизмов является исследование механизмов, регулирующих рост и размножение микробной клетки. Знание закономерностей роста и развития, их взаимосвязи с условиями внешней среды — ключ к сознательному управлению жизнедеятельностью микроорганизмов, основа для дальнейшего совершенствования технологии, повышения эффективности производства и улучшения качества выпускаемой продукции.

Из всех известных микроорганизмов дрожжи могут быть отнесены к наиболее ценным в практическом отношении. Они находят широкое применение в пищевой и микробиологической промышленности, причем масштабы их использования постоянно расширяются. Это связано как с развитием традиционных отраслей пищевой промышленности (хлебопекарная, пивоваренная, винодельческая, спиртовая), так и с бурным ростом новых видов производств микробиологической промышленности (кормовые дрожжи, ферменты). Кроме того, исключительная скорость размножения и богатый химический состав дрожжевых клеток обуславливают широкое использование их биомассы не только как ценного кормового продукта, широко используемого в животноводстве и птицеводстве, но и как исходного сырья для получения пищевых концентратов.

Практически решаются вопросы, связанные с получением и использованием дрожжевого белка для пищевых целей. Ферментативный способ разрушения клеточных стенок дрожжей открывает широкие возможности наиболее эффективного использования их продуктов биосинтеза, в том числе и для получения белка пищевого достоинства [41, 42, 112, 113].

Применение дрожжей в промышленности всецело связано с их размножением, предопределяемым обменом веществ (метаболизмом). При этом ведущую роль в управлении биохимическими процессами играют ферменты, выполняющие различные каталити-

ческие функции. Регулирование и координирование биохимических процессов зависит не только от количества ферментов, но и от их активности, определяемой внешними условиями. Внешние факторы воздействуют на ферменты непосредственно и необратимо, понижая при неблагоприятных условиях как их активность, так и долговечность.

ХАРАКТЕРНЫЕ БИОХИМИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ДРОЖЖЕЙ

В процессе жизнедеятельности в клетке осуществляются сложные и разнообразные биохимические превращения, направленные на синтез сложных органических соединений, характерных для состава самой клетки. Процессы в клетке протекают как бы по восходящей: из одних форм в другие, из низших в высшие, из простых в сложные.

Дрожжевые клетки по своему химическому составу сильно отличаются от ингредиентов питательной среды, в которой они размножаются. Отличительная особенность живой клетки заключается именно в том, что она обладает способностью вовлекать простые исходные ингредиенты питательной среды в процесс метаболизма. При этом должно проявляться согласованное взаимодействие реакций энергетического и конструктивного обмена, протекающих при биосинтезе предшественников. Весьма разнообразные органические молекулы в живой клетке построены из небольшого количества простых исходных молекул. К таким промежуточным молекулам, играющим роль исходных соединений, относятся кетокислоты, пуриновые и пиримидиновые основания, пентозы, гексозы, фосфопируват, малат, ацетат и некоторые другие. Следовательно, эти разнообразные по строению соединения принципиально отличаются от состава питательной среды, включающей минеральные соли и какое-либо органическое углеродсодержащее соединение: сахар, органическую кислоту, спирт, *n*-парафин и т. п.

Все эти источники углерода подвергаются в клетке многоступенчатому ферментативному расщеплению, причем каждый из них индуцирует синтез «собственных» ферментов. Последующая ступень усложнения организации клетки связана с образованием биомолекул (аминокислоты, мононуклеотиды, сахара, жирные кислоты, глицерин), играющих роль строительных блоков. Оказалось, что многие биомолекулы, несмотря на разнообразие их структур, между собой связаны, и прежде всего последовательностью ферментативных реакций метаболизма, имеющих общие промежуточные продукты. Например, углерод глюкозы используется живой клеткой для построения аланина и углеродного скелета пальмитиновой кислоты.

Таким образом, биомолекулы оказались пригодными на роль компонентов в живой клетке, с одной стороны, благодаря своим особым свойствам и структуре и, с другой — благодаря способности к самым разнообразным ферментативным взаимопревращениям. Из биомолекул образуется огромное разнообразие органи-

ческих и тонко специфических макромолекул. Эти молекулы придают клетке уникальные свойства, характерные только для живого микроорганизма. Макромолекулы характеризуются прежде всего сложностью состава и высоким уровнем организации. Они придают клетке усложненную внутреннюю структуру. Современная биохимия стремится исследовать химическое строение отдельных структурных элементов клетки и проникнуть в суть химических реакций, имеющих важнейшее значение для функции клеток [136а].

Каждая составная часть клетки имеет специальное назначение и выполняет строго определенную функцию, причем это касается не только отдельных органелл — ядра, митохондрий, мембран, рибосом, лизосом и т. п., но и индивидуальных химических компонентов — липидов, белков, нуклеиновых кислот. Поэтому не случайно, что одна из примечательных особенностей развития биохимии в настоящее время состоит в стремлении анализировать процессы не только на клеточном уровне, но и на уровне взаимодействия молекул. Такой подход — характерная черта молекулярной биологии, родоначальником которой, по мнению многих исследователей, явилась биологическая химия. В частности, большие успехи за последнее время сделаны в области более точного выяснения химических свойств белков и нуклеиновых кислот, которые играют решающую роль в жизни клетки. Более ясная картина вырисовывается также в определении пространственной структуры макромолекул и их физиологических свойств [136а].

В последние годы достигнуты исключительные успехи в области биохимии митохондрий. Эти органеллы, играющие в клетке роль главных производителей энергии, содержат не только свою собственную специфическую дезоксирибонуклеиновую кислоту (ДНК), но также специфические рибонуклеиновые кислоты (РНК), ферменты и рибосомы для транскрипции ДНК и синтеза белка [48, 202].

И наконец, самое главное свойство живой клетки заключено в способности к самовоспроизведению, причем основанному на репликации не только органоидов, но и ДНК [63, 16, 17]. Следовательно, осуществляется преобразование «неживых» молекул в специфически взаимодействующие молекулы, определяющие жизнедеятельность клетки. В отличие от состава среды в клетке преобладают органические соединения. Например, дрожжи и многие бактерии содержат около 5000 различных органических соединений, в том числе примерно 3000 белков и около 1000 нуклеиновых кислот. Большим многообразием представлены также полисахариды и липиды.

Для осуществления биохимических функций макромолекулы и прежде всего белки и нуклеиновые кислоты должны быть определенным образом пространственно взаиморасположены, иметь определенную пространственную укладку, часто довольно причудливой конфигурации. Если условия окружающей среды выходят из каких-то строго определенных границ температуры и рН, то

эти макромолекулярные вещества легко денатурируются, так как резко изменяют свои химические и физические свойства, теряют трех- и четырехмерную структуру, утрачивают свои специфические функции. Это объясняется тем, что связи, поддерживающие вторичную, третичную и четвертичную структуру, гораздо менее прочны, чем, например, пептидные связи в полипептидах. Следовательно, при денатурации разрушается структура высшего порядка при сохранении первичной структуры. Таким образом, допуская некоторую условность, можно сказать, что структуры высшего порядка белков и нуклеиновых кислот определяют метаболизм и жизнедеятельность микроорганизмов. Это первая отличительная особенность живой клетки.

Второй характерной особенностью клетки, в состав которой входят биологически важные макромолекулы, является их сложная организация. Живые клетки, в том числе и дрожжи, синтезируют эти макромолекулы легко и в изобилии. При этом синтез этих соединений происходит не в результате каких-то случайно протекающих химических процессов, а по строго спланированным схемам, обеспечивающим им специфичность. Образование новых клеток и синтез макромолекул рассматривается в настоящее время как реализация генетической информации, записанной в виде последовательности оснований ДНК в хромосомах материнской клетки. Молекула ДНК воспроизводит новую молекулу, которая не отличается от исходной.

Тем самым дочерние молекулы автоматически получают точными копиями родительской молекулы.

Молекула ДНК служит матрицей для синтеза РНК, которая в свою очередь обеспечивает синтез белка. Таким образом, между структурой ДНК и структурой белка существует прямое линейное соответствие. Или, другими словами, последовательность оснований ДНК обеспечивает аминокислотную последовательность в молекуле белка.

Необходимо иметь в виду, что процесс биосинтеза — это не только построение макромолекулярных компонентов, но и сборка из них различных органелл. Таким образом, сложная организация макромолекул, их строгое воспроизведение обеспечивают жизнедеятельность клетки.

Третья важная особенность живой клетки заключается также и в том, что ее молекулы — белки, нуклеиновые кислоты, липиды, углеводы — не синтезируются, так сказать, «раз и навсегда» и они не функционируют до «абсолютного износа», после которого потребовалась бы полная их замена.

В действительности оказалось, что все компоненты живой клетки находятся в состоянии непрерывных изменений. Все макромолекулы постоянно обновляются, т. е. «старые» молекулы расщепляются, а вместо них синтезируются новые вещества, аналогичные «состарившимся».

Таким образом, в клетке происходит непрерывный круговорот молекул.

РОЛЬ ФЕРМЕНТОВ В ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТИ ЖИВОЙ КЛЕТКИ

Среди биологически активных веществ, участвующих в различных биохимических процессах живой клетки, чрезвычайно важную роль играют биокатализаторы. Изучение ферментов позволяет глубже понять химические превращения, лежащие в основе жизнедеятельности дрожжей, и дает возможность интенсифицировать технологические процессы.

Дрожжевая клетка, попадая в питательную среду, должна обеспечить себя прежде всего механизмами, посредством которых она могла бы непрерывно воссоздавать внутриклеточные соединения из простейших молекул. При этом ведущую роль в управлении биохимическими процессами играют ферменты, выполняющие различные функции и локализованные в различных клеточных структурах [111, 141]. Они обладают способностью активизировать различные химические соединения и представляют собой движущую силу биохимических превращений. Ферменты не только ускоряют, замедляют или выключают, но и координируют биохимические реакции.

С целью наиболее эффективного действия ферменты объединяются в структуру, обеспечивающую выполнение последовательной цепи реакций. Так, например, если в клетке поддерживается цепь реакций $A \rightarrow B \rightarrow V \rightarrow G$, то эффективность всей системы будет гораздо выше в том случае, когда начальные продукты реакции $A \rightarrow B$ будут образовываться в непосредственной близости от места протекания следующей за ней реакции $B \rightarrow V$. Если же образующийся субстрат B должен каждый раз диффундировать через клетку в поисках фермента, способного перевести его в состояние V , то процесс в целом будет очень неэффективным. Чтобы избежать этого, ряд небольших «звеньев» объединяется в структуру большого размера. Связующим звеном отдельных мелких структур — звеньев являются липиды, которые не растворяются в воде и являются «твердым» субстратом для иммобилизации ферментов. При этом скорость ферментативных реакций значительно ускоряется и, по-видимому, возрастает многократность использования ферментов.

В отличие от неорганических катализаторов ферменты обладают чрезвычайной специфичностью действия. Они катализируют строго определенные реакции. Высокая специфичность действия ферментов является одной из важнейших особенностей живой материи [128, 129, 158]. Именно эта тончайшая специфичность ферментативного катализа лежит в основе биологического обмена веществ, т. е. всех процессов, благодаря которым проявляется жизнь. Поскольку каждый фермент способен ускорять только какую-то одну реакцию данного соединения, не влияя при этом на другие его возможные реакции, в живой клетке может протекать одновременно множество различных независимых реакций, причем без риска накопления бесполезных побочных продуктов и при стопроцентном их выходе. В то же время известно, что в

органических реакциях, проводимых в лаборатории при помощи искусственных катализаторов, почти всегда образуются побочные продукты.

Кроме того, ферменты способны в течение секунд и минут обеспечивать протекание сложных многостадийных реакций. Наряду с «индивидуальными» реакциями в клетках существуют, как указывалось ранее, также системы последовательных реакций, обеспечивающих направленность биохимических процессов. Специфические каталитические свойства ферментов выдвигают их на передний план как одно из действенных средств технического прогресса целого ряда отраслей народного хозяйства.

ИНДУЦИРОВАННОЕ ОБРАЗОВАНИЕ ФЕРМЕНТОВ

Дрожжи и другие микроорганизмы легко приспосабливаются к изменениям в составе питательной среды именно благодаря явлению индуцированного образования ферментов. Так, например, при культивировании дрожжей на среде, содержащей углеводороды в качестве единственного источника углерода, образуются и соответствующие ферменты, совершенно отличные от тех, которые синтезируются этими же дрожжевыми клетками, но при культивировании их на среде с углеводами. Постоянное культивирование дрожжей на среде с *n*-алканами позволило им выработать новый механизм, который обеспечивает включение запасных путей метаболизма и прежде всего глиоксилатного шунта наряду с циклом трикарбоновых кислот (ЦТК). При выращивании дрожжей на углеводной среде глиоксилатный шунт используется очень слабо, судя по активности изоцитратлиазы. Основным путем диссимиляции углеводов является ЦТК, глиоксилатный шунт оказывается в этих условиях запасным путем метаболизма [137, 196, 197, 39а].

Следовательно, индукция ферментов представляет собой механизм, который обеспечивает включение запасных путей для обеспечения метаболизма клетки при угрожающих изменениях в составе среды [39а].

Таким образом, микроорганизмы обладают способностью производить перестройку внутриклеточной ферментной системы и метаболических путей при изменении состава питательной среды.

Хотя механизмы живой клетки действуют в пределах известных физико-химических законов, химические реакции и процессы, протекающие в клетке, являются наиболее совершенными и могут служить лишь уникальной моделью, пока вне клетки невоспроизводимой. Однако управлять этими процессами в какой-то мере возможно. Например, известно, что в условиях стабильного состояния культуры химический состав клеток постоянен, но он может существенно меняться при изменении скорости роста. При этом усиливается синтез белка, РНК, клеточных стенок, митохондрий, нуклеотидов, цитохромов [109, 186]. С повышением удельной скорости роста дрожжей увеличивается размер клеток, скорость почкования и общее их количество [44].

При повышенном соотношении между азотом и углеродом усиливается синтез липидов с одновременным ослаблением синтеза других компонентов клетки. Клетка может «выключать» синтез ферментов, необходимых для образования данного продукта, из его предшественников при условии, если она получает этот продукт в готовом виде из питательной среды. Такая способность к саморегуляции очень важна для поддержания устойчивого состояния живой клетки.

Многие из этих приспособлений основаны на принципе отрицательной обратной связи, т. е. избыточное накопление продукта какой-либо реакции ведет к замедлению процесса его образования и, наоборот, недостаток этого продукта — к ускорению того же процесса. В конечном итоге обменные процессы координируются и направляются посредством регуляции синтеза клеточных ферментов. Например, образование индуцированных ферментов в значительной мере определяется условиями культивирования микроорганизма. Индуцированная ферментативная активность может быть значительно изменена под влиянием состава питательной среды при наличии или отсутствии специфического субстрата-индуктора.

Поэтому в зависимости от конечной цели, стоящей перед каждой отраслью производства, стремятся подобрать свои «оптимумы», обеспечивающие максимальный выход желаемого продукта. Характер метаболизма дрожжевой клетки и прежде всего его количественная сторона в значительной мере предопределяется условиями культивирования.

В последнее время в промышленности начинают применяться новые технологические способы и приемы, ускоряющие процессы размножения клеток, брожения, созревания вина и пива благодаря увеличению контакта клеток со средой, использованию физиологических и физических факторов, активных штаммов дрожжей и т. д. Одновременно внедряется новая аппаратура, обеспечивающая проточное культивирование, отъемно-доливное культивирование, периодическое культивирование с добавлением источников питания, многократное использование клеток и их органелл и т. д. К использованию новой техники и технологии специалисты-производственники должны быть теоретически подготовлены. Все эти технологические процессы базируются на жизнедеятельности дрожжевых клеток. Для того чтобы управлять процессами культивирования дрожжей с заданным составом клеток и определенной активностью обмена веществ, необходимо знать, как влияют различные условия выращивания на физиологическое состояние культуры, на ее продуктивность.

ДРОЖЖИ И МОЛЕКУЛЯРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ИХ КЛЕТОЧНОЙ СТРУКТУРЫ

Дрожжи и дрожжеподобные грибы имеют важное значение для промышленности и сельского хозяйства. Некоторые виды их вызывают брожение или интенсивно размножаются и накапливают значительную биомассу, используемую в качестве белковой добавки.

Дрожжи можно культивировать на различных питательных средах, содержащих, как правило, органические вещества, в частности углеводы, углеводороды, органические кислоты и т. п. Предпочтительнее, чтобы реакция среды этого типа была слегка кислой (рН 5,5). Такая реакция благоприятствует росту многих дрожжей, а также задерживает рост некоторых посторонних бактерий, загрязняющих культуру.

ДРОЖЖИ И ДРОЖЖЕПОДОБНЫЕ ГРИБЫ

По структуре и способу размножения дрожжи можно отнести к довольно просто организованным, хотя и более сложным, чем бактерии.

Дрожжи и дрожжеподобные грибы относятся к двум большим группам: сумчатым грибам и несовершенным грибам. Ниже указанные группы дрожжей — *Ascomycetes* и *Fungi imperfecti* — характеризуются дополнительно.

СУМЧАТЫЕ ГРИБЫ, ИЛИ ИСТИННЫЕ ДРОЖЖИ

Истинные дрожжи относятся к классу *Ascomycetes*, порядку *Endomycetales*, включающему три семейства [132]. Эти семейства дрожжевых организмов различаются между собой способом вегетативного размножения. Так, например, семейство *Saccharomycetaceae* включает дрожжевые организмы, размножающиеся почкованием; дрожжевые организмы, относящиеся к семейству *Schizosaccharomycetaceae*, размножаются делением, и, наконец, семейство *Saccharomycodaceae* объединяет дрожжи, размножающиеся почкованием, которое завершается делением. Каждое семейство разделяется на несколько родов в зависимости от формы спор, способа их образования и прорастания. В основу видového различия положено отношение организма к сахарам.

Из этой группы дрожжей наибольший интерес представляет род *Saccharomyces*, включающий 41 вид. Этот род объединяет наибольшее число дрожжей, размножающихся главным образом почкованием и дающих иногда мицелиевидные клетки с перегородками. Эти дрожжи подразделяются на подгруппы в зависимости от отношения их к сахарам. Дрожжи первой подгруппы сбраживают глюкозу, галактозу, сахарозу, мальтозу, раффинозу на $\frac{1}{3}$, но не сбраживают лактозу. К этой группе относится большинство промышленно важных дрожжей: спиртовые — *Sacch. cerevisiae* расы XII, XV, Я и др.; пивоваренные — *Sacch. cerevisiae* Froberg, *Sacch. carlsbergensis* расы 11, 776, А, 44, S-Львовская, винные — *Sacch. vini* (*ellipsoideus*), хлебопекарные — *Sacch. cerevisiae* расы 14 и др. [78, 110, 146, 188, 331]. Кроме указанных сахаров эти дрожжи усваивают также этиловый спирт, глицерин, молочную, уксусную и другие кислоты. Как правило, дрожжевые клетки имеют круглую, яйцевидную или овальную форму. Их размеры обычно составляют: ширина 5—7, длина 8—11 мкм. Они несколько крупнее бактериальных клеток. Поэтому и объем клеток дрожжей в несколько сот раз превышает объем, например, стафилококков; диаметр этих широко распространенных сферических бактерий равен около 1 мкм.

Размножаются дрожжи, как уже отмечалось ранее, при помощи почкования, а также спорообразования. При неблагоприятных условиях они образуют сумки (аски) со спорами по 1—4 споры в каждой сумке. Споры имеют шаровидную и слегка овальную форму, с гладкими оболочками, бесцветные. Сумки со спорами возникают партеногенетически из прекративших почкование клеток. При благоприятных для вегетативного размножения условиях споры превращаются в почкующиеся клетки; этому предшествует копуляция двух прорастающих спор или их первых почек.

Вид дрожжей *Sacch. cerevisiae* в диком состоянии в природе не встречается, тогда как другие виды этого рода, а также организмы других родов встречаются в природе. Все эти дрожжи, используемые в различных отраслях бродильного производства, приобрели в результате длительного культивирования характерные признаки, например глубину выбраживания сусла, образование специфического аромата, способность к низовому и верховому брожению и т. д.

По этим признакам они отличаются от дрожжей, встречающихся в природных условиях. Все эти дрожжи обладают высокой ферментативной активностью, обеспечивающей им способность интенсивно сбраживать сахара в анаэробных условиях с образованием этилового спирта и углекислоты. Способность этих микроорганизмов образовывать спирт используется для получения вина, пива и промышленного спирта.

К семейству *Saccharomycetaceae* относится также род *Debaryomyces*, представители которого имеют небольшие круглые клетки, гетерогамную копуляцию и споры, покрытые оболочкой с шипиками. К этому семейству относятся также роды *Zygo-*

saccharomyces, Hansenula, Schizosaccharomyces, Saccharomycodes, Hanseniaspora, Nadsonia. Одни из этих дрожжей находят широкое применение в промышленности, другие, наоборот, вызывают порчу продуктов, например пива, солений, маринадов.

В бродильном производстве, и в частности в спиртовой отрасли, применяют в течение длительного времени несколько рас дрожжей *Sacch. cerevisiae*, причем они оказались хорошо приспособленными к условиям спиртового брожения и занимают «внеконкурентное» положение по сравнению с другими известными расами. Однако, несмотря на то что сахаромикеты образуют богатый и разнообразный ферментный и в особенности зимазный комплекс, они в то же время не содержат амилолитических и декстринолитических ферментов, а также ферментов α -галактозидазы, отчего их действие не распространяется на трисахариды и более сложные по строению олигосахариды. Они слабо или вовсе не образуют внеклеточную протеиназу и пептидазу, вследствие чего могут ассимилировать в процессе роста лишь конечные продукты гидролиза белка и других азотсодержащих соединений. Сахаромикеты относительно слабо размножаются в условиях повышенного содержания спирта в среде и не обладают в достаточной степени антибиотическими свойствами против кислотообразующих бактерий; в условиях периодического брожения они сравнительно бурно проявляют, а затем быстро теряют способность к интенсивному размножению. Поэтому вопросы, связанные с выявлением или получением наиболее активных и жизнеспособных дрожжей, представляют практический интерес.

Одним из направлений, обеспечивающих получение новых высокопродуктивных рас дрожжей, является гибридизация. В результате скрещивания спор или вегетативных клеток исходных промышленных рас дрожжей образуются гибриды, которые приобретают новые свойства, заимствованные от исходных культур. Гибриды как бы «аккумулируют» в себе свойства, заключенные и разрозненные в исходных расах.

ГИБРИДЫ ДРОЖЖЕЙ

Гибридизация дрожжей широко и успешно применяется как метод генетического анализа в теоретических исследованиях, одновременно она используется и как метод получения и селекции продуктивных производственных штаммов [119]. Для получения гибридов дрожжей применяется либо попарное соединение заранее полученных спор, либо скрещивание вегетативных клеток, имеющих противоположные аллели типов спаривания. В последнем случае клетки можно соединять в пары, как и при соединении спор, или смешивать их в больших количествах — массовое скрещивание [187].

При помощи микроманипулятора споры соединяются либо в капельках суспензии, либо на агаровой пленке с питательной средой. Приготовленный препарат с соединенными спорами во влажной камере инкубируется в течение 16—18 ч

при 15—20° С. После этого можно наблюдать образование зиготы — диплоидной клетки, получившейся в результате слияния двух спор. Хромосомы в такой клетке (в отличие от гаплоидной) располагаются парами, причем одна хромосома в каждой паре получена от одной споры исходной расы дрожжей, другая — от другой споры исходной расы. Полученный таким способом гибрид наследует свойства двух исходных рас дрожжей, относящихся к одному или различным видам и даже родам.

При обычных условиях культивирования у дрожжей можно получить полиплоидные формы, т. е. с увеличенным числом хромосом. Они могут быть получены под влиянием митозных ядов (у аспорогенных дрожжей *Candida*, *Torula* и др.), или спонтанно, или при скрещивании как диплоидных, так и гетерозиготных клеток [119]. Например, установлена триплоидная природа хлебопекарной расы *Sacch. cerevisiae* 14-2 и гибрида 112, полученного от скрещивания спиртовых и хлебопекарных рас [122].

В Институте генетики Академии наук СССР в лаборатории, руководимой проф. К. В. Косиковым, путем внутривидовой и отдаленной гибридизации различных рас дрожжей получены высокопродуктивные гибридные дрожжи [118, 120, 121, 123].

Наибольший интерес представляют гибриды дрожжей, сбраживающие раффинозу (табл. 1).

Таблица 1
Сбраживание раффинозы гибридами дрожжей [120]

Дрожжи	Количество выделившейся CO ₂ , г/100 мл	Концентрация сухих веществ бражки, %	Несброженный сахар, определенный после 5-минутного гидролиза, %	Спирт, об. %	Количество клеток, млн./мл
Гибрид 13	0,70	3,2	1,72	0,96	77
Гибрид 67	1,75	0,5	0,21	2,58	119
Гибрид 70	0,65	4,0	1,80	0,96	84
Гибрид 73	1,85	0,3	0,14	2,68	115
<i>Sacch. cerevisiae</i>					
Я	0,50	3,8	1,80	0,96	80
В	0,40	3,8	1,80	0,99	97
Л	0,45	3,8	1,83	0,99	68
<i>Sach. carlsbergensis</i>	1,65	1,0	0,71	2,30	103

Примечание. Для брожения применялась среда Филиппсона, содержащая 6% раффинозы (вместо глюкозы), 0,15% сернистого аммония, 1% дрожжевого автолизата и соли.

Преимущества гибридных дрожжей по сравнению с производственными расами наиболее отчетливо проявляются при сбраживании мелассы. Выход спирта из одной тонны условного крахмала мелассы значительно возрастает. Объясняется это тем, что гибриды, например № 73, 67 и др., в состоянии полностью сбраживать раффинозу, которая постоянно содержится в мелассе. Это объясняется тем, что гибриды синтезируют фермент α -галактозидазу, катализирующий распад мелибиозы, получаемой из раффинозы, на глюкозу и галактозу. Производственные дрожжи этого фермента не образуют. Указанные гибриды широко применяются на заводах, перерабатывающих мелассу на спирт [120].

Представляет интерес гибрид № 112, полученный в результате скрещивания спор спиртовых и хлебопекарных рас дрожжей [121, 122]. Этот гибрид имеет ряд свойств, необходимых для производ-

ства хлебопекарных дрожжей на спиртовых заводах. Производство таких дрожжей в цехах спиртовых заводов ежегодно возрастает, и это оправдывается тем, что стоимость их примерно в 2 раза меньше тех хлебопекарных дрожжей, которые получают на специализированных дрожжевых заводах. В то же время применяемые спиртовые расы дрожжей имеют недостаточную мальтазную активность, что значительно снижает их хлебопекарные качества. Однако гибрид 112 имеет хорошую и стойкую мальтазную активность и в то же время синтезирует α -галактозидазу, обеспечивающую сбраживание раффинозы.

В результате применения гибрида выход спирта был на уровне контроля (*Sacch. cerevisiae* B), а мальтазная активность улучшилась по сравнению с контролем в 7—8 раз, и выход биомассы повысился на 16,4%. Такая повышенная продуктивность гибрида 112 обусловлена в основном полиплоидией, которая приводит к увеличению размеров клеток.

Применение гибрида 112 на заводах УССР, перерабатывающих мелассу на спирт с получением хлебопекарных дрожжей, обеспечивает хорошие производственные показатели [121]. Стойкие крупноклеточные полиплоидные формы у бактерий получены лишь у нескольких видов под действием митозных ядов (камфоры, аценафтена) или мутагенов (этиленимина, УФ-лучей) [88].

Предполагают, что полиплоидия, даже ее первая ступень — диплоидия, в том виде, в каком она представлена, например, у дрожжей, не дала бы бактериям всех преимуществ этого состояния из-за короткого и простого развития и высокой скорости размножения. Более того, диплоидия для некоторых организмов означала бы дополнительный расход энергии на поддержание ненужной избыточной информации, что имело бы отрицательные последствия для их существования. У бактерий единственная кольцевая хромосома несет в себе большое количество повторов, т. е. содержит несколько равноценных наборов генома. В связи с этим увеличение количества ДНК в полиплоидной клетке, по-видимому, не может принести ей какие-либо дополнительные преимущества.

Помимо культурных дрожжей в среде дрожжерастильных аппаратов часто встречаются дикие дрожжи. Общим отличием диких дрожжей от культурных является их неспособность к образованию спор. Дрожжи, которые не формируют ни аскоспор, ни базидий, объединяются в семейство *Cryptosporaceae*, включающее 3 подсемейства и 9 родов.

В процессе культивирования сахаромисцетов, в условиях одновременного развития инфекции, качество хлебопекарных дрожжей заметно снижается. Исключением оказались лишь дрожжи *Candida robusta*, содержание которых в количестве 10% от биомассы хлебопекарных дрожжей способствует улучшению их стойкости при хранении. В готовой продукции дрожжевых заводов было идентифицировано по крайней мере 7 видов (*Candida tenuis*, *C. curvata*, *C. humicola*, *C. solanii*, *Torulopsis dattila*, *C. guilliermondii* и *C. utilis*), определяющих состав инфекции. Эти дрожжи, как правило, бедны зимазным комплексом и в результате слабо сбраживают сахар.

НЕСОВЕРШЕННЫЕ ГРИБЫ

Эта группа дрожжеподобных организмов характеризуется тем, что они не образуют спор, а размножаются исключительно почкованием. Некоторые несовершенные грибы по форме напоминают плесени, другие — дрожжи. Наиболее обширная группа, к которой относятся несколько родов, получила название *Torulopsidaceae*. Эти дрожжи не образуют ни конидий, ни псевдомицелия, ни пигментов. Они представляют собой относительно короткие разветвленные цепочки дрожжеподобных клеток и благодаря этому напоминают дрожжи, но до сих пор образования аскоспор у них не наблюдалось. Часто их называют торулами. Подразделение этой группы на различные виды основывается на наличии или отсутствии конидий, образующихся бесполом способом; учитывается также цвет пигмента, форма и местообитание. В природе особенно широко распространены различные виды *Torulopsis*, нередко дающие на плотных питательных средах красные колонии.

Большинство дрожжей этой группы плохо сбраживает углеводы, но некоторые *Torulopsis* способны усваивать такие соединения, как пентозы, которые не усваиваются типичными дрожжами. Поэтому эти виды находят себе применение при получении кормовых и пищевых дрожжей. К дрожжеподобным грибам относятся также пленчатые дрожжи *Mycoderma vini*, образующие на поверхности вина или уксуса беловатую тонкую пленку. Микодерма способна окислять уксусную кислоту до CO_2 , и поэтому она является вредной для уксусного производства.

К несовершенным грибам относятся также дрожжи, объединяемые родами *Cryptococcus*, *Pityrosporum*, *Kloeckera*, *Trigonopsis*.

Группа дрожжей, получивших название *Rhodotorulaceae*, образуют ярко окрашенные пигменты: красный, розовый или оранжевый.

Большинство дрожжей этой группы являются, как отмечалось ранее, аспорогенными и размножаются исключительно почкованием. К аспорогенным дрожжам причисляют роды *Candida*, *Torulopsis*, *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Pullularia* и ряд других.

Из группы несакхаромицетов (*Non Saccharomycetaceae*) наиболее широкое применение находит род *Candida* семейства *Torulopsidaceae* [351]. Достопримечательность этих дрожжей связана прежде всего с высокой их способностью осуществлять рост и размножение за счет окисления углеводов нефти. Именно благодаря микробиологическому окислению углеводов осуществляется в широком масштабе производство кормовых дрожжей, представляющих собой белково-витаминный концентрат (БВК).

Благодаря высокому содержанию хорошо усвояемого белка, а также витаминов применение этих дрожжей в животноводстве и птицеводстве дает высокий эффект.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ КЛЕТОЧНОЙ СТРУКТУРЫ ДРОЖЖЕЙ

Клетки различных микроорганизмов имеют сложную структуру. Наблюдается дифференциация в строении и специализация отдельных структур для осуществления энергетических и синтетических процессов. Следовательно, субклеточные компоненты играют вполне определенную роль в общей деятельности клетки микроорганизмов. Как правило, клетки состоят из клеточной оболочки с цитоплазматической мембраной, цитоплазмы, внутри которой расположены ядро или ядерные структуры, эффективно выполняющие функцию ядра (у бактерий), митохондрий или мембранные системы (у бактерий), рибосомы и запасные гранулы.

Для микроорганизмов часто употребляют собирательное название протисты. На основании особенностей строения клеток протисты можно разделить на 2 четко различающиеся группы. Первая группа — высшие протисты, клетки которых содержат ядро и тем самым являются эукариотами. В эту группу входят дрожжи, микроскопические грибы, водоросли и простейшие. Строение их клеток сходно с животными и растительными клетками. Вторая группа — низшие протисты — включает бактерии и сине-зеленые водоросли. Так как в клетках этих микроорганизмов отсутствует четко оформленное ядро, они получили название прокариотических, что означает предъядерных.

УЛЬТРАСТРУКТУРА ЭУКАРИОТИЧЕСКИХ КЛЕТОК

Дрожжи, как и другие эукариотические клетки, имеют органоиды, присущие клеткам высших организмов, такие, как ядро, митохондрии, рибосомы, эндоплазматическая мембрана, вакуоли и клеточные стенки (рис. 1—1). Кроме того, показано наличие в дрожжевых мембранных структурах аппарата Гольджи и лизосом [104, 280]. Поэтому схема строения клетки высших организмов, обычно изображаемая во многих литературных источниках, соответствует схеме строения дрожжевой клетки. Она отличается, например, от клетки растений только отсутствием хлоропластов и наличием целлюлозной оболочки. Необходимо отметить, что не только дрожжеподобные клетки *Histoplasma capsulatum* содержат в ядре плотное ядрышко, но оно обнаружено у истинных дрожжей.

Удалось установить наличие в дрожжевом ядре нитей веретена и предположить существование в нем центриоли, т. е. органеллы, характерной для животных клеток. Центриоль находится в цитоплазме около ядра и формирует, вероятно, ряд протоплазматических нитей во время митоза и мейоза, т. е. деления клеточного ядра в процессе размножения клеток.

Клеточные органоиды представляют собой как бы внутриклеточные органы, с помощью которых живая клетка осуществляет свои жизненные функции. Внутриклеточное дифференцирование

обеспечивает разделение функций внутри микробной клетки. Ниже приводится краткий перечень компонентов клетки.

Структуры, видимые в световом микроскопе		Ультраструктуры	
Ядро	} Протопласт	Цитоплазматическая мембрана	}
Митохондрии		Эндоплазматическая сеть	
Цитоплазма		Аппарат Гольджи	
Вакуоли (тонопласт)		Лизосомы	
Клеточная стенка		Основная плазма (матрикс)	

Ниже приводятся данные, характеризующие размеры и количественное содержание субклеточных компонентов клетки.

Субклеточные компоненты	Количество в клетке	Диаметр
Ядро	1	2—5—20 мкм
Митохондрии	500—2000	1—5 мкм
Рибосомы	$(5 \div 50) 10^6$	25 нм
Молекулы ферментов	$(5 \div 50) 10^8$	2—10 нм

Первыми из органелл кроме ядра были обнаружены крупные по размерам образования — вакуоли и митохондрии. Эти органеллы отделены от цитоплазмы двойной мембраной, или оболочкой. Затем с развитием методов электронной микроскопии были установлены более мелкие структуры, т. е. ультраструктуры клетки: рибосомы, эндоплазматическая сеть, аппарат Гольджи. Ультраструктурные органеллы (в противоположность структурным) не отделены от цитоплазмы двойной мембраной, а свободно плавают в матриксе. Они, по-видимому, менее автономны, чем, например, митохондрии. Структурные органеллы цитоплазмы, выполняющие специализированные функции, имеют свой онтогенез: они возникают, проходят определенный цикл развития, растут и в конце концов исчезают [217].

В дрожжевых клетках, как и в других эукариотах, содержится несколько или много хромосом, а следовательно, и несколько или много молекул ДНК, каждая из которых имеет очень большую молекулярную массу, затрудняющую выделение ее в интактном виде.

В диплоидных клетках почти вся ДНК сосредоточена в клеточном ядре, где она связана с белками основного характера — гистонами — и распределена между хромосомами. Помимо ядерной

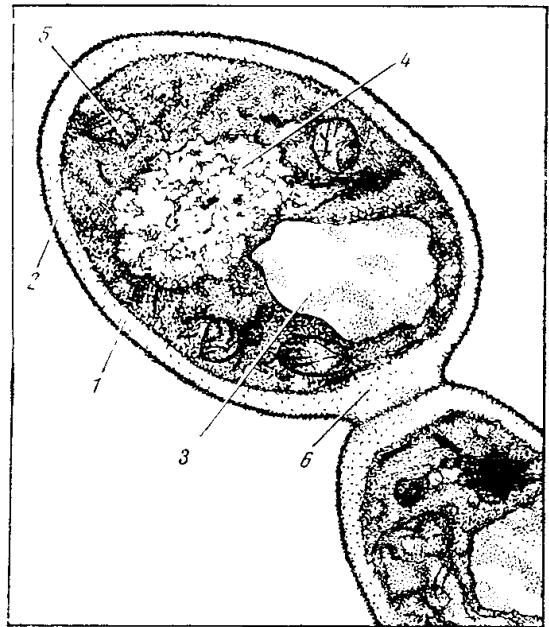


Рис. 1—1.
Электронная микрофотография среза целой дрожжевой клетки:
1 — клеточная стенка; 2 — цитоплазматическая мембрана; 3 — ядро; 4 — вакуоли; 5 — митохондрии; 6 — зарубцованный участок.

ДНК эукариотические клетки содержат очень небольшие количества цитоплазматической ДНК, часто называемой сателлитной ДНК. Последняя отличается от ядерной ДНК по составу оснований и молекулярной массе. К сателлитной относится ДНК, присутствующая в митохондриях. На долю этой ДНК приходится около 0,1—0,2% всей клеточной ДНК.

Рибосомы в цитоплазме дрожжей (эукариотов) гораздо крупнее, чем у бактерий (прокариотов); они характеризуются коэффициентом седиментации 80, их диаметр около 22 нм и молекулярная масса около 4 млн. [141].

МОЛЕКУЛЯРНАЯ СТРУКТУРА И ОСНОВНЫЕ СВОЙСТВА МЕМБРАН

Мембраны занимают одно из первых мест среди органоидов клетки и играют в ее жизни, по-видимому, не меньшую роль, чем ядро с его генетическим аппаратом. Общая площадь клеточных мембран очень велика, и потому на их долю может приходиться значительная часть всей сухой массы клетки [141, 96]. По своей молекулярной структуре все биологические мембраны в основном сходны, поскольку они имеют ряд общих свойств. Большинство мембран характеризуется одинаковым соотношением липидов и белка. Почти все мембраны легко проницаемы для воды и нейтральных липофильных соединений, в меньшей степени проницаемы для полярных веществ, таких, как сахара и амиды, и совсем плохо проницаемы для небольших ионов, таких, как Na^+ или Cl^- . Наконец, для большинства мембран характерно высокое электрическое сопротивление.

По-видимому, мембраны асимметричны, т. е. имеют лицевую и обратную сторону. Асимметрия может быть обусловлена химическими различиями в структуре белков, покрывающих разные стороны мембраны, или химическими различиями в структуре липидных слоев. Асимметрия может способствовать направленному переносу веществ через мембраны.

Необходимо отметить, что целостность мембранных структур независимо от их молекулярной организации поддерживается всецело благодаря гидрофобным и полярным взаимодействиям. И, наоборот, отсутствуют данные, которые свидетельствовали бы о наличии ковалентных связей между последовательно расположенными молекулами липидов, белков или между прилегающими друг к другу липидными и белковыми молекулами. Удавалось липиды экстрагировать из мембран смесями хлороформа и спирта, причем при добавлении липидов снова к мембранам отмечалась реассоциация, т. е. липиды подключались в мембранную структуру. Вероятно, мембраны представляют собой системы, соответствующие минимуму свободной энергии, поэтому они способны к самосборке.

Среди огромного количества клеточных мембран, функционально связанных между собой, первое место по ее физиологическому и биохимическому значению принадлежит цитоплазматической мембране (плазмалемме).

Цитоплазматическая мембрана. Имеет складчатую форму (рис. 1—2), вероятно, постоянно изменяется во времени и осуществляет колебательные «движения». Полагают, что цитоплазматическая мембрана совершает волнообразные колебательные движения, хотя эта особенность еще мало изучена вследствие чисто технических трудностей. В основе колебательных движений цито-

плазматической мембраны лежит прежде всего тепловое возбуждение молекул, которое препятствует созданию постоянной, геометрически правильной структуры ее. На изменение подвижности мембраны могут оказывать влияние локальные различия окружающей среды, внутренняя нестабильность самой клетки.

При некоторых условиях жизнедеятельности клетки метаболизм цитоплазмы, прилегающей к мембране, может меняться, что может также вызывать колебательные движения. Гиалоплазматический слой, непосредственно прилегающий к цитоплазматической мембране, отличается от остальной цитоплазмы клетки тем, что он содержит мало органоидов (митохондрий, рибосом, эндоплазматической сети). Вследствие этого гиалоплазма может влиять на механические свойства мембраны, и, в частности, она играет важную роль в процессах превращения геля (твердые коллоиды) в золь (растворимые коллоиды), и наоборот.

Вероятно, механические процессы, протекающие в цитоплазматической мембране, обуславливаются все же силами молекулярного сцепления, действующими на ее поверхности, а не явлениями поверхностного натяжения, силы которого очень слабы. На ее состояние оказывает воздействие также электрический заряд клеточной поверхности. Наличием заряда на поверхности клетки объясняется, например, превышение адсорбции клеткой анионов над адсорбцией катионов при условии, что большинство клеток несет отрицательный заряд.

Строение цитоплазматической мембраны. Мембрана состоит из двух слоев липидов, покрытых с обеих сторон белком. Большинство мембран состоит примерно из 40% липидов и 60% белка. Липидная часть мембраны содержит преимущественно полярные липиды различных типов, причем почти все количество таких липидов клетки сосредоточено в ее мембранах. Соотношение между различными липидами постоянно для каждого данного вида мембран и определяется генетически, тогда как жирнокислотные компоненты отдельных мембран липидов не фиксированы и количество их может варьировать [141, 325, 358]. Липиды образуют или двойной слой вытянутых и параллельных друг другу молекул, или концентрические мицеллы. В обоих случаях гидрофобные концы молекул обращены друг к другу, а гидрофильные (полярные) — к периферии, соприкасаясь с белковыми макромолекулами, граничащими с гиалоплазмой. Липидная природа плазматической мембраны подтверждает, что проникновение через нее веществ непосредственно зависит от их растворимости в липидах.



Рис. 1—2.
Цитоплазматическая мембрана (ЦМ) дрожжевой клетки *Candida tropicalis* (стрелками указаны более глубокие и многочисленные инвагинации).

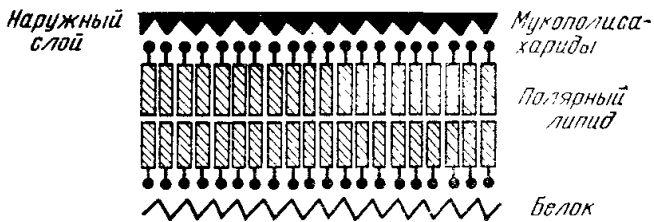


Рис. 1—3.
Модель элементарной мембраны Робертсона.

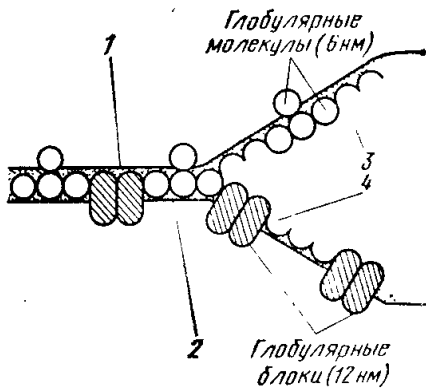


Рис. 1—4.
Глобулярная структура биомембраны:
1 — наружная поверхность; 2 — внутренняя поверхность; 3 — наружная поверхность скола; 4 — внутренняя поверхность скола.

характерна для всех цитомембран, она универсальна; поэтому он назвал свою модель элементарной мембраной.

Концепция элементарной мембраны основана на том, что под электронным микроскопом в цитомембранах выявляются три слоя: два слоя белковых, окрашенных после фиксации и контрастирования с использованием тяжелых металлов под электронным микроскопом, и один слой липидов.

Однако позже стали допускать, что мембраны полярны и что наружный слой состоит не из белков, а из мукополисахаридов, действительно обнаруженных в клеточных мембранах. Элементарная мембрана схематически представлена на рис. 1—3.

С помощью метода замораживания — травления (т. е. путем сублимации льда сверху и снизу мембраны) было показано, что мембрана имеет более сложное строение, а именно, что в ее состав входят глобулярные частицы разного размера.

Частицы размером 18 нм, встречающиеся в дрожжевых клетках, по-видимому, принимают участие в образовании фибрилл полиглюкана.

Глобулярные компоненты мембраны обнаружены на обеих ее сторонах, они сильно различаются по размеру (8,5 и 12—17,5 нм).

За последнее время установлена ультраструктура у изолированных мембран вакуолей (тонопластов) дрожжевых клеток. Она

В течение длительного времени противопоставлялись две модели ультраструктуры плазматической мембраны клетки: пластинчатая и глобулярная (шаровидная) модели. Согласно первой модели, выдвинутой Даусоном и Даниэлли, мембраны содержат непрерывную углеводородную фазу, образованную их липидными компонентами. Позднее указанная модель была несколько видоизменена и уточнена, главным образом в результате работ Робертсона. Он предположил, что белковый слой состоит из развернутых цепей белков, или цепей, имеющих конформацию α -спирали. Такая организация, по мнению Робертсона,

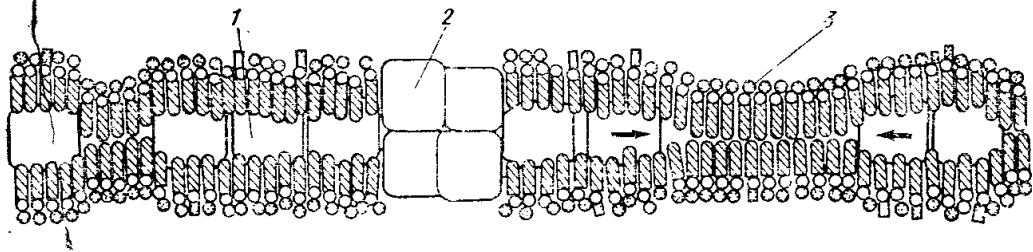


Рис. 1—5.
Глобулярная структура бномембраны дрожжей:

1 — белок; 2 — белковый комплекс; 3 — двойной слой липидов (стрелками указано изменение положения белков).

оказалась сходной с ультраструктурой мембран тилакоидов¹, изображенной на рис. 1—4. В соответствии с полученными данными, мембрана имеет четыре различных типа поверхности; ее наружная и внутренняя части при расщеплении методом травления образуют еще две дополнительные поверхности. Из рисунка видно, что на поверхности мембраны расположены лишь отдельные глобулярные молекулы, большая же их часть внедрена в толщу мембраны. При расщеплении мембраны частицы меньшего размера остаются связанными с ее наружным листком, тогда как крупные блоки (12 нм), состоящие из 6 субъединиц, встроены во внутренний листок и возвышаются над ним. Наличие белковых молекул внутри мембраны предотвращает ее сморщивание после экстракции липидов.

Однако у мембран вакуолей дрожжей обнаруживается относительно гладкая поверхность, а на сколах мембран можно видеть глобулярные частицы.

Все эти факты, по-видимому, указывают на то, что центральный слой цитомембран состоит из белков [345]. В отличие от прежнего представления полярные группы липидов не покрыты слоем белка, причем полярные липиды удаляются с помощью фосфолипазы без разрушения мембран и без изменения конформации белков. Однако пока еще нет полного единства мнений относительно характера взаимодействия белков центрального слоя и двойного слоя липидов [217].

В то же время известно, что цитоплазматическая мембрана у дрожжей содержит примерно равные количества белка и липидов.

Заслуживает внимания модель, предложенная Коппом (1972). Она основана на данных, полученных при исследовании двойных реплик с плазмалеммы дрожжевых клеток (рис. 1—5). Согласно этим данным, белковые молекулы, расположенные между слоями липидов, могут изменять свое положение (указано стрелками). На некоторых участках липидные слои не разделены белком, и именно здесь с помощью рентгеноструктурного анализа обнаруживаются двойные слои липидов.

¹ Тилакоиды — уплощенные замкнутые пузырьки — диски, содержащиеся в хлоропластах.

Ранее высказанные концепции о стабильности биомолекулярной пленки маловероятны не только потому, что в них не принимается во внимание полярность мембран, но и потому, что по существу своему мембраны статичны, тогда как метаболическая активность клетки предопределяет лабильное состояние мембран, поскольку непрерывный приток энергии не позволяет ей достигнуть стабильности. Экспериментально показано, что активность плазмалеммы может изменяться в течение короткого промежутка времени и что ее активация сопровождается колоссальными изменениями в ее морфологии.

Кроме того, модель Даниэлли — Даусона — Робертсона, предполагающая, что липиды имеют структуру сплошного бислоя, полярные головки которого электростатическими силами удерживают монослой белка, не соответствует современным экспериментальным данным. В действительности установлено, что не менее половины белка мембран удерживается не электростатическими, а гидрофобными силами; значительная часть поверхности мембран представлена только полярными головками фосфолипидов. Поэтому фосфолипаза С гидролизует фосфолипиды выделенных мембран — до 60—70% от их содержания в мембране. При этом мембраны не разрушаются и остается неизменным круговой дихроизм белков в мембране.

Удаление 70% фосфора увеличивает подвижность жирных кислот, однако белок конформации не изменяет. Следовательно, электростатические взаимодействия между полярными головками липидов и белков не определяют структуру мембраны, так как значительная часть мембранных белков удерживается в мембране гидрофобными силами, значительная часть липидов мембран вообще не связана с белком и отщепление 70% полярных головок не влияет на конформацию белка в мембране.

Липиды согласно этой модели организованы в бислои, но они не являются непрерывными. Липид ведет себя как растворитель для неполярных участков белков, стероидов и т. д. Эта модель адекватно описывает состояние белков в мембране; этим она привлекательна.

Роль мембран в осуществлении общих клеточных функций. Таким образом, в клетке имеются 2 типа растворителя: вода, составляющая 70—80% от сырой массы клетки, и жирнокислотные остатки липидов, содержание которых не превышает 0,002—0,0002% от сырой массы клеток, или 0,02—0,01% от их сухой массы. Липиды образуют большую поверхность раздела фаз внутри и на границе клетки. В этих местах имеется дополнительная энергия в виде поверхностного натяжения, а также межфазового скачка электрохимического потенциала. Поэтому мембраны служат местом, где осуществляются важнейшие функции клетки, требующие скорости, экономности, направленности и сопряжения в работе многих звеньев. В мембраны вмонтированы места инициации синтеза ДНК, цепи электронного транспорта, ферменты сопряжения окисления с фосфорилированием, вблизи мембраны

находятся ферменты окисления жиров, трикарбоновых кислот и т. д. На мембранах расположены ферменты гликолиза, протеолиза и эстеразы.

Гидрофобные вещества, такие, как неполярные аминокислоты, витамины, стероиды, имеют важное значение в жизнедеятельности клетки. Гидрофобная область мембран — вот возможное место их аппликации (применения) и работы [139, 181].

Таким образом, одна из функций мембран — это создание гидрофобной фазы внутри и на границе клетки, т. е. выполнение липидами роли гидрофобного растворителя.

Вторая функция мембран — это обеспечение построения мультиэнзимных комплексов, включающих систему ионов натрия и калия, активируемую АТФазой, цепь ферментов окислительного фосфорилирования, а на наружной стороне плазматической мембраны — протеолитические ферменты, ферменты гликолиза, эстеразы и др.

Третья функция мембран — это осуществление клеточной рецепции (восприимчивости). Специализированными мембранными структурами — рецепторами осуществляется распознавание и связывание аминокислот и медиаторов¹, например циклического АМФ (аденозинмонофосфат).

Клеточная мембрана играет еще и роль преобразователя трансмембранной разности электрических потенциалов в химическую энергию, запасаемую в макроэргических соединениях. Так, например, в митохондриях энергия трансмембранного электрического потенциала используется, по-видимому, для синтеза АТФ при окислении субстратов дыхания [204].

При этом одновременно выполняется и другая функция мембраны, вытекающая из того факта, что она содержит полярные вещества: водорастворимые белки, гликопротеины, гликопептиды. Эти мембранные компоненты несут полярные группы и фиксированные заряды и играют поэтому роль ионообменника, регулирующего прохождение заряженных ионов через мембрану. Мембраны могут накапливать минеральные и органические ионы и посредством сорбции и ионного обмена удерживать их вблизи или на поверхности мембранных структур. Другие ионы, входящие в состав среды, будут мембраной исключаться. При этом может изменяться концентрационный профиль веществ вблизи мембраны. В связи с этим накопление заряженных веществ и проницаемость веществ незаряженных зависит в значительной мере от ионообменной емкости мембраны и степени набухания ее компонентов.

Кроме того, следует указать еще на одну функцию мембраны. Работами последних лет установлено, что слой воды, примыкающие к мембране, не перемешиваются с остальным объемом раствора. Наличие такого слоя растворителя, в котором подвижность молекул воды понижена, позволяет создать депо тех или иных

¹ Медиатор — промежуточный продукт обмена, посредник между другими метаболитами.

веществ вблизи мембраны. Это и дополнительное диффузионное препятствие для проникающих в клетку веществ. Толщина этого неперемешивающегося водного слоя составляет микрометры [58, 83].

Часть функций осуществляется отдельными локусами мембраны (перенос веществ через мембрану, различные ионные каналы¹: Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Cl⁻, локально расположенные молекулы ферментов), другая часть функций осуществляется на всей мембране: образование диффузионно-осмотического барьера, создание гидрофобной фазы, участие в сборке мультиэнзимных ансамблей, поддержание ионной асимметрии, обеспечение направленности метаболических реакций, клеточной рецепции, система активного транспорта и т. д.

Кроме того, полагают, что белки в мембране могут перемещаться под воздействием электрического поля, образующегося на мембранах при некоторых условиях. В зависимости от заряда самих белков электрополе может вызывать или сближение (контакт) белков, или их расхождение (разъединение). Такие перемещения могут иметь важное регуляторное значение для процессов, требующих взаимодействия нескольких белков. Сообщается о подвижности белковых молекул микроорганизма *Micococcus lysodeicticus*, а также о мембране, содержащей молекулы родопсина (зрительного пигмента) [97].

ЦИТОПЛАЗМА

Внутриклеточное содержимое, кроме ядра, как известно, называется цитоплазмой. Это составная часть клетки, которая остается, если удалить все элементы, видимые под световым микроскопом: ядро, митохондрии, вакуоли. Таким образом, цитоплазму определяют по негативному критерию; иными словами, в этом определении не содержится характеристики самой цитоплазмы, а приводится перечень не входящих в ее состав компонентов, для которых она служит всего лишь матриksom [217]. Трудность определения цитоплазмы проявилась особенно ярко, когда под электронным микроскопом были открыты многие ультраструктурные органеллы. Поэтому все биохимические процессы, происходящие в цитоплазме, связаны с определенными структурами. Несмотря на это, все же кажется разумным придерживаться классических представлений и считать, что цитоплазма — это та часть клетки, которая остается, если удалить ядро, митохондрии и клеточную оболочку.

Итак, основой всего живого является цитоплазма — вязкая, слегка желтоватая, полужидкая субстанция.

Полужидкая консистенция цитоплазмы обусловлена наличием в ней высокомолекулярных соединений, в первую очередь белков и нуклеиновых кислот [156]. В состав цитоплазмы входят также

¹ Считают, например, что вход в натриевый канал контролируется несколькими (5—6) белковыми субъединицами, так что общая площадь, ими занимаемая, равна приблизительно 100—200 нм². Это составляет лишь 0,02% от всей площади мембраны.

липиды, углеводы, различные низкомолекулярные соединения, минеральные соли и вода.

Принимая во внимание, что структурные элементы занимают не более 10% ее общего объема, большую часть цитоплазмы можно рассматривать как водный раствор, лишенный структуры. Это положение обеспечивает постоянно высокую скорость реакции. Цитоплазматический коллоид способен обратимо переходить из геля в золь. Дилемма заключается в том, что образование структуры означает увеличение вязкости, а возросшая вязкость в то же время уменьшает скорость диффузии, а следовательно, и метаболизм клетки. Выход из такого положения связан с образованием гидрофильного геля. Ультраструктура геля поддерживается сшивками, соединяющими протяженные молекулы полимера, при этом остальной объем клетки находится в жидком состоянии. В зависимости от разрешающей способности микроскопа цитоплазма представляется гомогенной или зернистой, гранулярной. Размер гранул близок к размеру макромолекул. Задача будущего — выделить эти гранулы и описать их химические свойства.

Функции цитоплазмы многообразны. Они связаны с явлениями роста, морфогенеза (т. е. с образованием структур и дифференцированием клетки), цитоплазматической наследственности (плазмон или цитоплазматический геном) и т. п. Цитоплазма играет важную роль в биохимии клетки и находится в тесном взаимодействии с органеллами, которые она окружает. Например, первая стадия дыхания — гликолиз и спиртовое брожение — протекает в цитоплазме, тогда как его последующий этап — цикл трикарбоновых кислот — осуществляется в митохондриях.

МИТОХОНДРИИ

Митохондрии представляют собой важную органеллу, или субклеточную структуру, выполняющую специфические функции. Митохондрии, так же как и ядро, отделены от цитоплазмы двухслойной мембраной (рис. 1—6). Это самые большие из клеточных включений. Их толщина колеблется от 0,2 до 2 мкм, длина от 0,5 до 7 мкм. Двухслойная оболочка имеет толщину около 20 нм и по всему объему митохондрии образует складки, выступающие внутрь этих частиц. Эти перегородки (кристы, или гребень) сильно увеличивают внутреннюю поверхность, по которой располагаются ферменты. Количество митохондрий в клетке более или менее постоянно и характерно для данного типа микроорганизмов, однако оно может меняться в зависимости от стадии развития клетки и от ее функциональной активности [164, 309].

Главная функция митохондрий — перенос электронов, окислительное фосфорилирование, транспортирование субстратов, кофакторов и ионов и др. — связана с мембранами, состояние которых весьма динамично. В митохондриях синтезируются вещества, запасающие химическую энергию клетки. Поэтому не случайно их называют энергетической подстанцией клетки.

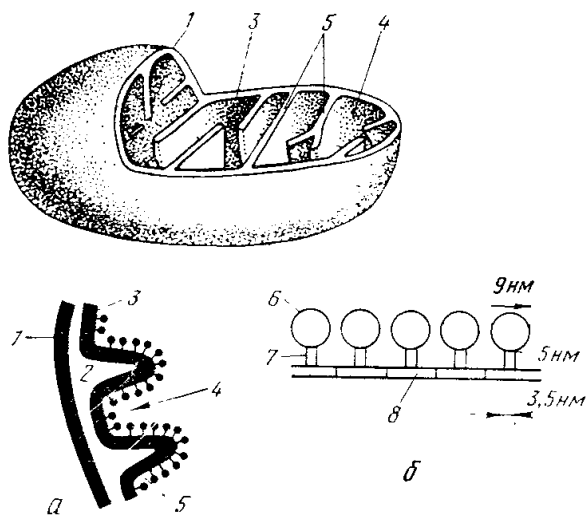


Рис. 1—6.
Схемы строения митохондрий:
а — общая схема строения; б — схема грибовидных тел внутренних мембран; 1 — наружная мембрана; 2 — межмембранное пространство; 3 — внутренняя мембрана; 4 — матрикс; 5 — кристы; 6 — головка; 7 — стержень; 8 — мембрана—базальная пластинка.

Установлена способность митохондрий к самовоспроизведению, а обнаружение у них особой формы ДНК способствовало пониманию вопросов клеточного дифференцирования. В биогенезе митохондрий участвуют как ядерный геном, так и собственный геном этих органелл.

Структурная организация митохондрий. Каждая митохондрия ограничена двойной мембраной. Наружная мембрана гладкая, внутренняя же образует кристы, пластинчатые у одних организмов и пальцеобразные у других. Величина крист зависит не только от вида организма, но также от его метаболического состояния.

Суммарная поверхность крист в общем пропорциональна дыхательной активности митохондрий.

Мембраны имеют толщину 5—7 нм и обнаруживают типичную трехслойную структуру, характерную для так называемой элементарной мембраны: две плотные линии, разделенные менее плотными промежутками. Однако эти две мембраны сильно различаются по своим физическим свойствам и составу [379]. Наружная мембрана менее плотная, чем внутренняя, и необратимо набухает в гипотоническом растворе фосфата, что приводит к ее разрыву и отделению. Таким образом, набухание наружной мембраны можно использовать для получения отдельных препаратов наружных и внутренних мембран.

Другой метод разделения связан с различной растворимостью мембран в дигитонине. Некоторые характерные свойства и компоненты обеих мембран приведены в табл. 2. Наружная мембрана, судя по ее составу и свойствам, является частью эндоплазматической сети. Однако отмечен и ряд различий между этими структурами, в частности, в них найдены ферменты, сходные, но не идентичные по своей активности: НАД.Н-цитохром-*b*-редуктаза, цитохром *b*₅, АТФ-зависимая ацил-КоА-синтетаза жирных кислот, глицеральдегидфосфат-ацил-КоА-трансфераза и фосфолипаза. Возможно, иногда происходит слияние наружных мембран митохондрий с элементами эндоплазматического ретикулула: в этом случае митохондрии получали бы легкий доступ к белкам и другим веществам, синтезируемым в цитоплазме, но предназначенным для функционирования в митохондриальной системе. По своему

Таблица 2

Локализация ферментов в митохондриях

Мембраны	Ферменты
Наружная мембрана	НАД.Н-цитохром-редуктаза, нечувствительная к ротенону; АТФ-зависимая ацил-КоА-синтетаза жирных кислот; глицерофосфатацилтрансфераза; фосфолипаза A ₁₁ ; нуклеозиддифосфокиназа; система удлинения цепей жирных кислот и др.
Внутренняя мембрана	Дыхательная цепь, включающая цитохромы <i>b</i> , <i>c</i> ₁ , <i>c</i> , <i>a</i> , <i>a</i> ₃ ; сукцинатдегидрогеназу; сукцинат-цитохром- <i>c</i> -редуктазу; сукцинатоксидазу; НАД.Н-цитохром- <i>c</i> -редуктазу, чувствительную к ротенону; НАД.Н-оксидазу; цитохром- <i>c</i> -оксидазу; ферменты фосфорилирования, сопряженного с дыханием. Кроме того, в ней локализованы и другие ферменты
Межмембранное пространство	Аденилаткиназа; нуклеозиддифосфокиназа; нуклеозидмонофосфокиназа и др.
Матрикс	Малтдегидрогеназа; изоцитратдегидрогеназа (НАДФ и НАД-специфические); α-кетоглутаратдегидрогеназа (липоилдегидрогеназа); цитратсинтетаза; аконитаза; фумараза; пируваткарбоксилаза; фосфопируваткарбоксилаза; аспаратаминотрансфераза; ацил-КоА-синтетаза жирных кислот и др.

Примечание. Многие ферменты, приводимые в таблице, были идентифицированы только по их активности.

ферментативному и липидному составу наружная мембрана сходна с эндоплазматической сетью, в непосредственной близости к которой она находится. В клетках дрожжей, растущих в анаэробных условиях, имеются мембраны, которые можно распознать по находящимся на их поверхности сферическим образованиям, содержащим АТФазу, однако в них отсутствуют многие липиды и ферменты, характерные для внутренней мембраны митохондрий.

Внутренняя митохондриальная мембрана чрезвычайно сложна, она обладает множеством отдельных, не связанных между собой функций и компонентов [202]. Эта мембрана уникальна по своему составу: она содержит многокомпонентные системы, осуществляющие перенос электронов, окислительное фосфорилирование и удлинение жирных кислот, а также белки-переносчики, регулирующие перенос катионов и небольших молекул во внутреннюю полость митохондрии и обратно. Содержащиеся в ней ферменты катализируют некоторые этапы разнообразных путей биосинтеза и многочисленные транспортные системы. Список ферментов, приведенных в табл. 2, далеко не полон.

Активность ферментов и мультиферментных комплексов зависит от надлежащего объединения их молекул в структуре мембраны, причем фосфолипиды играют ключевую роль в создании активных конфигураций. Представляет интерес наличие на внутренней мембране сферических частиц (около 8 нм в поперечнике),

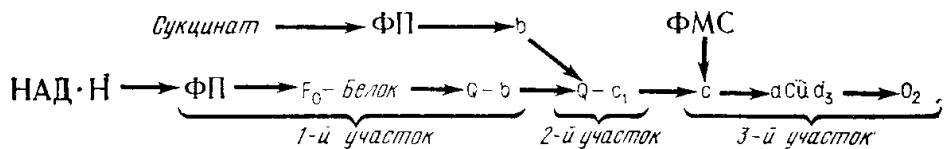


Рис. 1—7.

Цепь переноса электронов в митохондриях:

ФП — флавопротеид; F₀ — белок, содержащий негемное железо; а, а₃, с, с₁ — цитохром; ФМС — феназинметасульфат; 1-й участок чувствителен к ротенону, 2-й — к антимицину; 3-й — к цианиду.

сидящих на короткой ножке и выступающих в матрикс митохондрий. Эти частицы состоят из белка с молекулярной массой 284 000, получившего обозначение F₁, который обладает АТФазной активностью и участвует в окислительном фосфорилировании на всех трех участках цепи дыхания (рис. 1—7). АТФазная активность белка F₁, связанная с митохондриальной мембраной, устойчива к холоду и чувствительна к антибиотику олигомицину. Напротив, очищенный белок F₁ становится чувствительным к холоду, но проявляет АТФазную активность, устойчивую к олигомицину. После удаления частиц утрачивается АТФазная активность.

Из фракции препарата внутренней мембраны (CF₀) были экстрагированы цитохромы и большая часть липидов. Если фракцию CF₀ соединить с белком F₁ (с неактивной АТФазой) и добавить фосфолипиды, то в комплексе восстанавливается АТФазная активность, чувствительная к олигомицину, и появляются мембраны. Следовательно, АТФазная активность регулируется фосфолипидами.

Аллотопическая активность ферментов. Активность фермента, зависящая от связи его с мембраной, получила название аллотопической [75]. Примером аллотопического свойства служит чувствительность белка F₁ к олигомицину: она проявляется, когда этот белок связан с мембраной, и отсутствует, когда он находится в растворе.

Двухслойная структура мембран, образующих кристы, представлена на рис. 1—8. Внутренняя мембрана содержит: 1) систему переноса электронов и сопряженный с нею аппарат фосфорилирования; 2) систему удлинения жирных кислот; 3) переносчики промежуточных продуктов цикла Кребса, катионов, АТФ, АДФ, Ф_n и другие небольшие молекулы, участвующие в процессах роста и метаболизма митохондрий.

Различие митохондрий дрожжей, выращенных на глюкозе и на гексадекане. Установлено, что в функционировании ЦТК и ЦПЭ (цепи переноса электронов) в митохондриях «глюкозных» и «гексадекановых» клеток принципиальных различий не отмечается. Однако митохондрии «гексадекановых» клеток имеют резко повышенную активность ферментных систем, участвующих в окислении средних и высших спиртов (C₅—C₁₆) и альдегидов (C₉—C₁₆); активность этих ферментов в 3—7 раз превышает активность митохондрий глюкозных дрожжей. Одновременно у митохондрий гексадекановых клеток отмечается относительно увеличенная активность систем окисления высших жирных кислот и, наоборот, резко ослаблена способность к окислению экзогенного НАДН и практически полностью утрачена окислительная активность в отноше-

нии НАДФ. Н [86]. Однако спирты C_1 — C_3 и кислоты ЦТК окисляются как глюкозными, так и гексадекановыми митохондриями практически с одинаковой и относительно низкой скоростью [148, 87, 147].

Роль мембран митохондрий в регуляции активности и синтеза ферментов. Имеются основания полагать, что мембраны митохондрий участвуют в регуляции метаболических процессов как на уровне активности ферментов, так и на уровне их синтеза. Стабильность мно-

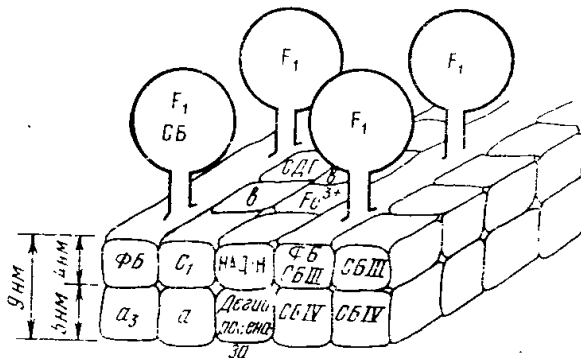


Рис. 1—8.
Схема двухслойной структуры мембран, образующих митохондриальные кристы:

F_1 — АТФаза; СБ — структурный белок; СДГ — сукцинатдегидрогеназа; ФБ — фибриллярный белок; Fe^{+3} — белок, содержащий негеминное железо.

гих ферментов обеспечивается, по-видимому, прежде всего благодаря их связыванию (иммобилизации) в мембранах. Кроме того, мембраны могут катализировать образование четвертичной структуры ферментов, в частности щелочной фосфатазы [161], а также участвовать в конформации белковых глобул и молекул РНК, взаимодействующих при трансляции, т. е. биосинтезе белка на тРНК в рибосоме. Вероятно, определенная часть рибосом погружена в мембрану, а полирибосомы (полисомы) в количестве от 10 до 75% связаны с мембранами, при этом они более эффективно включают аминокислоты в синтезируемые белки. Количественные изменения фосфолипидов, жирных кислот и минорного белкового компонента мембран дают основания полагать, что какое-то из указанных соединений может соответствовать продукту одного из регуляторных генов фосфогидролаз [161].

Структурный белок. Все белки митохондриальной мембраны, подобно F_1 , выполняют, вероятно, как ферментативную, так и структурную функции. Из-за больших трудностей идентификации белков мембран удалось выделить до сих пор лишь немногие их компоненты. В то же время показано, что митохондрии содержат большое количество белков, из которых одни находятся в матриксе, другие — в мембранах, одни в высоких концентрациях, другие — в очень низких. Одновременно установлено, что количество некоторых белков зависит от метаболического состояния клетки и на их синтез оказывают, вероятно, влияние индукция или репрессия. Кроме того, синтез и активность многих из белков регулируется другими компонентами органеллы.

Липиды. Они составляют около 30—40% всей массы митохондриальных мембран. Их состав из различных микроорганизмов различен, но во всех случаях около 90% составляют фосфолипиды трех главных типов: 1) фосфатидилхолин; 2) фосфатидилэтаноламин и 3) кардиолипин [202]. Каждый из этих компонентов обра-

зует эфиры с различными жирными кислотами, как насыщенными, так и ненасыщенными. Липидный состав заметно меняется в зависимости от условий культивирования микроорганизма. Так, например, у дрожжей при анаэробном росте в присутствии твина-80 и эргостерина жирные кислоты представлены главным образом мононенасыщенными соединениями, содержащими 16 и 18 атомов углерода, тогда как те же дрожжевые клетки, растущие в анаэробных условиях без твина-80 как источника жирных кислот с длинной цепью, содержат в основном ненасыщенные компоненты с 10 и 12 атомами углерода.

Как теперь известно, для ферментативного образования ненасыщенных связей в жирных кислотах необходим кислород. Поэтому анаэробные клетки нуждаются не только в эргостерине, но и во внешнем источнике жирных кислот с длинной цепью.

Промитохондрии. В дрожжевых клетках, росших в анаэробных условиях, замечены образования — промитохондрии. Эти образования в отличие от типичных митохондрий содержат главным образом ненасыщенные жирные кислоты с короткой цепью [202, 124]. В то же время в промитохондриях были найдены все основные типы фосфолипидов, хотя и не в тех количествах, которые характерны для митохондрий из клеток, растущих в аэробных условиях.

При изучении биогенеза митохондрий [56], осуществляемом на дрожжах из анаэробных культур, нашли, что промитохондрии содержат все компоненты АТФазы, чувствительной к олигомицину, неотличимые от соответствующих компонентов аэробных клеток, хотя и в несколько меньшем количестве. Среднее же число митохондрий (или промитохондрий) в отдельных клетках из аэробных и анаэробных культур было примерно одинаковым.

Более того, у промитохондрий обнаружили не только наружные и внутренние мембраны, но и одиночные, неправильно ориентированные кристы. Следовательно, внутренняя митохондриальная мембрана в зависимости от напряжения энергетического обмена способна образовывать большее или меньшее число складок крист, которые увеличивают ее активную поверхность [30]. Таким образом, анаэробный рост полностью не подавляет синтеза, а видоизменяет состав и формулу митохондрий [124].

Самая важная особенность промитохондрий — это отсутствие в них дыхательных пигментов и цепи электронов. Если цитохромы у анаэробных дрожжей полностью отсутствуют или недействительны, то активность сукцинатдегидрогеназы в зависимости от среды роста может быть и ничтожной, и довольно высокой.

РИБОСОМЫ

Ультрамикроскопические нуклеопротеидные частицы — рибосомы содержатся как в основной массе цитоплазмы и ядра, так и в митохондриях. В клетках прокариотов рибосомы расположены в цитоплазме свободно, тогда как в клетках эукариотов, имеющих эндоплазматическую сеть, локализация рибосом может несколько различаться в зависимости от того, каким образом должен быть использован синтезируемый белок. В тех клетках, в которых белок локализуется в цитоплазме и предназначается в основном для внутриклеточного использования, рибосомы в цитоплазме свободны, обнаруживаются преимущественно в форме полисом и не связаны с эндоплазматической сетью. Однако в тех клетках, которые секретируют белок, например ферменты, в окружающую среду, рибосомы большей частью связаны, по-видимому, с внеш-

ней поверхностью мембран эндоплазматической сети, где они часто располагаются рядами.

Рибосомы состоят из высокополимерной РНК и различных белков, связанных между собой в виде надмолекулярного комплекса. Нуклеиновые кислоты и белки в рибосомах удерживаются вместе при помощи слабых нековалентных сил — ионных взаимодействий, водородных связей, гидрофобных взаимодействий и ван-дер-ваальсовых сил. Нековалентное связывание макромолекул в надмолекулярные комплексы очень специфично и весьма стабильно вследствие комплементарности отдельных частей молекул [141].

Рибосомные белки нерастворимы в воде при рН 7,0 в нормальных условиях, но могут быть переведены в раствор с помощью 8 М мочевины и 4 М LiCl [141].

Рибосомы содержатся во всех клетках, включая бактериальные. Различают два класса рибосом: так называемые 80S- и 70S-рибосомы¹. Первые характеризуются молекулярной массой около $(4 \div 5) \cdot 10^6$ и коэффициентом седиментации (S_{20}^0, W) около 80 ед. Сведберга. Вторые несколько мельче — их молекулярная масса около $3 \cdot 10^6$ и S_{20}^0, W около 70 ед. Сведберга.

Рибосомы класса 80S характерны для дрожжей, плесневых грибов и других эукариотов. Рибосомы класса 70S — компонент цитоплазмы бактерий, актиномицетов и сине-зеленых водорослей, т. е. прокариотов. Некоторые антибиотики (стрептомицин, неомицин, канамицин, хлорамфеникол и эритромицин) специфически действуют только на 70S-рибосомы (бактерий), подавляя синтез белков. Эти же антибиотики не нарушают функции 80S-рибосом (дрожжей), ответственных за синтез белка в клетках эукариотов. Следовательно, несмотря на универсальность генетического кода и белоксинтезирующего механизма, рибосомы у эукариотов и прокариотов не идентичны.

На долю рибосом приходится почти треть массы клетки.

Рибосома состоит из двух неравных частей, или субъединиц, схематически изображенных на рис. 1—9 [206]. С помощью электронного микроскопа можно видеть структуру этих субъединиц: меньшая из них как бы «сидит» на поверхности большей. Каждая рибосомная субчастица представляет собой компактно

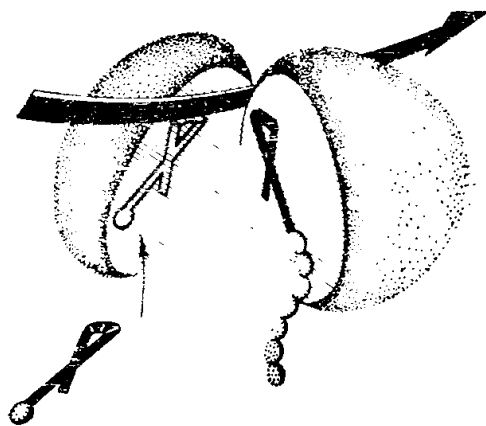


Рис. 1—9.
Схематическое изображение рибосомы с несколькими раздвинутыми субчастями (Спирин, 1974).

¹ S — начальная буква фамилии шведского ученого Сведберга, сконструировавшего первую ультрацентрифугу и разработавшего метод ультрацентрифугирования. Константу седиментации, т. е. единицу, определяющую скорость осаждения частиц в ультрацентрифуге, назвали единицами Сведберга, т. е. S.

свернутый рибонуклеопротеидный тяж (РНП-тяж) [32]. Рибосомы являются местом белкового синтеза. Белоксинтезирующие частицы, несколько сходные с рибосомами, найдены также в клеточном ядре и митохондриях.

Формы, размеры и состав. В первом приближении рибосому можно описать как слегка сплюснутый эллипсоид вращения с соотношением осей не более 1,5.

Размер рибосомальных частиц (гранул) составляет приблизительно 20 нм. По размерам и молекулярной массе рибосомы разделяются, как уже отмечалось ранее, на две четкие группы: 1) относительно мелкие рибосомы бактерий, актиномицетов, синезеленых водорослей, а также митохондрий; 2) более крупные цитоплазматические рибосомы всех эукариотических организмов, включая дрожжи, грибы, водоросли, высшие растения и животных.

Эукариотические рибосомы по сравнению с бактериальными содержат на 30—40% больше РНК и имеют большее относительное содержание белка. Рибосомы дрожжевой клетки содержат 40—44% РНК и соответственно 60—56% белка, их молекулярная масса варьирует от 4 до 5 млн.

В то же время рибосомы прокариотов содержат 60—65% РНК и 40—35% белка от сухой массы, а молекулярная масса их составляет около 2,8 млн. [141]. Таким образом, соотношение массы РНК/белок составляет около 1,6—1,8, причем это соотношение указывает на универсальность во всех рибосомах типа 70S независимо от вида бактерий [207]. Соотношение РНК/белок в 80S-рибосомах ниже, чем в бактериальных 70S-рибосомах и для наиболее чистых препаратов составляет около 1.

В общем в клетках разного типа рибосомы могут быть несколько различными по массе, по составу РНК и количественному соотношению между РНК и белком, но общая структура их одинакова.

Белковые компоненты рибосом из различных клеток также очень сходны по аминокислотному составу и довольно высокому содержанию основных аминокислот. Нуклеотидный состав рибосомной РНК у разных организмов значительно варьирует. Рибосомная РНК, хотя составляет значительную часть всей клеточной РНК (до 65—80%), ее функция в рибосомах еще не вполне выяснена. Обязательным низкомолекулярным компонентом рибосом являются катионы двухвалентных металлов — прежде всего Mg^{2+} и, по-видимому, Ca^{2+} . В физиологических условиях рибосомная РНК в составе рибосом, вероятно, находится преимущественно в виде Mg^{2+} (частично Ca^{2+})-соли. Для поддержания нативной структуры рибосомы обязательны также K^+ и (или) NH_4^+ [32].

Рибосомы обладают гуанозинтрифосфатазной (ГТФазной) активностью, что, по-видимому, играет важную роль в переносе аминокислот с транспортных РНК на растущую пептидную цепь. Было даже постулировано, что ГТФ обеспечивает рибосомам возможность передвигаться в полисоме вдоль молекулы иРНК.

Рибосомные субчастицы. Цитоплазматические рибосомы дрожжей представляют собой 80S-частицы, тогда как рибосомы, содержащиеся в митохондриях, относятся к бактериальному типу — 70S-частицы. Следовательно, рибосомы митохондрий отличаются от цитоплазматических тех же клеток не только меньшим размером, но и коэффициентом седиментации. Рибосомы удалось дис-

социировать на составляющие их субчастицы при понижении концентрации щелочноземельных катионов в растворе и вновь реассоциировать при восстановлении исходных условий. Сначала это было сделано для 80S-рибосом дрожжей, которые диссоциировали на субчастицы с коэффициентом седиментации 60 и 40 ед. Сведберга, а затем для 70S-рибосом бактерий, диссоциировавших на субчастицы с коэффициентом седиментации 50 и 30 ед. Сведберга. Диссоциация на две неравные субчастицы оказалась универсальным явлением, свойственным рибосомам всех организмов: $80S \rightarrow 60S + 40S$ или $70S \rightarrow 50S + 30S$.

Характерной структурной особенностью рибосомы является то, что она всегда построена из двух неравных субчастиц. Это универсальный принцип структурной организации рибосом.

Малая рибосомная субчастица 80S-рибосом обозначается как 40S-частица, характеризуется большим размером, чем 30S-частица, вследствие содержания в ней высокомолекулярной РНК и большего количества рибосомального белка.

Рибосомная РНК 40S-субчастицы 80S-рибосом, обозначаемая как 18S-РНК, имеет молекулярную массу около $0,7 \cdot 10^6$ [207]; это одна непрерывная полинуклеотидная цепь. Относительное содержание белка в 40S-частице несколько превышает половину (53—55%) ее сухой массы. Эта субчастица содержит вдвое больше белка и в целом по молекулярной массе в 1,7 раза крупнее, чем 30S-субчастица 70S-рибосомы, характерной для бактерий.

При определенных условиях 70S-рибосомы диссоциируются на малую 30S-субчастицу с молекулярной массой около $0,9 \cdot 10^6$, причем содержание РНК в 30S-частице больше, чем содержание белка. Вся рибосомная РНК 30S-субчастицы, составляющая около 60—65% сухой массы, представлена одной ковалентно-непрерывной молекулой с молекулярной массой $0,56 \cdot 10^6$. Обычно эта РНК в изолированном состоянии обозначается как 16S-РНК. Белковый компонент 30S-субчастицы, составляющий остальные 40—35% сухой массы, состоит из 21 полипептидной цепи.

Большая рибосомная субчастица 80S-рибосом, обозначаемая как 60S-частица, очень похожа по морфологии на 50S-частицу (бактериальную), но несколько крупнее. Ее молекулярная масса составляет около $3 \cdot 10^6$. В 60S-субчастице относительное содержание РНК больше, чем содержание белка. В 60S-частицах РНК составляет около 56—60%, а в 50S-частицах — около 63—65%. В 80S-рибосомах малая субчастица значительно больше нагружена белком, чем большая. Рибосомная РНК большой субчастицы (60S и 50S) всегда представлена двумя молекулами: высокомолекулярной 23S—28S-РНК и относительно низкомолекулярной 5S-РНК. Во всех случаях высокомолекулярная РНК большой рибосомной субчастицы представлена единой ковалентно-непрерывной цепью.

Низкомолекулярная 5S-РНК как 60S-, так и 50S-субчастиц представлена цепью из 120 нуклеотидов, т. е. имеет молекулярную массу около 40 000.

Подтвержден ранее полученный вывод, согласно которому РНК в среднем локализована ближе к центру частицы, чем белок.

Ассоциация субчастицы определяет синтез белка. Только целая рибосома может осуществлять синтез белка. Изолированные рибосомы способны синтезировать белки *in vitro*, если обеспечить их информационной РНК, набором нужных аминокислот, источником энергии, некоторыми ферментами и необходимыми транспортными РНК (тРНК). Именно в транслирующей рибосоме субчастицы связаны довольно прочно, и это их состояние в определенных условиях является необратимым. Рибосомные субчастицы, лишённые пептидил-тРНК и аминоацил-тРНК, ассоциируют не столь активно, и может существовать динамическое равновесие между свободными субчастицами и их ассоциатами: $70S \rightleftharpoons 50S + 30S$ [206, 241, 270, 339]. Повышение ионной силы среды за счет одновалентных катионов (K^+ , NH_4^+ и т. д.) способствует диссоциации [18, 199], в то время как ионы Mg^{2+} и Ca^{2+} , а также ионы Mn^{2+} и Co^{2+} способствуют ассоциации субчастиц. Факторами, способствующими диссоциации, являются также повышение температуры и pH. Эти результаты были подтверждены при получении 80S-рибосом [356]. По-видимому, лабильность ассоциации субчастиц требуется также и в течение элонгации [32].

Множественность белков рибосом была показана как при изучении 70S-бактерий, так и при изучении 80S-эукариотов. Множественность рибосомных белков проявляется при их фракционировании методом двухмерного электрофореза в полиакриламидном геле, когда на электрофореграмме обнаруживается более 50 пятен (для 70S-рибосом), большинство которых соответствует индивидуальным полипептидным цепям [312]. В составе малой субчастицы 70S-рибосом обнаруживается 21 белковая субъединица, а в большой — найдены 34 полипептидные цепи [390]. Количество различных полипептидных цепей в 80S-субчастицах существенно больше, чем в 70S-рибосомах.

Белки малой субчастицы принято обозначать буквой S, а большой — буквой L, и им присписывается номер по их положению на двухмерной электрофореграмме [390]. Молекулярная масса белковых субъединиц 30S- и 50S-субчастицы в основном варьирует от 10 000 до 30 000. Примерно в тех же пределах лежат значения молекулярной массы белков 80S-рибосом.

Большинство белков рибосом имеет основной характер, обусловленный высоким содержанием аргинина и лизина [313]. По строению они являются однотипными или одной копии, и лишь некоторые из них представлены двумя-тремя копиями. Судя по иммунологическим тестам, белки различных организмов неодинаковы по своей структуре. Под действием высоких концентраций солей одновалентных металлов удалось ступенчато «разобрать» субчастицу рибосом до почти полной ее депротенизации, при этом 50S-субчастицы одновременно теряют также свою 5S-РНК. Под действием солей происходит, по-видимому, ослабление белков с РНК и вытеснение ионов Mg^{2+} [226]. Вытеснение или удаление внутририбосомного Mg^{2+} приводит к разворачиванию субчастиц рибосом в РНП-тяжи.

Рибосомные белки существенно стабилизируют вторичную структуру РНК [226], в то же время рибосомная РНК является ковалентно-непрерывным каркасом, определяющим уникальное расположение белковых субъединиц в субчастицах рибосом. В этом и состоит биологическая роль рибосомных РНК.

Самосборка. В последние годы были найдены условия, в которых *in vitro* происходит самосборка активных в белковом синтезе 30S- и 50S-субчастиц из свободных РНК и полного набора рибосомных белков [348, 276]. На первом этапе сборки к РНК присоединяется 12—15 белков, в результате чего образуется неактивный РНП — предшественник (R1-частица), который активируется (реор-

ганизуется) при повышенной температуре в R1'-частицы, способные связать остальные 6—9 белков [114, 276]. Разные белки проявляют взаимодействие с РНК по-разному и в неодинаковой последовательности [223, 342].

Таким образом, дополнительно подтверждено, что субчастица рибосом представляет собой РНП-тяж со специфической последовательностью белков вдоль него. Этот тяж образуется в результате взаимодействия белков с полирибонуклеотидным каркасом, причем структура каркаса задается полинуклеотидной последовательностью РНК. Большинство белков субчастицы расположены на ее «поверхности» [18]. Однако способ укладки РНП-тяжа в субчастицах пока неизвестен. Продолжаются исследования в определении пространственной организации белков в рибосомах [32].

Количественное содержание рибосом. В зависимости от стадии роста и условий культивирования количество рибосом в клетках широко варьирует. Наименьшее количество рибосом в клетке содержится в стационарной фазе роста (в среднем $19,3 \cdot 10^3$), а наибольшее — в период активного роста [$(65 \div 95) 10^3$]. Таким образом, интенсивность биосинтеза белка у микроорганизмов зависит не столько от изменения скорости его образования, сколько от изменения их содержания в клетке [16]. Во многих клетках эффективными функциональными единицами, синтезирующими белок, служат группы из 5—6 рибосом, называемые полирибосомами или полисомами.

Полирибосомы. Нативные рибосомы, не подвергавшиеся действию рибонуклеаз, находятся в виде полирибосом (эргосом). Если полисомы можно расчленить на рибосомы действием рибонуклеазы, то, следовательно, они удерживаются при помощи цепи РНК. Эта цепь, соединяющая рибосомы, является иРНК, которая считывается одновременно несколькими рибосомами, расположенными на некотором расстоянии одна от другой (рис. 1—10). Каждая отдельная рибосома в полисоме способна синтезировать полную полипептидную цепь независимо от других. Однако образование групп рибосом повышает эффективность использования иРНК, поскольку на ней сможет одновременно синтезироваться несколько полипептидных цепей, как это было показано на рисунке. Трансляция осуществляется в направлении $5' \rightarrow 3'$. У бактерий считывание

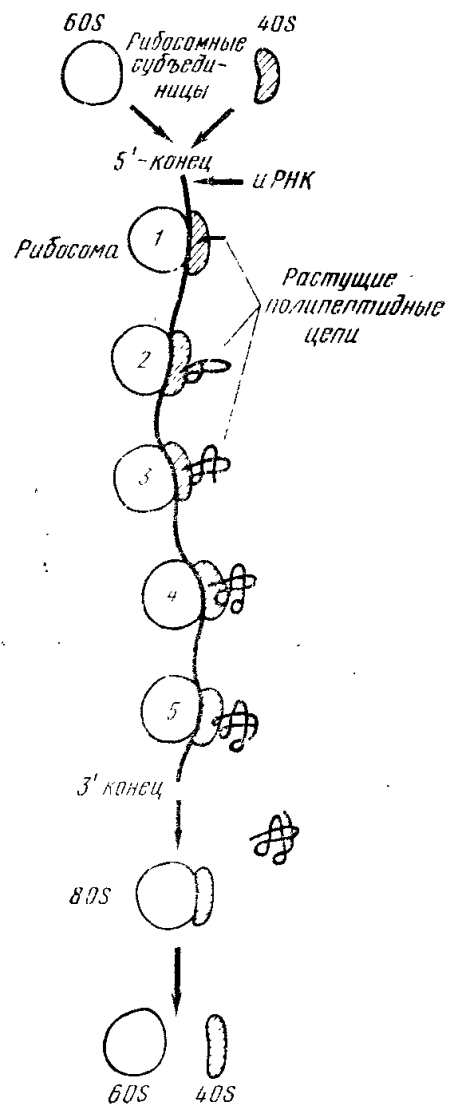


Рис. 1—10. Механизм образования полирибосомы.

иРНК на рибосомах осуществляется даже тогда, когда ее растущий конец еще связан с ДНК через РНК-полимеразу.

Установлено, что полипептидные цепи, содержащие около 150 аминокислотных остатков, кодируются молекулой, состоящей из 4 (т. е. $150 \cdot 3$) нуклеотидных единиц, что соответствует цепи длиной около 150 нм. Если диаметр 80S-рибосом равен 22 нм, то на иРНК вполне достаточно места для нескольких, одновременно считывающих ее рибосом. При условии содержания в полисоме 5—6 рибосом среднее расстояние между рибосомами с диаметром 22 нм вдоль цепи иРНК составит приблизительно 3 нм. Вероятно, действие рибосом синхронизировано.

Полисомы обладают в значительной степени упорядоченной трехмерной структурой. Если полисомы содержат более 6 рибосом, то они образуют плотно свернутые спиральные структуры. По-видимому, в клетках эукариотов рибосомы не рассеяны беспорядочно, а функционируют в значительной мере упорядоченно и регулярно.

Локализация рибосом. В клетках бактерий рибосомы (70S) расположены в цитоплазме свободно, тогда как в дрожжевых клетках они локализуются в разных местах в зависимости от использования синтезирующего белка: или свободно в виде полисом, состоящих из 5—6 рибосом, или большей частью связаны с внешней поверхностью мембран эндоплазматической сети, где они часто располагаются рядами.

ЛИЗОСОМЫ

Лизосомы — группа внутриклеточных органелл, встречающихся не только в животных, но и в дрожжевых клетках. Они представляют собой ограниченные липопроteidной мембраной тельца [141], которые содержат разнообразные ферменты, способные гидролизовать макромолекулярные соединения клетки: белки, полисахариды и нуклеиновые кислоты. Являясь производными аппарата Гольджи, они имеют относительное сходство ферментного состава. В свою очередь исходно ферменты могут возникать и в области шероховатой эндоплазматической сети. Поэтому лизосомы могут возникать из тяжей эндоплазматической сети, которые отшнуровывают маленькие пузырьки. Однако истинные лизосомы, или «пищеварительные» гранулы, синтезируются в мембранах комплекса Гольджи.

Когда на периферических участках диктиосом достигается достаточная концентрация необходимых протеолитических ферментов, лизосомы отшнуровываются от аппарата Гольджи и распределяются в клетке. Диаметр пузырька лизосомы составляет 0,25—0,5 мкм (рис. 1—11). На поверхности вакуоли дрожжей, которая функционирует как лизосома, обнаружены рибосомоподобные частицы. Легкие лизосомы с их менее плотным содержанием напоминают вакуоли, и вторичные лизосомы, возникающие при их слиянии, уже нельзя отличить от вакуолей. Таким образом, они

представляют собой автолитические вакуоли с набором гидролаз, необходимых для обновления белков, нуклеиновых кислот, полисахаридов.

Элементарная мембрана, ограничивающая лизосомы, предотвращает разрушительное действие ферментов, которые обеспечивают внутриклеточное переваривание. При разрыве лизосомной мембраны ферменты высвобождаются и подвергают клетку автолизу. В мембранах лизосом найдены те же самые оксидоредуктазы, которые принято называть десмолазами мембран эндоплазматической сети (цитохром с, НАД-оксидоредуктаза и НАД).



Рис. 1—11.

Лизосомы дрожжевой клетки (внедренные в вакуоли):

1 — *End. magnusii*; 2 — *Torula sphaerica*; 3 — *Sacch. cerevisiae* (внедренные в вакуоли); Л — лизосомы; В — вакуоль.

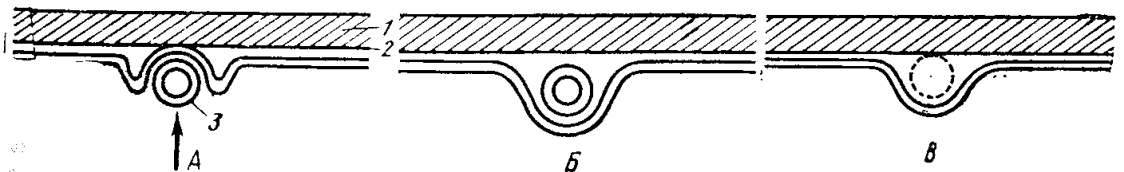


Рис. 1—12.

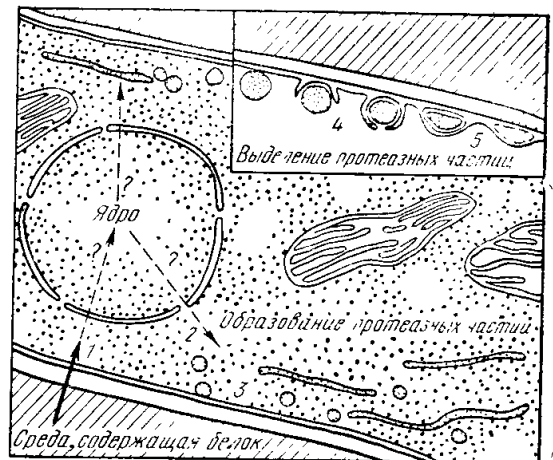
Выделение лизосомы у *Neurospora*:

1 — клеточная оболочка; 2 — цитоплазматическая мембрана; 3 — лизосома; А — мембрана эндоплазматической сети; Б — мембрана и окружающая ее мезосома; В — разрушенные мембраны лизосомы.

Рис. 1—13.

Схематическое изображение событий, следующих после добавления в культуральную среду с растущей в ней *Neurospora* белка вместо нитратов:

1 — передача информации от белка среды ядру клетки; 2 — передача сигнала эндоплазматической сети на образование лизосом; 3 — накопление лизосом возле плазмалеммы; 4 — выталкивание лизосом через плазмалемму; 5 — растворение мембран эндоплазматической сети вне клетки и выход протеазы, содержащейся в лизосомах, во внеклеточное пространство.



В гифах гриба *Neurospora crassa* были обнаружены особые частицы, содержащие протеолитические ферменты, которые назвали первичными лизосомами. Эти частицы играют важную роль во внеклеточном переваривании белков: желатина или гемоглобина. Заметили, что с появлением вне клетки белков возрастает и образование первичных лизосом, которые мигрируют к поверхности клетки, скапливаются около плазмалеммы, а затем выходят из протопласта, как это показано на рис. 1—12.

Элементарная мембрана лизосомы, возникшая из мембраны эндоплазматической сети, не сливается с плазмалеммой, а сохраняет целостность, когда частица появляется в пространстве между цитоплазматической мембраной и клеточной стенкой. Однако спустя какое-то время эта мембрана растворяется и протеаза освобождается, проникает через клеточную стенку и гидролизует белковый субстрат питательной среды.

Практически показано, хотя без теоретического объяснения, как ядро *Neurospora* реагирует на появление в среде белков вместо нитратов. При этом поглощение аминокислот связано с усилением образования первичных лизосом. Цитоплазматическая мембрана в свою очередь усиливает секрецию протеазы во внеклеточное пространство. И наконец, мембраны лизосом, сохранившиеся во время движения по клетке и сквозь плазмалемму, потом растворяются и протеазы освобождаются.

Схематическое изображение событий, следующих после добавления в культуральную среду белка вместо нитратов, представлено на рис. 1—13.

Как уже отмечалось, лизосомы (как легкие, так и тяжелые) содержат наряду с протеазами и ДНКазы фосфатазу и различные эстеразы. Кроме того, легкие лизосомы содержат трансаминазы, а тяжелые — оксиредуктазы, причем эти ферменты имеются также и в мембранах эндоплазматической сети.

ВАКУОЛИ (ТОНОПЛАСТ)

Дрожжевые клетки содержат в цитоплазме вакуоли — полости, наполненные водянистой жидкостью и отделенные от остальной цитоплазмы вакуолярной мембраной (тонопластом). Вакуоль содержит клеточный сок, являющийся разбавленным раствором солей органических кислот, сахаров и, вероятно, метаболитов. Центральная вакуоль возникает в результате слияния маленьких вакуолей, однако этот процесс может протекать в обратном направлении вплоть до образования вакуолей или провакуолей, которые в свою очередь образуются из вздутый на тяжях эндоплазматической сети.

Таким образом, мембраны вакуолей, или тонопласт, представляют собой мембраны этой органеллы.

В тонопласте обнаружены частицы, которые участвуют, по-видимому, в синтезе ферментов. Вакуоли содержат протеазу и РНКазу и могут обладать свойствами лизосом. Как уже отмечалось ранее, вакуоль дрожжевой клетки представляет собой такую типичную лизосому. Происходит ли она от эндоплазматической сети, пока неизвестно. Однако при почковании дрожжевых клеток

можно наблюдать, как от материнской вакуоли отшнуровывается маленькая вакуоль, которая переходит в дочернюю клетку и образует там новую центральную вакуоль. Следовательно, при развитии дрожжей проявляется в отличие от растительных клеток непрерывность вакуолярной системы. Во взрослой вакуоли отмечается процесс автолиза. В процессе роста и дифференцирования часть плазмы попадает в вакуоль и переваривается в ней (рис. 1—14) [31, 213]. То, что вакуолярный аппарат является производным других мембранных систем, подтверждается и тем, что он образуется в клетках с возрастом. В почках и клетках молодой культуры он, как правило, отсутствует.

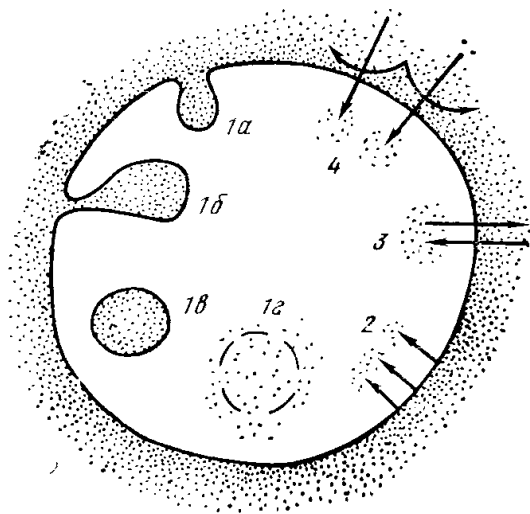


Рис. 1—14. Процессы, связанные с функциями вакуолей у дрожжей [160]:

1а—1д — втягивание части плазмы в полость лизосомы, напоминающее эндоцитоз в мембране вакуоли; 2 — участки мембраны вакуоли в синтезе лизосомных ферментов; 3 и 4 — транспорт микромолекул через мембрану вакуоли (взаимодействие между вакуолью и цитоплазмой).

АППАРАТ ГОЛЬДЖИ

Аппарат Гольджи состоит из группы плоских вафлеобразных цистерн и системы сферических пузырьков разного размера, расположенных по краям этих цистерн.

Цистерны получили название диктиосом от греческого «диктиос» — сеть. Эти пузырьки, или цистерны, имеют различную форму — шарообразную, уплощенную, вытянутую, часто располагаются параллельно друг другу, нередко соединяются с канальцами эндоплазматической сети. Плоские, параллельно расположенные цистерны представляют собой как бы стопку таких цистерн. Однако на электронных микрофотографиях система цистерн не выглядит как сеть, а напоминает по виду сито. В целом же это скорее стопка пластин, изогнутых наподобие блюда, чем сеть. От краев такого «блюда» отшнуровываются пузырьки или трубочки. Вся структура носит полярный характер. Существует проксимальный, или формирующий, полюс, где образуются новые цистерны и где происходит фрагментация цистерн с образованием пузырьков (рис. 1—15). При этом образуются маленькие пузырьки по краям цистерны и вся она набухает так, что формируется крупная полость, окруженная мембраной Гольджи. Этот пузырь покидает диктиосомы, и его заменяет новая цистерна. Тем самым наблюдается постоянное перемещение цистерн от формирующего полюса к секретизирующему.

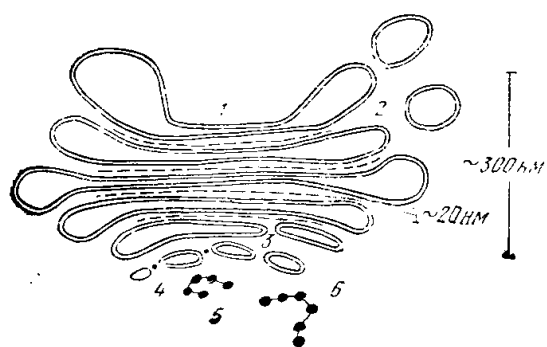


Рис. 1—15.
Схематическое изображение диктиосом (сети) аппарата Гольджи:

1 — дистальный, или секретирующий, полюс; 2 — слой основной плазмы; 3 — поры; 4 — гранулы (нуклеопротенда); 5 — проксимальный, или формирующий, полюс; 6 — рибосомы.

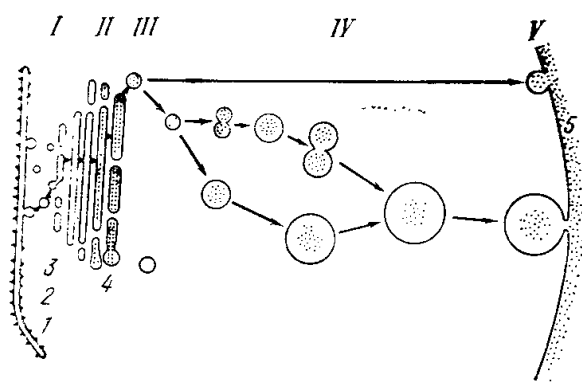


Рис. 1—16.

Функционирование аппарата Гольджи, приводящее к росту кончика гифы гриба:

I — материал переносится от компонентов эндоплазматической сети (1) к диктиосомам путем образования пузырьков и их слияния в цистерны на проксимальном полюсе диктиосом (2); II — содержание цистерн и их мембран изменяется по мере перемещения к дистальному полюсу; (3); III — цистерны на дистальном полюсе образуют секреторные пузырьки; IV — секреторные пузырьки движутся к кончику гифы, часть из них увеличивается в размере или сливается с другими пузырьками; V — пузырьки сливаются с плазмалеммой (5) кончика гифы, а их содержимое выходит в матрицу клеточной оболочки; 2 — рибосомы.

пузырьков, отделившихся от эндоплазматической сети (рис. 1—16) или от наружного листка ядерной оболочки. Процесс созревания цистерн происходит во время перемещения их от формирующего к секретирующему полюсу. Водянистая жидкость эндоплазматической сети или перинуклеарного пространства обогащается мономерными и олигомерными углеводами. Мембрана, ответственная за это увеличение концентрации сахаров, сильно изменяется: мембраны Гольджи намного толще (7—10 нм) мембран эндоплазматической сети (5—6 нм). Скорость образования мембран Гольджи составляет доли минуты. Так, например, у сине-зеленой водоросли *Glaucocystis* каждые 30 с от аппарата Гольджи отделяется крупная вакуоль, и в то же время число цистерн не уменьшается. Пузырьки, отделяющиеся на дистальном полюсе, обогащены углеводами. Они

Расстояние между цистернами составляет 20—25 нм. В пространстве между цистернами просматривается электроплотный слой, состоящий из равномерно распределенных белковоподобных нитей, представляющих собой сжатую цитоплазму.

Прослежено изменение аппарата Гольджи у дрожжей при различных их функциональных состояниях [31]. Установлено, что у бродящих дрожжей зона Гольджи представляет собой группу пузырьков различного диаметра (от 20 до 100 нм). У аэробных дрожжей, способных к брожению, этот органоид состоит из пузырьков или немногочисленных, параллельно упакованных дисковидных пластиц — диктиосом. У строгих аэробов он представляет собой параллельно уложенные диктиосомы, ширина межмембранного пространства которых колеблется от 20 до 250 нм. Нередко в зону Гольджи, достигающую у некоторых дрожжей 1 мкм в диаметре, включаются округлые или звездчатые вакуоли — фагосомы [30].

Онтогенез. Предполагают, что у эукариотов цистерны Гольджи возникают из эндоплазматической сети [287]. Они образуются путем слияния многочисленных

мигрируют к поверхности клетки и попутно могут сливаться или увеличиваться в размере. Небольшие пузырьки могут образоваться на периферии и отшнуровываться от крупных. Некоторые из них превращаются в вакуоли, в которых концентрируются секреторные продукты. Другие пузырьки достигают цитоплазматической мембраны, и после этого содержимое из них может выделяться.

Функция. Комплекс Гольджи функционирует как орган секреции продуктов метаболизма клетки. Возможно, выделение из микробной клетки белков-ферментов, углеводов, липидов и т. п. осуществляется путем экзоцитоза. При этом имеется в виду способность дрожжей и других микроорганизмов синтезировать многие внутриклеточные соединения и выделять (секретировать) их из клетки в окружающую среду. По-видимому, процесс секретирования происходит с участием аппарата Гольджи. Основной функцией аппарата Гольджи считается транслокация. Именно секреторная активность клетки предполагает как образование секретлируемых веществ, так и их перенос от места синтеза к месту экзоцитоза.

В связи с этим перемещению пузырьков Гольджи придается большее значение, чем их участию в синтезе физиологически важных соединений.

Кроме того, комплекс Гольджи принимает непосредственное участие в построении плазматической мембраны и мембраны лизосом. Мембраны Гольджи и плазмалемма сходны как в онтогенетическом, так и в функциональном отношении. Аппарат Гольджи, по-видимому, функционирует как система формирования внутриклеточной плазмалеммы, обеспечивающая высокую скорость химических реакций. Так, например, за 1 ч к цитоплазматической мембране добавляется шестикратное по отношению к клеточной поверхности количество мембран вакуолей Гольджи. Следовательно, такое же количество цитоплазматической мембраны за указанное время должно исчезнуть. Возможно, эта мембрана попадает в цитоплазму тем же путем, что и мембраны эндоцитозных пузырьков (рис. 1—17), т. е. происходит переваривание мембраны в цитоплазме. В связи с таким быстрым обновлением мембран, естественно, может возникнуть вопрос, связанный с возможностью вторичного использования субмикроскопических элементов цитоплазматической мембраны, находящихся в цитоплазме, для созревания мембран высокоактивных цистерн Гольджи.

Накопление углеводов. Цистерны Гольджи, как уже отмечалось ранее, синтезируют олигомерные углеводы из простых сахаров, причем с высокой скоростью. Источником энергии для активного поглощения является АТФ.

Углеводы накапливаются в форме растворимых олигомеров гексоз (глюкозы, маннозы, галактозы) или пентоз (арабинозы,

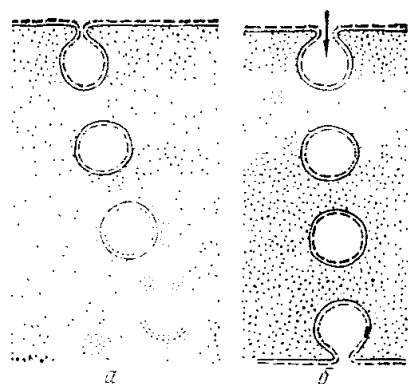


Рис. 1—17.
Эндоцитоз (а) и цитопамп-
сис (б).

ксилозы). Из более специфических соединений накапливаются уронины, такие, как глюкуроновая, галактуриновая и галактуриновая кислоты. Их полимеры представляют собой гидратированные гели, способные очень сильно набухать. Такие уронины входят в состав гемицеллюлоз и слизи, а галактурины с частично метилированными карбоксильными группами служат строительными блоками для синтеза пектиновых веществ. Синтез некоторых белков, входящих в состав мукопротеинов, происходит в эндоплазматической сети, а оттуда они переносятся в сливающиеся пузырьки Гольджи.

Клеточная пластинка. При делении клеток происходит новообразование клеточной оболочки, которая закладывается как диафрагма, перпендикулярная митотическому веретену, между двумя телофазными ядрами.

Клеточная пластинка образуется в результате слияния капель, образующихся из субмикроскопических пузырьков Гольджи (диаметром менее 100 нм), которые сливаются в экваториальной плоскости и образуют указанные капли. Клеточная стенка растет центробежно до тех пор, пока не достигнет продольных стенок материнской клетки. Между пузырьками возникают тяжи эндоплазматической сети. Эти тяжи в дальнейшем обеспечивают прямой контакт между двумя дочерними клетками, образуя систему плазмодесм, пронизывающих клеточную оболочку. Когда края клеточной пластинки достигают продольных клеточных стенок, две клетки оказываются разделенными так называемой срединной пластинкой будущей клеточной оболочки. С этого момента пластинка начинает утолщаться путем присоединения с обеих сторон новых пузырьков, в результате чего поверхность клеточной оболочки становится бугристой.

Если основная функция аппарата Гольджи связана с транслокацией, перемещением пузырьков-цистерн наряду с их участием в синтезе физиологически важных соединений, то многие вопросы физиологии клетки, связанные с системой Гольджи, остаются пока мало изученными, хотя и имеют проблемный характер. Один из важных вопросов связан с вскрытием причин перемещения пузырьков Гольджи к участкам поверхности клетки, где они выделяют свое содержимое. Считают, что движение пузырьков осуществляется с помощью пассивного механизма, митотический аппарат при этом расходится к двум полюсам, а анафазные хромосомы и телофазные ядра наподобие поршня давят на примыкающую к ним цитоплазму. Такое давление вызывает потоки цитоплазмы вдоль стенок клетки в направлении экватора, где и встречаются эти два потока, возникшие на противоположных полюсах.

Встретившись, потоки вынуждены повернуть и двигаться в экваториальной плоскости; поэтому здесь и выстраиваются увеличенные цитоплазмой пузырьки Гольджи. Когда ток цитоплазмы в экваториальной плоскости прекращается, пузырьки остаются на местах, где мы их обычно находим.

ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКАЯ СЕТЬ

МАГ
НУ

Дрожжевые клетки и клетки других микроорганизмы мембранами эндоплазматической сети, образуя лабиринт. Эндоплазматический ретикулум представляет систему канальцев, пузырьков или цистерн (рис. 1—18), связанную с цитоплазматической мембраной и нуклеолеммой. Толщина ретикулярных мембран приблизительно равна 4—5 нм [30]. На тонких срезах обычно видны только изолированные, удлиненные пузырьки и цистерны, но, как потом было установлено, эти элементы пространственно взаимосвязаны и действительно образуют сеть. Несмотря на то что крупные цистерны настолько велики, что они обнаруживаются в световом микроскопе, тем не менее эндоплазматическую сеть считают ультраструктурной органеллой, поскольку детали ее строения различимы только в электронном микроскопе.

Очень часто эндоплазматическая сеть располагается вдоль клеточной оболочки в непосредственной близости к плазмалемме, не вступая, однако, в контакт с ней. Цистерны шероховатой эндоплаз-

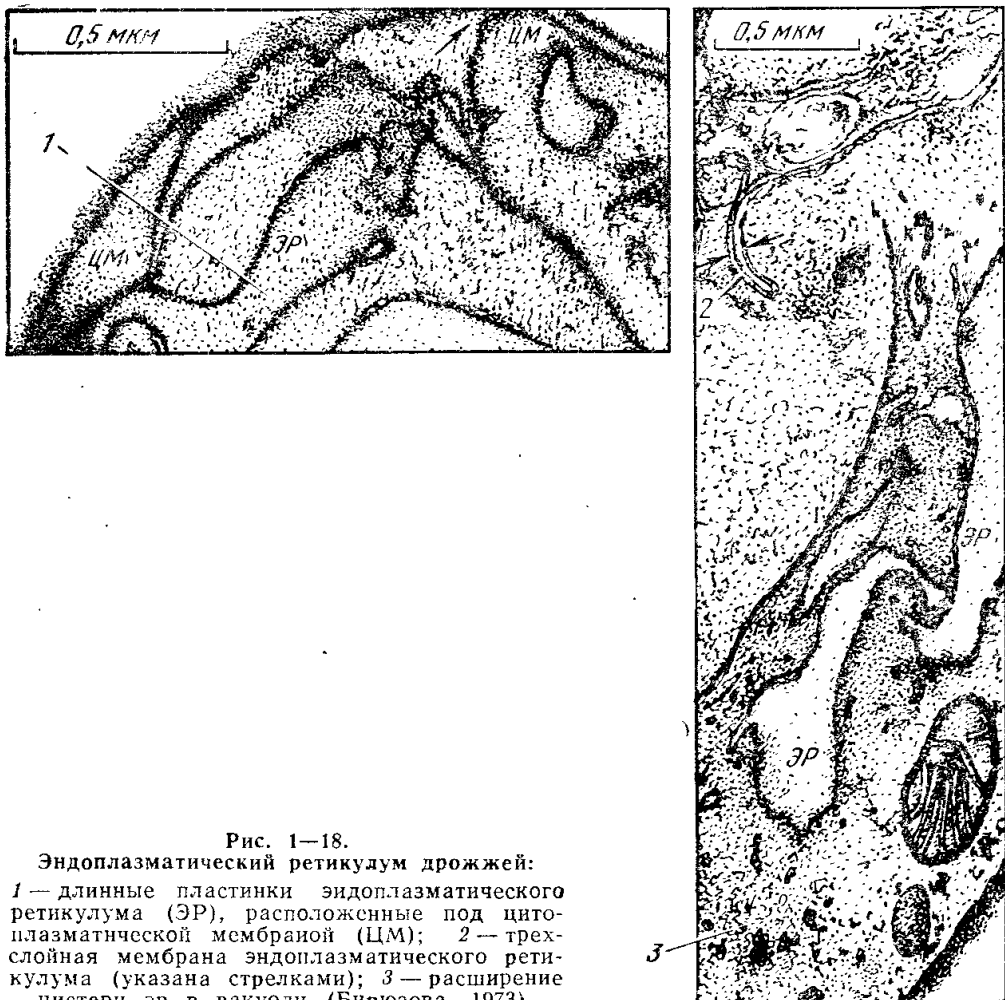


Рис. 1—18.

Эндоплазматический ретикулум дрожжей:

1 — длинные пластинки эндоплазматического ретикулума (ЭР), расположенные под цитоплазматической мембраной (ЦМ); 2 — трехслойная мембрана эндоплазматического ретикулума (указана стрелками); 3 — расширение цистерн эр в вакуоли (Бирюзова, 1973).

матической сети могут окружать вакуоли клеток; вокруг лизосом имеется также чехол из шероховатой эндоплазматической сети.

Компоненты эндоплазматической сети окружены элементарной мембраной, которая значительно тоньше цитоплазматической мембраны и зрелых мембран Гольджи. При гомогенизации клеток все компоненты округляются и превращаются в шарики диаметром приблизительно 0,15 мкм, которые названы микросомами. При анализе микросомных мембран было обнаружено, что они на $\frac{2}{3}$ состоят из белка и на $\frac{1}{3}$ из липидов.

Ультроструктура	Отношение белок/липиды (по массе)
Плазмалемма	
дрожжевых клеток	1,05
тилакоидов хлоропластов	0,96—0,80
Эндоплазматическая сеть	6,7—0,8
Оболочка ядра	4,1
Микросомы	2,3
Митохондрии	
внутренняя мембрана	3,6—3,3
наружная мембрана	1,2—0,95

Эндоплазматическая сеть бывает двух типов: гладкая (агранулярная), состоящая из одних только мембран, и гранулярная (шероховатая), к мембранам которой прикреплено множество рибосом. Одна и та же клетка может содержать как гранулярную, так и гладкую эндоплазматическую сеть. Плотные упакованные мембраны сети иногда образуют каналы диаметром около 50—100 нм. В других частях клетки промежутки между мембранами могут быть расширены, так что получаются уплощенные мешочки-цистерны. Все эти мембраны разделяют цитоплазму на множество относительно обособленных отсеков, в которых, возможно, протекают различные химические реакции. Компоненты эндоплазматической сети содержат бесцветную электроннопрозрачную жидкость, коэффициент преломления которой почти не отличается от коэффициента преломления цитоплазмы.

Онтогенез. Отмечают непосредственную связь между системой эндоплазматической сети и ядерной оболочкой. Во время митоза ядерная оболочка исчезает и в то же время она не синтезируется, а образуется путем слияния пузырьков эндоплазматической сети, возникших в процессе дезинтеграции оболочки в профазе. Другие везикулярные структуры, внешне неотличимые от пузырьков дезинтегрированной ядерной оболочки, дают начало системе эндоплазматической сети в цитоплазме двух дочерних клеток. Таким образом, вся система эндоплазматической сети цитоплазмы является производным ядерной оболочки, и, по-видимому, наоборот. Вокруг оболочки ядра обнаружено кольцо из отдельных компонентов эндоплазматической сети (рис. 1—19). Это дополнительное образование выполняет, по-видимому, часть функций оболочки ядра. Возможно, что филогенетически оболочка ядра возникла так же, как эта «наружная оболочка».

Эндоплазматическая сеть и мембраны плазмалеммы. Хотя тяжёлые эндоплазматической сети часто подходят вплотную к плазмалемме, но никогда не отмечали истинных контактов между мембранами. В ходе секреции, при прохождении лизосом через мембрану, которая при этом не сливается с плазмалеммой и исчезает только тогда, когда пузырек-лизосом покинет пределы протопласта. В то

же время плазмалемма и мембраны эндоплазматической сети взаимосвязаны. Так, например, аппарат Гольджи у дрожжей, хотя и обнаруживается не во всех клетках, однако формируется в результате пролиферации компонентов эндоплазматической сети, пузырьки которой в местах будущего почкования принимают участие в построении новой клеточной оболочки.

В литературе описан процесс образования цитоплазматической мембраны спор из компонентов эндоплазматической сети в сумках аскомицетов. Цитоплазма сумки разделяется на будущие аскоспоры с помощью плоских цистерн эндоплазматической сети, которые затем сливаются таким же образом, как и при восстановлении оболочки ядра после митоза. Протопласт будущей аскоспоры оказывается окруженным двойной мембраной — мешочком, внутренний листок которого впоследствии функционирует как плазмалемма споры. Так же и у дрожжей плазмалемма образуется элементами эндоплазматической сети. Аскоспоры у дрожжей *Nauphula wingei* возникают из шляповидных цистерн эндоплазматической сети. При этом содержащиеся внутри мукополисахариды формируют клеточную оболочку, а внутренняя мембрана становится плазмалеммой [246]. Таким образом, у дрожжей скопления пузырьков эндоплазматической сети функционируют как пузырьки Гольджи, обеспечивая локальный рост клеточной стенки. Эти пузырьки секретируют через плазмалемму не только материал матрикса (маннан), но и лизосомную гидролазу (β -1,3-глюканазу), которая необходима для размягчения клеточной оболочки в месте возникновения почки [265].

Схематично показанное филогенетическое родство: мембраны эндоплазматической сети → мембраны Гольджи → мембраны плазмалеммы — подтверждает ту точку зрения, что система Гольджи представляет собой аппарат образования плазмалеммы. При этом происходит не только встраивание пузырьков в места растяжения уже существующей плазмалеммы, но и, возможно, также преобразование эндоплазматической сети в мембраны плазмалеммы.

Мембраны эндоплазматической сети и плазмалеммы помимо различий в онтогенезе не идентичны в химическом отношении. Они несут различные ферментные комплексы и неравный отрицательный заряд на мембранах.

Функции. При синтезе мукопротеидов обе органеллы, т. е. эндоплазматическая сеть и аппарат Гольджи, действуют согласованно. В растительных клетках эндоплазматическая сеть доставляет глюкозу, необходимую для внеклеточного синтеза целлюлозы. Шероховатая эндоплазматическая сеть выполняет также функцию

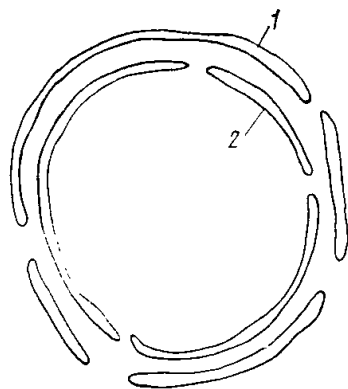


Рис. 1—19.
Слой цистерн эндоплазматической сети вокруг ядра у водорослей:
1 — эндоплазматическая сеть;
2 — оболочка ядра.

внутриклеточного транспорта, т. е. доставляет питательный материал к местам роста, синтетическим реакциям. Перемещение микромолекулы (возможно, и макро-) происходит гораздо быстрее, чем если бы оно осуществлялось путем диффузии. Однако процессы внутриклеточного перемещения молекул, пузырьков Гольджи и эндоплазматической сети пока труднообъяснимы.

ПЕРОКСИСОМЫ (МАКРОТЕЛЬЦА)

Пероксисомами называют частицы, близкие по размерам к митохондриям (1—0,5 мкм в диаметре) и имеющие вид пузырька, окруженного одной мембраной. Название «пероксисомы» было предложено в 1965 г., когда удалось получить данные о морфологии, ферментативных свойствах и распространении новых частиц. Затем пероксисомы были обнаружены в дрожжевых клетках [154]. Основные сведения о пероксисомах получены лишь в последние годы, поэтому вопрос о биологических функциях этих компонентов клетки разработан еще недостаточно. Типичными ферментами для пероксисом оказались каталаза, оксидаза *D*-аминокислот и уратоксидаза (уриказы).

Однако потом было обнаружено несколько ферментов глиоксиплатного цикла, в частности изоцитратлиаза (изоцитратаза), малатсинтетаза, глиоксалатоксидаза. Эти ферменты были установ-

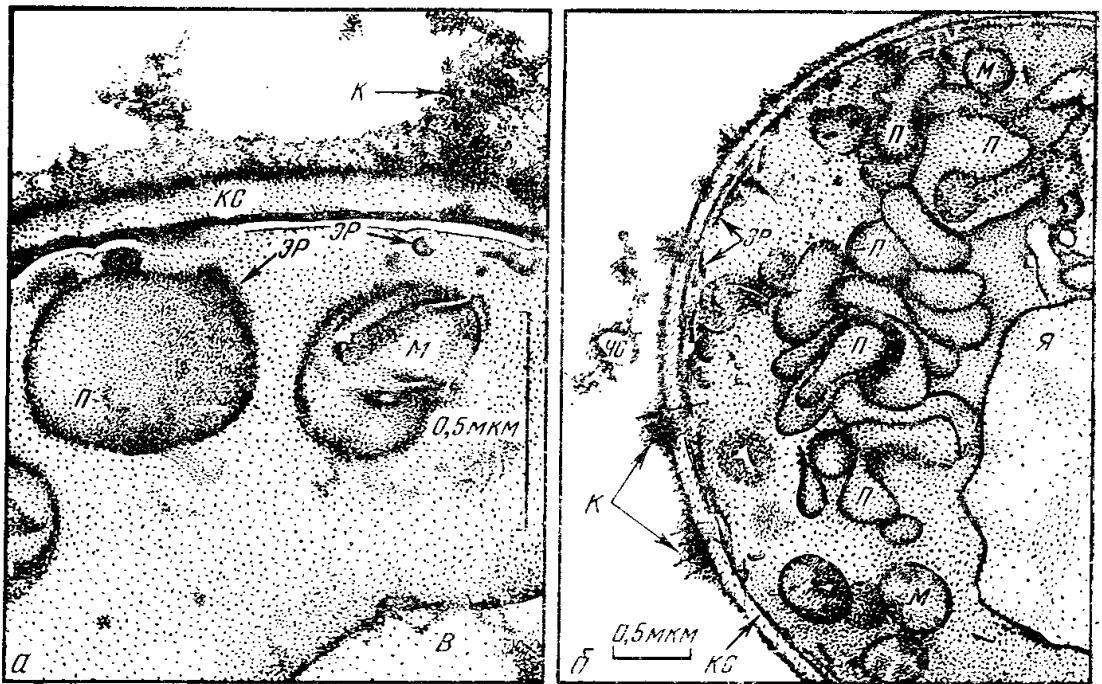


Рис. 1—20.

Пероксисомы дрожжей *Candida tropicalis*, выращенных на среде с *n*-алканами:

a — пероксисомы (П) с прилегающими к ним отрезками эндоплазматического ретикулума (ЭР); *б* — большое количество пероксисом, собранных в пучок; КС — клеточная стенка; М — митохондрия; П — пероксисома; ЭР — эндоплазматический ретикулум; Я — ядро; К — канал; В — вакуоль (Мейсель, Медведева, Козлова, 1976).

лены в глиоксисомах, которые, вероятно, имеют общее происхождение с пероксисомами или даже происходят от этих последних. Глиоксисомы, как пероксисомы, богаты каталазой и, кроме того, способны превращать жирные кислоты в углеводы [141]. Функционирование пероксисом, по-видимому, тесно взаимосвязано с функционированием митохондрий и растворимой фазы клетки [60].

Интерес к дрожжевым пероксисомам значительно возрос, когда выяснилось, что их количество крайне возрастает при развитии дрожжей на *n*-алканах, метиловом спирте [279] и высших жирных кислотах [153]. Если при культивировании дрожжей на углеводных средах пероксисом бывает сравнительно немного, то при росте их на среде с *n*-алканами отмечаются на ультратонком срезе не только отдельные органеллы, но целое их «семейство», собранное в пучок (рис. 1—20).

Обычно пероксисомы находятся в контакте с канальцами эндоплазматического ретикулума. Однако за последнее время отмечен факт, представляющий научный интерес. Оказалось, что при массовом появлении в дрожжевых клетках пероксисом отмечается одновременно уменьшение количества митохондрий и появление в последних различных включений. Кроме того, у дрожжей Кюескега *bovidinii* при развитии их на среде с метанолом наблюдается непосредственная связь митохондрий с пероксисомой, которая в течение некоторого времени бывает окружена двойной мембраной, а затем снова одинарной [105].

ЦИТОЗОЛЬ

Цитозоль относительно однороден, бесструктурен и отличается высокой вязкостью. Содержание белка в нем превышает 20%. В цитозоле, особенно бактерий, содержится большинство ферментов, а также промежуточные продукты метаболизма и неорганические соли. В цитозоле дрожжевых клеток, например, имеются определенные ингибиторы, которые связывают и инактивируют ту протеазу, которая активирует (гидролизует) зимоген хитинсинтетазы [254]. Как указывалось ранее, хитинсинтетаза обычно находится в клетках дрожжей в неактивном состоянии в форме зимогена. В момент, непосредственно предшествующий образованию септы, т. е. первичной перегородки в процессе почкования, зимоген под влиянием определенной протенназы гидролизует и превращается в хитинсинтетазу. В цитозоле микробной клетки содержится около 24% всей РНК, в основном тРНК.

КЛЕТОЧНАЯ СТЕНКА ДРОЖЖЕЙ

Обнаружено, что клеточная стенка дрожжей представляет собой слоистые структуры. Количество слоев в них обычно равно 3, но иногда и более. Наружный, наиболее контрастный слой представляет собой липопротеидную гладкую мембрану толщиной 10—30 нм. Залегаящий под ней слой, состоящий из маннано-протеинового комплекса, достигает толщины 100 нм.

При гидролизе комплекса получены вещества тетра-, три- и диманнозного типа, связанные с небольшим количеством гексозамина, белка и фосфатов. У разных представителей дрожжей маннаны различаются по структуре молекул. У одних связь между

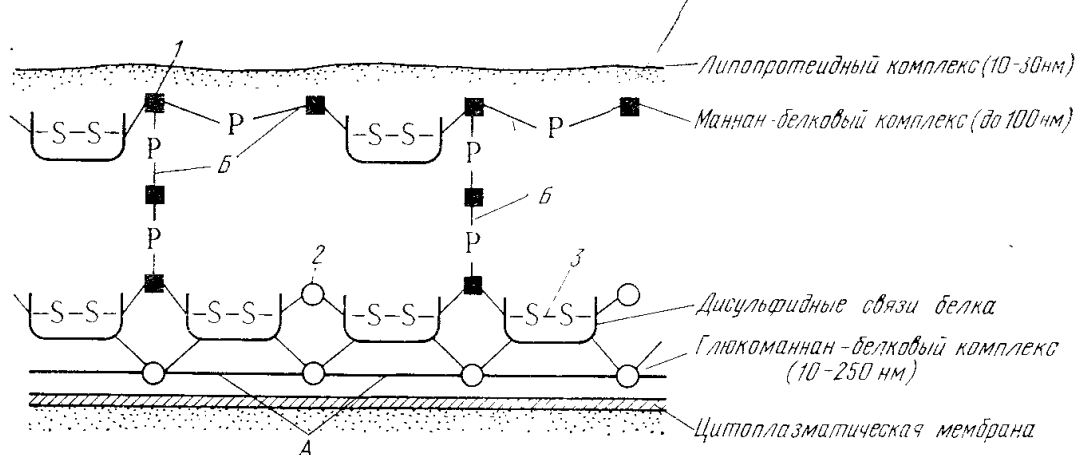


Рис. 1—21.

Схема строения дрожжевой клеточной стенки и характер действия глюканаза и маннааза, входящих в комплекс литических ферментов продуцента *Actinomyces griseus* 11:

1 — маниан, представляющий собой разветвленный полисахарид (α -1,6-, α -1,2- и α -1,3-связи, частично фосфорилированные); 2 — глюкан — разветвленный полисахарид с β -1,6-, β -1,3-связями; 3 — дисульфидные связи белка.

остатками маннозы происходит по α -1,6-, α -1,2- и α -1,3-атомам, у других — по β -1,2 и β -1,4.

Следующий слой состоит почти полностью из глюкана (около 94% глюкозы и 6% гексозамина); толщина его равна 10—250 нм. Глюкан является химически устойчивым соединением и, по-видимому, ответственен за ригидность клеточной стенки дрожжей [121].

Схема, показывающая строение дрожжевой клеточной стенки, представлена на рис. 1—21 [319]. Клеточная стенка составляет от 6—15 до 27—30% массы сухой биомассы дрожжей. Так, например, при интенсивном росте дрожжей *Candida guilliermondii* на среде с *n*-парафинами содержание клеточных оболочек составляет незначительную часть клетки, и, наоборот, при замедленном росте дрожжей клеточная стенка их составляет иногда даже более 30%. В этих условиях основное количество неиспользованных («остаточных») углеводов (до 50—80%) локализовано в клеточной стенке. При оптимальных условиях роста, наоборот, содержание неокисленных углеводов сосредоточено в цитоплазме.

Итак, клеточные стенки дрожжей содержат глюкан, маннан, белок, фосфаты, липиды, а также глюкозамин, часть которого находится в форме хитина. Локализуется хитин, по-видимому, в почечных рубцах [42], однако точно неизвестно, в виде ли комплекса с глюканом [45] или с маннаном.

Количественный состав клеточных стенок дрожжей приводится ниже.

Компоненты	Количество, % от массы сухих клеточных стенок	Компоненты	Количество, % от массы сухих клеточных стенок
Глюкан	30—45	Хитин	0,5—1,0
Маннан	30—45	Фосфат	0,1—2,0
Белок	10—25	Зола	7—9
Липиды	3—10		

Как следует из приведенных данных, содержание глюкана и маннана в сумме может составлять 90% массы сухих клеточных стенок [97].

Структура полисахаридов клеточных стенок подробно рассмотрена во многих обзорах [90, 113, 221]. В связи с этим здесь она описывается в краткой форме.

Маннан. Молекула его сильно разветвлена и состоит из 300—400 остатков маннозы, соединенных связью α -1,6 в главную цепь. От этой цепи через короткие промежутки отходят боковые цепи, состоящие из нескольких остатков маннозы, соединенных связями α -1,2 и α -1,3 с преобладанием α -1,2. Маннан, входящий в состав клеточных стенок дрожжей, тесно связан с белком в виде маннано-белкового комплекса, причем белка в нем содержится около 7%. Отношение белок:маннан в этом комплексе было определено как 1:9 и 1:12. В комплекс помимо маннана и белка входит также фосфат, по-видимому, в виде маннозо-6-фосфата [254]. Маннано-белковый комплекс образует поверхностный слой клеточной стенки.

Обработка клеточных стенок дрожжей папаином приводила к удалению маннано-белкового комплекса; при действии 0,5 н. NaOH при 50° С происходило также полное растворение маннано-белкового комплекса. Маннан — единственный компонент клеточной оболочки, который, являясь структурным веществом, одновременно может использоваться клеткой в качестве резервного углевода, поэтому его содержание претерпевает значительные изменения. Дрожжи *Hansenula holstii* во время роста на среде с глюкозой выделяют растворимый маннан, частично (на 20%) этерифицированный фосфатной кислотой [227]. Присутствие маннана в почечных рубцах с достоверностью доказано [244], хотя ранее считали, что в их состав входят хитин и глюкан [255].

Глюкан. Глюкан дрожжевых клеток, как и маннан, имеет сильно разветвленную структуру и состоит из глюкозных остатков, связанных в основном β -1,3-глюкозидными связями. Имеются также β -1,6- и β -1,2-глюкозидные связи. Глюкан, как и маннан, тесно связан с белком.

В ходе развития культуры соотношение маннан — глюкан изменяется незначительно — в пределах 1,6—1,8, в то же время отмечается в отдельных опытах постепенное уменьшение маннана и увеличение доли глюкана [333]. При непрерывном главном брожении отмечается уменьшение соотношения маннан — глюкан и увеличение количества глюкана. К концу брожения содержание маннанов также уменьшается. Добавление к среде актидиона вызывает ингибирование синтеза полисахаридов клеточной стенки и особенно маннана. Глюкан клеточной стенки дрожжей растворяется под действием гепатопанкреотического секрета улитки, содержащего более 30 различных ферментов.

Дрожжеподобные грибы *Pullularia pullulans* при росте на среде, содержащей глюкозу или сахарозу, выделяют особый α -1,4-глюкан — пуллулан, не атакуемый амилазами.

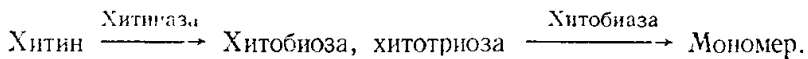
Фосфаты. В маннано-белковом комплексе стенок пивоваренных дрожжей обнаружен фосфор (менее 1%) [333, 257]. Установлено, что фосфат с помощью диэфирной связи соединяется с одной молекулой маннозы через С—1, а с другой — через С—6. Затем был выделен маннозо-6-фосфат, содержание которого составляет 70—75% от общего содержания фосфатов маннано-белкового комплекса [332]. Кроме того, из клеточных стенок был выделен новый тип фосфорилированного маннана, дающий при ацетоллизе маннозу, маннобиозу, маннотриозу и маннотриозофосфат вместо обычной у дрожжей маннотетраозы [258]. Итак, дополнительно показано, что фосфатные группы локализовались в боковых цепях полисахарида и были связаны с терминальной молекулой маннозы через С—1, а с другими молекулами — через С—6. Связь между терминальной маннозой и фосфатной группой легко гидролизовалась щелочью. Отношение фосфор:манноза у дрожжей *Sacch. carlsbergensis* составляло 1:17 или 1:23 и 1:28. Процентное содержание фосфора от массы сухих стенок равнялось 0,3—0,4. По-видимому, степень фосфорилирования маннана связана с ростом дрожжей [282]. Полагают, что роль фосфатов наружного слоя клеточных стенок состоит в обеспечении достаточного электрического заряда клетки для притягивания Ca^{2+} и в последующем его вовлечении в соединение хелатного типа [333].

Полифосфаты. На основании полученных результатов высказано предположение о том, что синтез маннана у дрожжей и высокомолекулярных фракций полифосфатов между собою сопряжен. В частности, установлено, что кислото-нерастворимая фракция полифосфатов у дрожжей полностью локализуется снаружи от цитоплазматической мембраны [134, 222].

Белок. Показано, что основными аминокислотами клеточных стенок дрожжей *Sacch. cerevisiae* и *Sacch. carlsbergensis* являются аспарагиновая и глутаминовая кислоты, серин и треонин. Количество белка, входящего в маннано-белковый комплекс, неодинаково у разных штаммов [332]. Вероятно, карбоксильные группы, образующие поверхностный заряд клеток, являются частью белков, входящих в состав маннано-белкового комплекса.

Глюкозамин (аминосахар). В состав клеточных стенок дрожжей входит в небольшом количестве глюкозамин — вещество, функция которого пока точно не установлена. В форме хитина находится только около 10% глюкозамина, а остальная часть входит, по-видимому, в состав глюкотеинов. У дрожжей *Sacch. cerevisiae* глюкозамин составляет 5,6% от общего содержания аминокислот.

Хитин. Он состоит из остатков *N*-ацетилглюкозамина (ацетилированных аминогрупп), соединенных (подобно остаткам глюкозы в целлюлозе) 1,4- β -глюкозидными связями. Большую стабильность хитина можно объяснить наличием водородных мостиков, в образовании которых участвуют *N*-ацетильные боковые группы. Многие почвенные и водные бактерии обладают способностью использовать хитин. Из бактерий, разлагающих хитин, можно указать *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Nocardia* и др. [227]. Расщепление хитина можно схематично представить следующим образом:



Липиды. Количество липидов в клеточных стенках дрожжей сильно различается в зависимости от возраста культуры и условий роста и может варьировать в пределах от 0,5 до 13% [333]. В состав липидов входят моно-, ди- и триглицериды, эфиры стероидов, свободные жирные кислоты, фосфолипиды. Липиды делятся на «свободные», экстрагируемые нейтральными растворителями, и на «связанные» липиды, экстрагируемые подкисленными растворителями.

Состав почечных рубцов. Из клеточных стенок были изолированы почечные рубцы. Установлено, что у дрожжей *Sacch. carlsbergensis* в рубцах содержится 85% маннозы, 4% глюкозы и 2,7% глюкозамина. По данным некоторых исследователей, в рубцах (и примыкающих зонах) содержится также хитин. При переходе от экспоненциальной к стационарной фазе роста масса клеточной стенки возрастает. По мере старения клеточная стенка дрожжей почти удваивается по массе. Основной слой клеточной стенки состоит из глюкана, а также хитина, наружный — из маннана, азотсодержащих веществ и липидов. В отсутствие инозитола в составе питательной среды клеточная стенка содержит меньше маннана, белка и фосфора, но больше глюкана и глюкозамина, чем клетки в нормальных условиях.

* * *

Итак, вместо проблем, объединяемых под общим названием «макромолекулы в структуре клетки», возникли новые проблемы, касающиеся организации макромолекул в органеллах. Отмечается высокая динамичность органелл во время роста и дифференцирования клетки, характеризующаяся не только морфологическими, но и структурными изменениями. Органелла должна отвечать следующим условиям: представлять собой лабильную структуру из белков, нуклеиновых кислот и (или) углеводов, служащую морфологической основой; обладать донором энергии (например, АТФ) для поддержания своего динамического состояния; иметь также систему информации (например, от иРНК), обеспечивающую регулирование ее активности в соответствии с метаболизмом всей клетки.

Органеллы характеризуются набором специфических ферментов, отдельные из которых используются в качестве маркеров для характеристики чистоты и нативности выделенных структур. Фракционирование клеточных структур позволяет не только получать нативные органеллы, но и разделять ферменты и получать их в чистом виде. Следовательно, гетерогенность структуры дрожжевых клеток является основным фактором, обеспечивающим регуляцию обмена веществ на субклеточном и клеточном уровне.

БИОХИМИЯ РОСТА, РАЗВИТИЯ И РАЗМНОЖЕНИЯ ДРОЖЖЕЙ

Основное свойство живой клетки характеризуется прежде всего ее способностью самовоспроизводить себе подобных, причем это свойство проявляется почти с предельной точностью. Другая особенность клетки определяется ее способностью к обмену веществ (метаболизму) и к осуществлению множества химических реакций. Не менее характерно то, что указанные процессы — размножение клеток и метаболизм — взаимосвязаны и взаимообусловлены. Жизнедеятельность клетки, ее существование невозможны без взаимосвязи огромного числа разнообразных биохимических внутриклеточных превращений. В основе этих превращений лежит тончайшая специфичность ферментативного катализа.

Высокая специфичность действия ферментов является одной из важнейших особенностей живой материи. Поскольку каждый фермент способен катализировать только какую-то одну реакцию данного соединения, не влияя при этом на другие его возможные реакции, в живой клетке протекает одновременно множество различных «обособленных» и в то же время синхронизированных реакций, причем без риска накопления бесполезных побочных продуктов.

Жизнедеятельность дрожжей определяется также приспособляемостью к внешним условиям. Взаимосвязь дрожжевых клеток с питательной средой, приспособление к этой среде и изменение ее применительно к своим потребностям создают благоприятные физико-химические условия и определяют активность ферментов, дополнительный их синтез, ускоряют и обеспечивают тем самым внутриклеточные биохимические превращения, без которых невозможен процесс почкования. Это процессы способствуют также и проявлению индуцированного синтеза ферментов. По современным взглядам, клетки микроорганизмов, так же как и многочисленные клеточные структуры, не возникают заново, а образуются из таких же существующих особей. При размножении дочерняя клетка должна получить от материнской информацию, позволяющую ей путем взаимодействия с окружающей средой вырасти в заранее предопределенный микроорганизм. Известно, что клетка любого микроорганизма отличается исключительной сложностью, и тем самым для образования новой себе подобной клетки требуется сложная и специфическая информация (инструкция), так как размножение или самовоспроизведение всегда означает сохранение чистоты вида и даже штамма.

Прежде всего было установлено, что ядро (ядерная ДНК) является органом управления и сосредоточения всей информации о клетке. Следовательно, все процессы размножения и метаболизма дрожжевой клетки в конечном счете зависят от генетической

информации, заключенной в ядерной ДНК. Непосредственная регуляция метаболизма, обуславливающая клеточное деление, осуществляется при помощи ферментных белков, структура которых определяется информацией, закодированной в ДНК. Как известно, гены заключены в хромосомах, специфичность и свойства которых всецело определяет ДНК. Вследствии этого размножение клеток с позиции молекулярной биологии рассматривается как сложный процесс, в основе которого лежит самовоспроизведение ДНК. Именно репликация ДНК — носителя генетической информации — и обеспечивает передачу признаков из одной клетки в другую в процессе размножения.

Известны два основных типа размножения дрожжей: бесполое, или вегетативное, и половое. В бесполом размножении дрожжей участвует только одна родительская клетка, которая делится или почкуется с образованием двух новых клеток, идентичных по своим наследственным признакам исходной клетке. Схематично размножение дрожжевых клеток показано на рис. 2—1.

В половом типе размножения всегда участвуют две особи, которые сливаются друг с другом, образуя зиготу, т. е. диплоидную клетку. На рис. 2—2 показан жизненный цикл дрожжей *Sacch. cerevisiae*. Начинается он с процесса скрещивания гаплоидных клеток противоположных типов — a и α — и образования диплоидной зиготы. В дальнейшем диплоидная зигота размножается почкованием с образованием клона, т. е. популяции диплоидных клеток. Далее диплоидные клетки претерпевают мейоз, в результате которого образуются дочерние клетки с гаплоидным (уменьшенным) числом хромосом. При определенных условиях гаплоидные клетки образуют аск (сум-

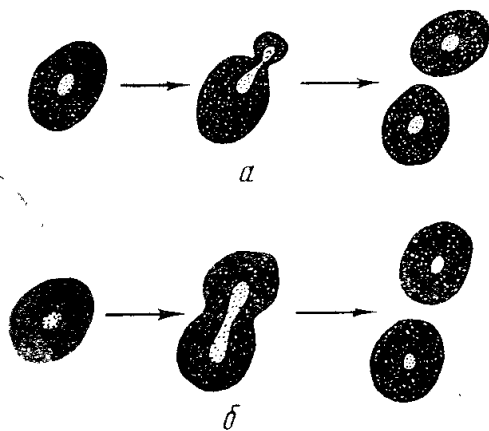


Рис. 2—1. Размножение дрожжей почкованием (а) или делением (б).

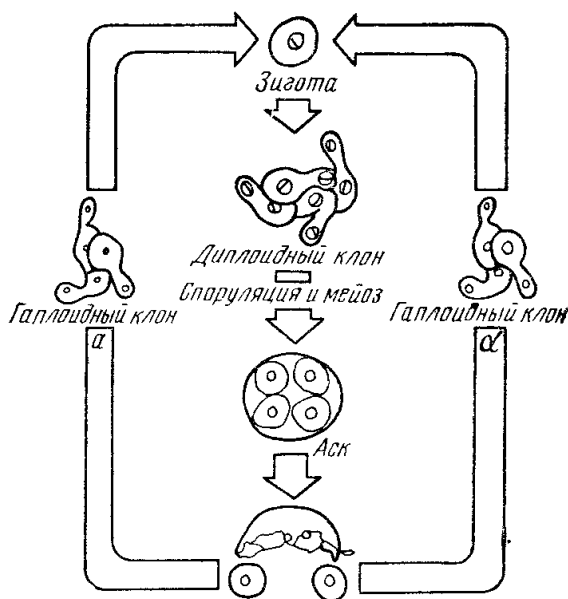


Рис. 2—2. Жизненный цикл дрожжей *Sacch. cerevisiae*.

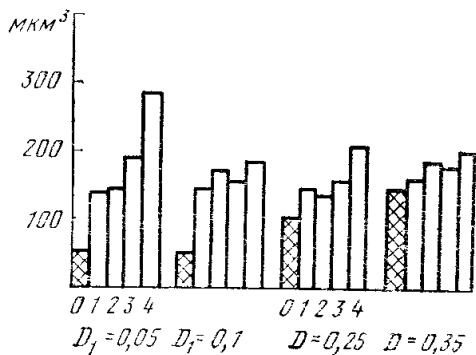


Рис. 2—3. Размер дочерних (черные столбики) и материнских клеток с числом рубцов от одного до четырех в культуре при разной удельной скорости роста (Вран, Беран, 1977).

ку), содержащий 4 аскоспоры. Каждая спора образует клон клеток, которые могут сливаться с клетками противоположного типа скрещиваемости. Далее цикл повторяется [202, 159, 178].

В популяции *Sacch. cerevisiae* средний размер материнских клеток не зависит от удельной скорости роста, но увеличивает средний размер дочерних клеток (рис. 2—3), что сказывается на размере всей популяции. Следовательно, с повышением удельной скорости роста уменьшается разница в размере дочерних и материнских клеток дрожжей [44, 302]. Чем больше удельная скорость роста культуры приближается к максимуму, тем физиологически более совершенной становится дочерняя клетка в момент отделения.

Отмечают существование трех типов взаимосвязи между делением ядра и почкообразованием: 1) ядро делится во время образования почки; 2) ядро делится после образования почки и по достижении последнего размера материнской клетки мигрирует в нее; 3) деление ядра происходит одновременно с почкообразованием в перешейке между материнской и дочерней клетками.

Отмечается, что у дрожжей время, необходимое для репликации ДНК, близко к времени удвоения биомассы при максимальной удельной скорости роста. Это положение в значительной мере подтверждается экспериментальными данными, представленными на рис. 2—3. Так, например, при удельной скорости роста, близкой $\mu_{\text{макс}}$, время, необходимое для репликации ДНК, близко к времени удвоения биомассы [44].

μ	Время удвоения биомассы, ч—мин	Время репликации ДНК, ч—мин	Время отделения дочерней клетки, ч—мин
0,05	14—00	1—30	5—00
0,35	1—54	1—30	1—36

Окончательная репликация ДНК является хотя и необходимым, но не единственным условием для отделения дочерней клетки. Однако все же физиологической причиной замедленного процесса деления дочерних клеток является относительно медленно протекающий синтез ДНК, который значительно отстает от синтеза РНК.

БИОХИМИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ, ПРЕДШЕСТВУЮЩИЕ РАЗМНОЖЕНИЮ ДРОЖЖЕВЫХ КЛЕТОК

Размножение дрожжей предопределяется сложными биохимическими процессами, протекающими внутри клетки. Если клетка находится в условиях, обеспечивающих синтез всех необходимых ферментов, то она будет в состоянии почковаться и размножаться. При этом клетка должна быть обеспечена прежде всего питанием. Транспорт в клетку веществ, необходимых для осуществления конструктивного и энергетического обмена, является сложным процессом. Тем самым питание является важнейшей стороной обмена веществ, а потому и важнейшей связью микроорганизма и питательной среды. При этом клетка способна вовлекать простые

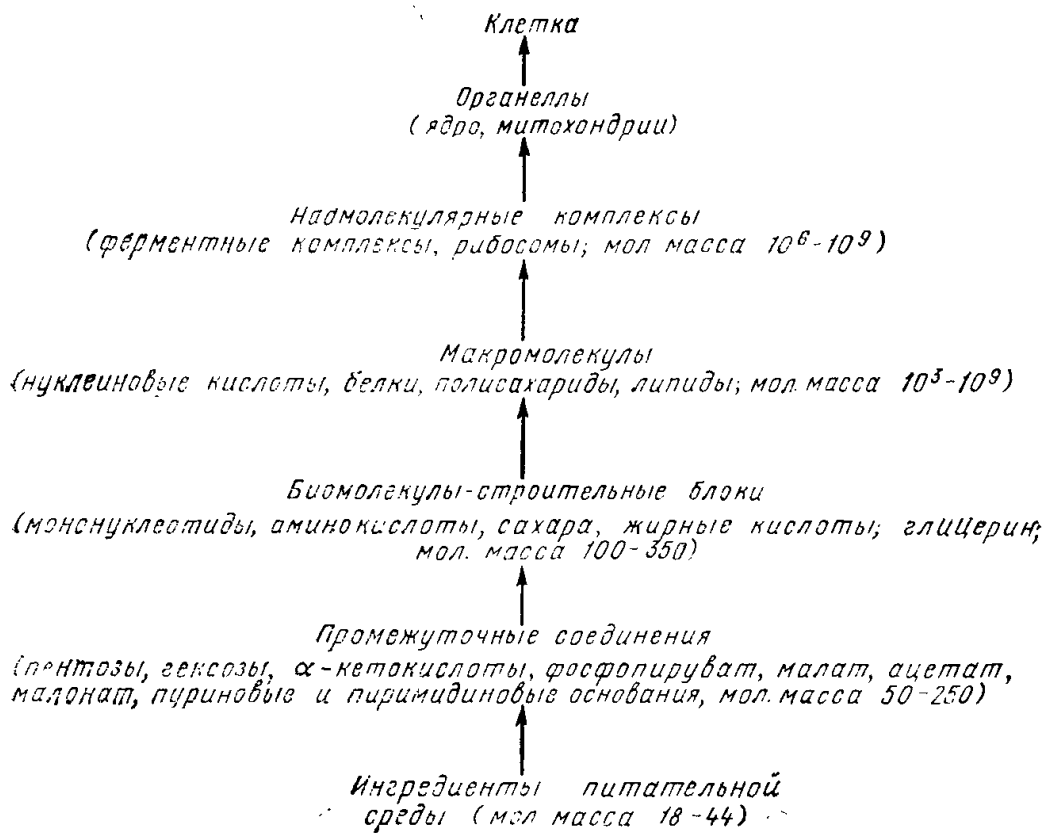


Рис. 2-4.
Усложнение организации внутриклеточных молекул.

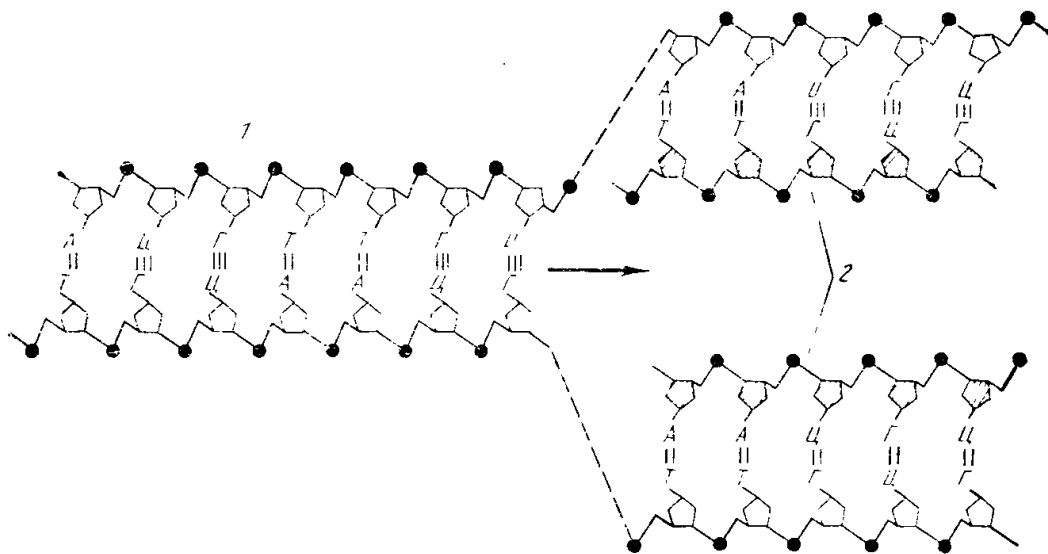


Рис. 2-5.
Репликация, или самоудвоение, двойной цепи ДНК:
1 — материнская молекула; 2 — дочерние молекулы.

исходные ингредиенты питательной среды в процесс метаболизма. Следовательно, из небольшого количества простых исходных молекул клетка синтезирует большое разнообразие органических биомолекул, а из них — тонко специфические макромолекулы и надмолекулярные комплексы. Эти молекулы придают клетке уникальные свойства, характерные для живой клетки.

Ступени возрастания сложности внутриклеточных биомолекул представлены на рис. 2—4. Разные по структуре, сложности и специфическим функциям, внутриклеточные молекулы синтезируются дрожжами в нужных количествах, обеспечивающих им жизнедеятельность и условия размножения:

	Число молекул		Число молекул
Белки	3000	Жиры	40
ДНК	1 и более	Строительные белки	500
РНК	1000		
Углеводы	50	Неорганические ионы	12

Синтез разнообразных и уникальных внутриклеточных биомолекул катализируется, направляется и координируется ферментами [128, 141, 269]. Однако одним из наиболее важных процессов является все же самоудвоение, или размножение, ДНК. Как уже отмечалось ранее, молекулы ДНК являются двухцепочечными, причем обе цепи комплементарны друг другу.

В результате расщепления двойной молекулы на две одинаковые цепи и последующего достраивания недостающих «половинок» по принципу комплементарности возникают две двойные цепи (рис. 2—5). При клеточном размножении каждая из двух вновь образующихся клеток получает одну из этих двойных цепей, идентичных исходной.

В течение митотического цикла в дрожжевых клетках протекают сложные процессы, связанные с биосинтезом ДНК (репликация), РНК (транскрипция) и белка (трансляция). Все эти процессы взаимосвязаны, обусловлены и катализируются соответствующими ферментами: ДНК-полимеразой, ДНК-лигазой, эндонуклеазой, ректриктазой и др. Эти ферменты определяют рост, развитие и размножение дрожжей.

Ниже приводятся некоторые экспериментальные данные, подтверждающие важность синтеза ДНК для размножения дрожжей.

РЕПЛИКАЦИЯ, ИЛИ САМОУДВОЕНИЕ, ДНК

Пусковым началом клеточного размножения является, вероятно, синтез ДНК, который осуществляется в течение короткого периода, именно в первой четверти клеточного цикла, перед началом почкования. Эти данные были подтверждены опытами, в которых отдельно учитывался синтез ядерной и митохондриальной ДНК у дрожжей *Sacch. cerevisiae*.

Еще ранее другими авторами также отмечалось, что почкование клеток начинается примерно через 40 мин инкубации, а

фаза синтеза ДНК является короткой. К аналогичным выводам пришли и некоторые другие авторы [205a], которые подтвердили, что синтез ДНК занимает примерно $\frac{1}{8}$ долю всего цикла, или около 30 мин при первом митотическом делении, тогда как процессы, непосредственно связанные с делением ядра, занимают около половины всего митотического цикла [205a].

Синтез ДНК у дрожжей *Schizosaccharomyces pombe* осуществляется в самом конце клеточного цикла, перед делением клеток, в течение очень короткого времени — 10—16 мин [247]. Положение о том, что синтез ДНК у делящихся дрожжей происходит непосредственно перед делением клеток, было подтверждено последующими исследованиями. В то же время содержание ДНК в дрожжевых клетках неизменно сохраняется в течение всего периода онтогенеза (рис. 2—6), они всегда, при любых условиях, стремятся удержать количество ДНК на постоянном уровне [109]. Поэтому считается установленным положение, согласно которому «все соматические диплоидные клетки организма данного вида содержат одно и то же количество ДНК, независимо от питания и условий среды» [141]. Количество же ДНК на одну клетку возрастает по мере продвижения вверх по эволюционной лестнице.

Как уже отмечалось ранее, процесс почкования и размножения клеток определяется сложными биохимическими превращениями, причем как конструктивного, так и энергетического характера. И механизм клеточного деления должен быть наиболее сложным, дифференцированным и точно координированным, так как он включает процессы синтеза не только белка, но и нуклеиновых кислот, липидов, полисахаридов и т. п., обуславливающие образование субклеточных структур и характер энергетических реакций.

Например, функции полимераз, ответственных за репликацию и транскрипцию ДНК, много сложнее, чем функции ферментов, катализирующих реакции с участием неинформационных молекул.

Процесс репликации, или размножения, ДНК является событием пускового типа и для других биохимических превращений. Прежде всего это касается таких клеточных структур, как гены и хромосомы, строение и функция которых предопределяется содержанием в них ДНК.

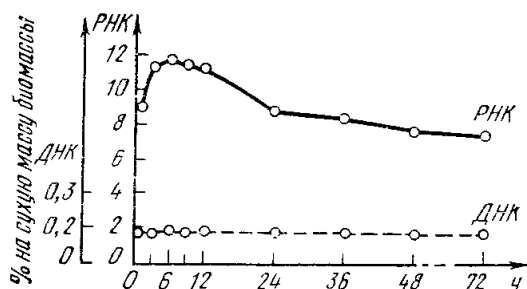


Рис. 2—6.
Содержание ДНК и РНК в дрожжах *Sacch. cerevisiae* XII расы на различных фазах их роста [109].

ВОСПРОИЗВЕДЕНИЕ ГЕНОВ И ХРОМОСОМ

Основным процессом, определяющим рост и размножение клеток, является воспроизведение генома, т. е. полного набора генов, расположенных на хромосомах. Без репликации хромосом, обуславливающих информацию на биосинтез других органелл и структур, не могут быть переданы наследственные при-

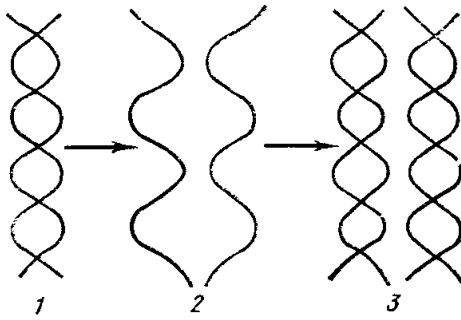


Рис. 2—7.
Репликация хромосомы:
 1 — хромосома; 2 — продольное разделение хромосомы на две хроматиды; 3 — две хромосомы, идентичные исходной.

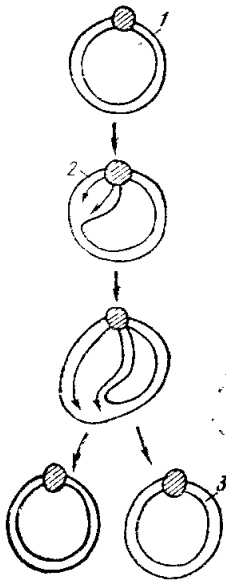


Рис. 2—8.
Последовательные этапы репликации хромосом:
 1 — две цепи родительской ДНК с точкой роста; 2 — точка нинициации; 3 — вновь синтезированные дочерние цепи (всего четыре).

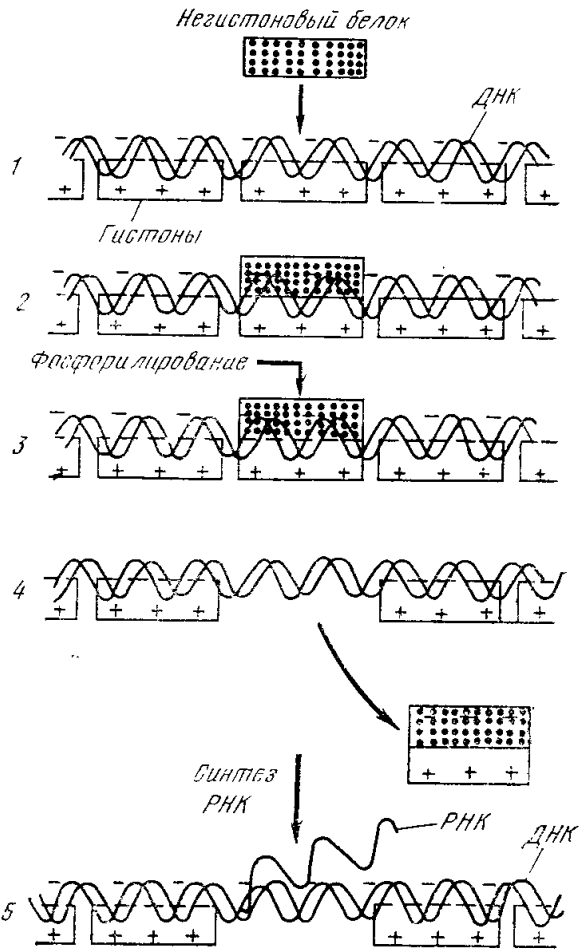


Рис. 2—9.
Возможный механизм регуляции транскрипции отдельных генов с помощью негистоновых хромосомных белков:
 1 — ген, включенный в специфический участок цепи ДНК, «узнанный» негистоновым белком; 2 — негистоновый белок, связанный со специфическим участком цепи ДНК; 3 — фосфорилируемый негистоновый белок, отрицательно заряженный, стимулирующий синтез РНК; 4 — негистоновый белок, отталкивающий отрицательно заряженную ДНК; 5 — участок ДНК, не комплекующий с гистоном, доступный для транскрипции в РНК [207а].

знаки последующим поколениям. Число хромосом у *Sacch. cerevisiae* было найдено равным 17 [344], у *Hansenula wingei* — всего 4. Чаще всего число их не превышает 8—12 и оно зависит от родовой принадлежности организма [33].

Имеются основания полагать, что воспроизведение генов и хромосом всецело связано с репликацией ДНК. Именно в процессе деления клетки (митоз) обеспечивается репликация ДНК, сосредоточенной в хромосомах. Размножение клетки начинается с удвоения генов с последующим делением хромосом и образованием новых дочерних хромосом — точных копий «материнских». Новая хромосома начинает строиться из имеющегося в ядре материала несколько раньше, чем можно наблюдать митотический процесс, который обычно длится 1,5—2,0 ч.

Репликация хромосомы, по-видимому, формально сходна с репликацией двойной спирали ДНК (рис. 2—7), однако соотношения между цитологическими и молекулярными событиями пока еще не ясны [39]. Как известно, ДНК бактериальной хромосомы представляет собой кольцевую двойную спираль, которая перед репликацией не разделяется полностью. Две цепи постепенно расходятся, так что образуется Y-образная конфигурация (репликационная вилка); точка пересечения и является единственной точкой роста, перемещающейся вдоль всей хромосомы, которая, очевидно, остается кольцевой на протяжении всего периода репликации (рис. 2—8). В результате завершения репликации образуются две кольцевые двухспиральные хромосомы, а всего 4 цепи.

Репликация ДНК обеспечивает тем самым самоудвоение хромосом и полную передачу в процессе митоза генетической информации дочернему ядру. У дрожжей в процессе митоза оболочки ядер сохраняются, поэтому репликация и расхождение хромосом протекает внутри ядерной оболочки [205а].

Оказалось, что синтез ДНК тесно сопряжен с синтезом хромосомных гистонов. Показано, что гистоны и ДНК синтезируются одновременно и что подавление репликации ДНК сопровождается немедленным снижением синтеза гистонов. Информационные РНК, кодирующие гистоны, связаны лишь с белоксинтезирующими структурами клетки и поступают (транслируются) в белки во время синтеза ДНК.

Итак, гистоны участвуют (помимо поддержания структуры хроматина) в подавлении ДНК — зависимого синтеза РНК, причем блокирование гистонами транскрипции основано на их связывании с ДНК, а не на ингибировании РНК-полимеразы. По-видимому, нормальная функция гистонов связана с подавлением способности генов транскрибироваться в РНК [207а]. Однако показано, что добавление негистоновых хромосомных белков¹ к бесклеточной системе снижает подавляющее действие на синтез РНК, обычно наблюдаемое в присутствии гистонов. Следовательно, негистоновые хромосомные белки препятствуют полному подавлению синтеза РНК гистонами.

Установлено, что фосфорилирование негистоновых белков связано с клеточным дифференцированием и активацией генов. Вероятно, фосфорилирование негистоновых белков каким-то образом связано с механизмом регуляции транскрипции генов этими молекулами. Негистоновые белки более активно фосфорилируются в S-фазе (синтеза ДНК)², чем при делении как таковом, а гистоны связываются с ДНК клеток в S-фазе менее прочно, чем с ДНК митотических клеток. В свою очередь гены транскрибируются более активно в S-фазе, чем в митозе.

Отмечается тесная связь между активностью генов, фосфорилированием негистоновых хромосомных белков и связыванием гистонов с ДНК (рис. 2—9).

Хотя гистоны синтезируются в цитоплазме, но как только они переносятся в ядро, то связываются с ДНК сразу же после синтеза. В отношении негистоновых белков этого не отмечается. Если одни негистоновые белки комплексируются с ДНК сразу после

¹ Хромосомные белки обычно делят на две группы: гистоны и негистоновые белки.

² Обычно периоды клеточного деления делят на S-фазу, т. е. фазу интенсивного синтеза ДНК, и митоз, т. е. собственно деление клетки.

синтеза, то другие входят в состав хроматина через различные промежутки времени. Они характеризуются более высокой скоростью обновления, чем гистоны. Продолжительность жизни одних негистоновых фракций составляет лишь несколько минут, а другие так же устойчивы, как клеточные ДНК и гистоны. Их молекулярная масса варьирует от менее чем 10 000 до более чем 150 000 дальтон. О функциональном разнообразии негеминовых белков свидетельствует наличие среди них множества сложных ферментных систем, в том числе полимераз, участвующих в синтезе и репарации РНК и ДНК, а также ферментов, модифицирующих нуклеиновые кислоты и белки путем добавления или удаления ацетатных, метильных и фосфатных групп. Негистоновые белки участвуют в регуляции активности генов.

Таким образом, функции гистонов и негистоновых хромосомных белков взаимосвязаны с биологической функцией ДНК.

Дрожжевые клетки обладают отличительной особенностью, заключающейся в том, что в процессе митоза оболочки ядер сохраняются и репликация и расхождение хромосом протекают внутри ядерной оболочки [205а].

Информация, заключенная в каждом гене, «считывается» и используется для синтеза специфического белка. Наличие в организме этого белка, например фермента, создает химическую основу для проявления определенного признака.

Воспроизведение генов и хромосом в значительной мере предопределяет деление ядра и последующее деление клетки.

С большой долей достоверности можно говорить о том, что удвоение ядра также обусловлено процессом репликации ДНК. По-видимому, пусковое начало, вызывающее и обеспечивающее удвоение генов, хромосом и ядра, является общим. Как известно, деление ядра (митоз) тесно связано с делением цитоплазмы (цитокinesis) или с воспроизведением ее органелл. Эти два процесса — митоз и цитокinesis — почти всегда хорошо синхронизированы и координированы между собой, тем не менее это два самостоятельных и различных процесса.

Полагают все же, что деление ядра осуществляется с опережением деления клетки.

Таким образом, пусковым началом как для удвоения генов, хромосом и ядра, так и для почкования дрожжей в целом является ДНК, ее характерная способность к самоудвоению. Сложный процесс размножения дрожжей на молекулярном уровне связан, очевидно, с уникальной способностью нуклеиновых кислот к самоудвоению, в основе которой лежит специфичность сравнительно слабых водородных связей между парами нуклеидов. Эти основные молекулярные механизмы биологически универсальны, т. е. характерны для всех бактерий (прокариотов), а также для дрожжей (эукариотов), которые в основном размножаются, как отмечалось ранее, вегетативным способом.

Если ДНК является первичным хранителем генетической информации, то она в значительной мере предопределяет процесс

«транскрибирования», т. е. передачу генетической информации на РНК, которая сама потом выступает в роли матрицы, определяя последовательность соединения аминокислот в белках (трансляция).

Эти процессы обеспечивают универсальность и специфичность структур и конфигураций макромолекул. Размер и форма биомолекул определяют как биологическую специфичность, так и ультраструктуру живой клетки и ее органелл. Эти важнейшие макромолекулы играют исключительную роль в регуляции химических реакций, протекающих в клетке.

ФУНКЦИЯ МАКРОМОЛЕКУЛ

Универсальная функция нуклеиновых кислот состоит, как уже отмечалось ранее, в хранении и передаче генетической информации, закодированной в специфической последовательности мононуклеотидов и азотистых оснований. Синтез ДНК зависит от функционирования определенных ферментов, образование которых в свою очередь зависит от ДНК и других ферментов. Кинетика такой системы может быть представлена математически как «замкнутая» [72а].

Белки являются непосредственными продуктами действия генов, в которых заключена генетическая информация. Большинство белков функционирует в качестве ферментов, другая часть их служит структурными элементами, а также выполняет другие биологические функции. Обычно функциональная единица белка образована 20—30 аминокислотами. Дополнительные функциональные группы, не участвующие в образовании пептидной связи и способные к ионизации, образуют полярные участки. Наличие полярных групп в белке определяет его реакционную способность и тем самым его функцию. Так, например, в состав ферментов входит большое число аминокислот со свободными полярными группами: NH_2 , COOH , OH , SH . Функциональная активность белков зависит прежде всего от местных зарядов в их молекулах, которые обусловлены полярными группами аминокислот, причем общий суммарный заряд молекулы белка определяется концентрацией водородных (pH) и других ионов.

В белковой молекуле можно выделить несколько уровней организации. Первый уровень — это так называемая первичная структура, т. е. последовательность аминокислот в полипептидной цепи. Второй уровень организации белковой молекулы (вторичная структура) создается в результате свертывания полипептидной цепи в спираль или в другую правильную конфигурацию. В глобулярных белках имеется еще и третичный уровень организации.

В формировании третичной структуры многих белков важную роль играют ковалентные связи наряду с водородными, электростатическими и гидрофобными. В жизнедеятельной клетке имеются белки с различным уровнем организации. Однако биологическая активность белка в значительной степени зависит от специфической третичной структуры.

Эти свойства белков являются, вероятно, также универсальными независимо от уровня развития организма и, в частности, свой-

ственно как дрожжам (эукариотам), так и бактериям (прокариотам).

Таким образом, белки, как и нуклеиновые кислоты, являются в силу особенностей их структуры информационными макромолекулами. Эти соединения обладают, как правило, несколькими биологически важными функциями, и только совокупность этих функций определяет пригодность их для микробной клетки. В основе взаимодействия макромолекул лежит система строго специфических связей, обеспечивающих в целом молекулярную структуру протоплазмы.

Естественно, что удвоение молекул ДНК и синтез информационной РНК—очень сложные процессы, протекающие во взаимодействии с другими процессами обмена веществ и прежде всего с белками, из которых определяющее действие оказывают ферменты.

СИНТЕЗ ФЕРМЕНТОВ В ЦИКЛЕ МИТОТИЧЕСКОГО ДЕЛЕНИЯ ДРОЖЖЕЙ

Высокоинтенсивный синтез ДНК в первый период цикла митотического размножения дрожжей всецело определяется активностью ряда ферментов и условиями, обеспечивающими их каталитическое действие. В частности, показано, что репликация ДНК осуществляется при совместном каталитическом действии по крайней мере трех ферментов: ДНК-полимеразы, ДНК-лигазы и эндонуклеазы. Репликация коротких участков обеих цепей протекает в основном с участием ДНК-полимеразы, которая попеременно использует обе цепи в качестве матрицы, причем связи всегда образуются в 5'-, 3'-направлении. Репликация же нативной двухцепочной ДНК начинается, по-видимому, с разрыва нуклеазой цепи с последующим каталитическим действием ДНК-полимеразы. Этот фермент способен катализировать образование ДНК с большой скоростью, указанной ранее.

Следовательно, синтез ДНК следует рассматривать одновременно с активностью и образованием ферментов, обеспечивающих процесс репликации ДНК. В связи с этим имеют исключительное значение оптимальные условия среды, обеспечивающие действие ферментов и синтез ДНК—начальный «пуск» митоза у дрожжей.

Если синтез ДНК протекает лишь в течение короткого периода клеточного цикла, то образование РНК и белка отмечается непрерывно в течение всего митотического цикла. Концентрация белка экспоненциально увеличивается по мере роста почки. Одновременно интенсивно синтезируются нерастворимые углеводы, главным образом структурные полисахариды, необходимые для синтеза клеточной стенки [388]. Почка с самого начала окружена, вероятно, растянутой стенкой и заново синтезированной клеточной стенкой [251]. Почкование дрожжевых клеток всецело связано с накоплением специальных митохондрий, содержащих липиды и участвующих в синтезе РНК-протендов.

Клеточная перегородка между материнской клеткой и почкой у дрожжей строится центрипетрально, т. е. в направлении от краев к центру. Развитие этой поперечной перегородки начинается на ранних стадиях почкования. По обе стороны от первичной перегородки затем формируются две электронно-плотные вторичные перегородки [272]. Клеточные перегородки материнской клетки строятся одновременно и самостоятельно, причем полное формирование перегородки заканчивается быстро.

Процесс расщепления двух сформированных перегородок происходит в направлении от центра к периферии по слою, лежащему между ними, причем первичная перегородка становится в дальнейшем частью края почечного шрама материнской клетки [372]. Почечные шрамы всегда остаются на материнской клетке после отделения почек. Центральная часть почечного шрама формируется из вторичной перегородки материнской клетки [372].

На поверхности почки, отделившейся от материнской клетки, также остается след, называемый «родильным рубцом». Он формируется целиком из вещества вторичной перегородки почки и является менее заметным, чем почечные шрамы на поверхности материнской клетки.

В состав почечных шрамов дрожжей входит значительное количество хитина. Хитин располагается в виде кольца по краю шрама, локализуясь между двумя слоями глюкана. Полагают, что хитин предохраняет от сжатия почечный канал, через который осуществляется переход ядра и других органелл из материнской клетки в почку [255]. Синтез хитина начинается в самом начале почкования и заканчивается перед полным разделением клеток [254]. Одновременно был выделен фермент хитинсинтетаза, участвующий в синтезе хитина, осуществляемом ступенчато. В неактивном состоянии, в виде «зимогена», хитинсинтетаза связана с частицами, которые могут быть получены из сферопластов *Sacch. cerevisiae*.

Почки у дрожжей рода *Saccharomyces* образуются на разных участках поверхности клетки (многополярное почкование), а у дрожжей рода *Saccharomycodes* и *Nadsonia* — только на вершинах клеток (апикалярное почкование), и, наконец, у *Hansenula polstii* иногда образуются булавовидные почки, соединенные с родительской клеткой сравнительно длинным стебельком [300].

Синтез внутриклеточных соединений, необходимых для формирования перегородок, клеточных стенок и роста почки в целом, сопровождается уменьшением объема клетки 350 до 230 мкм³. Это связано, по-видимому, с распадом крупных вакуолей, характерных для покоящихся клеток, на более мелкие, вследствие чего увеличивается плотность клеток.

При этом увеличивается поверхность клеток, а следовательно, и их контакт с внешней средой, и, кроме того, возрастает «компактность» цитоплазмы, в большей мере обеспечивающей химические реакции.

Итак, если репликация ДНК осуществляется с опережением митотического цикла, а образование белка, РНК и других соединений протекает в самом начале его, непрерывно и даже экспоненциально, то синтез некоторых ферментов отмечается лишь в течение определенного периода цикла, т. е. является ступенчатым.

К таким ферментам относятся α -глюкозидаза, аспартаттранскарбоксилаза, орнитинтранскарбоксилаза.

Синтез таких ферментов, как α -глюкозидаза, α -галактозидаза и α -орнитинтрансаминазы, осуществляется только один раз за клеточный цикл в середине его, а аргиназы — в первой трети цикла [366]. Один раз, перед образованием почки, синтезируется экзо- β -1,3-глюканаза [265]. Синтез же щелочной фосфатазы, сахаразы и мальтазы протекает непрерывно в течение митотического цикла. Однако и в этом случае отмечаются «критические точки» в митотическом цикле, когда скорость синтеза какого-либо фермента возрастает.

Предполагают, что эти эффекты в ускорении синтеза, например, щелочной и кислой фосфатазы у дрожжей, связаны с изменением импульсных эффектов соответствующих генов и местом их расположения.

Периодичность синтеза ферментов связана, вероятно, с процессом транскрибирования различных генов, осуществляемым в строго определенном периоде митотического цикла. Кроме того, известно, что микроорганизмы располагают механизмами, обуславливающими их способность экономно синтезировать компоненты клетки и в большей степени приспособляться к постоянно меняющимся условиям среды. Самый действенный принцип экономии состоит, вероятно, в том, чтобы всегда синтезировать только те ферменты, которые требуются в конкретных условиях, остальные же, напротив, не синтезировать совсем или образовывать в самом незначительном количестве. Даже в условиях, обеспечивающих очень быстрый темп размножения, накапливаются лишь очень небольшие количества внутриклеточных веществ, используемых в системе нового клеточного материала. Это дополнительно указывает на то, что непроизводительные затраты метаболизма чрезвычайно малы. Оказалось, что подобные механизмы, связанные с экономичностью, наследуются, т. е. соответствующая информация закрепляется в геноме.

В процессе почкования дрожжевых клеток им тем более необходимо проявлять экономию и синтезировать лишь жизненно нужные ферменты и другие биомолекулы. Избыточные внутриклеточные продукты могут только тормозить ход биохимического синтеза.

УСЛОВИЯ БИОСИНТЕЗА БЕЛКА

СБАЛАНСИРОВАННОСТЬ СИНТЕЗА ДНК И БЕЛКА

В настоящее время установлено, что жизнедеятельность размножающихся дрожжей и других микроорганизмов сопровождается постоянным нарушением и восстановлением структурной целостности ДНК. Нарушения структуры ДНК носят различный характер, в частности происходят так называемые «физиологические» разрывы цепей, возникающие в процессе транскрипции и репара-

ции, а также в результате ошибок в работе репликационной ДНК — полимеразы, метилазы и других ферментов.

«Физиологические» надрезы цепей не представляют большой опасности для клеток, так как легко устраняются быстродействующим и безошибочным механизмом репарации, состоящим из одного фермента — полинуклеотидлигазы [46]. Однако образование даже ограниченного числа брешей (т. е. выпавших нескольких десятков или сотен нуклеотидов) таит опасность для размножающихся клеток вследствие нарушения координации сопряженных реакций гидролиза и ресинтеза. Резкое нарушение равновесия синтеза ДНК и белка может обусловить разобщение реакций гидролиза и синтеза. Это в свою очередь может привести к стабилизации разрывов в цепях ДНК и гибели клеток. И наоборот, выравнивание скоростей синтеза ДНК и белка путем их сбалансированного ингибирования может обеспечить синхронность реакций гидролиза и ресинтеза и, следовательно, — репарацию (устранение) разрывов в цепях ДНК и сохранение жизнеспособности клеток.

Высказывают предположение [4], что размножающиеся клетки детерминированно проявляют ответную реакцию на резкое нарушение равновесия между скоростями внутриклеточных синтезов ДНК и белка. Например, отмечается четкая корреляция между полным или частичным исчезновением разрывов в ДНК на фоне сбалансированного синтеза ДНК и белка и жизнеспособностью клеток, полноценных в отношении репарации ДНК. Частичное уменьшение одностежковых разрывов в ДНК сопровождается лишь уменьшением гибели клеток, тогда как полное исчезновение разрывов в цепях ДНК приводит к 100%-ному сохранению жизнеспособности клеток.

Следовательно, выравнивание скоростей синтеза ДНК и белка устраняет разрывы в ДНК через посредство процессов репарации ДНК, или, другими словами, равновесие скоростей синтезов ДНК и белка является необходимым условием для функционирования процессов репарации ДНК. И наоборот, если разрывы в цепях ДНК, возникшие, например, в ходе репликации, остаются незаполненными вследствие нарушения процессов репарации, то эти «метаболические» разрывы могут стать «стартовыми» точками экзонуклеазных атак, которые сопровождаются частичной деградацией ДНК и образованием брешей.

Тем самым нерепарированные брешы могут быть причиной «дисбалансной» гибели клеток. Следовательно, нарушение равновесия между скоростями синтеза ДНК и белка разобщает обычно сопряженные в процессе репарации реакции гидролиза и ресинтеза ДНК с торможением ресинтеза.

Такое разобщение приводит к расширению метаболических разрывов (брешей) цепей ДНК.

Именно проявлением действия экзонуклеаз *in vivo* служит деградация ДНК, которая и наблюдается на фоне дисбаланса синтеза ДНК и белка у микроорганизмов. Нарушение баланса между скоростями синтеза ДНК и белка обуславливает, вероятно, сни-

жение эффективности процессов репарации ДНК. Восстановление повреждений определяется не только генетически детерминированными репарационными способностями клетки, но и балансом внутриклеточного синтеза ДНК и белка. Таким образом, равновесие между скоростями синтеза ДНК и белка является для микроорганизмов жизненно важной константной величиной с определенными допустимыми пределами колебаний [216]¹.

Следовательно, сбалансированность синтеза ДНК и белка тем более необходима в процессе размножения дрожжей.

Необходимо отметить, что рост и размножение дрожжей следует рассматривать не только под углом зрения биохимических превращений макромолекул. Известно, что процессы репликации ДНК, транскрипции РНК и трансляции белка, катализируемые соответствующими ферментами, зависят от внешних условий культивирования микроорганизма. Связь между генетическим аппаратом клетки и обменными процессами часто устанавливается посредством низкомолекулярных соединений — субстратов, а также конечных продуктов, которые постоянно информируют клетку о состоянии метаболизма. Например, биосинтез индуцированных ферментов, как уже указывалось ранее, в значительной мере определяется условиями культивирования микроорганизма. Образование промежуточных соединений (пентозы, гексозы, α -кетокислоты, фосфолипиды, малат, ацетат, малонат, пуриновые и пиримидиновые основания) всецело обуславливается составом питательной среды и условиями культивирования. Оптимальные внешние условия позволяют клетке сохранять внутриклеточную среду как можно более постоянной (гомеостаз)². Специфические внешние факторы могут влиять на ход метаболизма или служить сигналом к замедлению или ускорению реакции или процесса.

Показано, что оптимальный состав в среде неорганических ионов оказывает влияние не только на ионный гомеостаз клетки, но и на ее жизнедеятельность [98], в том числе на синтез ДНК, активирование хромосом, стабильность рибосом и т. д.

СТИМУЛЯТОРЫ СИНТЕЗА ДНК

Представляет интерес концепция о роли Ca^{2+} в репарации клетки и поддержании физико-химических свойств цитоплазмы.

Ионы кальция действуют и как регуляторы репликации ДНК. Для синтеза ДНК необходим Ca^{2+} при работе как с целыми клетками, так и с выделенными ядрами [253, 272]. Стимулирующим действием на синтез ДНК в ядре обладают полиамины (путресцин и кадаверин). Фактором контроля репликации ДНК могут быть также полианионы. Так, гепарин (мукополисахарид некоторых

¹ Скорость синтеза ДНК и белка в клетках, обработанных налиндиксовой кислотой (НК), определяют в процентах по сравнению со скоростями этого же синтеза (принятых за 100%) в нитактных клетках. Соотношение скоростей синтезов ДНК/белок является показателем баланса: при сбалансировании оно равно единице.

² Тенденцию к сохранению постоянства внутриклеточной среды в процессе метаболизма клетки называют гомеостазом.

тканей) активирует синтез ДНК в изолированных ядрах [252], вероятно, путем стимулирования матричной активности хроматина по отношению к ДНК-полимеразе [324]. Наоборот, кислые полисахариды угнетают ДНК-полимеразную активность [236]. Для осуществления репарации (исправления) и дупликации (удвоения) ДНК необходимо оптимально поддерживать внутриклеточные физико-химические параметры: активность воды, рН, концентрацию солей и т. д. Эти внутриклеточные параметры зависят от цитоплазматической мембраны, системы активного транспорта и энергетического аппарата. Изменение внутриклеточных концентраций катионов (K^+ , Na^+) проявляется в качестве пускового механизма для переключения активности с редупликации на транскрипцию [312], т. е. с процесса образования двух тождественных двухцепочечных молекул ДНК на биосинтез иРНК на ДНК. А трансмембранная разность потенциала играет, вероятно, ведущую роль в регуляции деления клеток.

ВЛИЯНИЕ ИОНОВ НА СИНТЕЗ РНК

В изолированных ядрах синтез РНК сильнее стимулируют ионы K^+ , чем ионы натрия [376], а иногда и, наоборот, стимулируют ионы Na^+ , а не K^+ . В других условиях опыта синтез РНК зависит от обоих этих катионов [8]. Действие Na^+ отмечается тем, что в его присутствии достигается наилучшее дифференцирование РНК-полимераз.

Оказалось, что Mg^{2+} является специфическим активатором РНК-полимеразы I, которая сосредоточена в ядрышке и транскрибирует цистроны рибосомальных РНК, тогда как Mn^{2+} активирует РНК-полимеразу II, локализованную в экстраядрышковом хроматине и активирующую образование гетерогенных РНК. В модельных опытах с изолированными ядрами гепарин, например, не только вызывал набухание ядер и деконденсацию хроматина, но и активацию синтеза РНК [321]. В очищенных РНК-полимеразных системах отмечалось угнетение РНК-полимеразной активности кислыми полисахаридами, экстрагированными из тканей [236, 349].

ВЛИЯНИЕ ИОНОВ НА УРОВЕНЬ ХРОМОСОМ

Ионы способны регулировать активацию хромосом или их отдельных участков. При определенных концентрациях Na^+ и Mg^{2+} обнаружено специфическое активирование нескольких сегментов на хромосомах [330]. Изолированные хромосомы под влиянием отдельных комбинаций ионов могут обнаруживать характерные явления деконденсации (набухания) дисков без одновременного синтеза РНК. Отдельные ионы могут специфически стимулировать некоторые локусы хромосом и в условиях *in vivo*.

ВЛИЯНИЕ ИОНОВ И ПОЛИАМИНОВ НА БЕЛКОВЫЙ СИНТЕЗ

Установлена избирательность эффекта катионов при синтезе полипептидов на различных матрицах. Так, NH_4^+ сильнее активировал синтез при трансляции полиуридиловой кислоты (поли-У),

тогда как в случае других матриц активирующая способность NH_4^+ и K^+ различалась незначительно (Rb^+ влиял слабо, а Cs^+ и Na^+ не влияли на трансляцию).

Ионы Mg^{2+} являются нормальными участниками реакции аминоацилирования тРНК [71], тогда как ионы Ca^{2+} ингибируют ее конкурентно по отношению к Mg^{2+} [360].

В некоторых случаях полиамины оказываются более эффективными активаторами аминоацилирования, чем Mg^{2+} [306]. Отдельные катионы обнаруживают значительную избирательность действия на образование аминоксил-тРНК. В системах из *Escherichia coli* в отсутствие Mg^{2+} реакция при различных комбинациях аминокислот и тРНК стимулировалась различными одновалентными катионами неодинаково [55]. Следовательно, белковый синтез может в значительной мере контролироваться (как количественно, так и качественно) соотношением Mg^{2+} , Ca^{2+} и полиаминов (путресцин, спермидин, кадеверин). Влияние полиаминов на белковый синтез *in vitro* настолько сильно выражено, что их можно считать более важными регуляторами белкового синтеза в бактериях, чем ионы Mg^{2+} . Специфический (близкий к наблюдаемому *in vivo*) характер трансляции ряда матричных РНК в присутствии тиаминов проявляется более выражено, чем в присутствии Mg^{2+} .

ВЛИЯНИЕ КАТИОНОВ НА СТАБИЛЬНОСТЬ РИБОСОМ И ОБРАЗОВАНИЕ ПОЛИРИБОСОМ

Важное значение катионов и прежде всего специфическая роль Mg^{2+} установлены для сохранения структуры рибосом, для образования комплекса рибосом с матрицами и в процессе трансляции [207]. По способности поддерживать целостность полирибосом в присутствии Mg^{2+} ионы можно расположить следующим образом:



В присутствии Ca^{2+} полирибосомы стабилизируются лишь ионами NH_4^+ . В отсутствие же двухвалентных катионов полирибосомы диссоциируют в среде, не содержащей K^+ , NH_4^+ , Cs^+ и Rb^+ или содержащей Li^+ или Na^+ . Способность 50S-субъединиц рибосом катализировать пептидилтрансферазную реакцию обнаруживает абсолютную зависимость от присутствия одновалентных катионов, которые располагаются по активирующей способности в ряд: $\text{NH}_4^+ \gg \text{Rb}^+ > \text{K}^+ > \text{Cs}^+$; однако Na^+ и Li^+ неактивны [340]. Полиамины спермидин и путресцин увеличивают время жизни рибосомальной РНК (рРНК) в условиях, когда рибосомальные белки еще недостаточно для стабилизации рРНК [348]. Кроме того, спермидин и Mg^{2+} стимулируют прикрепление свободных рибосом к мембранам эндоплазматической сети *in vitro* [318].

Показано, что ионы магния внутриклеточно связываются не только с рибосомами, но и с другими полианионами Mg^{2+} и, в частности, в виде полимерного ортофосфата магния [165, 166]. Этот полимер локализован около цитоплазматической и вакуолярной мембран, а также внутри вакуолей [167]. Доля катиона в полимерной форме составляет до 20% от общего содержания металлов в клетке. Это одна из форм регулирования внутриклеточной концентрации свободного магния и поддержания в стационарном состоянии биохимических реакций.

ВОЗМОЖНЫЕ ПУТИ РЕГУЛЯЦИИ УРОВНЯ КАТИОНОВ

Влияние катионов на биосинтез макромолекул и органелл обуславливается активированием соответствующих ферментов. Концентрация ионов в клетках должна строго регулироваться, поскольку она может выступать в качестве внутриклеточного регуляторного фактора.

Первый этап регуляции внутриклеточных ионов осуществляется системой их транспорта и выделения. Показано, например, что содержание общего и осмотически свободного магния изменяется в 2—3 раза при увеличении концентрации экзогенного магния в 300 раз у дрожжей, в 13 000 у грибов [168] и в 2500 раз у бактерий [375]. Если общее содержание Mg^{2+} в клетках может возрасти во много раз (даже в 30 раз), то концентрация свободного Mg^{2+} практически остается постоянной, причем она не зависит от концентрации экзогенного Mg^{2+} . Однако при увеличении концентрации Mg^{2+} в среде возрастает его аккумуляция клетками. Эта зависимость заметно проявляется в интервале концентраций от 0,40—0,77 до 46 мМ.

Общее содержание Mg^{2+} в клетках также зависит от концентрации экзогенных ионов Fe^{3+} и ортофосфатов, причем фосфор необходим как для накопления, так и удержания Mg^{2+} . Если на среде с фосфатом содержание общего Mg^{2+} составило 14 200 мкг на 1 г сухой биомассы, то на среде без фосфата лишь 2440 мкг. Общее содержание Mg^{2+} составляет 0,27—8,7% массы сухой биомассы. Транспортируется Mg^{2+} в дрожжевые клетки против градиента концентрации 1 : 125, 1 : 1300 и 1 : 100 в зависимости от содержания в среде железа или фосфата [168].

Роль катионов отмечается в дифференцировании микроорганизмов [329].

Второй этап регуляции уровня ионов у дрожжей осуществляется с помощью мембран внутриклеточных органелл. Установлено, например, что вакуоли обогащены магнием в 2—8 раз больше по сравнению с гомогенатом дрожжей [168]. Следовательно, магний, а также марганец распределены внутри клеток дрожжей неравномерно, т. е. отмечается локальное сосредоточение ионов, «ком-партментализация». Уменьшение скорости роста микроорганизма приводит к 3—8-кратному увеличению общего содержания магния [165].

Третий этап регуляции обуславливается выведением иона из осмотически свободного состояния. Этот внутриклеточный механизм регуляции обеспечивает определенный уровень иона Mg^{2+} в свободной форме [165].

Итак, скорость размножения микроорганизмов в значительной степени определяется их синтетической деятельностью, которая характеризуется быстрым превращением исходного субстрата среды, высокой способностью синтезировать сложные молекулы из простых и интенсивным воспроизведением новых ультраструктур и в целом клеток с очень высокой плотностью популяции.

РЕПРОДУКТИВНЫЙ ВОЗРАСТ ДРОЖЖЕВЫХ КЛЕТОК

Скорость размножения дрожжевых клеток является величиной непостоянной и зависит от меняющихся внешних условий культивирования. Наиболее интенсивно рост популяции клеток отмечается лишь в экспоненциальной фазе, когда увеличение числа клеток и прирост биомассы происходит в геометрической прогрессии, т. е. за каждый час в e^c раз, согласно уравнению $m_t = m_0 e^{ct}$, в котором m_t — прирост биомассы за время t ; m_0 — начальная биомасса; e — основание натурального логарифма, равное 2,718...; c — удельная скорость роста.

При этом необходимо принять во внимание и то, что «начальная» клетка в процессе ферментации в состоянии многократно почковаться и образовать в зависимости от условий культивирования от 9 до 43 клеток. При достижении определенного размера почка отшнуровывается и начинает самостоятельное существование. Однако репродуктивность дрожжей можно установить не подсчетом клеток в процессе их культивирования, а по числу почечных шрамов. По их количеству может быть сделана оценка репродуктивного возраста дрожжевой клетки, так как новая почка не образуется на месте старого почечного шрама. Установлено, что у гаплоидных клеток *Sacch. cerevisiae* насчитывается максимально 18, а у диплоидных максимально 32 почечных шрама, тогда как у *Schizosaccharomyces* только 6 шрамов деления.

Путем непосредственного наблюдения за жизнедеятельностью дрожжей было установлено, что диплоидные клетки могут продуцировать от 23 до 49 дочерних клеток, а гаплоидные — от 2 до 33 клеток.

Управление процессом размножения дрожжевых клеток должно быть увязано со знанием их биохимии. Так, например, в соответствии с принципом экономичности в метаболизме концентрация многих метаболитов в клетке (например, пирувата) очень низкая и она остается, как правило, в любой момент почти без изменений вследствие стационарного состояния, обусловленного равновесием между скоростью синтеза и распада каждого конкретного соединения.

Клетка не синтезирует в свой «резерв» даже ферментов. Чтобы поддерживать стационарное состояние, клетка нуждается в постоянном притоке энергии и соответствующих ингредиентов питательных веществ. Жизнь клетки зависит от условий окружающей среды. Отсутствие в «резерве» клетки метаболитов вынуждает ее немедленно реагировать на сигнальную информацию, связанную, например, с нарушением концентрации какого-либо ингредиента среды. Поэтому она быстро реагирует на изменение состава среды.

Именно такую зависимость роста дрожжевых клеток от состава среды можно проиллюстрировать известным примером. Если дрожжи, не адаптированные к углеводородам, поместить в питательную среду, содержащую в качестве источника энергии только

эти парафины, то рост клеток начинается не сразу: ему предшествует определенный латентный период. Сначала должны дерепрессироваться оперон и синтезироваться углеводородокисляющие ферменты. Только после синтеза индуцированных ферментов клетки начнут размножаться. Если же дрожжи поместить в питательную среду, содержащую и алканы, и глюкозу, то их рост начинается незамедлительно. Сначала избирательно ассимилируется глюкоза, поскольку необходимые для этого ферменты являются конститутивными. С полным использованием глюкозы исчезает корепрессор; наступает латентный период. В этот момент начинает действовать индуктор (алканы). Инактивированный репрессор освобождает оперон, синтезируются ферменты, которые начинают диссимилировать алканы. В связи с этим начинается новый цикл роста дрожжей.

Другой пример: если к микробной культуре, находящейся в стационарном метаболическом состоянии, добавить такое соединение, как изопропилтио- β -*D*-галактозид, то в клетках может начаться индуцированный синтез относительно больших количеств фермента — в этом случае β -галактозидазы.

Взаимосвязанные биохимические реакции обеспечивают приспособляемость клетки к изменившимся условиям. При этом проявляется универсальное действие принципов строгого контроля в метаболизме микроорганизма, по-видимому, в разных клетках и разных условиях в неравной степени. Уже теперь выявлены некоторые основные регуляторные механизмы. Однако физиология дрожжей все еще весьма далека от того, чтобы быть в состоянии дать «молекулярную» интерпретацию многих других механизмов регуляции, которые, по-видимому, действуют в микробной клетке.

* * *

Итак, ранее было показано, что клетка создает новые вещества и все более сложные формы. За короткое время из атомов углерода, водорода, кислорода, азота и фосфора клетки образуют сложные и высокоупорядоченные структуры, из которых строятся макромолекулы.

Рост и размножение клетки определяются прежде всего макромолекулами, информация о структуре которых записана в генетическом коде. В свою очередь синтез макромолекул предопределяется содержанием малых молекул — метаболитов и ионов, информация которых задается в виде их концентраций. Неравномерное распределение ионов между клеткой и средой может служить сигнальной функцией для клетки, которая соответственно направляет синтетические реакции [98]. Синтез относительно низкомолекулярных соединений представляет собой тесно переплетающуюся сеть реакций. В случае размножения клетки синтез любого ее компонента зависит от функционирования остальных.

Особенностью химии живой клетки является динамическое состояние составляющих ее молекул, распад и синтез которых катализируется большим количеством ферментов, проявляющих

действие в исключительно мягких условиях температуры, давления и кислотности среды. Почкование и размножение дрожжевой клетки связаны с процессом ее роста и могут начаться лишь тогда, когда количество определенных клеточных компонентов достигнет критической величины.

Характерно также и то, что микробной клетке свойственна точная «воспроизводимость» структуры и состава даже при росте на сильно различающихся химических средах. Следовательно, отмечается проявление «тотальной интеграции клеточных функций». Репликация информационных молекул, а также внутриклеточных органелл, функции которых взаимообусловлены и согласованы, позволяет обеспечивать воспроизведение микроорганизмом самого себя.

Для обеспечения самовоспроизведения дрожжевая клетка выработала регуляторные механизмы, позволяющие ей направлять и координировать биохимические процессы. Так, например, поступление питательных веществ в клетку из питательной среды регулируется пермеазной системой. Подавление этой системы может привести к прекращению размножения клеток. Питательная среда, лишенная ионов магния, обуславливает изменение клеточной проницаемости и торможение почкования клеток. Отсутствие в среде ионов Mg^{2+} может привести к торможению роста клеток не только вследствие изменения клеточной оболочки, но и в результате снижения содержания рибосом и замедления синтеза белка.

Разобщение процессов энергетического и конструктивного обмена приводит к прекращению и роста, и деления клетки. Например, разобщение процессов окисления и фосфорилирования отмечается у биохимических мутантов. Имеется в виду класс мутаций *petite*, основанный на изменении митохондриальной ДНК. Мутанты *petite* дрожжей лишены способности к дыханию из-за недостаточной активности цитохромов и поэтому растут только на сбраживаемых субстратах [202].

Итак, рост и размножение могут быть определены как упорядоченное увеличение числа всех компонентов живой клетки. Размножение предопределяет воспроизведение всех клеточных структур, органелл и компонентов клетки. Основные функции, характеризующие жизнедеятельность клетки, связаны с обменом веществ, выражающимся в дыхании и ассимиляции питательных веществ, с процессами роста, развития, старения и гибели. Все эти функции обусловлены структурами клетки, каталитическим действием ферментов.

Известно, что структура и функция, или форма и жизненные процессы, — два взаимообусловленных аспекта жизни [7]. С другой стороны, все сложные биохимические процессы, определяющие жизнедеятельность клетки, направляются и координируются ферментами. Поэтому биокатализаторы, их каталитическое действие определяют условия для жизни и роста живой клетки.

МЕТАБОЛИЗМ И ПРЕВРАЩЕНИЕ ЭНЕРГИИ

Дрожжи, как и другие микроорганизмы, нуждаются в источнике энергии. Реакции, обеспечивающие синтез новых клеточных компонентов, должны быть сопряжены с другими реакциями, в результате которых выделяется энергия. Дрожжевая клетка не может ни создавать энергию из ничего, ни уничтожить ее, она может только преобразовывать одну форму энергии в другую.

В питательных средах, включающих углеродсодержащие органические соединения и другие ингредиенты, заключена потенциальная энергия. Она сосредоточена в различных ковалентных связях между атомами в молекуле. Только распад (диссимиляция) питательных веществ в результате окислительно-восстановительных реакций сопровождается освобождением энергии и образованием химически активных метаболитов, которые используются при выполнении всех жизненных функций.

Таким образом, химическая энергия углеродсодержащих соединений превращается в процессе клеточного дыхания в биологически доступную энергию микроэргических фосфатных связей. Часть энергии при этом теряется, рассеиваясь в виде тепла: она клеткой не утилизируется (204, 245). Следовательно, дыхательный метаболизм представляет собой процесс использования энергии субстрата и образования активных метаболитов, используемых для синтеза различных структурных соединений.

ОБМЕН ВЕЩЕСТВ (МЕТАБОЛИЗМ)

Обмен веществ (метаболизм) связан с осуществлением множества разнообразных химических реакций, катализируемых ферментами. Совокупность осуществляемых клеткой биохимических процессов, обеспечивающих ее рост, развитие, размножение и другие проявления жизнедеятельности, и называется метаболизмом. Обмен веществ складывается из двух процессов: катаболизма и анаболизма. Метаболизм дрожжевых клеток может изменяться в зависимости от того, какие питательные вещества и в каком количестве имеются в питательной среде. В качестве источника углерода дрожжи используют не только глюкозу, но и другие сахара, органические кислоты, метиловый и этиловый спирты, углеводороды и др.

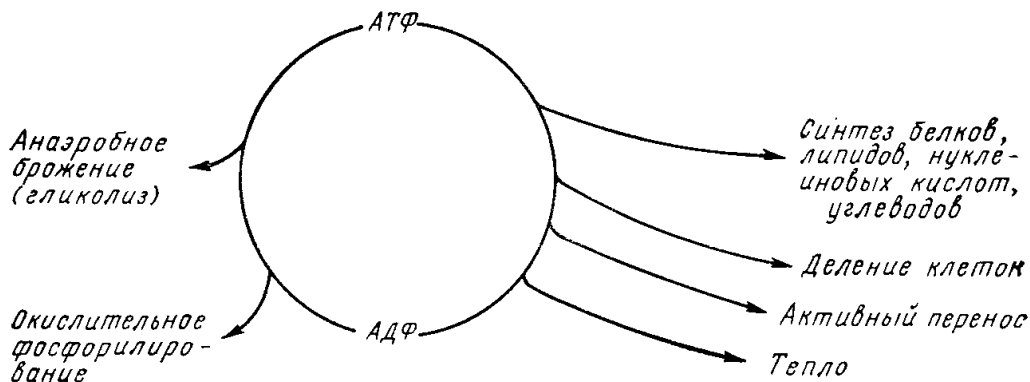


Рис. 3—1.

Схема взаимосвязи между экзергоническими и эндергоническими процессами, протекающими с участием АТФ.

Все эти углеродные соединения в конечном счете превращаются в метаболиты с освобождением энергии. Во всех процессах преобразования энергии участвуют молекулы АТФ (рис. 3—1).

К а т а б о л и з м — ферментативное расщепление углеводов, углеводовородов, липидов, белков — включает три главные стадии (рис. 3—2). На первой крупные молекулы питательной среды расщепляются на составляющие их основные строительные блоки: гексозы, пентозы, жирные кислоты, глицерин, аминокислоты. Однако дрожжевые клетки как исключение среди микроорганизмов эти строительные блоки получают уже в готовом виде, так как они не в состоянии синтезировать внеклеточные ферменты, которые катализировали бы распад сложноорганических соединений: крахмала, липидов, белка и т. п. Поэтому первая стадия подготовки высокомолекулярных соединений для дрожжей протекает вне клетки и без ее участия.

На второй стадии многие продукты, образовавшиеся на первой стадии, превращаются в более простые молекулы.

Так, например, гексозы, пентозы и глицерин, проникая в цитоплазму и разрушаясь в ней, превращаются сначала в глицеральдегид-3-фосфат, а затем в ацетильную группу, входящую в состав ацетил-КоА. Различные аминокислоты также дают при расщеплении лишь несколько конечных продуктов, а именно: ацетил-КоА, α -кетоглутарат, сукцинат, фумарат и оксалоацетат.

Продукты, образовавшиеся на второй стадии, вступают в третью стадию, которая для них всех является общей и на которой они в конечном счете окисляются до CO_2 и воды, а также распадаются на низкомолекулярные образования для анаболитических процессов.

В результате окисления органических соединений питательной среды освобождается энергия, необходимая для проявления жизнедеятельности клетки, а также образуются, как уже указывалось, различные двух-, трех- и четырехуглеродные предшественники, которые являются исходным материалом для биосинтетических реакций.

Следовательно, в ходе окисления крупные молекулы расщепляются с образованием более мелких соединений и высвобождают при этом энергию, заключенную в их сложной молекулярной структуре. Эта энергия запасается в форме энергии фосфатных связей аденозинтрифосфата (АТФ).

А н а б о л и з м — ферментативный синтез, осуществляемый клеткой, — ведет к увеличению сложности соединения. Питательные вещества среды, или предшественники, или строительные блоки, полученные на первой стадии катаболизма, проникнув внутрь клетки, подвергаются серии химических изменений, т. е. метаболизируются (рис. 3—3).

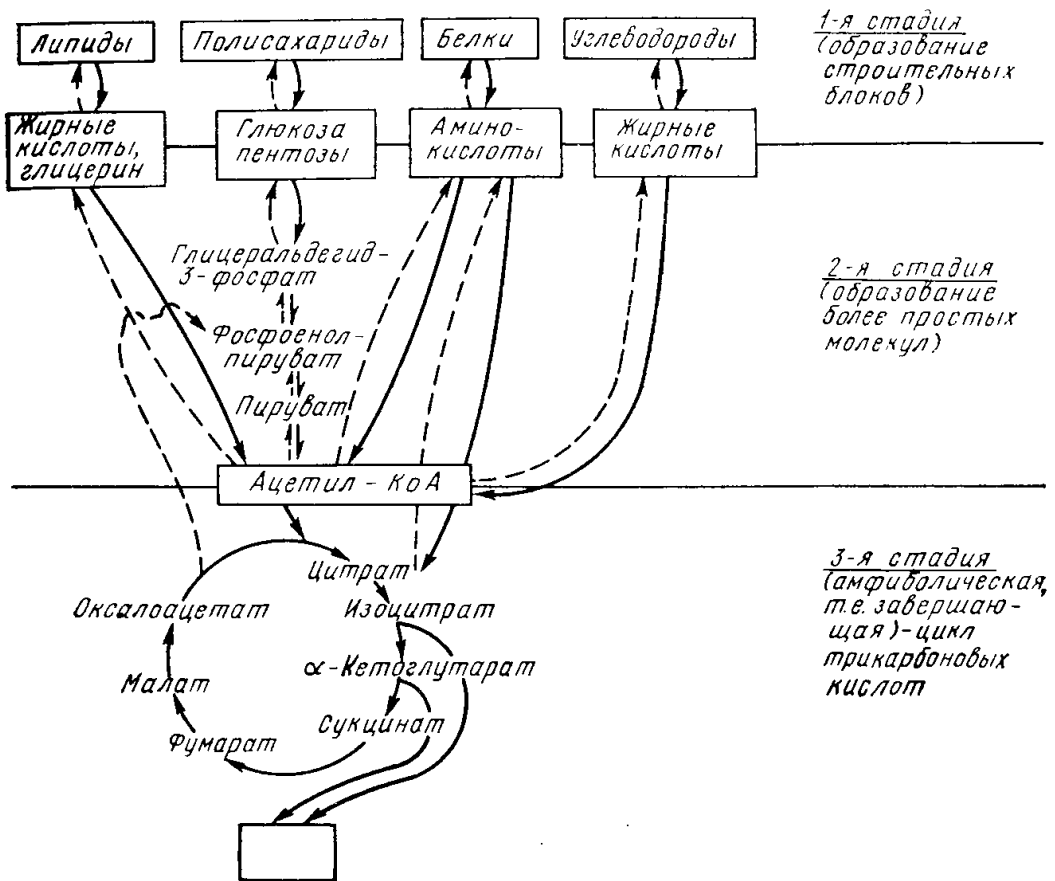


Рис. 3—2.
Три стадии катаболизма и анаболизма (жирные стрелки—катаболические пути, пунктирные—анаболические).

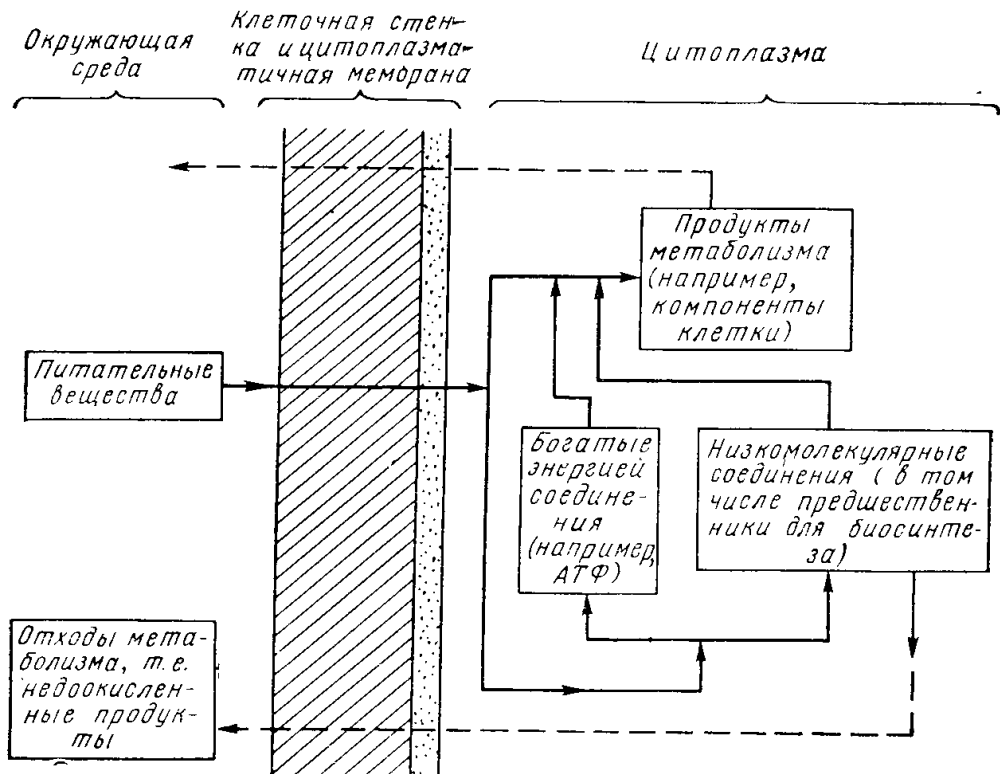


Рис. 3—3.
Схема основных метаболических путей у микроорганизмов.

Процесс анаболизма также включает три стадии. Исходными веществами или строительными блоками служат для него соединения, поставляемые третьей стадией катаболизма. Таким образом, третья стадия катаболизма является в то же время первой, исходной стадией анаболизма. Синтез белка, например, начинается на этой стадии с α -кетокислот, являющихся предшественниками α -аминокислот. На второй стадии анаболизма α -кетокислоты аминуются аминогруппой доноров с образованием α -аминокислот, а на третьей, заключительной стадии аминокислоты превращаются в пептидные цепи.

Поскольку процессы синтеза (белков, полисахаридов, нуклеиновых кислот, липидов) ведут к увеличению размеров молекул и усложнению их структуры, что означает уменьшение энтропии¹, процессы эти связаны с потреблением свободной энергии, которая поставляется в форме энергии фосфатных связей АТФ. Таким образом, катаболизм и анаболизм протекает в клетках одновременно. Именно такие метаболические или амфиболические пути характеризуются одновременным протеканием как анаболизма, так и катаболизма. К амфиболическим путям относятся гликолиз, или спиртовое брожение, гексомонофосфатный путь, цикл трикарбоновых кислот, глюкогенез [136].

Последовательно протекающие ферментативные реакции, в результате которых происходит соответственно разрушение (катаболизм) или синтез (анаболизм) ковалентного остова биомолекул, обеспечивает одновременно и образование всевозможных промежуточных продуктов, носящих название метаболитов; вся же цепь превращений объединяется под названием промежуточного метаболизма. Каждой из ферментативных реакций промежуточного метаболизма сопутствует превращение энергии.

На некоторых этапах катаболизма химическая энергия метаболитов запасается (как правило, в форме энергии фосфатных связей), а на определенных этапах анаболизма — расходуется. Эту сторону метаболизма принято называть сопряжением энергии. Промежуточный метаболизм и сопряжение энергии взаимосвязаны и взаимозависимы [141, 245, 291, 303, 304].

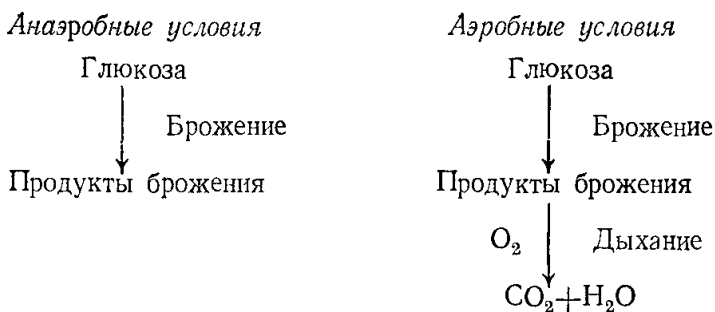
При рассмотрении вопроса об энергетическом обмене дрожжей и других хемоорганотрофных микроорганизмов приходится сталкиваться с терминами «брожение» и «дыхание» [110, 227, 141]. Под брожением следует понимать такие энергетические процессы, в которых органические углеродсодержащие соединения функционируют одновременно и как доноры, и как акцепторы электронов. При брожении роль конечного окислителя, или акцептора электронов, играет обычно какая-нибудь органическая молекула, которая образуется в ходе самого брожения. Брожение — это внутренний окислительно-восстановительный процесс, называемый также анаэробным дыханием в отличие от аэробного дыхания, когда конечным акцептором электрона является кислород.

Микроорганизмы, которые могут существовать в анаэробных условиях, делятся на два класса: облигатных анаэробов и факультативных анаэробов. К облигатным анаэробам принадлежит сравнительно небольшое число видов бактерий, обитающих в условиях пониженного содержания кислорода или полного его отсутствия (глубоко в почве, в нижних слоях водоемов,

¹ Уменьшение энтропии приводит к увеличению упорядоченности протекающих в клетке физических и химических процессов.

морском иле и т. д.). К ним относятся клостридии, а также денитрофицирующие и метанобразующие бактерии.

Факультативные анаэробы включают многие бактерии, дрожжи, мицелиальные грибы. В анаэробных условиях такие организмы получают энергию, сбраживая глюкозу подобно тому, как это делают облигатные анаэробы; в аэробных условиях они расщепляют сахара анаэробным способом, а затем получаемые при этом продукты анаэробного распада окисляются молекулярным кислородом. Таким образом, анаэробное расщепление глюкозы у факультативных анаэробов превратилось в обязательную первую стадию, за которой следует аэробная фаза — дыхание:



Уникальным свойством дрожжевой клетки является непрерывное получение энергии — химической, электрической и т. д., необходимой для ее жизнедеятельности и физиологических функций. Энергия в клетке получается в результате окислительно-восстановительных реакций, протекающих в процессе ее жизнедеятельности в анаэробных и аэробных условиях.

Процессы анаэробного и аэробного распада углеродсодержащих соединений рассматриваются ниже.

БИОХИМИЯ БРОЖЕНИЯ И ДЫХАНИЯ

Анаэробное брожение следует рассматривать как простейшую форму биологического механизма, обеспечивающего получение энергии из питательных веществ. Этот примитивный способ является своего рода подготовительной ступенью для дальнейшего окисления продуктов брожения кислородом. Отдельные этапы анаэробного расщепления глюкозы, катализируемые специфическими ферментами, в настоящее время хорошо известны. Поэтому различные типы брожения и в первую очередь гликолиз являются моделями для изучения более сложных и менее исследованных процессов дыхания.

Для дрожжей — спиртовых, пивных, винных, которые сбраживают глюкозу до спирта и CO_2 , а не до молочной кислоты, — характерен процесс брожения, совпадающий с гликолизом во всем, за исключением конечного этапа, катализируемого лактатдегидрогеназой. При спиртовом брожении этот этап заменен двумя другими ферментативными реакциями (рис. 3—4), катализируемы-

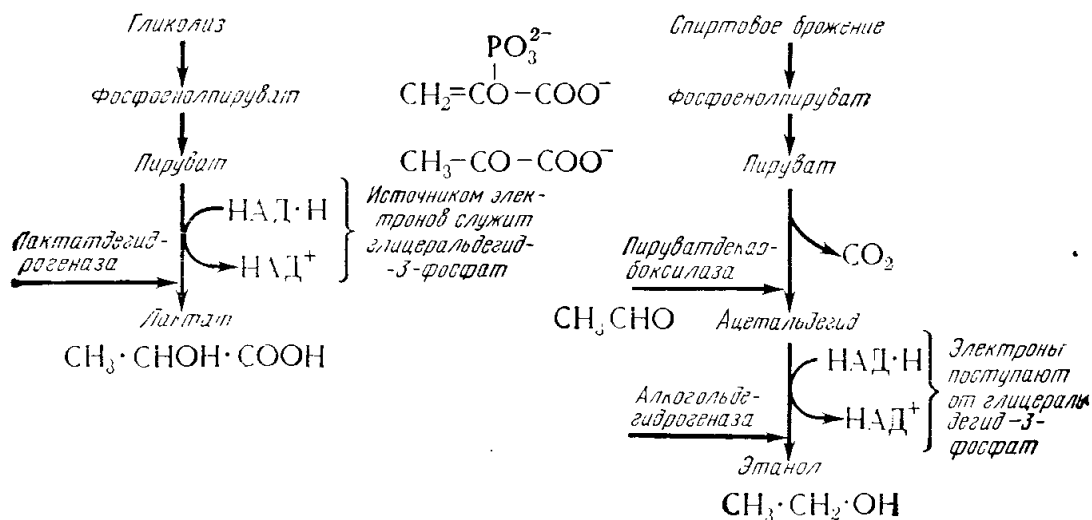


Рис. 3—4.

Сбраживание глюкозы двумя способами—гликолиза и спиртового брожения, тесно связанными между собой.

ми соответственно пируватдекарбоксилазой и алкогольдегидрогеназой.

Начальные этапы спиртового и других видов брожения, вплоть до образования пировиноградной кислоты (пирувата), полностью идентичны гликолизу. Более того, сравнительное изучение процессов анаэробного расщепления углеводов различными микроорганизмами показало, что ферменты и катализируемые ими реакции, протекающие с участием фосфорной кислоты, во всех случаях общие и эта общность сохраняется до образования из субстрата пировиноградной кислоты. Ферменты, катализирующие эти превращения, найдены в дрожжах, бактериях, тканях животных, семенах, листьях, клубнях. Все эти биохимические превращения происходят без участия кислорода воздуха, т. е. в анаэробных условиях.

Образовавшаяся на первых стадиях брожения пировиноградная кислота может затем подвергаться различным превращениям, направление которых зависит от наличия анаэробных или аэробных условий и от специфических особенностей данного организма. В анаэробных условиях пировиноградная кислота подвергается превращениям, происходящим в спиртовом, молочнокислом и ацетонобутиловом брожении. В аэробных условиях в соответствии с уравнением аэробного дыхания, окислительного декарбоксилирования и т. д. пировиноградная кислота может окисляться до уксусной, лимонной или другой органической кислоты или подвергаться полному окислению до углекислотного газа и воды. Таким образом, все известные типы брожения протекают в две фазы:

1) общая, или начальная, фаза, в течение которой происходит анаэробный распад сахара до образования пировиноградной кислоты;

2) конечная фаза, которая в каждом типе брожения протекает по-своему в зависимости от условий культивирования микроорганизма и его физиолого-биохимических особенностей.

В настоящей главе вопросы катаболизма и энергетического обмена будут рассмотрены в основном на примере жизнедеятельности дрожжей и прежде всего спиртового брожения.

АНАЭРОБНЫЙ РАСПАД УГЛЕВОДОВ

Одним из путей анаэробного превращения углеводов является спиртовое брожение. Брожение можно определить как глубокий распад сахара и других углеродсодержащих соединений, происхо-

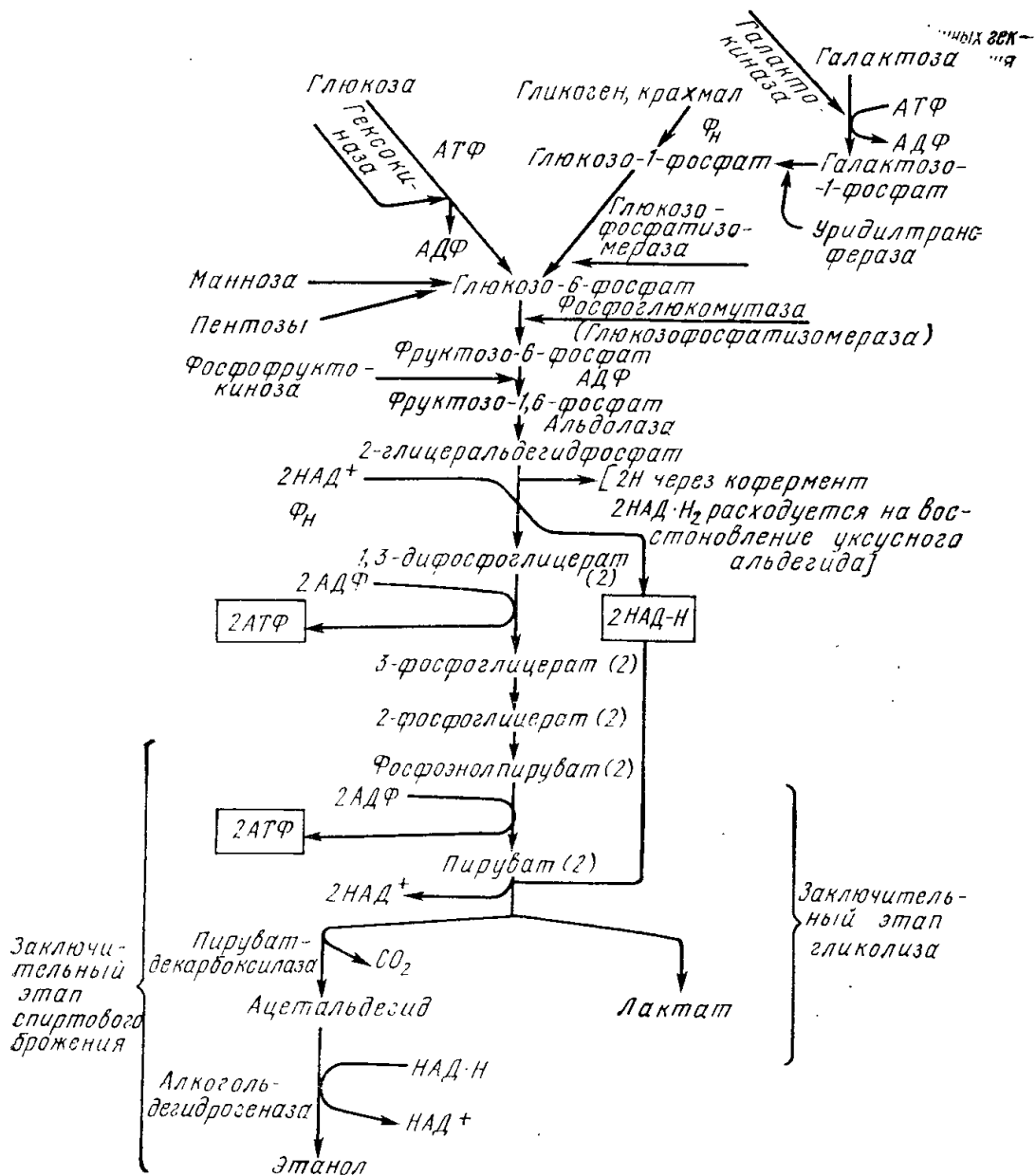


Рис. 3—5.

Схема анаэробного расщепления углеводов, включающая заключительные этапы спиртового брожения и гликолиза:
 Φ_H — неорганический фосфат.

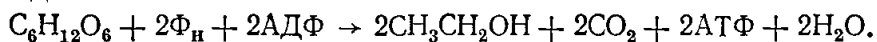
дующий под действием живых клеток или выделенных из них ферментов.

Брожение всегда включает промежуточные окислительно-восстановительные реакции, но никогда не приводит к полному окислению органических веществ. При спиртовом брожении распад глюкозы завершается образованием этилового спирта и углекислого газа (рис. 3—5). Одновременно осуществляются и биосинтетические реакции.

Основное значение брожения состоит в перестройке структуры молекул гексозы или другого углеродсодержащего соединения. Эти перестройки обуславливают биохимические превращения исходного субстрата, протекание окислительно-восстановительных процессов и образование в конечном итоге высокоактивного и лабильного в химическом отношении метаболита, которым является пировиноградная кислота.

Спиртовое брожение осуществляется, как уже отмечалось ранее, тем же ферментативным путем, что и гликолиз, с той разницей, что трехуглеродные промежуточные фрагменты разрушаются до этанола и CO_2 . Большинство других типов сбраживания глюкозы являются вариантами основного пути, т. е. гликолиза.

В спиртовом брожении и гликолизе не участвует кислород. Тем не менее оба эти процесса включают окислительно-восстановительные реакции. Об этом особенно отчетливо свидетельствуют конечные продукты спиртового брожения; этанол можно рассматривать как относительно-восстановительное соединение, поскольку его молекула содержит определенное количество водорода, а CO_2 — как относительно окислительное, поскольку в его молекуле водород отсутствует. Процессы спиртового брожения и гликолиза сопровождаются образованием АТФ из АДФ и фосфата. Без одновременного фосфорилирования АДФ они вообще не могут протекать. Суммарное уравнение спиртового брожения имеет следующий вид:

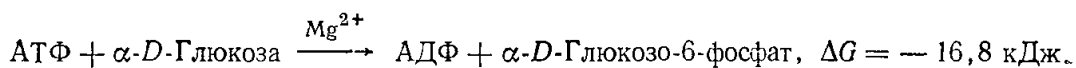


СТАДИИ СПИРТОВОГО БРОЖЕНИЯ (ГЛИКОЛИЗА)

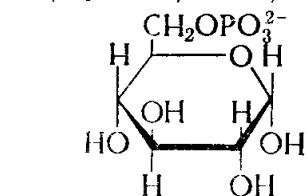
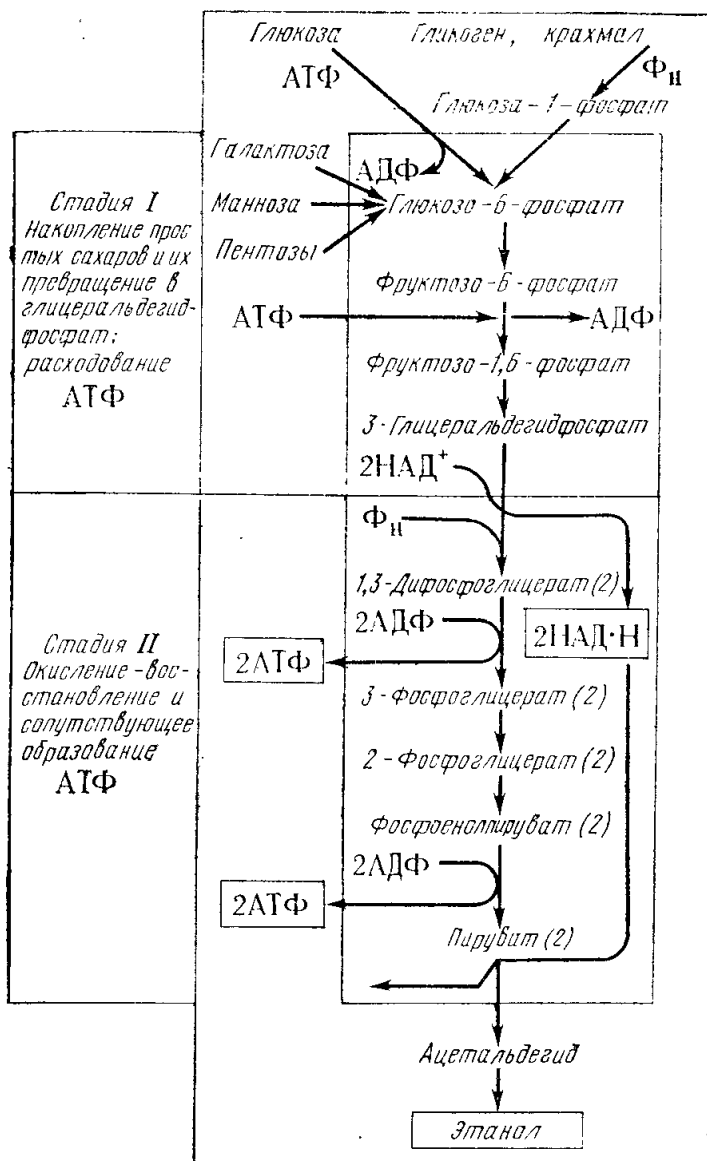
На первой стадии различные гексозы вовлекаются в процесс диссимиляции, фосфорилируясь за счет АТФ и образуя общий продукт — глицеральдегид-3-фосфат. Вторая стадия представляет собой процесс, общий для всех сахаров. Она включает и окислительно-восстановительные реакции, и механизмы накопления энергии — этапы, в ходе которых АДФ фосфорилируется до АТФ (рис. 3—6).

Первая стадия спиртового брожения

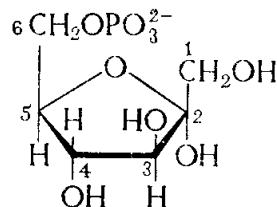
Она начинается с фосфорилирования *D*-глюкозы за счет АТФ. Реакция фосфорилирования как бы запускает процесс брожения. Нейтральная молекула *D*-глюкозы при этом активируется для участия в последующих этапах диссимиляции. В результате фосфорилирования за счет АТФ глюкоза превращается в отрицательно заряженную частицу. Этот процесс катализируется ферментами двух типов: гексокиназой и глюкокиназой, которые различаются между собой по специфичности действия в отношении сахаров. Ниже приведена реакция, которая катализируется указанными ферментами:



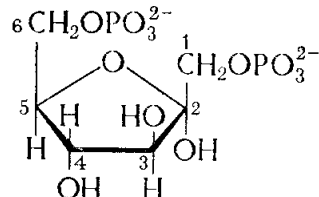
Структура фосфорилированных гексоз и продуктов спиртового брожения



α -D-Глюкозо-6-фосфат



α -D-Фруктозо-6-фосфат



Фруктозо-1,6-дифосфат

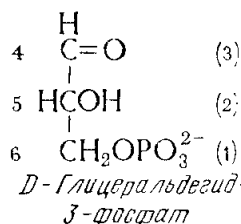
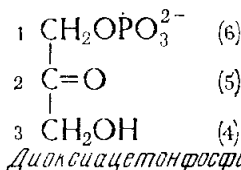


Рис. 3-6. Две стадии спиртового брожения.

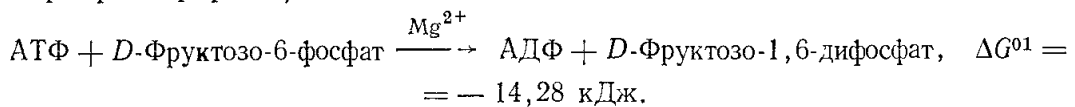
Гексокиназа — наиболее важный фермент, который способен катализировать фосфорилирование не только D-глюкозы, но также и многих других гексоз: фруктозы, маннозы, глюкозоаминна и др. Фермент обладает значительно более высоким сродством к альдогексозам, чем к кетогексозам. Гексокиназы обнаружены у дрожжей и бактерий, а также во многих животных и растительных тканях. Дрожжевая гексокиназа была получена в кристаллическом виде, ее молекулярная масса составляет 96 000. В животных тканях гексокиназа встречается в форме изоферментов.

Второй фермент — глюкокиназа катализирует перенос фосфатных групп только на D-глюкозу. Глюкокиназа обладает гораздо-

более низким сродством к *D*-глюкозе ($K_m = 2 \cdot 10^{-2} M$), чем гексокиназа ($K_m = 1 \cdot 10^{-5} M$), и вступает в действие только в случае крайней необходимости, когда концентрация глюкозы достигает высокого уровня. Обе киназы нуждаются в присутствии двухвалентных катионов (Mg^{2+} или Mn^{2+}), которые связываются с АТФ, образуя истинные субстраты: $MgATP^{2-}$ или $MnATP^{2-}$. Некоторые сульфгидрильные реактивы (например, мышьяковистые соединения) действуют как ингибиторы гексокиназы.

Превращение глюкозо-6-фосфата во фруктозо-6-фосфат. Реакцию изомеризации, в результате которой глюкозо-6-фосфат превращается во фруктозо-6-фосфат, катализирует фермент фосфоглюкоизомеразы: α -*D*-глюкозо-6-фосфат \rightleftharpoons α -*D*-фруктозо-6-фосфат, $\Delta G^{01} = +1,68$ кДж. Эта реакция протекает легко в обоих направлениях. Фермент обладает специфичностью в отношении глюкозо-6-фосфата и фруктозо-6-фосфата.

Фосфорилирование *D*-фруктозо-6-фосфата с образованием фруктозо-1,6-дифосфата. В этой второй, «пусковой» реакции используется еще одна молекула АТФ, на этот раз для фосфорилирования фруктозо-6-фосфата в положении С—1 при участии фермента фосфофруктокиназы (АТФ: *D*-фруктозо-6-фосфат-1-фосфотрансферазы):

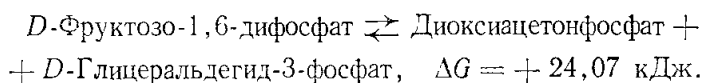


Роль специфического акцептора фосфата в реакции играет фруктозо-6-фосфат. Роль донора фосфата могут выполнять помимо АТФ также УТФ и ИТФ (уридинтрифосфат и инозинтрифосфат).

Фосфорилирование фруктозо-6-фосфата — важный этап, при помощи которого осуществляется регуляция брожения и гликолиза. Фосфофруктокиназа относится к числу аллостерических, или регуляторных, ферментов¹. Как и большинство других аллостерических ферментов, она имеет довольно высокую молекулярную массу, соответствующую 360 000, и с трудом поддается очистке. Поскольку фосфофруктокиназа ингибируется АТФ и цитратом (в высоких концентрациях) и стимулируется АДФ и АМФ, считается, что она представляет собой поливалентный аллостерический фермент, т. е. подчиняется действию более чем одного специфического модулятора (метаболита-ингибитора).

Фосфофруктокиназа, как регуляторный фермент, катализирует реакцию, лимитирующую общую скорость спиртового брожения.

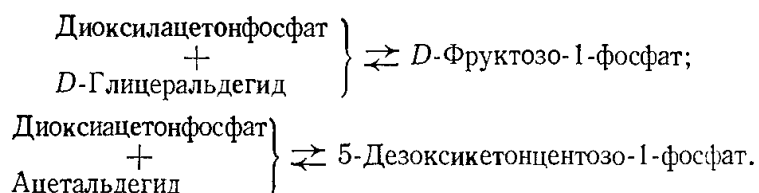
Расщепление фруктозо-1,6-дифосфата на глицеральдегид-3-фосфат и диоксиацетонфосфат. Осуществляется альдолазой (*D*-фруктозо-1,6-дифосфат-*D*-глицеральдегид-3-фосфат-лиаза). Реакция представляет собой обратимую альдольную конденсацию:



¹ В саморегулируемых ферментных системах конечный продукт ингибирует самый первый из ферментов, катализирующих данную последовательность реакций. Этот фермент (первый) называют регуляторным или аллостерическим ферментом, а ингибирующий метаболит — эффектором или модулятором.

Свободная энергия в этой реакции выражается довольно большой положительной величиной. В реакциях этого типа, в которых одна молекула исходного вещества расщепляется с образованием двух молекул продукта, на положение равновесия сильно влияет концентрация исходного вещества. Расчет показывает, что чем меньше начальная концентрация фруктозо-1,6-дифосфата, тем большая доля его должна расщепляться для того, чтобы было достигнуто состояние равновесия.

Молекула альдолазы (молекулярная масса 150 000) состоит из четырех субъединиц. В кислой среде фермент диссоциирует на неактивные субъединицы; в нейтральной среде субъединицы легко и самопроизвольно воссоединяются, образуя активный фермент. Альдолаза содержит свободные —SH-группы; некоторые из них играют важную роль в ее каталитической активности. Фермент проявляет строгую специфичность в отношении диоксиацетонфосфата, но вместо глицеральдегид-3-фосфата может катализировать реакцию с другими альдегидами, например с ацетальдегидом или незамещенным глицериновым альдегидом:



Полагают, что альдолаза образует фермент-субстратный комплекс с диоксиацетонфосфатом и другими кетозо-1-фосфатами. Таким образом, фермент-субстратный комплекс, возникающий между альдолазой и диоксиацетонфосфатом, включает шиффово основание, в образовании которого участвует E-аминогруппа лизинового остатка фермента (рис. 3—7).

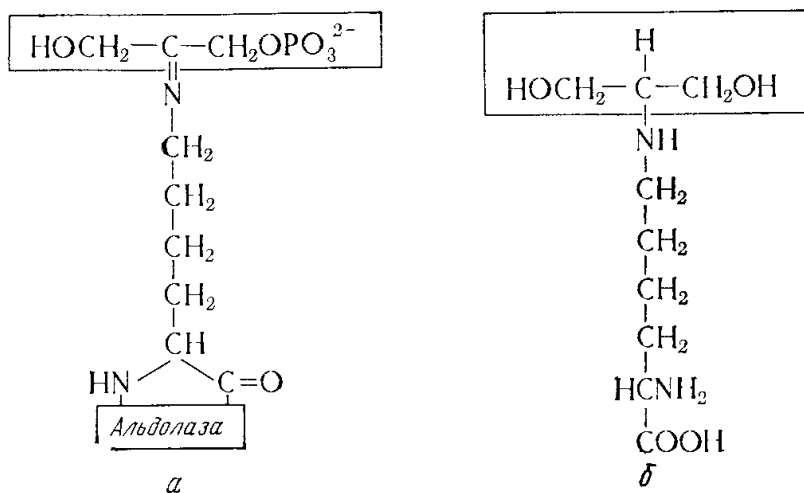
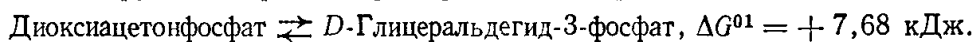


Рис. 3—7.

Фермент-субстратный комплекс альдолазы и диоксиацетонфосфата (а) и лизиновое производное диоксиацетонфосфата, выделенное из гидролизата восстановленного фермент-субстратного комплекса (б).

Альдолазы, обнаруженные у дрожжей, бактерий и грибов, различаются по своей потребности в ионах определенных двухвалентных металлов, обычно Zn^{2+} , Ca^{2+} или Fe^{2+} ; они нуждаются также в ионах K^+ . Молекулярная масса этих альдолаз равна приблизительно 65 000, что вдвое меньше молекулярной массы тех же ферментов животного происхождения.

Взаимопревращения тризофосфатов. В последующие реакции спиртового брожения может непосредственно включаться лишь глицеральдегид-3-фосфат, а диоксиацетонфосфат превращается в указанный альдегид в обратимой реакции, катализируемой триозофосфатизомеразой:



При равновесии на долю диоксиацетонфосфата приходится более 90% в смеси обоих тризофосфатов.

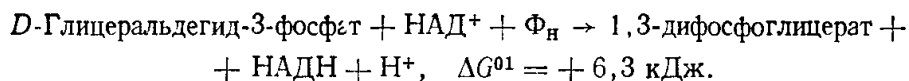
Таким образом, рассматриваемая реакция завершает первую стадию спиртового брожения, в которой молекула глюкозы путем двух фосфорилирований и расщепления подготавливается для второй стадии.

Вторая стадия спиртового брожения

В этой стадии протекают окислительно-восстановительные реакции и реакции фосфорилирования, в процессе которых генерируется АТФ. Поскольку из одной молекулы глюкозы образуются 2 молекулы глицеральдегид-3-фосфата, в последующих реакциях обе половины молекулы глюкозы претерпевают одинаковые превращения.

Окисление глицеральдегид-3-фосфата до 1,3-дифосфоглицерата. При этом энергия, освобождающаяся при окислении альдегидной группы глицеральдегид-3-фосфата, сохраняется в форме высокоэнергетического продукта окисления 1,3-дифосфоглицерата. В этой реакции проявляется одновременно ферментативный и химический механизм, с помощью которого энергия, высвобождающаяся в ходе окисления органических молекул, может запасаться в молекулах АТФ. Катализирует эту реакцию глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа. Фермент получен в кристаллическом виде (молекулярная масса 140 000) из дрожжей и мышц животных. Молекула его содержит 4 идентичные субъединицы, каждая из которых представляет собой одиночную полипептидную цепь, состоящую примерно из 330 аминокислотных остатков; расшифрована последовательность аминокислот в молекуле этого фермента.

Ниже представлена суммарная реакция, катализируемая глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназой:



В этой реакции к окислителю НАД^+ присоединяется электрон от альдегидной группы D -глицеральдегид-3-фосфата. Известно, что кофермент НАД является компонентом козимазы, которую в более ранних работах определяли как термостабильную фракцию

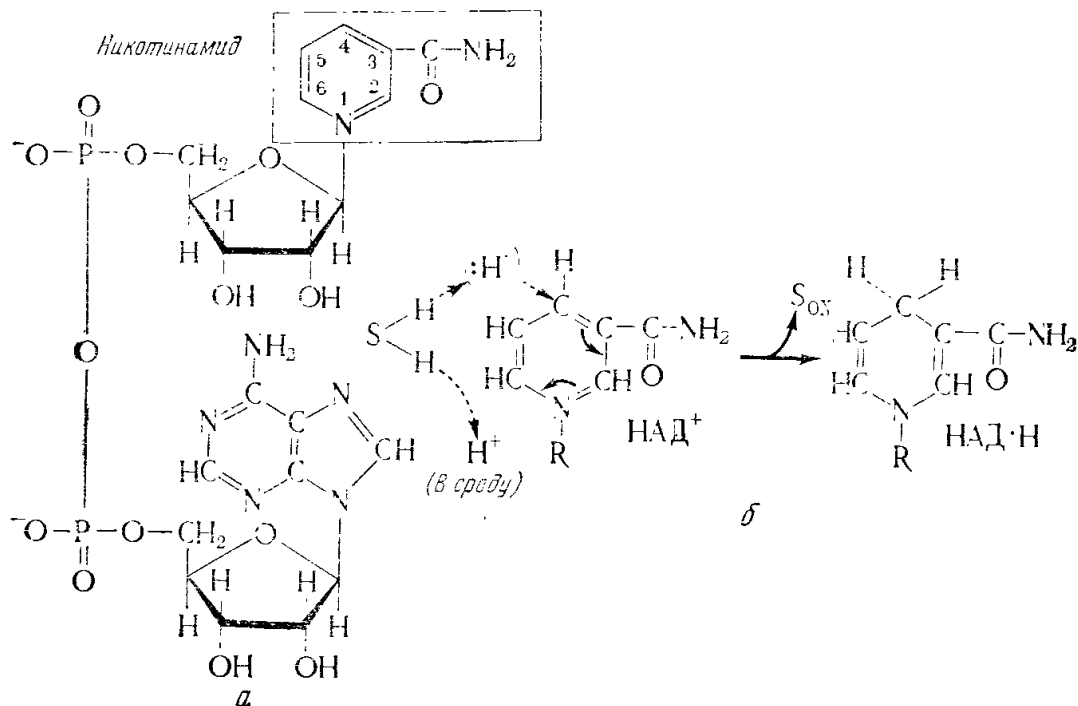
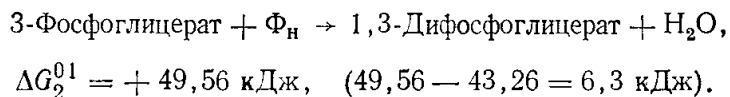
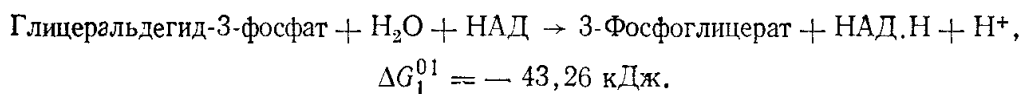


Рис. 3—8
 НАД-никотинамидадениндинуклеотид (а) и восстановление пиридинового кольца
 НАД⁺ субстратом (Н₂) (б).

ферментной системы спиртового брожения. Он служит переносчиком электронов от *D*-глицеральдегид-3-фосфата, играющего роль донора электронов, к пирувату, образуемому на одном из более поздних этапов брожения. Молекула НАД⁺ содержит положительно заряженное замещенное производное пиридина — никотинамид. Когда НАД⁺ переходит в восстановленную форму (НАД·Н), от молекулы субстрата в положении 4 пиридинового кольца никотинамида переносится гидрид — ион (:Н⁻), результатом чего оказывается восстановление по положениям 1 и 4 (рис. 3—8). Вторым водородом субстрата переходит в среду в виде Н⁺-иона.

Реакцию можно представить в виде двух отдельных процессов:



Следовательно, окисление за счет НАД⁺ представляет собой экзергонический процесс, который в обычных условиях идет в сторону завершения, тогда как эндергоническая реакция образования 1,3-дифосфатглицерата в таких условиях идти не может. В суммарной ферментативной реакции эндергонический процесс сопряжен с экзергоническим: энергия, высвобождающаяся при окис-

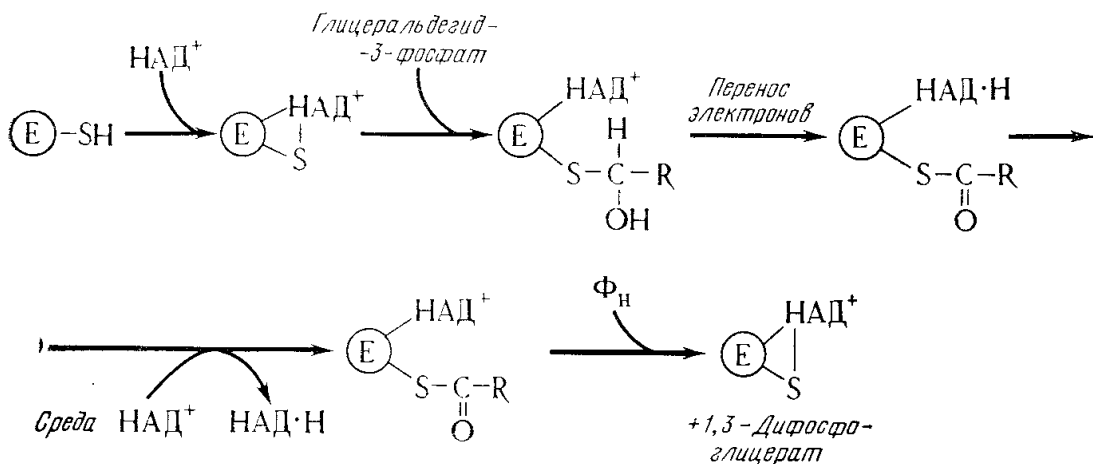


Рис. 3—9.

Механизм действия глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (молекула НАД остается связанной с активным центром на протяжении всего цикла).

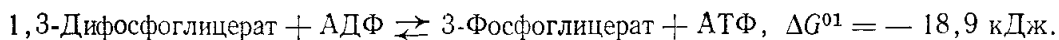
лении альдегида, запасается в высокоэнергетической фосфатной группе 1,3-дифосфоглицерата.

Каждая из четырех идентичных субъединиц глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы содержит один остаток связанного НАД⁺ и, по-видимому, также один активный каталитический центр. В связи с тем что глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа ингибируется тяжелыми металлами (Mg²⁺ и др.), а также алкилирующими агентами (йодацетат и др.), было сделано заключение, что важнейшей функциональной группой в катализе следует считать сульфгидрильную группу (—S—H) активного центра.

Как показано на рис. 3—9, первоначально фермент связывается, по-видимому с окисленной формой кофермента НАД⁺, причем в ходе этой реакции сульфгидрильная группа химически или стерически маскируется. Затем альдегидная группа субстрата взаимодействует с сульфгидрильной группой, образуя тиополуацеталь. После этого фермент катализирует перенос водорода, ковалентно связанного с глицеральдегид-3-фосфатом, на связанный НАД⁺; в результате возникает тиоэфир, в образовании которого участвует сульфгидрильная группа фермента и карбоксильная группа субстрата. Восстановленный НАД не отделяется от фермента, а отдает свой атом водорода и электрон молекуле свободного НАД, находящегося в среде, т. е. переходит в окисленную форму, называемую ацилферментом. Ацильная группа переносится затем от сульфгидрильной группы фермента на неорганический фосфат с образованием продукта окисления — 1,3-дифосфоглицерата, после чего свободная окисленная форма фермента может включаться в следующий каталитический цикл.

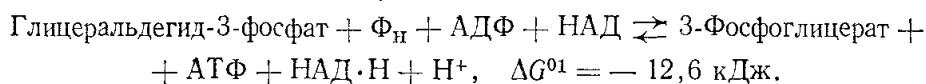
Кофермент НАД⁺ необходим ферменту как окислитель. Однако максимальную активность он проявляет с глицеральдегид-3-фосфатом; другие соединения (*D*- или *L*-глицеральдегид; ацетальдегид) он окисляет весьма медленно.

Перенос фосфатной группы от 1,3-дифосфоглицерата. Образовавшийся ранее 1,3-дифосфоглицерат вступает далее в ферментативную реакцию с АДФ, катализируемую фосфоглицераткиназой. При этом фосфатная группа в положении 1 переносится на АДФ с образованием АТФ и 3-фосфоглицерата:



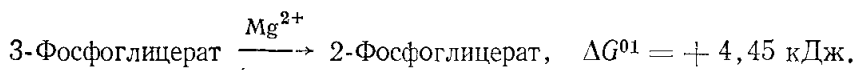
Реакция эта сильно экзергоническая, позволяющая предыдущей реакции идти до полного завершения.

Следует отметить, что фосфоглицераткиназа обладает чрезвычайно высоким сродством к 1,3-дифосфоглицерату. Суммарное уравнение двух реакций, в результате которых альдегидная группа глицеральдегид-3-фосфата окисляется до карбоксильной группы 3-фосфоглицерата с одновременным образованием АТФ из АДФ и фосфата, имеет следующий вид:



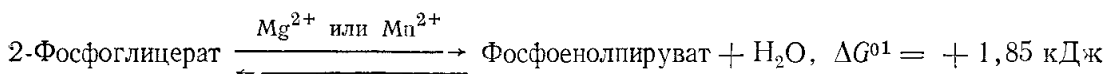
Вследствие действия двух ферментов — глицеральдегид-3-фосфат-дегидразы и фосфоглицераткиназы — энергия, высвобождающаяся при окислении альдегидной группы до карбоксильной, запасается в форме энергии фосфатных связей АТФ.

Превращение 3-фосфоглицерата в 2-фосфоглицерат. Посредством фермента фосфоглицеромутазы фосфатная группа переносится из положения 3 в глицериновой кислоте в положение 2:



Фермент фосфоглицеромутаза существует в двух формах: 1) для одной из них в качестве промежуточного продукта необходим 2,3-дифосфоглицерат, 2) «собственно» фосфоглюкомутаза, механизм действия которой является аналогом для первой.

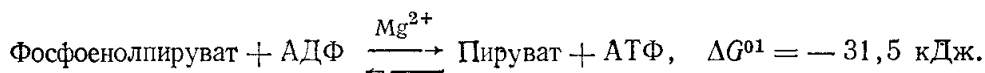
Дегидратация 2-фосфоглицерата с образованием фосфоенолпирувата. В этой второй реакции спиртового брожения образуется высокоэнергетическая связь; она катализируется енолазой:



Рассматриваемая реакция формально представляет собой отщепление молекулы H_2O от 2-го и 3-го углеродных атомов 2-фосфоглицерата, одновременно ее можно также рассматривать как внутримолекулярный окислительно-восстановительный процесс; так, при отщеплении молекулы H_2O степень окисления 2-го углеродного атома увеличивается, а 3-го уменьшается. Гидролитическое отщепление фосфатной группы от исходного вещества (2-фосфоглицерата) и от продукта (фосфоенолпирувата) сопровождается совершенно различным изменением стандартной свободной энергии; для фосфоглицерата оно равно приблизительно $-17,6$ кДж, а для фосфоенолпирувата $-62,16$ кДж. Тем самым дегидратация молекулы 2-фосфоглицерата, в результате которой образуется фосфоенолпируват, сопровождается значительным перераспределением энергии внутри молекулы.

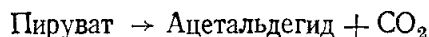
Енолаза была получена в кристаллическом виде из нескольких источников (молекулярная масса 85000). Она легко ингибируется фторидом, особенно в присутствии фосфата (Mg^{2+} -фторофосфатным комплексом).

Перенос фосфатной группы от фосфоенолпирувата. Реакция переноса фосфатной группы от фосфоенолпирувата на АДФ с образованием пирувата и АТФ катализируется пируваткиназой (АТФ: пируватфосфотрансферазой):



Пируваткиназа (молекулярная масса 250 000) была получена в кристаллическом виде. Ион Ca^{2+} конкурирует с ионами Mg^{2+} и Mn^{2+} и образует с ферментом неактивный комплекс. Необходимы также катионы щелочных металлов — K^+ , Rb^+ и Cs^+ . Ион K^+ действует как активатор. Полагают, что связывание с K^+ вызывает конформационное изменение, в результате которого образуется более активная форма фермента. Реакция внутри клетки протекает необратимо, сильно экзергонична.

Декарбоксилирование пирувата и образование ацетальдегида. В результате декарбоксилирования пирувата образуется ацетальдегид:



Катализирует эту реакцию пируватдекарбоксилаза, причем она характеризуется полной необратимостью. Фермент требует наличия ионов Mg^{2+} и кофермента тиаминпирофосфата (ТПФ, или кокарбоксилаза), который представляет собой эфир пирофосфорной кислоты и тиамина, необходимого многим микроорганизмам в качестве фактора роста и в качестве витамина B_1 . Структурные формулы тиамина и тиаминпирофосфата представлены на рис. 3—10.

Тиаминпирофосфат выполняет функцию кофермента для целого ряда ферментов, катализирующих реакции как неокислительного, так и окислительного декарбоксилирования α -кетокислот. Декарбоксилирование пирувата осуществляется через ряд промежуточных стадий, протекающих на поверхности молекулы фермента. Отдельные стадии декарбоксилирования показаны на рис. 3—11. Сначала α -углеродный атом пирувата атакуется нуклеофильным двухуглеродным атомом тиазолового кольца тиаминпирофосфата, связанного с ферментом, в результате чего образуется 2- α -лактильное производное кофермента.

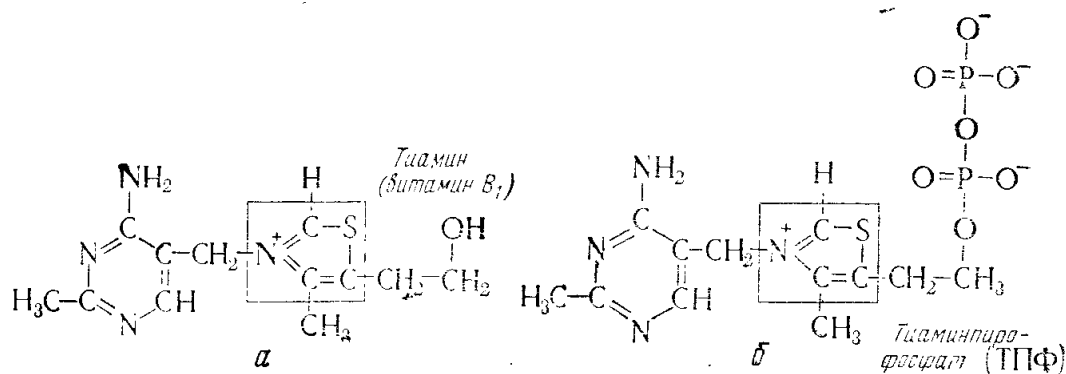


Рис. 3—10. Структура тиамина (а) и тиаминпирофосфата (б) (активной группой является тиазольное кольцо).

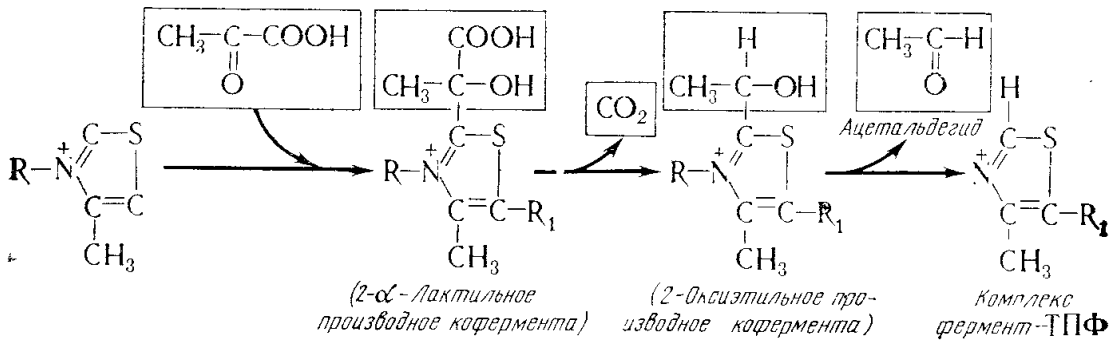


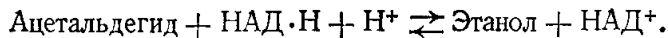
Рис. 3—11.

Отдельные стадии декарбоксилирования пирувата, протекающего при участии тиаминпирофосфата.

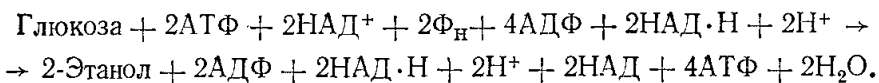
Этот промежуточный продукт подвергается затем декарбоксилированию с отщеплением CO_2 ; кофермент остается при этом в форме 2-оксиэтильного производного — соединения, которое можно рассматривать как активированную или связанную с коферментом форму ацетальдегида. На последней стадии оксиэтильная группа отделяется от кофермента в виде свободного ацетальдегида, что приводит к регенерации свободного комплекса фермент — тиаминпирофосфат (ТПФ). Он служит переносчиком активных альдегидных групп, точно также, как АТФ служит переносчиком активных фосфатных групп.

Заключительная реакция спиртового брожения

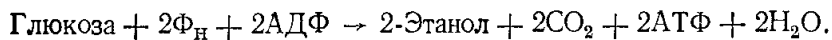
Эта реакция обеспечивает восстановление ацетальдегида до этанола под действием фермента алкогольдегидрогеназы. В качестве восстановителя здесь выступает НАД. $\text{H} + \text{H}^+$:



Суммарное уравнение спиртового брожения можно поэтому написать в следующем развернутом виде:



Вычеркнув в правой и левой частях уравнения одни и те же члены, получим



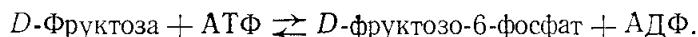
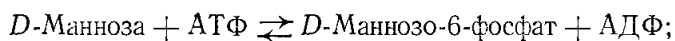
Таким образом, процесс спиртового брожения состоит в превращении одной молекулы D-глюкозы в две молекулы этанола и двух молекул АДФ в две молекулы АТФ; кроме того, от глицеральдегид-3-фосфата к пирувату переносится четыре электрона в форме $2\text{НАД} \cdot \text{H} + 2\text{H}^+$. Реакции, обеспечивающие выделение энергии, сохраняют ее в форме АТФ, при спиртовом брожении и гликолизе идентичны. В этом примере амфиболического пути возможны оба типа регуляции, т. е. ингибирование конечным продуктом и регуляция активности под действием метаболитов — индикаторов энергетического состояния клетки. Например, ключевым ферментом спиртового брожения (гликолиза) является фосфофруктокиназа (ФФК: КФ 2.7.1.11). Этот фермент, с одной стороны, инги-

бируется фосфоенолпируватом, который можно рассматривать как конечный продукт цепи фруктозо-6-фосфат $\xrightarrow{\text{ФФ}}$ фруктозо-1,6-дифосфат $\rightarrow\rightarrow\rightarrow$ фосфоенолпируват, а с другой стороны, активируется АДФ [128, 136, 141].

Итак, спиртовое брожение осуществляется с помощью 12 ферментов, катализирующих этот процесс.

Сбраживание маннозы, фруктозы, галактозы

D-манноза и *D*-фруктоза фосфорилируются в положении 6 под действием относительно неспецифичной гексокиназы:



D-фруктозо-6-фосфат в дальнейшем непосредственно включается в спиртовое брожение как промежуточный продукт этого процесса. Что касается образовавшегося *D*-маннозо-6-фосфата, то она в реакции изомеризации превращается в *D*-фруктозо-6-фосфат; причем в качестве катализатора этого процесса участвует фосфоманнозоизомераза.

D-Галактоза включается в брожение также через фосфорилирование, катализируемое галактокиназой в присутствии АТФ.

Образовавшийся при этом *D*-галактозо-1-фосфат превращается в свой C_4 -эпимер, т. е. в *D*-глюкозо-1-фосфат (рис. 3—12). Это превращение осуществляется в несколько этапов [10, 14].

Из пентоз одним из наиболее широко потребляемых сахаров является, по-видимому, ксилоза.

Дрожжевая алкогольдегидрогеназа (КФ.1.1.1.1.) относится к ферментам двухсубстратных систем, т. е. она катализирует, с одной стороны, восстановление ацетальдегида в этанол, как это отмечалось ранее, а с другой стороны — окисление этанола. Следовательно, фермент действует на первичные или вторичные спирты и полуацетали (кетоны). При этом оказалось, что утилизация этанола не связана с адсорбцией на митохондриальных мембранах высокоактивной цитоплазматической алкогольдегидрогеназы, а обусловлена присутствием внутримитохондриального окислительного фермента. Тем самым была установлена уникальная особенность митохондрий дрожжей, заключающаяся в том, что они содержат НАД-зависимую форму алкогольдегидрогеназы.

Затем было показано, что у дрожжей имеются 3 различные зависимые от НАД алкогольдегидрогеназы (АД), из которых АД₁

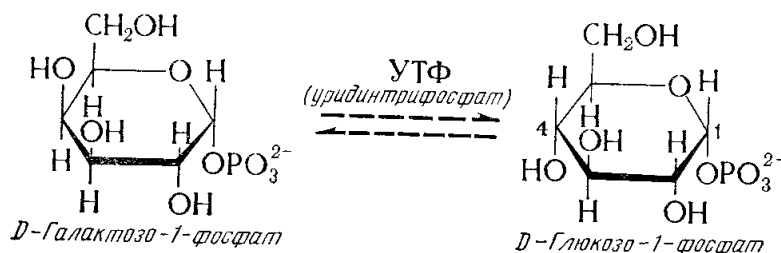


Рис. 3—12.
Эпимеризация *D*-галактозо-1-фосфата.

и АД₂ локализованы в цитозоле¹ (цитоплазме), а третья (АД₃) — в митохондриях. Молекулярные формы митохондриальной и цитоплазматических (их две) алкогольдегидрогеназ различаются между собой свойствами, причем не только направленностью катализируемых ими реакций и топологической локализацией в клетке, но и физико-химическими и ферментативными свойствами. Они характеризуются прежде всего различной термостабильностью, а также субстратной специфичностью [386] и электрофоретической подвижностью на крахмальном и полиакриламидном гелях. Эти различия обусловлены физиологическими функциями и различными типами метаболической и генетической регуляции. Митохондриальный изоэнзим, т. е. АД₃, изолирован из дрожжевых митохондрий, очищен и охарактеризован [384].

При выращивании дрожжей на среде с этанолом в качестве единственного источника углерода активность митохондриального фермента может составлять до 5—6% от общей активности клеточной алкогольдегидрогеназы [384]. Аналогичные соотношения между молекулярными формами фермента обнаружены у дрожжей *Sacch. fragilis* и у клеток *Neurospora crassa*.

Предполагают, что митохондриальный изофермент имеет ту же тетрамерную структуру, установленную для цитоплазматического фермента. Ионы цинка стабилизируют активную тетрамерную форму дрожжевой алкогольдегидрогеназы. Одновременно показано, что скорость окисления этанола целыми дрожжевыми клетками определяется внутриклеточным соотношением АДФ, АТФ и Ф_п. Эта скорость контролируется в конечном итоге концентрацией АДФ и содержанием неорганического фосфата, количество которого должно превосходить АДФ в несколько раз.

Присоединение НАД·Н₂ к белковой части фермента может быть прослежено по измерению спектра поглощения или спектра флуоресценции. В связывании НАД важную роль играют тиоловые группы. Кинетика действия дрожжевой алкогольдегидрогеназы указывает на образование комплексов, т. е. окисления — восстановления.

ДИССИМИЛЯЦИЯ ГЛИКОГЕНА

Гликоген содержится в дрожжевой клетке как резервный полисахарид в значительных количествах: от 8 до 30% от сухой массы [200], причем он запасается в виде цитоплазматических гранул. В отсутствие поступления извне питательных веществ дрожжи используют внутриклеточный гликоген в качестве источника энергии и углерода.

В этих условиях проявляется так называемый эндогенный метаболизм в результате использования резервных полисахаридов. В гликогене, как известно, *D*-глюкозные единицы соединены (1→4) = связями. В то же время он характеризуется высокой степенью ветвления, причем точки ветвления в его молекуле располагаются в среднем через каждые 8—10 остатков *D*-глюкозы [208]. Связи в точках ветвления принадлежат к (1→6)-типу. *D*-глюкозные единицы глико-

¹ Цитозоль — бактериальная внутриклеточная однородная структура, содержащая многие ферменты, метаболиты и неорганические соли [141], в данном случае — цитоплазма,

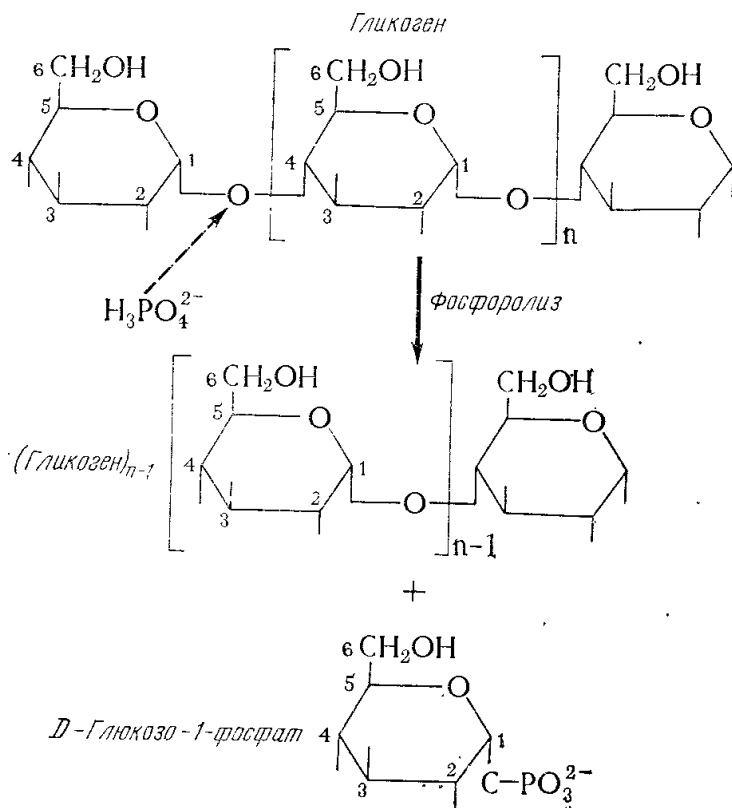
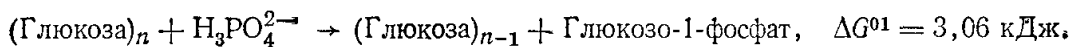


Рис. 3—13.

Фосфоролитическое отщепление остатка глюкозы от нередуцирующего конца цепи гликогена под действием фосфорилазы.

гена вовлекаются в клеточный обмен благодаря последовательному действию фермента гликогенфосфорилазы:



В этой реакции концевая нередуцирующая α -1,4-гликозидная связь боковой цепи гликогена $[(\text{глюкоза})_n]$ подвергается фосфоролитическому отщеплению: от цепи отщепляется концевой остаток глюкозы с образованием глюкозо-1-фосфата, а сама цепь становится короче $[(\text{глюкоза})_{n-1}]$ на одну глюкозную единицу (рис. 3—13).

Фосфорилаза продолжает атаковать нередуцирующий конец цепи до тех пор, пока не дойдет до точки ветвления, т. е. до α -1,6-связи, которую она атаковать не может (остаточный декстрин).

Разрыв 1,6-связи катализирует другой (гидролитический) фермент — α -1,6-глюкозидаза. После разрыва этих связей открывается возможность для действия гликогенфосфорилазы — нового участка полисахаридной цепи.

Фосфорилаза гликогена или крахмала встречается в двух формах: активной (фосфорилаза *a*) и значительно менее активной (фосфорилаза *b*). Фосфорилаза *a* (молекулярная масса 380 000) была получена в кристаллическом виде; ее молекула состоит из четырех идентичных субъединиц. Каждая субъединица содержит остаток фосфорсерина, важный для каталитической активности, и молекулу кофермента пиридоксальфосфата, связанную ковалентной связью с остатком лизина. Фосфорилаза *a* расщепляется на димеры под действием другого фермента — фосфатазы фосфорилазы, который вызывает гидролитический разрыв связи между фосфатной группой и остатком серина (рис. 3—14).

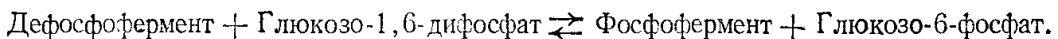
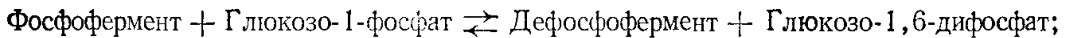
Димерная форма фосфорилазы *b* превращается в активную форму — фосфорилазу *a* — с помощью другого фермента — киназы фосфорилазы — при наличии четырех молекул АТФ. Эти реакции позволяют регулировать соотношение активной фосфорилазы *a* и менее активной фосфорилазы *b* внутри клетки

и тем самым обеспечивать требуемую скорость превращения гликогена в глюкозо-1-фосфат. Активность киназы фосфорилазы в свою очередь регулируется путем существования ее также в двух формах — активной и неактивной.

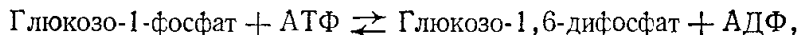
Глюкозо-1-фосфат — конечный продукт фосфорилазной реакции при расщеплении гликогена (или крахмала) превращается в глюкозо-6-фосфат под действием фермента фосфоглюкомутазы.

Фермент катализирует также превращение *D*-маннозо-1-фосфата в *D*-маннозо-6-фосфат, но со скоростью в 100 раз меньшей.

Фосфоглюкомутаза является представителем ферментов серинового класса. Она нуждается как в ионах Mg^{2+} , так и в органическом кофакторе — глюкозо-1,6-фосфате, роль которого видна из следующих уравнений:



Чтобы глюкозо-1-фосфат превратился в глюкозо-6-фосфат, фосфоглюкомутаза должна находиться в фосфорилированной форме, которая образуется при реакции дефосфорилированной формы фермента с глюкозо-1,6-дифосфатом. Этот глюкозо-1,6-дифосфат представляет собой продукт другой реакции:



которая катализируется ферментом фосфоглюкокиназой. Глюкозо-6-фосфат, образовавшийся как продукт фосфоглюкомутазной реакции, может включаться в процесс спиртового брожения.

Если расщепление гликогена внутри живой клетки происходит аналогично гидролизу, но роль воды при этом выполняет фосфорная кислота и сам процесс превращения называется фосфоролизом, то вне дрожжевой клетки механизм распада полисахарида осуществляется по-другому. Вне клетки наиболее глубоко происходит расщепление гликогена с помощью комплекса амилотических ферментов. Например, α - и β -амилазы катализируют гидролиз с образованием соответственно глюкозы и мальтозы. Однако и в этом случае, как и при фосфоролизе, образуется остаточный декстрин.

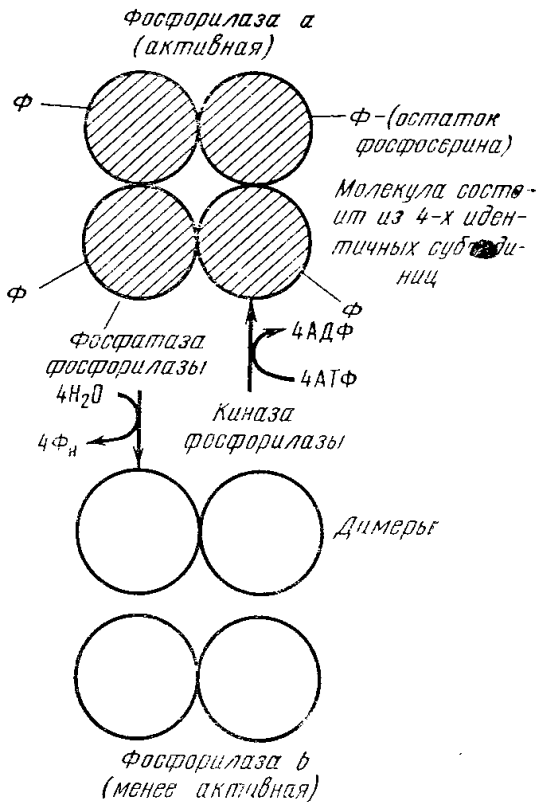


Рис. 3—14. Превращение фосфорилазы *a* в фосфорилазу *b* под действием фосфатазы и реактивация фосфорилазы *b* под действием киназы фосфорилазы.

АЭРОБНЫЙ РАСПАД УГЛЕВОДОВ

Аэробные клетки дрожжей и других микроорганизмов получают наибольшую часть энергии в результате дыхания, при котором электроны переносятся от органических молекул на молекулярный кислород. Дыхание — процесс значительно более сложный, чем спиртовое брожение (гликолиз).

БИОХИМИЧЕСКИЕ ФАЗЫ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ОБМЕНА

В катаболических процессах, обеспечивающих освобождение энергии, различают 3 биохимические фазы [110], резко отличающиеся друг от друга.

Первая фаза — гидролитическое расщепление питательных веществ. В этой фазе происходит в основном гидролитический распад сложных питательных веществ, сопровождающийся выделением относительно небольшого количества энергии. Дополнительное количество энергии дрожжи получают в процессе расщепления запасных веществ самой клетки. Так, например, расщепление глюкозидных связей гликогена высвобождает энергию, равную 18,06 кДж/моль, а расщепление пептидных связей — 12,6 кДж/моль.

Вторая фаза — брожение (гликолиз). Во второй фазе происходит выделение энергии в результате сбраживания различных углеродсодержащих субстратов в анаэробных условиях или диссимиляция по типу пентозного цикла в аэробных условиях. Главным источником энергии у бродящего типа дрожжей является анаэробный распад сахара, при котором количество потребленной глюкозы почти стехиометрически соответствует образовавшемуся количеству этанола и CO_2 . Следовательно, в процессе брожения высвобождается лишь очень незначительная часть той химической энергии (239,4 кДж), которая потенциально может быть извлечена из молекулы глюкозы (2881,2 кДж). Поэтому для получения необходимого количества энергии клеткам, находящимся в анаэробных условиях, приходится расходовать гораздо больше глюкозы, чем тем же самым клеткам в условиях аэробноза.

Обычно в анаэробных условиях функционирует модифицированный цикл трикарбоновых кислот (ЦТК) в виде его окисленной ветви до α -кетоглутарата и восстановленной от оксалацетата до сукцината.

Предварительное размножение дрожжей целесообразно вести в условиях аэробноза. Здесь образование АТФ преобладает над их расщеплением, в результате аэробные клетки содержат в потенци (запасе) больше химической энергии, которую они могут расходовать в условиях анаэробноза.

Третья фаза — дыхание. Как уже отмечалось ранее, ацетильные группы, образовавшиеся из углеводов, жиров и аминокислот на второй стадии катаболизма, вступают в третью стадию, т. е. в цикл трикарбоновых кислот. Этот цикл является основной фа-

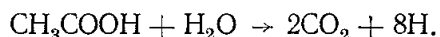
зой, обеспечивающей не только энергетический, но и конструктивный обмен веществ у дрожжей и многих других микроорганизмов. Он представляет собой общий конечный путь окислительного катаболизма всех видов клеточной энергии в аэробных условиях. Около $\frac{2}{3}$ всей энергии освобождается в цикле трикарбоновых кислот. Следствием этого является и различная скорость почкования и размножения дрожжевых клеток. Кислород воздуха оказывает действие в первую очередь на морфологию и физиологию дрожжевой клетки. Сопоставление данных, обобщенных автором, отчетливо показывает особенность аэробной клетки: изменяется размер и строение клетки, ее химический состав, активность некоторых ферментов и т. д.

Несмотря на глубокое различие в химизме брожения и дыхания, переход с одного типа диссимилиации на другой, с аэробного на анаэробный и обратно, протекает очень легко. Механизм «переключения» очень прост и связан прежде всего с АТФ.

ЦИКЛ ТРИКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ

У дрожжей, как и у высших организмов, основным механизмом, обеспечивающим как энергетический, так и конструктивный обмен веществ, является цикл трикарбоновых кислот.

В процессе спиртового брожения, как это было показано ранее, пировиноградная кислота превращается в уксусный альдегид, который является акцептором водорода от НАДН. В аэробных условиях пировиноградная кислота через образование уксусной кислоты полностью окисляется до CO_2 и воды. Суммарная реакция цикла трикарбоновых кислот описывается уравнением



Из этого уравнения видно, что в цикл не вовлекаются ни молекулярный кислород, ни неорганический фосфат, ни АТФ. Главная функция цикла заключается в дегидрировании уксусной кислоты, которое в конечном счете приводит к образованию двух молекул CO_2 и четырех пар атомов водорода.

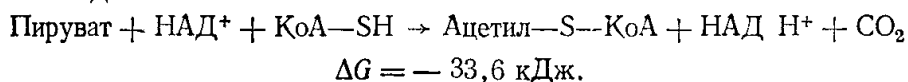
Этот процесс включает ряд последовательных ферментативных реакций, замкнутых в цикл (в отличие от реакции брожения). При каждом обороте цикла молекула уксусной кислоты (2 атома углерода) вступает во взаимодействие с молекулой четырехуглеродного соединения — щавелевоуксусной кислоты, образуя шестиуглеродное соединение — лимонную кислоту. Затем лимонная кислота разрушается с образованием двух молекул CO_2 и четырехуглеродного соединения — янтарной кислоты. Последняя в конечном счете окисляется до щавелевоуксусной кислоты, которая может снова включиться в цикл. При каждом обороте в цикл вовлекается одна молекула уксусной кислоты и образуются 2 молекулы CO_2 . Одна молекула щавелевоуксусной кислоты расходуется на образование лимонной кислоты, но в конце цикла регенерируется. Поэтому практически щавелевоуксусная кислота в цикле не рас-

ходуется: одной ее молекулы достаточно для окисления неограниченного числа молекул уксусной кислоты.

Таким образом, цикл трикарбоновых кислот является каталитическим в двух отношениях: 1) каждый отдельный этап цикла катализируется специфическим ферментом и 2) на этот уровень катализа накладывается каталитический эффект самих промежуточных продуктов цикла, т. е. молекула любого промежуточного продукта цикла катализирует расщепление многих молекул уксусной кислоты.

Окисление пирувата до ацетил-КоА. При росте дрожжей на глюкозе декарбоксилирование и дегидрирование пирувата, катализируемое пируватдегидрогеназным комплексом (ПВДГ), является завершающей реакцией гликолиза, приводящей к образованию ацетил-КоА, метаболизируемого далее в ЦТК.

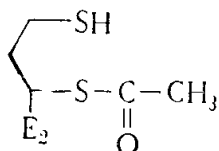
Аэробное декарбоксилирование пировиноградной кислоты — сложный процесс. Суммарное уравнение этого процесса имеет следующий вид:



Этот процесс осуществляется координированным действием нескольких ферментных систем и кофакторов. В пируватдегидрогеназный комплекс входят пируватдегидрогеназа, дигидролипоилтрансацилаза и дигидролипоилдегидрогеназа (флавопротеид). Эти ферменты, входящие в систему, образуют единый комплекс, который может быть разделен на отдельные составляющие его ферменты. Индивидуальные ферменты после диссоциации сохраняют активность, и при нейтральных значениях рН могут спонтанно реассоциировать с восстановлением структуры и свойств исходного комплекса.

Пируватдегидрогеназа имеет структуру $\alpha_2\beta_2$, и каждая молекула этого фермента несет два активных центра. Флавопротеид (дигидролипоилдегидрогеназа) состоит из двух идентичных полипептидных цепей и содержит также 2 активных центра. Установлено, что пируватдегидрогеназа и флавопротеид не взаимодействуют друг с другом, но каждый из этих компонентов соединяется с трансацилазой, которая имеет, по-видимому, специфические центры связывания пируватдегидрогеназы и флавопротеида. Пространственно центральное расположение трансацилазы связано с ее функцией переносчика ацетильной группы от пируватдегидрогеназы на флавопротеид.

Таким образом, для превращения пирувата до ацетил-КоА и CO_2 требуется участие трех ферментов и пяти коферментов (НАД, Mg, ТПФ, КоА, α -липоевая кислота), объединенных в мультиферментный комплекс — пируватдегидрогеназную систему. На первой стадии образуется оксиэтильное производное между пируватдегидрогеназой (E_1), ТПФ (кофермент тиаминпирофосфат) и пируватом — $E_1 - \text{ТПФ} - \text{СНОН} - \text{СН}_3 + \text{CO}_2$ (оксиэтильная группа комплекса). На второй стадии оксиэтильная группа комплекса переносится на один из атомов серы циклической дисульфидной группы липоевой кислоты (рис. 3—15), которая ковалентно связана с дигидролипоилтрансацилазой (E_2). При этом оксиэтильная группа превращается в ацетильную —



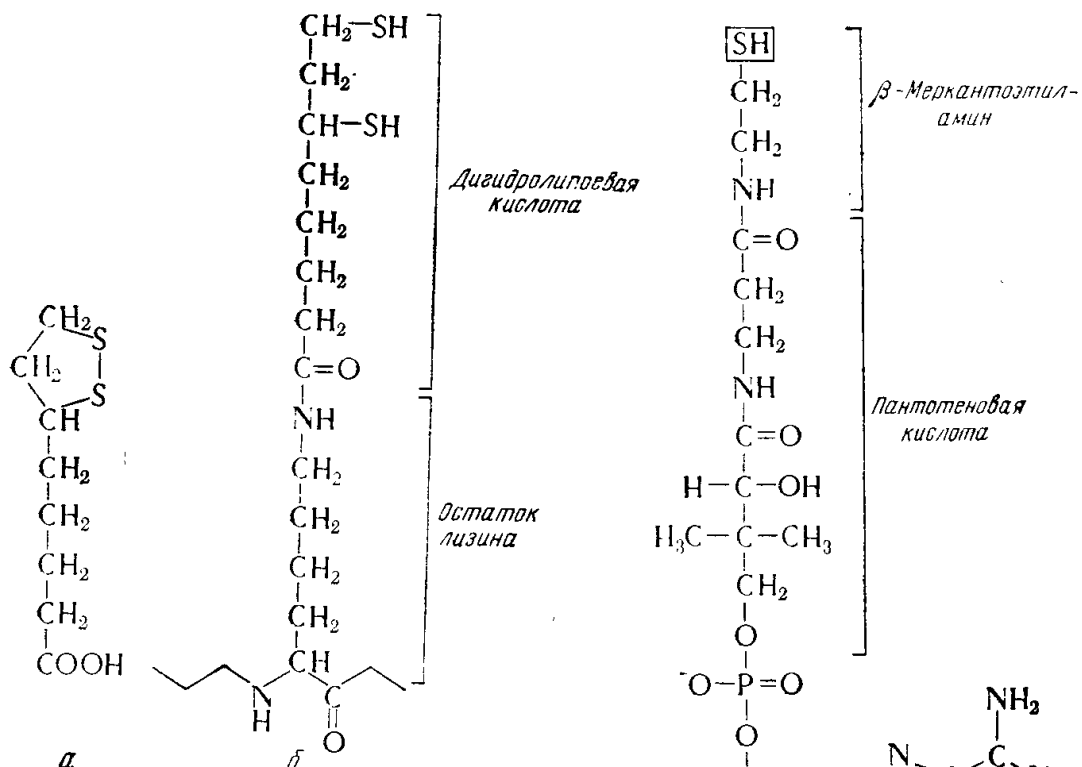


Рис. 3—15.

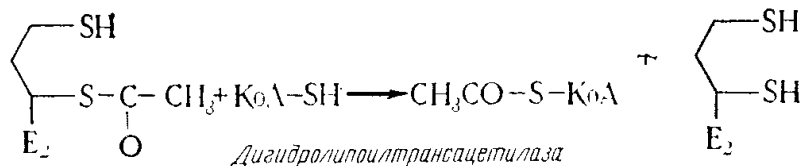
Формы липоевой кислоты:

a — свободная липоевая кислота (S-S-форма); *b* — дигидролипоиллизиновый остаток дигидролипоилтрансацилазы.

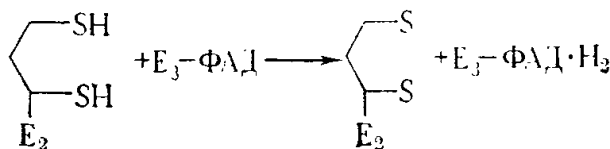
Рис. 3—16.

Структура кофермента А (свободная тиоловая группа показана в рамке).

На третьей стадии ацетильная группа переносится от липоиловой группы дигидролипоилтрансацилазы к тиоловой группе КоА (рис. 3—16); образовавшийся в результате этого ацетил-КоА отделяется от ферментного комплекса, как это схематично показано ниже:



На четвертой стадии происходит реокисление дитиоловой формы дигидролипоилтрансацилазы до ее дисульфидной формы с помощью третьего фермента — дигидролипоилдегидрогеназы — E_3 — ФАД; ФАД, прочно связанный с ферментом, действует как акцептор водорода:



В завершающей реакции (пятой стадии) ФАД. H_2 реокисляется за счет НАД^+ , в результате чего регенерируется окисленная форма E_3 — ФАД и образуется НАД. H .

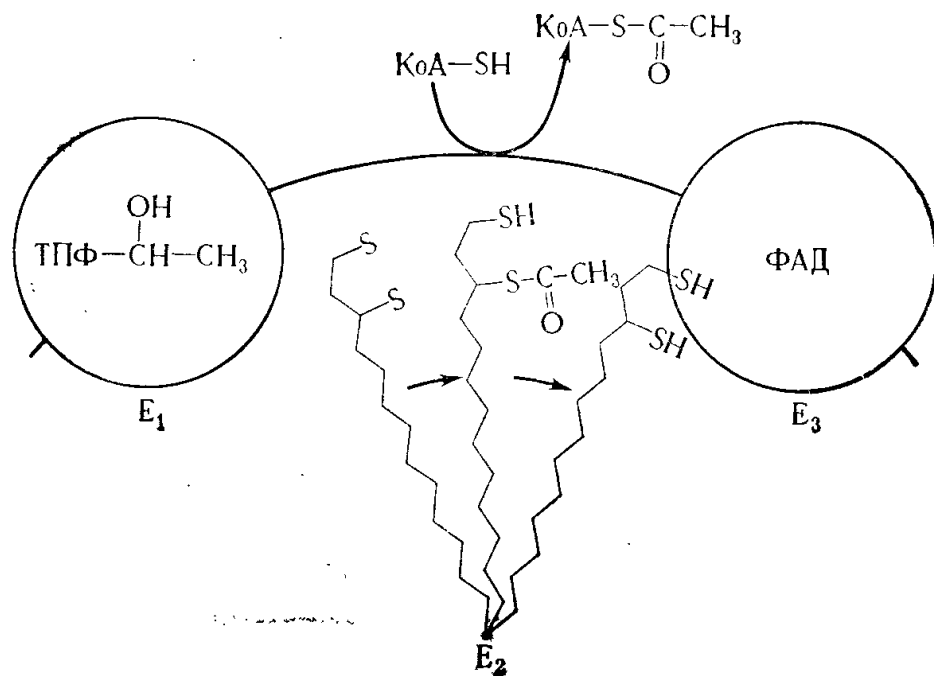


Рис. 3—17.

Липоиллизиновая боковая цепь дигидролипоятрансацетилазы (E_2), действующая как поворотный кронштейн при переносе электронов от пируватдегидрогеназы (E_1) к дигидролипоятдегидрогеназе (E_3).

Предполагаемый механизм действия пируватдегидрогеназного комплекса представлен на рис. 3—17. Комплекс состоит из 24 молекул пируватдегидрогеназы (молекулярная масса 90 000, каждой молекуле присоединен остаток ТПФ), одной молекулы дигидролипоятрансацетилазы (состоит из 24 полипептидных цепей, каждая цепь имеет массу 36 000, содержит один остаток липоевой кислоты) и 12 молекул дигидролипоятдегидрогеназы (масса 55 000, к каждой молекуле присоединен один остаток ФАД). Полагают, что длинная липоиллизиновая боковая цепь E_2 функционирует как поворотный кронштейн при переносе пары электронов от E_1 к E_3 .

Пируватдегидрогеназный комплекс ингибируется (помимо соединений мышьяка и арсенита) также АТФ (10^{-5} М) в присутствии 10^{-3} М MgCl_2 . Таким образом, АТФ служит негативным модулятором. Как только содержание АТФ в клетке начинает превышать определенный уровень, пируватдегидрогеназная система, поставляющая энергию для ЦТК, сразу же выключается. Показано, что действие АТФ состоит в фосфорилировании пируваткарбоксилазы специальной протеинкиназой.

Окисление пирувата в дрожжевой клетке, как и в плесневых грибах и животных тканях, локализовано исключительно в митохондриях и протекает с участием указанных коферментов.

Процесс окисления пирувата до ацетил-КоА не является ча-

стью ЦТК, но он представляет собой необходимую стадию, благодаря которой углеводы, т. е. ацетил-КоА, поступает в ЦТК. Ниже рассматриваются отдельные наиболее важные реакции, составляющие ЦТК.

ОТДЕЛЬНЫЕ РЕАКЦИИ ЦИКЛА ТРИКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ

За последнее время знания о механизме действия ферментов цикла трикарбонных кислот существенно пополнились. Это связано прежде всего с использованием в исследованиях высокоочищенных препаратов ферментов, катализирующих отдельные реакции цикла.

Образование лимонной кислоты. Первой стадией собственно цикла Кребса является альдольная конденсация ацетил-КоА с оксалоацетатом, приводящая к образованию цитрата и свободного КоА [215]. Реакция катализируется ферментом цитратсинтазой (старое название — конденсирующий фермент), который был получен в кристаллическом виде (КФ.4.1.3.7). В качестве промежуточного продукта образуется цитрил-КоА. При этом метильная группа ацетил-КоА присоединяется к углероду карбонильной группы оксалоацетата (рис. 3—18) с последующим гидролизом тиоэфирной связи и образованием свободного КоА—SH. Равновесие реакции сильно смещено в сторону образования цитрата (рис. 3—19), поскольку гидролиз высокоэнергетической тиоэфирной связи сопровождается значительным уменьшением стандартной свободной энергии ($\Delta G = -39,34$ кДж).

Цитратсинтаза относится к регуляторным ферментам: она ингибируется АТФ (конечным продуктом, в форме которого запа-

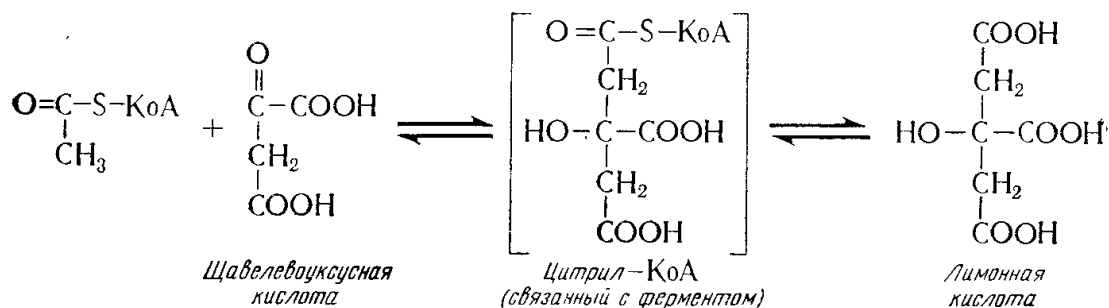


Рис. 3—18.
Цитратсинтазная реакция.

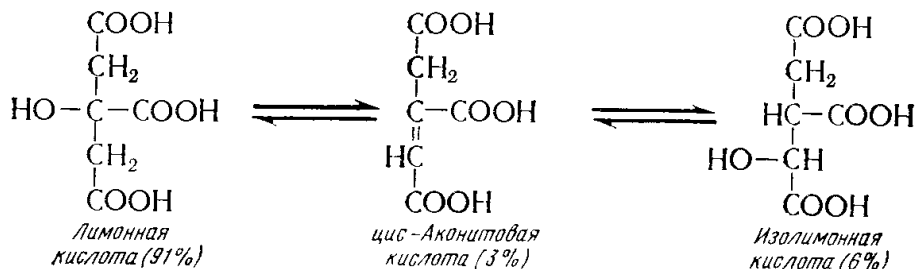


Рис. 3—19.
Аконитазное равновесие.

сается энергия, высвобождающаяся в процессе дыхания) и НАД.Н (конечным продуктом реакций цикла, связанных с дегидрированием).

Аконитазное равновесие. Ранее образовавшийся цитрат подвергается дальнейшим превращениям. При этом фермент аконитаза обеспечивает равновесие в системе, состоящей из лимонной, *цис*-аконитовой и изолимонной кислот. Это равновесие обеспечивается при рН 7,4 и температуре 25°С. В этой системе в одной из реакций происходит обратимое присоединение воды к α - и β -двойной связи *цис*-аконитата. Причем присоединение воды по двойной связи *цис*-аконитата происходит одновременно двумя способами: с образованием либо лимонной, либо изолимонной кислоты. Установлено, что Н и ОН присоединяются по двойной связи в трансположении относительно друг друга [13]. Кроме того, следует отметить, что для проявления аконитазной реакции необходим ион железа, который образует стабильный хелатный комплекс с лимонной кислотой (аконитазо- Fe^{2+} -субстратный комплекс).

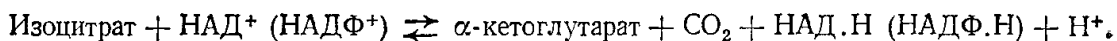
Весь Fe^{2+} -цитратный (-изоцитратный) комплекс присоединяется к активному центру фермента. В результате вращения Fe^{2+} -комплекса осуществляется перенос ОН-группы и водорода, и при этом может образоваться, в частности, изоцитрат [13].

Аконитаза, как и цитратсинтаза, локализована в митохондриях и цитозоле, причем митохондриальная и цитоплазматическая формы дрожжевой аконитазы неотличимы по своим свойствам.

Изоцитратдегидрогеназа окисляет изоцитрат до α -кетоглутарата и тем самым обеспечивает переход от C_6 к C_5 — углеродным соединениям. При этом происходит дегидрирование при 2-м углеродном атоме изоцитрата в кетогруппу с одновременным декарбоксилированием «средней» карбоксильной, или, точнее, β -карбоксильной, группы ($\text{HC}-\text{COOH} \rightarrow -\text{CH}_2 + \text{CO}_2$). Эта реакция катализируется аллостерическим ферментом и именно этот этап обычно лимитирует скорость всего процесса в целом, т. е. ЦТК.

Добавлением к среде субстрата и эффекторов (модуляторов) обуславливается наличие на белке аллостерических точек, связывание которых приводит, вероятно, к конформационным изменениям фермента и в конечном счете к увеличению сродства активной точки к субстрату.

Дрожжи содержат два типа изоцитратдегидрогеназ. Один из них использует в качестве акцептора электронов НАД⁺, а другой — НАДФ. Суммарные реакции, катализируемые изоцитратдегидрогеназами двух разных типов, идентичны:



Установлено, что первый тип изоцитратдегидрогеназы содержится только в митохондриях, тогда как второй тип, НАДФ-зависимый, встречается и в митохондриях, и вне митохондрий, в цитоплазме. Роль катализатора окисления изоцитрата в цикле трикарбоновых кислот играет НАД-зависимая изоцитратдегидрогеназа; фермент же, связанный с НАДФ, используется преимущественно во вспомогательных биосинтетических реакциях цикла. Для НАД-зависимой изоцитратдегидрогеназы в качестве специфического активатора необходим АДФ. При отсутствии АДФ активность его весьма незначительна. В связи с малой активностью фермента в отсутствие АДФ иногда неправильно считают, что

он играет второстепенную роль. При стимулирующем действии АДФ не претерпевает ферментативных превращений и по окончании реакции может использоваться снова. Стимулирующий эффект АДФ максимален при низкой концентрации изоцитрата. Это привело к выводу, что связывание АДФ с регуляторным центром фермента вызывает уменьшение величины K_m для изоцитрата, т. е. увеличение сродства фермента к своему субстрату.

На активность изоцитратдегидрогеназы влияют также АТФ и НАД.Н, которые сильно ингибируют фермент, главным образом в результате конкуренции с НАД⁺.

Таким образом, при повышении концентрации АДФ в клетке вследствие, например, чрезмерно быстрого разрушения АТФ в реакциях автоматически увеличивается скорость окисления изоцитрата, а вместе с тем и скорость всего цикла Кребса, так как эта реакция лимитирует скорость процесса в целом.

С увеличением концентрации АТФ в клетке концентрация АДФ должна уменьшаться, что ведет к «выключению» изоцитратдегидрогеназы. Накопление НАД.Н в митохондриях также может приостанавливать окисление изоцитрата.

НАД-зависимая изоцитратдегидрогеназа может существовать, вероятно, в двух формах — мономерной (молекулярная масса 330 000) и димерной. В присутствии положительного модулятора¹ (АДФ) мономерная форма претерпевает агрегацию с образованием димера; отрицательный модулятор (НАД.Н), наоборот, препятствует этой индуцируемой АДФ агрегации. Димер значительно более активен при низких концентрациях АДФ. У некоторых организмов пунктом первичного контроля ЦТК является, по-видимому, цитратсинтазная реакция, тогда как изоцитратдегидрогеназная реакция служит важной вторичной регуляторной стадией.

Окисление α -кетоглутарата до сукцината. Процесс протекает в две стадии, обеспечивающие переход от C_5 - к C_4 -углеродному соединению. На первой стадии α -кетоглутарат подвергается окислительному декарбоксилированию, в результате чего образуется сукцинил —S—КоА и CO_2 .

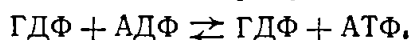
В этой реакции, как и в реакции окисления пирувата до ацетил-КоА и CO_2 , участвует комплекс, включающий α -кетоглутаратдегидрогеназу, дигидролипоилтрансукцинилиазу и дигидролипоилдегидрогеназу [52a], а также коферменты тиаминпирофосфат (ТПФ), липоевую кислоту, КоА, НАД и ФАД. Комплекс по структуре и свойствам напоминает пируватдегидрогеназный комплекс.

Для максимальной скорости окисления α -кетоглутарата ($KT = 1.5 \cdot 10^{-4}$ М) необходимо было присутствие НАД⁺ и КоА, в меньшей степени Mg^{2+} и тиаминпирофосфата; оптимум реакций — рН 6.2. Конечный продукт этой реакции, сукцинил —S—КоА, представляет собой высокоэнергетический тиоэфир, у которого в образовании сложноэфирной связи участвует одна из карбоксильных групп янтарной кислоты.

¹ Модулятор — метаболит.

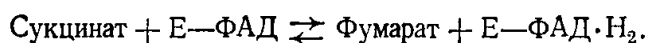
На следующем этапе сукцинил—S—КоА утрачивает свою КоА- группу не путем гидролиза, а в результате реакции с участием гуанозиндифосфата (ГДФ) и Φ_{H} , при которой освобождающаяся энергия запасается в фосфатной связи ГТФ.

Эта реакция катализируется сукцинил т и о к и н а з о й (сукцинил-КоА-синтетазой). Фермент специфичен в отношении ГДФ, который играет роль акцептора фосфата. ГТФ отдает затем свою концевую фосфатную группу (в нуклеозиддифосфокиназной реакции) АДФ, вследствие чего образуется АТФ:



Синтез АТФ, сопряженный с деацелированием сукцинил-КоА, часто называют фосфорилированием на уровне субстрата в отличие от фосфорилирования, осуществляемого при участии дыхательной цепи.

Окисление сукцината (янтарной кислоты). Эта реакция катализируется сукцинат д е г и д р о г е н а з о й — флавопротеидом, в молекуле которого с белком ковалентно связан ФАД (флавинадениндинуклеотид). Кофермент действует как акцептор водорода в следующей реакции:



Восстановленный фермент может отдавать электроны различным непригодным акцепторам (восстанавливающимся красителям).

Фермент имеет молекулярную массу 200 000 и содержит в 1 моль ФАД, 4 атома $\text{Fe}_{\text{HГ}}$ и 4 лабильных сульфида. Атомы железа, входящие в состав фермента, изменяют в ходе реакции свою валентность ($\text{Fe}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+}$). Негеминовое железо и лабильные атомы серы локализуются в определенных субъединицах фермента, которые вследствие этого называются белками, содержащими негеминовое железо. Некоторые из белков, содержащие негеминовое железо, — так называемые ферродоксины — участвуют в световых реакциях фотосинтеза или выполняют функцию катализаторов в гидрогеназной системе бактерий.

Флавиновая группа прочно связана с белком ковалентной связью (через 8- α -группу изоаллоксазинового кольца) и освобождается лишь при обработке протеолитическими ферментами. Связь $\text{Fe}_{\text{HГ}}$ с белком осуществляется, вероятно, через кислотолабильную серу фермента.

Сукцинатдегидрогеназа прочно связана с митохондриальной мембраной. Фермент удалось выделить в высокоочищенном виде.

Сукцинатдегидрогеназа обладает некоторыми свойствами аллостерического фермента; она активируется фосфатом, сукцинатом и фумаратом и конкурентно ингибируется следами оксалоацетата.

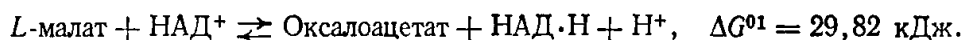
Гидратация фумарата. Процесс гидратации фумарата с образованием малата катализируется ферментом ф у м а р а з о й:



Для дрожжевого фермента характерна лишь более существенная роль SH-групп в катализе. Дрожжевые препараты в качестве функциональных групп содержат имидазольную группу гистидина и SH-группу цистеина, тогда как фумараза из животных тканей содержит в активном центре фенольную группу тирозина. Вероятно, дрожжевая фумараза, как и фермент из животных тканей, представляет собой тетрамерный белок, состоящий из четырех неидентичных субъединиц. Фумаразная активность обнаруживается как в митохондриях, так и в цитосоле (цитоплазме). Растворимый и митохондриальный ферменты неотличимы по своим свойствам.

Молекулярная масса фумаразы равна приблизительно 200 000. АТФ ингибирует действие фермента, так как она уменьшает сродство фумаразы к фумарату и таким путем подавляет реакцию всякий раз, когда концентрация фумарата оказывается ниже насыщающей.

Окисление малата до оксалоацетата. На последней стадии цикла трикарбоновых кислот НАД-зависимая *L*-малатдегидрогеназа катализирует окисление *L*-малата в оксалоацетат:



Хотя реакция носит эндергонический характер, тем не менее в клетке она очень легко идет в прямом направлении, поскольку ее продукты — оксалоацетат и восстановленный НАД — быстро удаляются. НАДФ⁺ восстанавливается ферментом лишь в слабой степени.

Для дрожжевых организмов, как и для большинства клеток эукариотов, характерно присутствие нескольких молекулярных форм фермента, катализирующих общую реакцию, но различающихся внутриклеточной локализацией (также изоферменты получили название гетеротропов) и физико-химическими и кинетическими свойствами. Хлебопекарные дрожжи содержат по крайней мере три структурно и генетически независимых молекулярных варианта малатдегидрогеназы, один из которых представлен в митохондриях, а два других — в цитосоле (цитоплазме). По-видимому, только один из гетеротропов — митохондриальный (конститутивный) — имеет отношение к утилизации малата через цикл трикарбоновых кислот. Один из цитоплазматических ферментов, индуцируемый при росте клеток на ацетате или этаноле, может специфически включаться в функционирование глиоксилатного цикла, действующего как анаплеротический (дополнительный) придаток к циклу Кребса при мобилизации С-соединений.

Роль другой цитоплазматической формы малатдегидрогеназы, активность которой не меняется при изменении источника углерода или напряжения O₂, может быть определена как: 1) регуляторная, контролирующая уровень восстановленных пиридиннуклеотидов; 2) «компенсаторная», обеспечивающая усиленную продукцию метаболитов в условиях усиленного синтеза клеточного материала; 3) «аварийная» в условиях анаэробнозиса, когда наблюда-

Ацетил-КоА

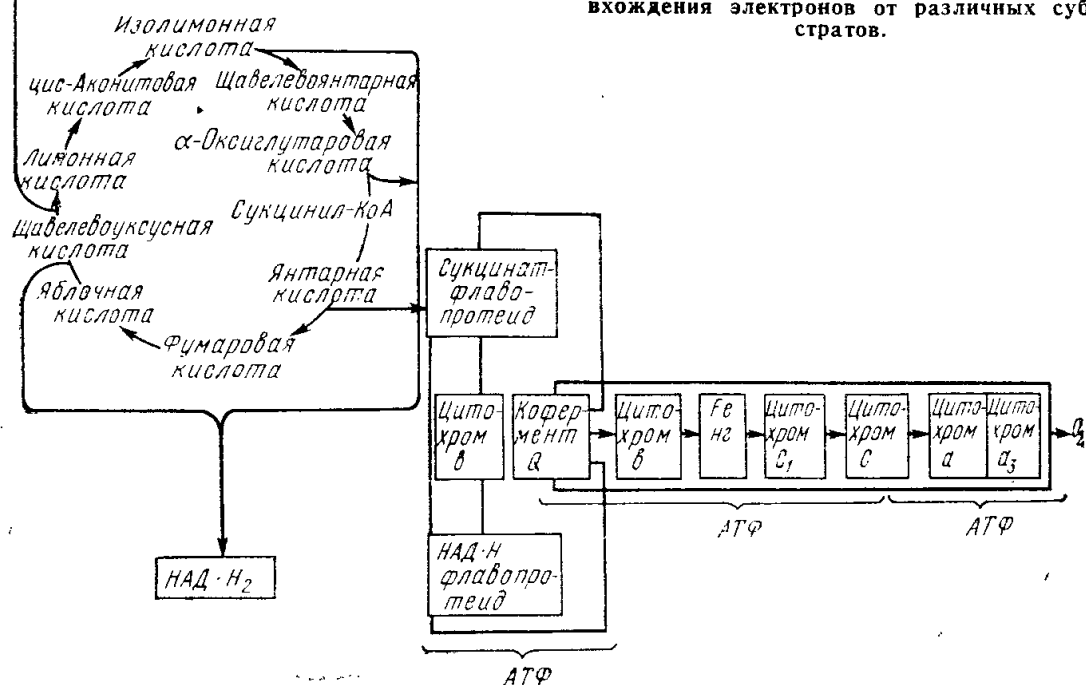


Рис. 3—20. Дыхательная цепь, включающая места вхождения электронов от различных субстратов.

ется функционирование лишь модифицированного цикла Кребса от оксалоацетата к сукцинату.

Клетки высших организмов содержат две формы *L*-малатдегидрогеназы; одна из них локализуется также в митохондриях, а другая в цитоплазме. Митохондриальный фермент в свою очередь существует по крайней мере в пяти различных формах, которые имеют идентичные каталитические характеристики, но различные конформации.

Существование изоферментов обеспечивает избирательную регуляцию различных метаболических функций.

При подведении баланса одного оборота цикла трикарбоновых кислот можно прежде всего констатировать, что все ферменты этого цикла локализованы в дрожжевых митохондриях и, следовательно, он является типичным митохондриальным циклом. Из цикла выводятся два атома углерода в виде CO_2 , т. е. ровно столько же, сколько поступает в цикл в виде ацетильной группы, однако это не те же самые, а другие атомы. В реакциях ферментативного дегидрирования образуются также четыре пары атомов водорода; три пары используются для восстановления НАД^+ , а один — для восстановления ФАД сукцинатдегидрогеназы.

В конечном счете все четыре пары атомов водорода превращаются в ионы H^+ и соответствующее число электронов переносится по дыхательной цепи на кислород (рис. 3—20). Число точек сопряжения в дыхательной цепи дрожжей обычно равно двум или трем [124].

В цикл подключаются четыре дегидрогеназы: изоцитратдегидрогеназа, кетоглутаратдегидрогеназа, сукцинатдегидрогеназа и малатдегидрогеназа, определяющие оптимальное функционирование цикла. Непрерывная работа цикла требует обязательного присутствия акцепторов H^+ для реокисления восстановленных эквивалентов. Поскольку наиболее эффективным акцептором является O_2 , то максимальная скорость цикла наблюдается только в условиях достаточного снабжения O_2 .

В дрожевой клетке относительная значимость ЦТК может изменяться в зависимости от условий культивирования. Так, например, в анаэробных усло-

виях (в атмосфере N_2 или в присутствии ингибитора электронного транспорта антимицина) функционирует лишь модифицированный ЦТК в виде его окисленной (до α -кетоглутарата) и восстановленной (от оксалоацетата до сукцината) ветви. При этом реакции цикла не сопровождаются запасанием большого количества энергии, а их функции целиком определяются доставкой углеродных скелетов для синтеза клеточного метаболита.

Таким образом помимо энергетической и биосинтетической функций ЦТК имеет еще и регуляторное значение. Вхождение в цикл соединений, находящихся на перекрестке важных метаболических путей, делает его существенным регуляторным фактором митохондриального и всего клеточного обмена.

Сам факт существования цикла Кребса в интактной клетке и то, что окисление углеводов, углеводородов, жирных кислот и аминокислот количественно связано с этим циклом, имеют важное значение.

Цикл Кребса представляет собой и амфоболический путь, т. е. функции его связаны не только с катаболизмом, но и с анаболическими процессами, для которых он поставляет предшественников. Одновременно существует ряд важных вспомогательных ферментативных реакций, в результате которых некоторые промежуточные продукты цикла, в частности α -кетоглутарат, сукцинат и оксалоацетат, могут удаляться из цикла и использоваться как предшественники аминокислот.

ПЕНТОЗОФОСФАТНЫЙ ПУТЬ ОКИСЛЕНИЯ ГЛЮКОЗЫ

Наряду со спиртовым брожением (гликолизом) имеется другой важный путь для расщепления гексоз до пирувата — пентозофосфатный, или гексозомонофосфатный (фосфоглюконатный), шунт. Его основное назначение — генерировать в цитоплазме восстановитель в форме НАДФ.Н и поставлять пентозы, главным образом *D*-рибозу (рис. 3—21), необходимую для синтеза нуклеиновых кислот [141].

Пентозофосфатный путь (ПФП) прежде всего связан со спиртовым брожением. Эти — апотомический (ПФП) и дихотомический (гликолиз) — пути окисления глюкозы альтернативны лишь в том отношении, что конкурируют за общий субстрат — глюкозо-6-фосфат.

Под действием фосфопентозоизомеразы *D*-рибулозо-5-фосфат обратимо превращается в свой 3-эпимер-*D*-ксилулозо-5-фосфат (рис. 3—22). При участии фосфопентозоизомеразы *D*-рибулозо-5-фосфат способен также обратимо превращаться в свой альдоизомер, *D*-рибозо-5-фосфат, используемый клеткой для синтеза пентозосодержащих нуклеотидов и РНК. При определенных условиях ПФП на этом завершается, и тогда суммарная реакция описывается уравнением



Результат сводится в итоге к образованию НАДФ.Н. Этот восстановитель нужен для синтеза жирных кислот.

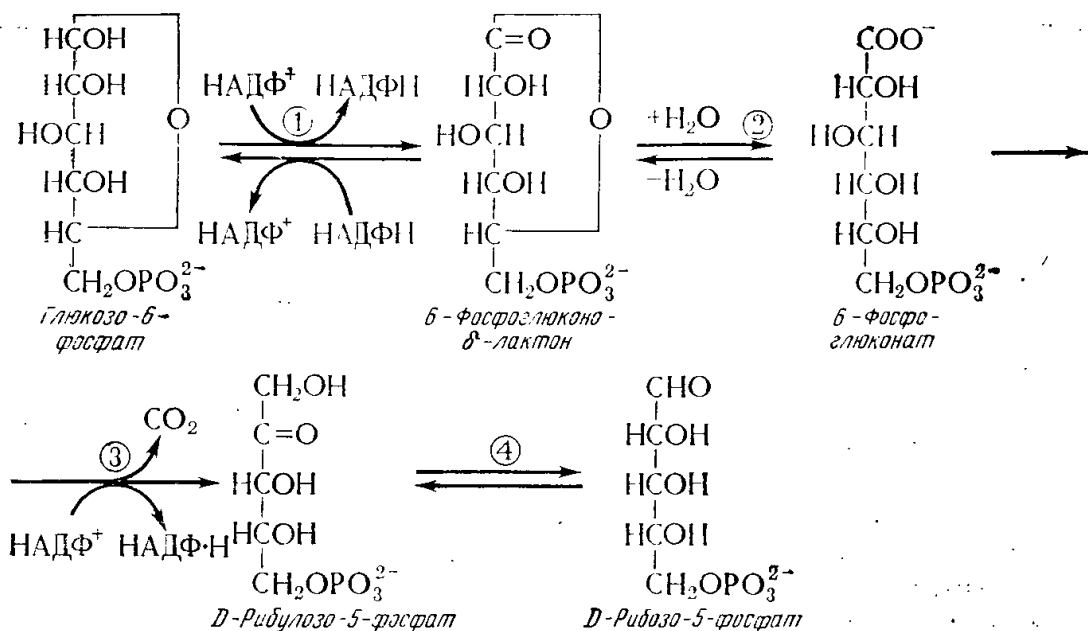


Рис. 3—21.

Пентозофосфатный путь:

1 — глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа; 2 — лактоназа; 3 — 6-фосфоглюконатдегидрогеназа; 4 — фосфоглюцентиозомераза.

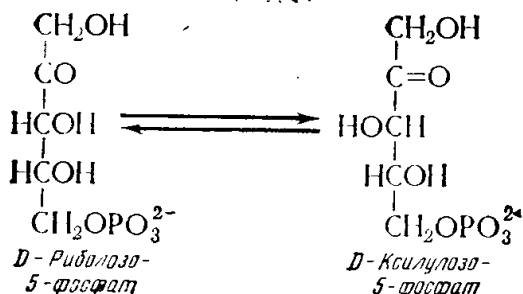


Рис. 3—22.

Реакция, катализируемая пентозоэпимеразой.

В других условиях ПФП включает несколько реакций, катализируемых транскетолазой и трансальдолазой (рис. 3—23) [20].

Таким образом, ПФП и брожение продуцируют и другие общие метаболиты: фруктозо-6-фосфат и глицеральдегид-3-фосфат. Такая взаимосвязь обеспечивает возможность переключения направления потока метаболитов с одного пути на другой [297, 125, 133, 316]. Например, при блокировании начальных этапов гликолиза глицеральдегид-3-фосфат может образовываться в реакциях ПФП. А при недостаточности витамина В₁ продукты промежуточных реакций гликолиза компенсаторно восполняют низкий выход продуктов транскетолазной реакции. Вероятно, изоформа I транскетолазы обеспечивает взаимосвязь ПФП с гликолизом, формируя функциональные комплексы с глицеральдегидфосфатдегидрогеназой (КФ 1.2.1.12), а изоформа II транскетолазы — с трансальдолазой [125]. ПФП проявляет взаимосвязь не только с процессом гликолитического распада углеводов, но и с

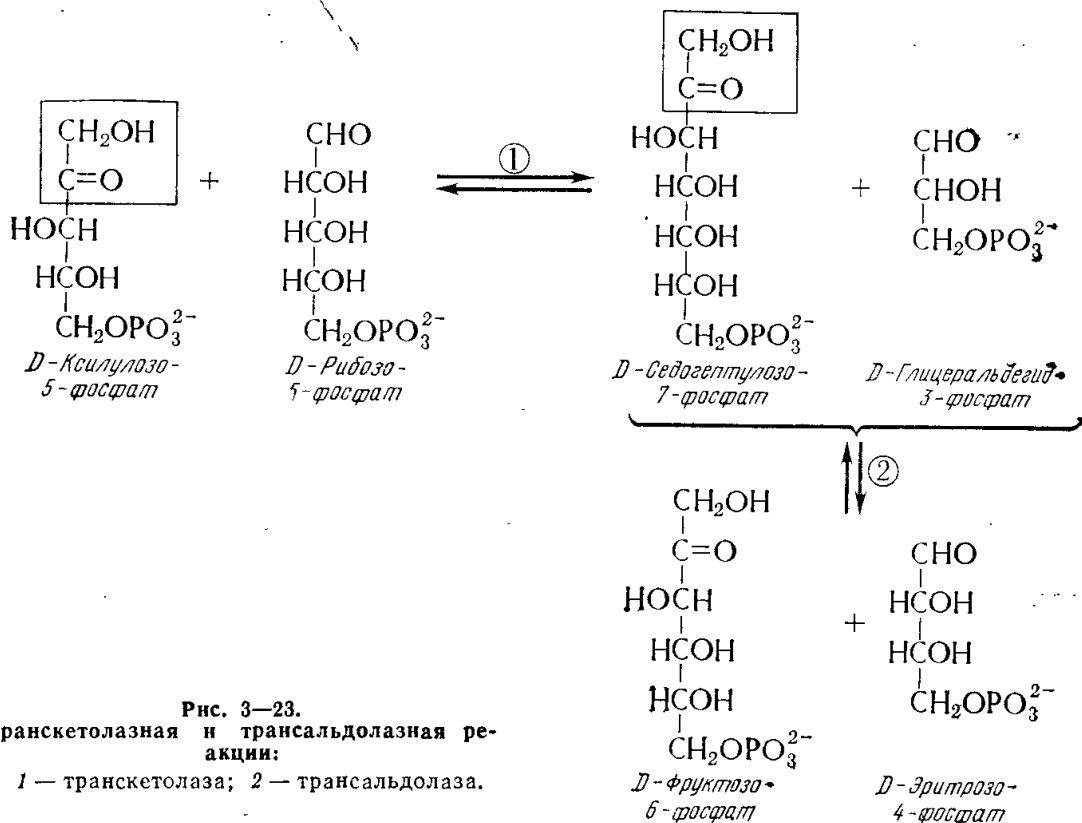


Рис. 3—23.
 Транскетолозная и трансальдозная реакции:
 1 — транскетололаза; 2 — трансальдозлаза.

другими метаболическими путями, в частности с циклом трикарбоновых кислот и нуклеиновым обменом.

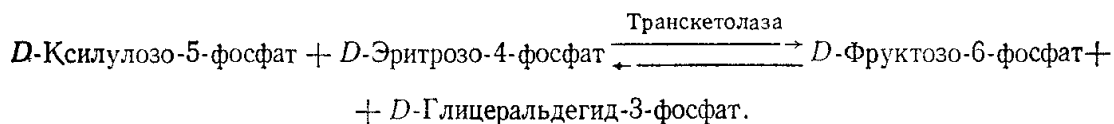
Поскольку общая скорость многоэтапного процесса лимитирована наиболее медленным звеном в цепи реакций, логично считать транскетололазу тем ферментным триггером (тормозом), посредством которого осуществляется регуляция ПФП и обмен глюкозо-6-фосфата направляется либо на нужды синтеза, либо по пути гликолитических превращений. Наличие групповой специфичности у транскетололазы, проявляющейся в отношении субстрата, значительно расширяет число вероятных интермедиатов (промежуточный продукт) этой гликольальдегидферазной реакции. Для транскетололазы известно 7 доноров и 10 акцепторов гликолевого альдегида [125, 110].

В комплексе гликолитических ферментов наряду с ферментами, обладающими очень высокой реакционной способностью [триозофосфатаизомераза, фосфоглицераткиназа), имеются ферменты, каталитическая активность которых в десятки и даже сотни раз меньше (фосфофруктокиназа) [110]. Подобные сопоставления активности ферментов, катализирующих наиболее медленные стадии двух альтернативных путей углеводного метаболизма, свидетельствуют, что реализуемая клетками скорость прямого окисления глюкозо-6-фосфата может достигать величины, близкой к скорости анаэробного распада глюкозы.

Установлено, что окислительное и неокислительное звенья в цепи реакции ПФП работают одновременно и что в результате транскетолозных реакций в

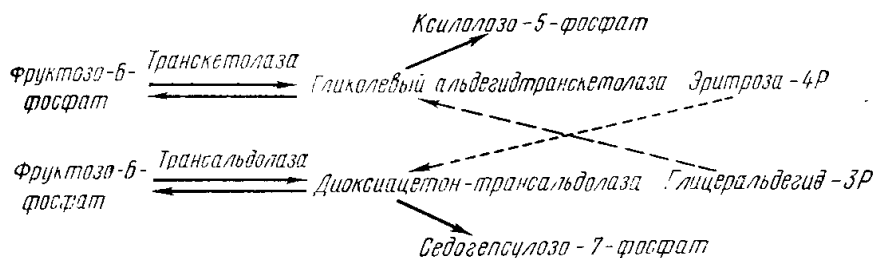
логарифмической фазе роста микроорганизмов синтезируется до 70% пентозофосфатов. В ходе же окислительных реакций ПФП формируется только 30% пентозофосфатов [263]. Показано, что эритрозо-4-фосфат является важнейшим регулятором неокислительных реакций ПФП. Он прежде всего ингибирует реакцию между ксилулозо-5-фосфатом и рибозо-5-фосфатом.

В зависимости от того, существует ли в клетке острая потребность в пентозах, или последние синтезируются в относительном избытке, эритрозо-4-фосфат участвует соответственно либо в трансальдозной реакции, образуя, как показано ранее, седогептулозо-1,7-дифосфат, либо в транскетолазной реакции, образуя фруктозо-6-фосфат и глицеральдегид-3-фосфат:



В последнем случае создается возможность для синтеза фосфонентоз путем превращения фруктозо-6-фосфата в глюкозо-6-фосфат и дальнейшего преобразования глюкозо-6-фосфата в ходе окислительных реакций ПФП. Образовавшийся *D*-седогептулозо-7-фосфат легко фосфорилируется ферментом фосфофруктокиназой до седогептулозо-1,7-дифосфата.

Интересно отметить, что транскетолаза оказывалась комплексом, состоящим из двух ферментов: транскетолазы, представленной изоформой I, и глицеральдегидфосфатдегидрогеназы [136, 125, 126]. В ферментных препаратах дрожжей *Candida utilis* обнаружена трансальдозаза в комплексе с транскетолазой. Комплексообразование транскетолазы и трансальдозазы дополнительно создает возможность образования пентозофосфатов без выделения интермедиатов реакций [125]:



Таким образом, каталитическое действие транскетолазы, связанное, с одной стороны, с утилизацией пентозофосфатов, образованных из глюкозо-6-фосфата при участии НАДФ-дегидрогеназ, а с другой — с формированием пентозофосфатов неокислительным путем, создает высокую функциональную мобильность ПФП [133].

Ключевым ферментом окислительной ветви ПФП является глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, а неокислительной ветви — транскетолазы.

Отмечена прямая корреляция между активностью глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы и уровнем ДНК и РНК, а также скоростью митотических процессов. И вообще отмечается взаимосвязь между содержанием нуклеиновых кислот (НК), белков, уровнем

азотистого обмена и функциональной активностью ферментов ПФП. Возрастание концентрации НК и белков происходит параллельно увеличению активности ферментов ПФП. В частности, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа играет роль фактора, ограничивающего скорость метаболизма глюкозо-6-фосфата по ПФП.

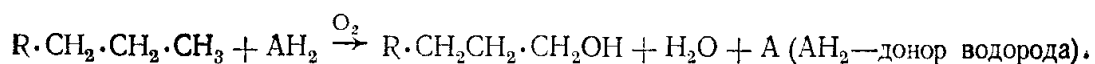
С функциональной активностью транскетолазы связаны скорость и направление ПФП на всех этапах развития организма. Таким образом, в процессе онтогенеза организма существенно меняется соотношение активности ключевых ферментов окислительного (глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы) и неокислительного (транскетолазы) звена ПФП. Следовательно, ферменты ПФП в зависимости от метаболических потребностей оказываются ориентированными в направлении преимущественного образования либо пентозофосфатов, либо восстановительных эквивалентов НАДФ.

Активность ферментов неокислительного звена ПФП тесно связана с активностью РНКаз на всех стадиях онтогенеза микроорганизмов, РНКазы которых (в отличие от эндорибонуклеаз животных и растений) разрывают преимущественно связи пуринов [59].

Трансферазы ПФП являются относительно консервативными системами, тогда как дегидрогеназные системы характеризуются пластичностью. Следовательно, положение о двух независимых и отдельно регулируемых звеньях ПФП (окислительном и неокислительном) является обоснованным.

БИОЛОГИЧЕСКОЕ ОКИСЛЕНИЕ УГЛЕВОДОРОДОВ

В настоящее время углеводороды, ранее считавшиеся инертными, широко используются в качестве единственного источника углерода при культивировании дрожжей и других микроорганизмов (19). Особенности обмена углеводородов заключаются прежде всего в специфике биологического окисления *n*-алканов. В отличие от углеводного обмена, где O_2 служит конечным акцептором электронов в дыхательной цепи, при окислении *n*-алканов O_2 включается в молекулу в самых первых реакциях оксигеназным путем. Оксигеназы относятся к типу оксидаз смешанных функций, т. е. включают один атом молекулы кислорода в субстрат, восстанавливая другой до воды с помощью НАД \cdot H $_2$ или НАДФ \cdot H $_2$, как это схематично показано ниже:



Соокисление в процессе гидроксилирования может обеспечивать одновременно окисление двух субстратов, из которых один является ростовым (например, *n*-алкан), а другой, наоборот, не используется для роста (например, ароматический или циклический углеводород). В основу гипотетической модели механизма соокисления положены индукция и репрессия ферментов. Оказалось, что окисление субстратных аналогов (косубстрат) осуществляется ферментами, индуцированными ростовым субстратом, т. е. *n*-алканом [290, 365].

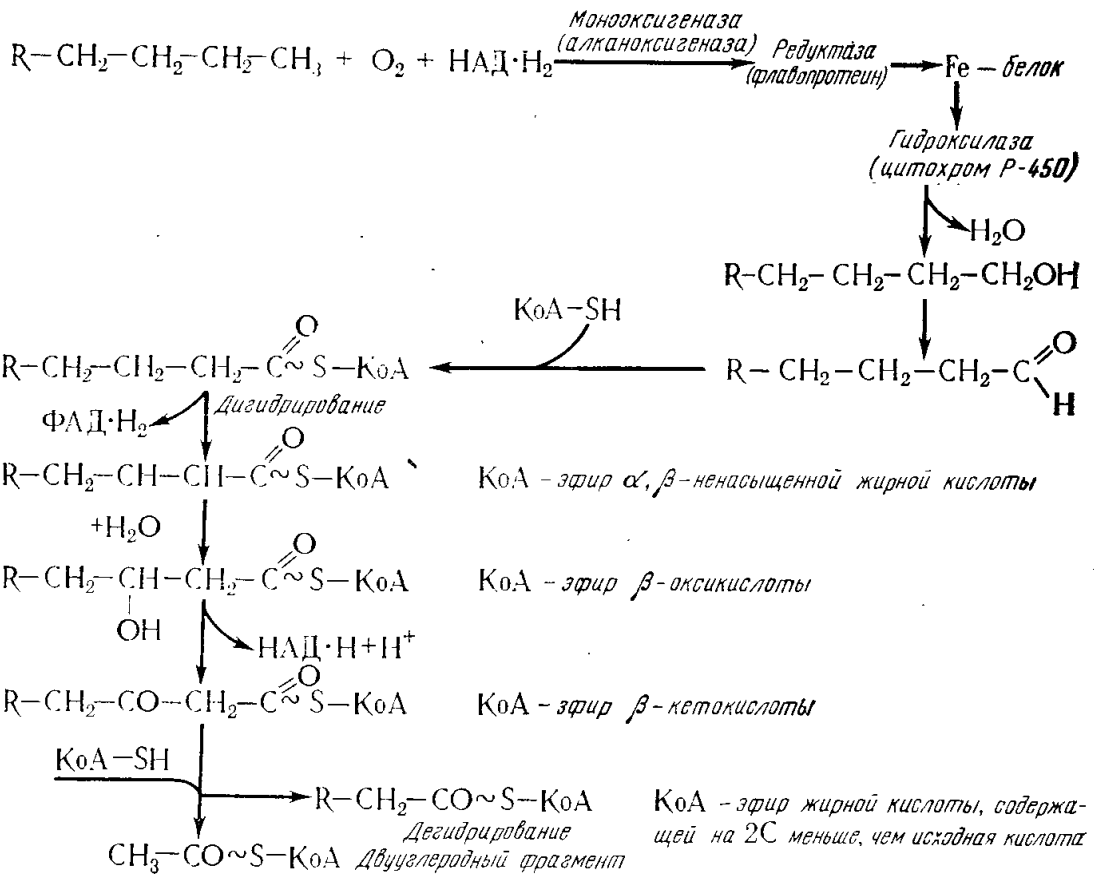


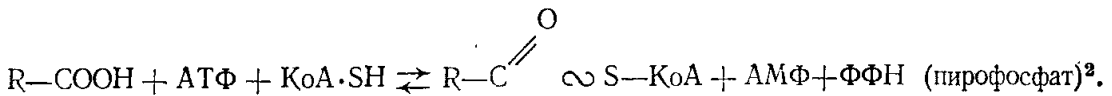
Рис. 3—24.

Расщепление парафинов через терминальное окисление и включение в промежуточный обмен через β -окисление.

В гидроксилирование вовлекаются три фермента: НАД.Н-рубредоксинредуктаза, рубредоксин и ω -гидроксилаза, выделенная в очищенном виде¹.

Первичный спирт, возникающий в ходе монотерминального окисления, превращается в альдегид, альдегид — в кислоту, которая далее подвергается процессам β -окисления [1].

Жирная кислота активируется тиюкиназами с использованием энергии АТФ:



В присутствии карнитина и фермента карнитин-о-ацетилтрансферазы жирная кислота быстрее проникает через внутреннюю мембрану митохондрии в виде КоА-эфиров, окисляющихся в матриксе митохондрии. Молекулы ацетил-КоА вовлекаются затем в цикл трикарбоновых кислот. Процесс окисления *n*-алканов в общем виде представлен на рис. 3—24.

¹ Puettinger R. T., Olson S. T., Boyer R. F., Coon I. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1974, 57, 1011.

² Пирофосфат (ФФН) гидролизует неорганической пирофосфатазой.

Дрожжи окисляют углеводороды с помощью индуцированных ферментов. Это подтверждается, в частности, данными по включению меченого углерода октадекана (рис. 3—25). Протопласты дрожжей способны окислять индивидуальные парафины с интенсивностью, равной интенсивности окисления их целыми клетками (рис. 3—26). Следовательно, ферментативная система, ответственная за окисление *n*-парафинов, не связана с дрожжевой клеточной стенкой. Включение C^{14} -алкана в клеточные стенки дрожжей происходит также в ограниченных количествах и лишь в начальной фазе роста клеток (рис. 3—27). Показана возможность получения первичных спиртов и пальмитиновой кислоты при окислении гексадекана [21].

Биохимические особенности дрожжей. Установлены определенные биохимические особенности при росте ряда дрожжей и бактерий на средах с *n*-алканами, причем отмечается интенсификация некоторых физиологических процессов по сравнению с таковыми у этих же микроорганизмов, но растущих на среде с углеводами. Оказалось, что при окислении дрожжевыми клетками парафина происходит потребление кислорода и выделение тепла в 2 с лишним раза больше, чем в условиях окисления глюкозы. Одновременно отмечается увеличение интенсивности дыха-

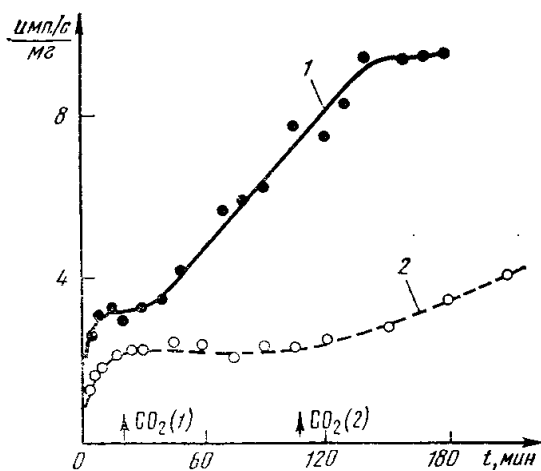


Рис. 3—25. Включение углерода-14 в биомассу дрожжей, инкубируемых на C^{14} -октадекане: 1 — культура, адаптированная к парафину; 2 — культура, не адаптированная к парафину (В. В. Рачинский и др.)

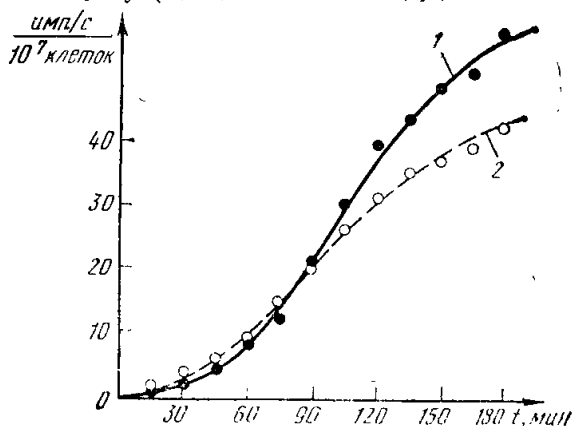


Рис. 3—26. Кинетические кривые выделения $^{14}CO_2$: 1 — дрожжевыми клетками; 2 — протопластами.

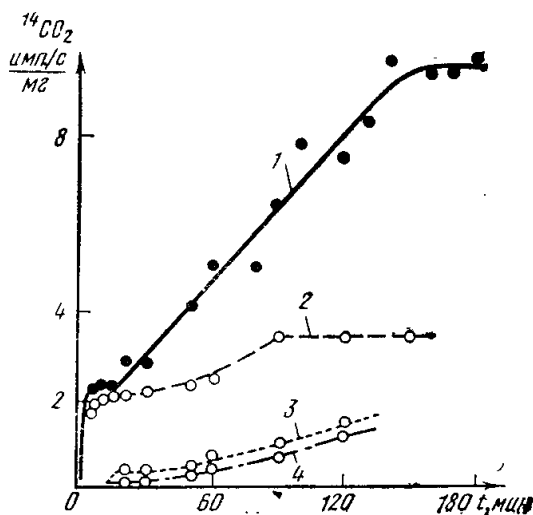


Рис. 3—27. Кинетические кривые включения углерода-14:

1 — в клетки дрожжей; 2 — в клеточные стенки; 3 — в клеточные стенки после экстракции липидов; 4 — в $^{14}CO_2$.

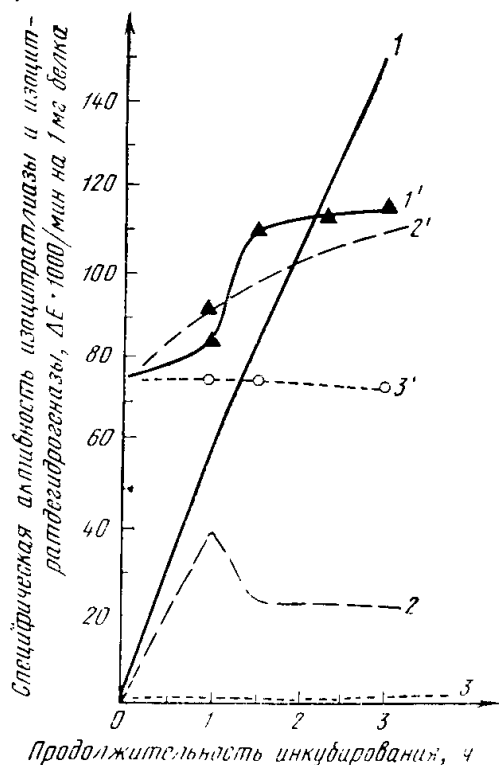


Рис. 3—28.

Активность изоцитратлиазы (1) и изоцитратдегидрогеназы (1') на среде с парафином (1, 1'), на среде без источника углерода (2, 2') и на среде с глюкозой (3, 3') [137].

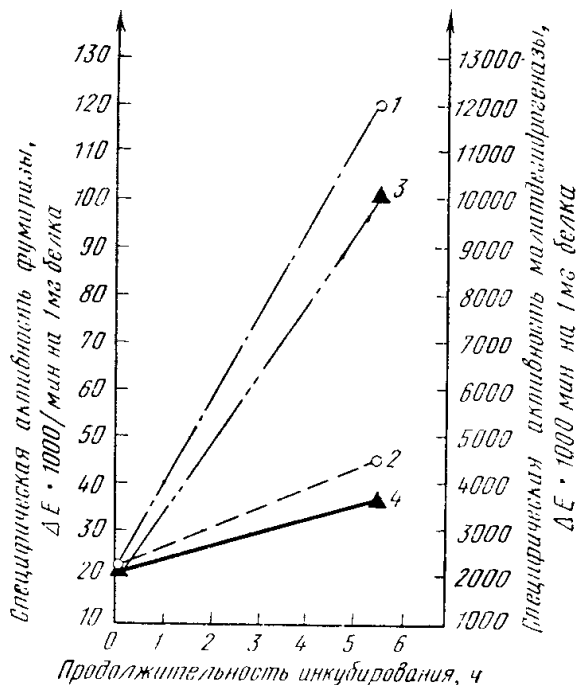


Рис. 3—29.

Изменение активности фумаразы и цитоплазматической НАД-зависимой малатдегидрогеназы при резкой смене источника углерода в среде:

1 — специфическая активность фумаразы на среде с парафином; 2 — то же, на среде с глюкозой; 3 — специфическая активность малатдегидрогеназы на среде с парафином; 4 — то же, на среде с глюкозой [138].

ния у дрожжей, растущих на среде с алканами, а также повышенное содержание у них компонентов цепи переноса электронов, в частности, увеличенное количество в клетках флавинов, цитохромов, а также количество фосфорсодержащих богатых энергией соединений [350] и прежде всего полифосфатов [135].

При росте дрожжи на среде с алканами потребляют из среды и содержат в клетках в 2 раза больше фосфора, чем в условиях развития на среде с сахарами. Общее содержание полифосфатов в дрожжах, выращенных на среде с парафинами, оказалось в 2,0—2,5 раза выше, чем в дрожжах, выращенных на среде с глюкозой [57].

Значительная разница отмечается и в активности фермента полифосфатфосфогидролазы, участвующего, вероятно, не только в гидролизе, но и биосинтезе полифосфатов, причем активность фермента в 3,0—3,5 раза выше по сравнению с дрожжами, выращенными на среде с глюкозой [52]. Показаны качественные и количественные изменения в составе липидов у микроорганизмов, окисляющих *n*-алканы, причем количественное содержание

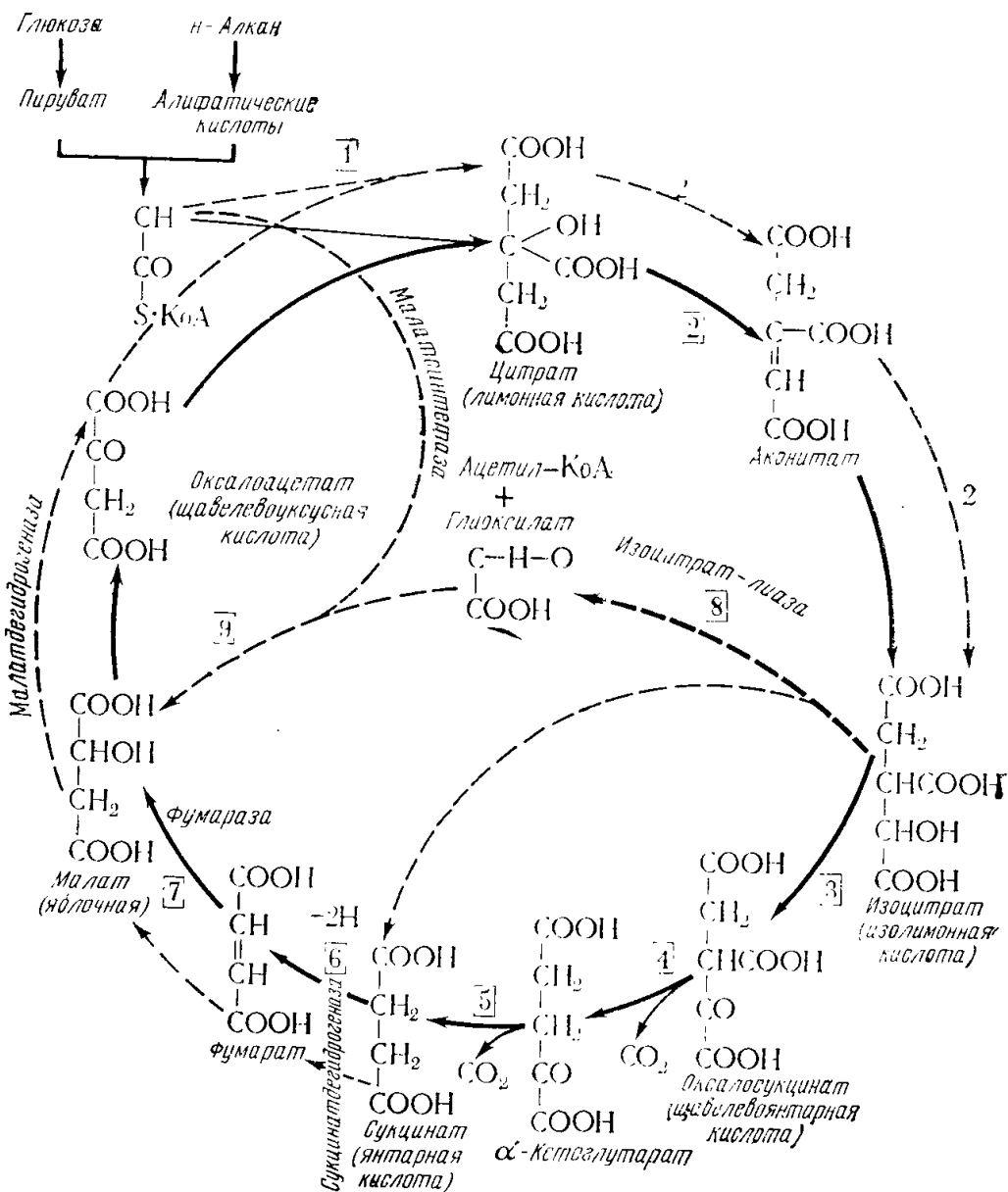


Рис. 3—30.

Цикл трикарбоновых кислот (сплошные стрелки) и глиоксилатный цикл (пунктирные стрелки):

1 — синтезирующий фермент; 2 — аконитаза; 3 — изоцитратдегидрогеназа; 4 — β-кетоглутаратдегидрогеназа; 5 — сукцинатдегидрогеназа; 6 — фумараза; 7 — малатдегидрогеназа; 8 — изоцитратлиаза; 9 — малатсинтетаза.

их часто в 3 раза выше по сравнению с организмом, культивируемым на среде с глюкозой.

Размер и структура клетки. Дрожжевые клетки, выращенные на углеводородах, являются относительно крупными. Размер клеток обуславливает изменение в соотношении внутриклеточных компонентов, и в частности между содержанием клеточных стенок и цитоплазмы. Клеточная стенка дрожжей, ассимилирующих n-алканы, значительно толще (400—600 нм) по сравнению с углеводокисляющими дрожжами (100—200 нм). Цитоплазматическая мембрана парафинокисляющих дрожжей образует множест-

Таблица 3

Изменение активности ферментов по фазам развития *Candida guilliermondii* 2 на средах с разными источниками углерода [137] (активность выражена в $\Delta \epsilon \cdot 1000$ мин на 1 мг белка)

Ферменты	На среде с глюкозой		На среде с парафином	
	экспоненциальная фаза роста	стационарная фаза роста	экспоненциальная фаза роста	стационарная фаза роста
Изоцитратдегидрогеназа	40	50	80	110
Изоцитратлиаза	0	10	70	130
Малатдегидрогеназа	3040	5220	3430	11230
Фумараза	22	30	45	120
Сукцинатдегидрогеназа	9	—	14	—

Примечание. Тире обозначает, что измерение активности не проводили.

во «впячиваний» (инвагинаций) в цитоплазму, которые увеличивают общую поверхность плазмалеммы; имеют более мощно развитый эндоплазматический ретикулум и больше митохондрий.

При росте дрожжей на парафине активируются ферменты глиоксилатного цикла (рис. 3—28), а также ферменты цикла трикарбоновых кислот (рис. 3—29) [39а, 51, 77, 137, 138, 194]. У дрожжей, растущих на *n*-алканах, активность ферментов цитратного цикла — сукцинатдегидрогеназы, изоцитратдегидрогеназы, малатдегидрогеназы — в стационарной фазе возрастает на 30—40%, а активность изоцитратлиазы и фумаразы — на 100—160% соответственно. Повышение активности указанных ферментов свидетельствует о возможности одновременного функционирования цитратного цикла и глиоксилатного шунта (рис. 3—30). Изменения активности ферментов при росте дрожжей на средах с глюкозой и *n*-парафинами обобщены в табл. 3.

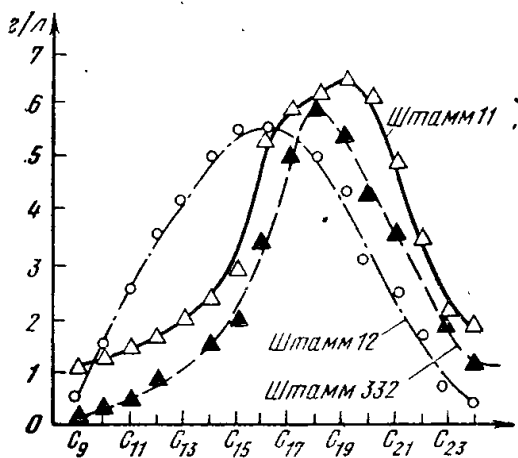


Рис. 3—31. Накопление биомассы (в г/л) дрожжами *Candida guilliermondii* штаммов 332, 11 и 12 при выращивании на индивидуальных *n*-парафинах [156].

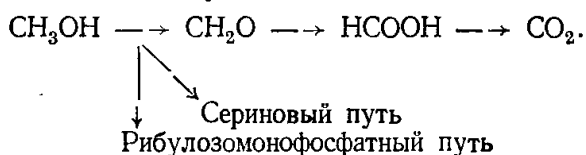
Кроме того, при росте дрожжей на глюкозе уже в процессе спиртового брожения определенная часть углерода субстрата идет на биосинтез еще до образования ацетил-КоА. Образующиеся при этом интермедиаты расходуются на анаплеротический (дополнительный) ресинтез оксалоацетата (пируват, фосфоенолпируват) и одновременно на биосинтез клеточных метаболитов. В отличие от этого при окислении *n*-алканов почти весь углерод субстрата превращается в ацетил-КоА, без участия пируватдегидрогеназной реак-

ции. Анаэробный ресинтез оксалоацетата осуществляется благодаря функционированию глиоксилатного шунта: пируват и фосфоенолпируват в качестве интермедиатов не образуются. Поэтому «глюкозные» клетки дрожжей имеют более высокую активность пируватдегидрогеназного комплекса, чем «гексадекановые» [147, 39а, 201].

Различные расы дрожжей могут с разной скоростью размножаться и накапливать биомассу в зависимости от длины углеродной цепочки *n*-алкана (рис. 3—31).

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ОКИСЛЕНИЕ МЕТАНОЛА

Систему окисления метанола микроорганизмами можно схематически представить в следующем виде:



Следовательно, молекула метанола окисляется последовательно до формальдегида, формиата и CO_2 при участии соответствующих ферментов и восстановлении различных кофакторов: НАД, НАДФ, дихлорфенолиндофенола, феназинметосульфата, цитохрома.

Известны три основных пути диссимиляции одноуглеродных соединений у микроорганизмов. Два из них — сериновый и гексулозофосфатный — наиболее обычны для метилотрофов, ассимилирующих в основном на уровне формальдегида (CH_2O). Третий — автотрофный путь (цикл Кальвина), обнаруженный сначала только у *Pseudomonas oxalaticus*, растущего на среде с формиатом (НСOОН) и усваивающего его после окисления до CO_2 . За последнее время было установлено, что автотрофный путь присущ также *Micrococcus denitrificans* [266] и *Rhodospseudomonas acidophila* [362], использующим метанол.

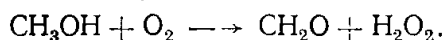
В настоящее время проводятся широкие разработки процесса метилотрофного культивирования не только бактерий [175, 144, 145], но и дрожжей при использовании в качестве источника углерода метанола, а также метана [293, 385, 389]. Метанол рассматривается как перспективное сырье для микробиологической промышленности. Метанолюкисляющие дрожжи впервые описаны сравнительно недавно [74], однако несмотря на это уже известны многие культуры, проявляющие способность ассимилировать метанол [74, 100, 212, 337, 338].

МЕТИЛОТРОФНЫЕ ДРОЖЖИ

У дрожжей в отличие от бактерий окисление метанола катализирует метанолюксидаза. Этот фермент выделен из клеток многих дрожжей и очищен [362, 162, 74, 267]. Молекулярная масса его

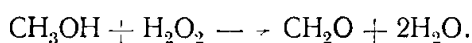
составляет 57 000—600 000. Простетической группой является ФАД.

Метанолоксидаза катализирует окисление метанола с образованием формальдегида и перекиси водорода:



Этот фермент катализирует окисление и других низкомолекулярных спиртов (этанол, *n*-пропанол, *n*-бутанол). Он локализован в микротельцах (пероксисомах). Эти внутриклеточные структуры обнаружены только в клетках, выращенных в присутствии метанола, и отсутствовали при использовании глюкозы или этанола.

У метилотрофных дрожжей в окислении метанола участвует кроме метанолоксидазы также каталаза, причем при окислении двух молекул метанола одна окисляется оксидазой, а другая каталазой:



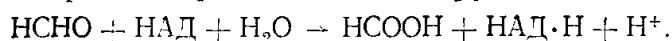
Вероятно, начальный этап окисления метанола происходит в пероксисомах, а последующее окисление формальдегида и формата — в цитоплазме.

За последнее время появились указания об участии НАД-зависимой алкогольдегидрогеназы в окислении метанола у дрожжей. Наряду с конститутивной у многих культур дрожжей обнаружена и индуцибельная НАД-зависимая алкогольдегидрогеназа. Показано, что фермент присутствует в дрожжах как при росте на среде с метанолом, так и на среде с этанолом, однако относительно высокая удельная активность его с метанолом дает основание считать, что фермент играет важную роль в метаболизме метанола. Для проявления активности алкогольдегидрогеназы требует дитиотрейтола.

Интересно отметить, что *Candida methylica* окисляет метанол до формата без образования формальдегида как промежуточного продукта. По-видимому, алкогольдегидрогеназа способна окислять формальдегид по реакции дисмутации: из каждых двух молекул формальдегида образуется одна молекула метанола.

ОКИСЛЕНИЕ ФОРМАЛЬДЕГИДА

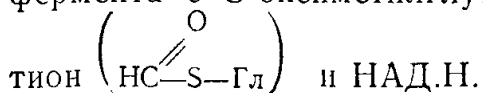
Как уже отмечалось ранее, диссимилиация метанола может происходить на уровне формальдегида. НАД-зависимая формальдегиддегидрогеназа катализирует его окисление в присутствии восстановленного глутатиона, который оказался высокоспецифичным кофактором. Фермент катализирует следующую реакцию:



Роль глутатиона при этом сводится, по-видимому, к неэнзиматическому взаимодействию его с формальдегидом с образованием

S-оксиметилглутатиона $\left(\begin{array}{c} \text{OH} \\ | \\ \text{H}_2\text{C} \diagdown \text{S} \text{— Гл} \end{array} \right)$, который и является

субстратом для формальдегиддегидрогеназы. При взаимодействии фермента с S-оксиметилглутатионом образуются S-формилглутатион



Специфический фермент гидролаза катализирует распад S-формилглутатиона на глутатион (Гл—SH) и формиат (НСООН). При отсутствии гидролазы конечным продуктом является S-формилглутатион. Установлено, что НАД-зависимая формальдегиддегидрогеназа является индуцибельной при росте дрожжей на метаноле. Фермент состоит из 2 идентичных субъединиц.

Другим типом дегидрогеназ является формальдегиддегидрогеназа, которая окисляет формальдегид в присутствии НАД⁺, но без участия глутатиона. Фермент обнаружен как в бактериях, так и в клетках дрожжей. И наконец, известна НАД-независимая формальдегиддегидрогеназа.

Кроме указанных дегидрогеназ в окислении формальдегида могут участвовать феназинметосульфатзависимая метанолдегидрогеназа, альдегидоксидаза, алкогольоксидаза, а также система метанолоксидазы и каталазы. Известно, что формальдегид может окисляться и без участия формиата. Образовавшийся формальдегид согласно гексулозофосфатному циклу [141, 285] включается в конденсацию с рибулозо-5-фосфатом с последующей изомеризацией продукта до глюкозо-6-фосфата и окислением последнего до СО₂ и рибулозо-5-фосфата (рис. 3—32). Катализирует конденсацию формальдегида и рибулозо-5-фосфата гексулозофосфатсинтаза, которая в клетках метилотрофов достигает высокой активности. Таким образом, процесс окисления формальдегида зависит от наличия рибулозо-5-фосфата и природы акцептора электронов (212). Следовательно, посредством гексулозофосфатного цикла формальдегидные единицы используются микроорганизмом на энергетические и биосинтетические потребности.

ОКИСЛЕНИЕ ФОРМИАТА

Окисление формиата (НСООН) до СО₂ катализируется формиатдегидрогеназой. Эта реакция сопровождается образованием молекулы АТФ и тем самым в энергетическом отношении является наиболее выгодной в окислении метанола. У микроорганизмов найдены два типа формиатдегидрогеназ: зависимая от НАД и от цитохрома *b*. Последняя катализирует анаэробное окисление формиата. НАД-зависимый фермент дрожжей проявляет строгую специфичность к формиату (как субстрату) и НАД⁺ (как акцептору Н⁺); он катализирует реакцию



В активный центр фермента входит SH-группа, окисление которой приводит к его инактивации. Стабильность фермента частично достигается исходными субстратами (формиат, НАД, НАД·Н), а в наибольшей мере — наличием сульфгидрильных ре-

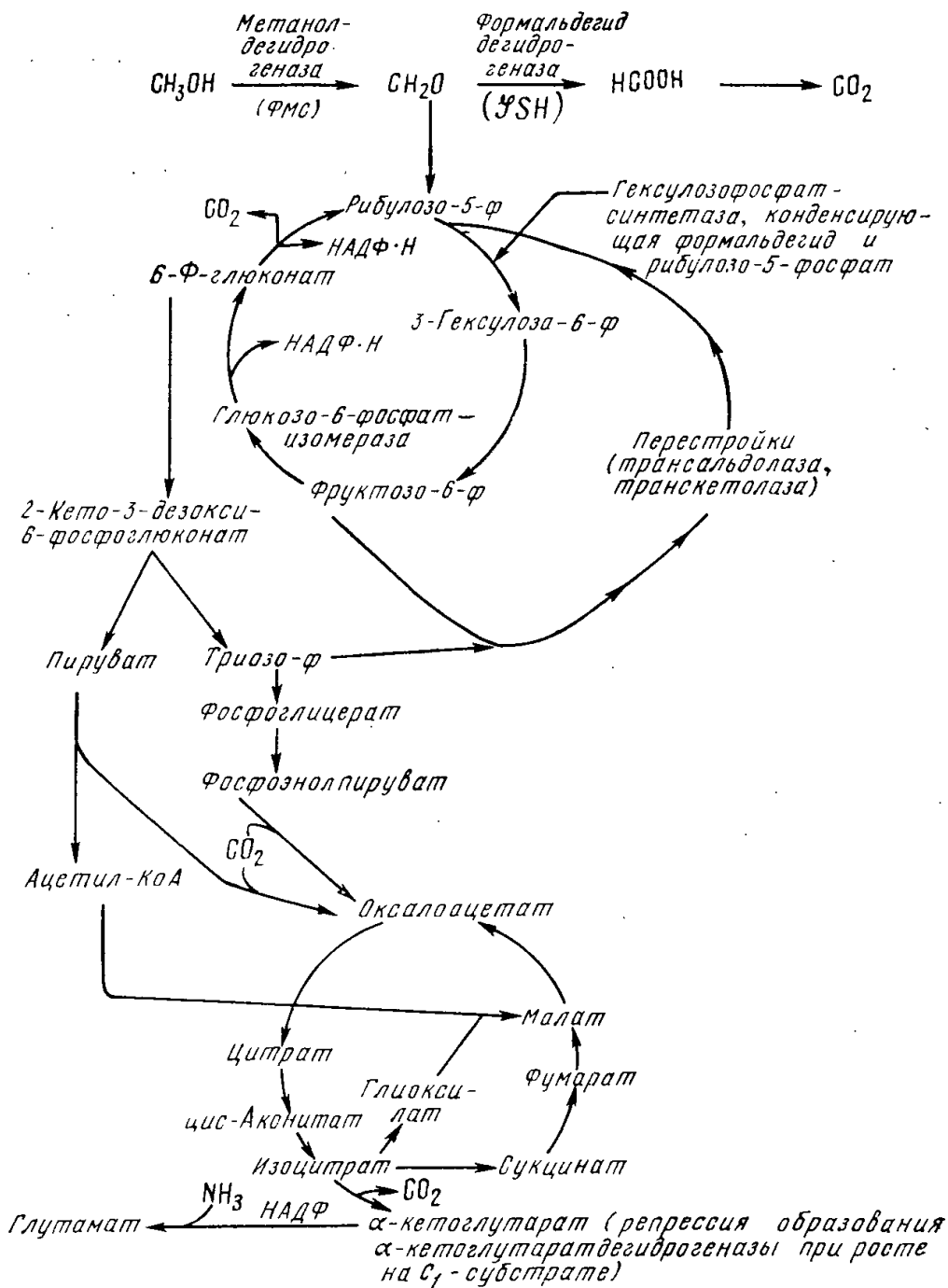


Рис. 3—32. Схема путей метаболизма метанола у *Pseudomonas oleovorans* [144] и *Candida boidinii* [84a].

активов (меркаптоэтанол, дитиотрейтол). Высокоочищенная формилдегидрогеназа окисляет формиат при высоких концентрациях глутатиона.

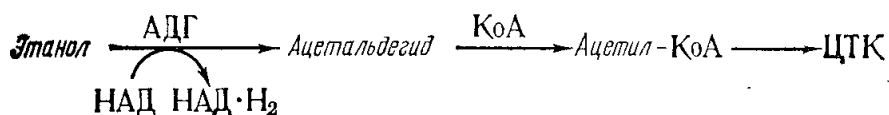
Итак, метилотрофные микроорганизмы в состоянии осуществлять рост в среде, содержащей до 6% метанола [75], и могут быть использованы не только как продуценты кормового белка,

но и для получения других продуктов, например ферментов, аминокислот, а также внеклеточных полисахаридов. Выход биомассы может достигать 40—50% от субстрата. Максимальный теоретический экономический коэффициент для роста *Candida bovidinii* на среде с метанолом составляет 0,47 г образованной биомассы на 1 г потребного метанола [84a].

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ОКИСЛЕНИЕ ЭТАНОЛА

Известны микроорганизмы, легко использующие этанол в качестве единственного источника углеродного питания. Среди этих микроорганизмов имеются и дрожжи [218, 370].

Уникальной особенностью митохондрий дрожжей является наличие митохондриальной формы НАД-зависимой алкогольдегидрогеназы (КФ 1.1.1.1), катализирующей окисление этанола:



У дрожжей обнаружены две группы алкогольдегидрогеназ (АДГ): растворимая АДГ и АДГ, связанная с мембранными структурами, локализованными в митохондриях. Если цитоплазматическая АДГ превращает ацетальдегид в этанол, то митохондриальная АДГ, наоборот, окисляет этанол в ацетальдегид. Превращение дрожжами ацетальдегида в этанол и ацетат схематично показано на рис. 3—33.

Следовательно, в ходе спиртового брожения свободный ацетальдегид превращается с образованием ацетата в этанол. При этом одна молекула ацетальдегида активируется коферментом А и дегидрируется с образованием ацетил-КоА. Выделяющийся при этом H^+ активируется НАД, а затем переносится на вторую молекулу ацетальдегида, которая восстанавливается в этанол. В даль-

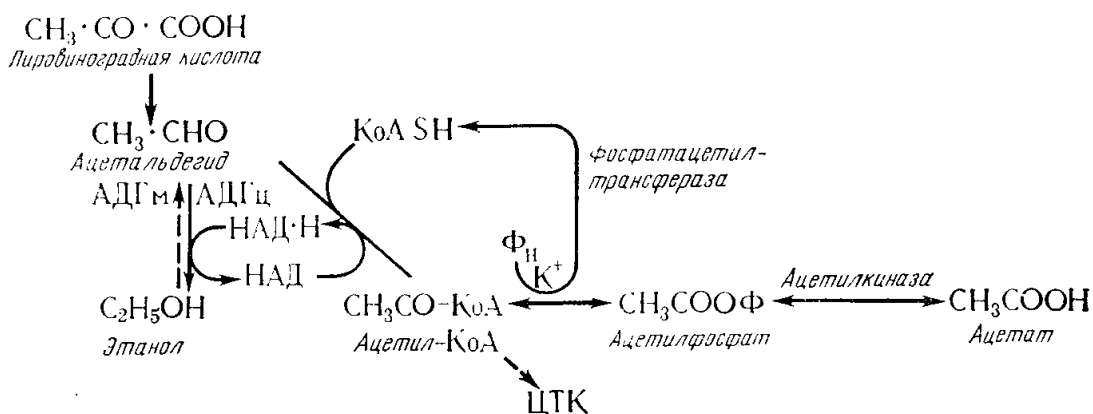
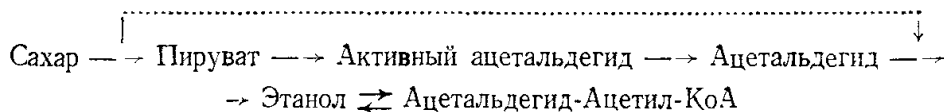


Рис. 3—33.

Механизм окислительно-восстановительного превращения дрожжами в аэробнозе ацетальдегида в этанол и ацетат [124] (АДГ_ц—цитоплазматическая алкогольдегидрогеназа, АДГ_м—митохондриальная алкогольдегидрогеназа).

нейшем ацетил-КоА окисляется в ЦТК или преобразуется в свободный ацетат.

Свободный ацетальдегид используется не только в дыхании дрожжей (через ацетил-КоА), но и в синтезе биомассы, образовании высших спиртов, органических кислот и т. д. Таким образом, проявляются метаболические пути глюкозы, пирувата и этанола. Их взаимосвязь можно представить схематически в следующем виде:



В настоящее время в условиях непрерывного способа культивирования дрожжей стабильно обеспечивается высокий коэффициент эффективности потребления этилового спирта, равный 65% [218] и даже 70% [380].

Если в исходной среде концентрация этанола составляла 3%, то содержание остаточного спирта в культуре не превышало 0,02%. Основные параметры непрерывного выращивания *Mucoderma vini* в зависимости от степени аэрации представлены в табл. 4.

Таблица 4
Непрерывное выращивание дрожжей в аппарате «Хемап»

Концентрация этанола в культуральной жидкости, %	Расход воздуха, л/(л·ч)	Средняя концентрация сухих дрожжей, г/л	Удельная скорость роста, ч ⁻¹	Производительность аппарата, кг·м ³ /ч	Выход биомассы от массы этанола, %
0,01	75	16,6	0,17	2,8	65
0,02	150	15,1	0,17	2,6	58
0,02	20 (O ₂)	16,0	0,25	4,0	53

Следовательно, концентрация биомассы в ферментаторе составляла в среднем 16 г/л в пересчете на абсолютную сухую массу. При этом имеются некоторые «резервы», реализация которых позволит, в частности, повысить коэффициент эффективности потребления этанола и увеличить его концентрацию в исходной среде. Например, при непрерывном культивировании *Candida utilis* в четырехступенчатом башенном ферментаторе [350, 351] удалось получить максимум продуктивности (2,2 г/л в час), причем это было достигнуто при концентрации этанола 75 г/л. При этом скорость разбавления соответствовала 0,3 ч⁻¹.

При культивировании дрожжей в многоступенчатом башенном ферментаторе без механического перемешивания максимальный выход биомассы был получен при концентрации этанола 10 г/л. Коэффициент эффективности составлял при этом 66% к использованному этанолу.

При концентрации этанола в среде, равной 16 г/л, и степени разбавления, соответствующей $0,25 \text{ ч}^{-1}$, максимальная продуктивность была 1 г/л в час. На основании полученных данных делается вывод о том, что башенный ферментатор пригоден для летучих субстратов, используемых в высоких концентрациях. О новой конструкции ферментатора, обеспечивающего высокую скорость переноса O_2 и интенсивное охлаждение, указывается во французском патенте [176].

* * *

Итак, усвояемость углеродсодержащего соединения зависит как от его растворимости, так и от строения молекулы и степени окисленности. Поглощаемые клеткой органические вещества вовлекаются в сопряженные окислительно-восстановительные реакции. Часть атомов углерода окисляется до CO — и COOH , освобождая тем самым необходимую для жизнедеятельности клетки энергию. Другая часть углеродных атомов, восстановившись до $-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2$ и $-\text{CH}$, используется для синтеза компонентов цитоплазмы. Окислительно-восстановительным превращением легче всего подвергаются полуокисленные атомы углерода: $-\text{CH}_2\text{OH}$, $-\text{CHOH}-$, $=\text{COH}$. Органические углеродсодержащие вещества с большим количеством восстановленных групп усваиваются относительно хуже (из-за плохой их растворимости и невозможности вовлечения в сопряженные окислительно-восстановительные реакции).

ВТОРИЧНЫЕ И ПОБОЧНЫЕ ПРОДУКТЫ МЕТАБОЛИЗМА ДРОЖЖЕЙ

Основными продуктами спиртового брожения являются этанол и углекислый газ. Наряду с этими соединениями образуются другие метаболиты и прежде всего так называемые побочные продукты: высшие спирты, кислоты, эфиры, альдегиды, дикетоны (диацетил, ацетоин) и др. Эти продукты синтезируются как в результате диссимиляции углеводов, так и вследствие обмена аминокислот. Например, образование диацетила и высших спиртов происходит на пути синтеза аминокислот из их кетоаналогов. Эта гипотеза обобщена в ряде работ [110, 54].

Необходимо отметить, что образование этанола не коррелирует с накоплением побочных продуктов обмена дрожжей, поэтому сброженные растворы, содержащие одинаковое количество этилового спирта, могут резко различаться по вкусовым и ароматическим показателям [55].

В связи с этим изучение обмена веществ дрожжей и установление факторов, влияющих на этот обмен и образование ими побочных продуктов, имеет большое теоретическое и практическое значение, так как количественное содержание их часто определяет качество пищевых продуктов.

При интенсификации спиртового брожения управляемыми и действующими факторами, часто используемыми для этих целей, являются температура, количество посевных дрожжей и рациональный выбор расы дрожжей [28, 54, 103]. Использование повышенных количеств посевных дрожжей и температур сбраживания приводит к изменению концентрации не только высших спиртов, как имеющих высокий удельный вес среди метаболитов, возникающих при конструктивном обмене веществ у дрожжей, но и других побочных продуктов, прежде всего диацетила и ацетоина. Все эти метаболиты оказывают существенное влияние на вкус и аромат готового продукта [102, 103, 25, 274].

АЦЕТОИН И ДИАЦЕТИЛ

Эти соединения оказывают существенное влияние на качество ряда пищевых продуктов, в том числе пива, вина и др. Дрожжи образуют диацетил и ацетоин при нормальном спиртовом брожении [26, 28, 296]. Обобщая имеющиеся данные, исследователи

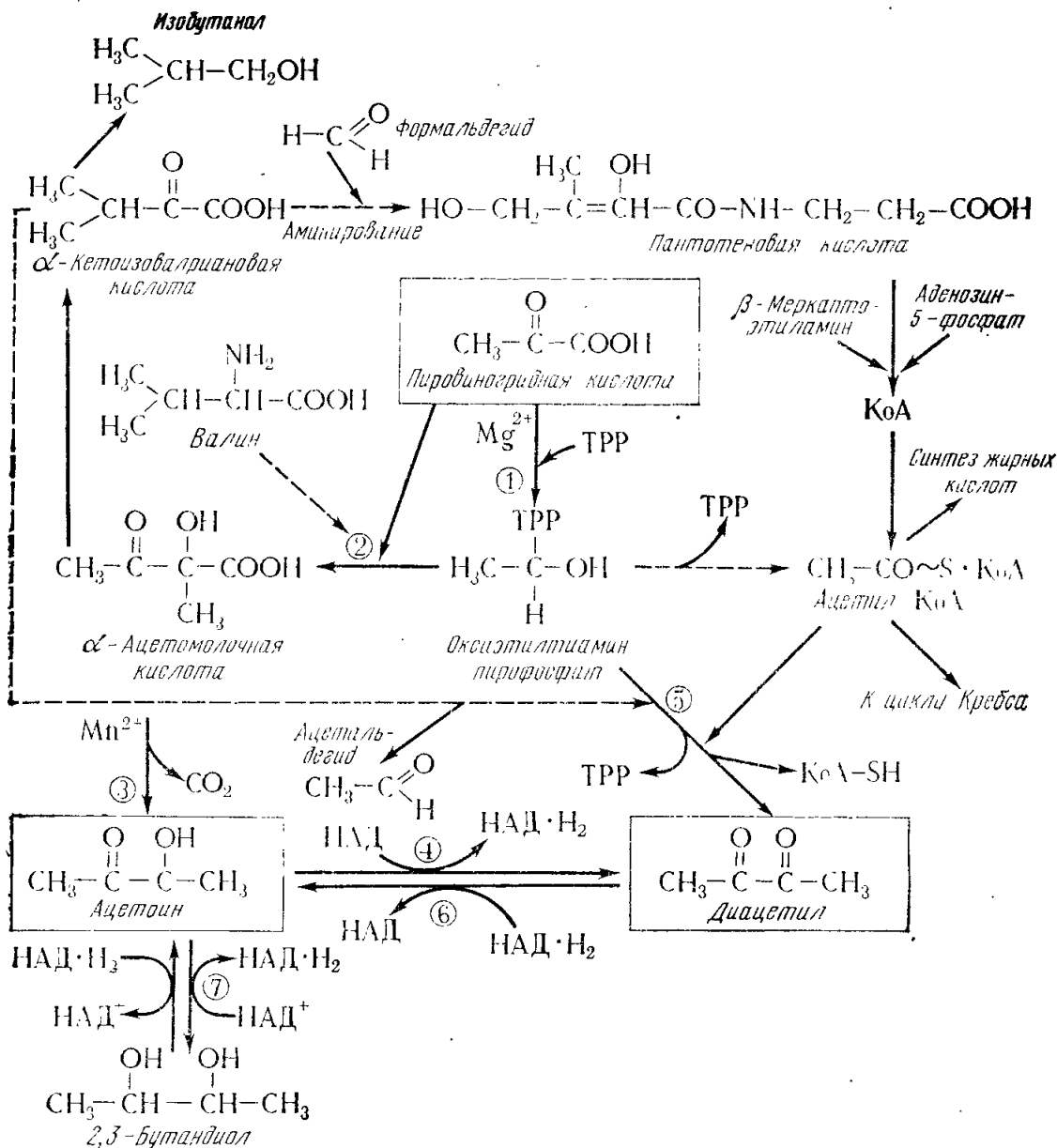


Рис. 4—1.

Схема биосинтеза ацетоина и диацетила микроорганизмами:

1 — пироватдекарбоксилаза; 2 — α-ацетолактатсинтаза; 3 — α-ацетолактатдекарбоксилаза; 4 — ацетондегидрогеназа; 5 — диацетилсинтаза; 6 — диацетилредуктаза; 7 — бутиленгликольдегидрогеназа (пунктиром обозначено действие по принципу обратной связи); TPP — тиаминпиррифосфат [192].

приходят к признанию сложности механизма образования этих веществ.

Схема биосинтеза и метаболизма ацетоина и диацетила микроорганизмами в обобщенной форме представлена на рис. 4—1 [192, 190, 191]. Исходным продуктом для биосинтеза ацетоина и диацетила является, как это вытекает из схемы, пировиноградная кислота. Предшественником ацетоина считается ацетомолочная кислота [192, 103], которая в свою очередь образуется из

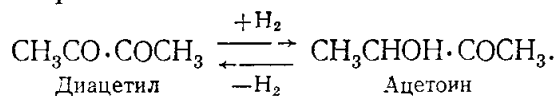
оксиэтилтиаминпирофосфата и пировиноградной кислоты. Следовательно, для образования ацетомолочной кислоты необходимы две молекулы пировиноградной кислоты, тиаминпирофосфат (ТПФ) и ионы Mg^{2+} или Mn^{2+} . При этом под действием пируватдекарбоксилазы пировиноградная кислота превращается в оксиэтилтиаминпирофосфат, который с новой молекулой пировиноградной кислоты образует α -ацетомолочную кислоту; катализируется реакция образования α -ацетомолочной кислоты ферментом α -ацетолактатсинтетазой. И наконец, ацетомолочная кислота декарбоксилируется с помощью ацетолактатдекарбоксилазы в ацетонн.

Как известно, ацетомолочная кислота является исходным продуктом для биосинтеза валина [92, 93, 103, 262], который в свою очередь проявляет ингибирующее действие на синтез ацетомолочной кислоты [110, 169]. По-видимому, валин действует по принципу обратной связи на α -ацетолактатсинтетазу. Поэтому добавление в сусло валина и ацетолактата подавляет образование диацетила дрожжами, а при избытке изолейцина, наоборот, синтез его возрастает. Низкое содержание аминокислот в сусле приводит к быстрому образованию диацетила [283]. Далее было установлено, что уровень α -ацетомолочной кислоты контролируется валином и что α -ацетомолочная кислота может потом превращаться через ацетонн в диацетил, как это схематично показано на рис. 4—1. Следовательно, предшественником диацетила оказалась, как отмечалось ранее, α -ацетомолочная кислота, которая образуется внутри клетки при синтезе валина из пировиноградной кислоты.

Кетонзвалернановая кислота является предшественником не только валина в результате ее аминирования, но и изобутанола, входящего в состав сивушного масла [192, 55, 264].

Ацетонн под действием ацетониндегидрогеназы и НАД превращается в диацетил [190, 193].

Образование диацетила и в значительной мере ацетонна осуществляется одновременно с размножением дрожжей, т. е. эти процессы как бы взаимосвязаны. В то же время отмечено, что в момент энергичного размножения дрожжей количество диацетила в сбраживаемой среде относительно уменьшается. При этом происходит, по-видимому, превращение диацетила в ацетонн, т. е. протекает следующая реакция:



Известно и другое предположение, заключающееся в том, что дрожжи в процессе жизнедеятельности сначала превращают ацетальдегид в ацетил-КоА, который конденсируется с пировиноградной кислотой, образуя при этом ацетомолочную кислоту, которая в результате декарбоксилирования образует ацетонн [192].

Вероятно, не исключается и спонтанное (неферментативное) внеклеточное превращение α -ацетомолочной кислоты в диацетил

и ацетон, особенно при аэрировании и высокой температуре, а также при наличии в среде ионов Fe^{3+} , Al^{3+} и Cu^{2+} как доноров электронов. При распаде ацетомолочной кислоты образуется не только диацетил, но может образоваться и муравьиная кислота.

ОБРАЗОВАНИЕ ДИАЦЕТИЛА НА ПУТИ БИОСИНТЕЗА ПАНТОТЕНОВОЙ КИСЛОТЫ

Как уже отмечалось ранее, добавление к среде 0,1% валина предотвращало образование диацетила *Sacch. cerevisiae*, однако он не ингибировал накопление ацетона. В свою очередь добавление 0,02% пантотената Ca к среде приводило к повышению концентрации диацетила на 62% и максимального количества биомассы на 33%. Следовательно, стимулирование образования диацетила пантотеновой кислотой еще раз указывает на то, что ацетил-КоА играет важную роль при синтезе диацетила, а включение α -ацетомолочной кислоты в синтез диацетила определяется лишь способностью дрожжей синтезировать пантотеновую кислоту. Ингибирование же валином образования диацетила указывает на их взаимосвязь не через α -ацетомолочную кислоту, а через пантотеновую кислоту. Валин при дезаминировании, превращаясь в α -кетовалериановую кислоту, образует пантотеновую кислоту и, наконец, КоА. Таким образом, ингибирующее действие валина на диацетил является симптомом недостатка пантотеновой кислоты в среде. Более того, оказалось, что при наличии в среде α -оксизовалериановой кислоты валин не ингибирует образование клеточными экстрактами диацетила из пировиноградной кислоты [283].

В связи с этими данными предпринята попытка объединить ранее описанные механизмы в модифицированную схему.

Взаимосвязь биосинтеза ацетона и валина отмечается и у многих бактериальных культур, причем наибольший выход ацетона отмечается на среде с глюкозой (12,5—13,0 г/л), а максимальное накопление валина — на среде с глюкозой и глицерином (1,8—4,8 г/л). На средах с глюкозой или глицерином и их комбинацией можно получить различные соотношения выходов ацетона и валина [224, 93]. На средах, в состав которых входит глицерин, ослаблена, вероятно, активность декарбоксилазы α -ацетомолочной кислоты, следствием чего явилось снижение выхода ацетона на 27—85% по сравнению с глюкозной средой и относительное повышение валина [92].

ВЛИЯНИЕ НЕКОТОРЫХ ФАКТОРОВ НА ОБРАЗОВАНИЕ ДИАЦЕТИЛА

Виды дрожжей. Расы и виды дрожжей в значительной мере определяют уровень дикетонов в сбраживаемой среде. Имеет значение и метаболическое состояние и величина бродильной энергии дрожжей [295, 335, 103, 25].

Количество посевных дрожжей. При относительно небольшом количестве начальных дрожжей, их клеток — 10 и 30 млн./мл — содержание диацетила после суточного брожения составляло 0,003 и 0,018 мг%, при среднем количестве посевных дрожжей — 50—90 млн./мл — его было 0,024 и 0,058 мг% и при большом количестве дрожжей — 130—200 млн. — 0,098 и 0,184 мг%. Следовательно, с повышением количества посевных дрожжей содержание диацетила в бражке значительно возрастает [103]. Чем больше посевных дрожжей вносится в сусло, тем быстрее заканчивается образование диацетила. Если количество этого метаболита рассчитать на 1 млн. клеток, то за 48 ч брожения оно составит 0,082 мкг/100 мл, за 72 ч — 0,124 мкг/100 мл, а затем, после 4 сут брожения, содержание его снижается. Общим для всех

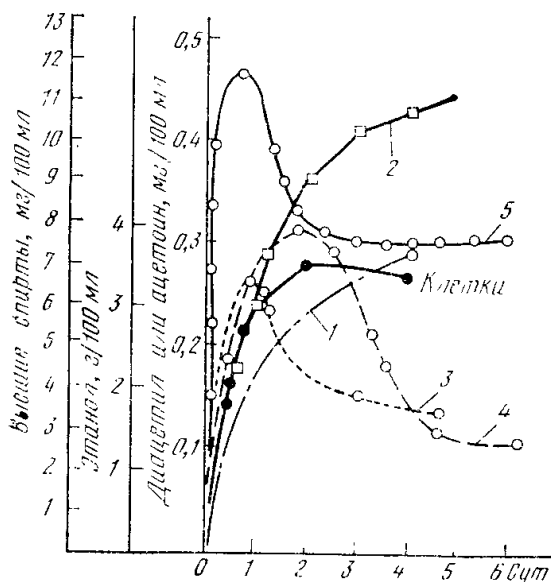


Рис. 4—2.
Динамика роста дрожжей *Sacch. carlsbergensis* 11, образование этанола (1), высших спиртов (2), альдегидов (3), диацетила (4) и ацетона (5) при сбраживании 11%-ного сусла [102].

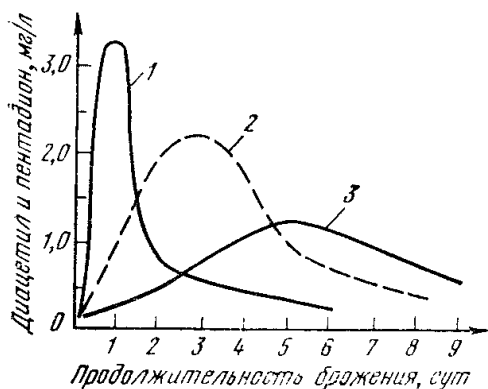


Рис. 4—3.
Различия в образовании и восстановлении дикетониев при изменении температуры и количества посевных дрожжей: 1 — высокие температуры брожения; 2 — средние температуры, 3 — низкие температуры.

опытов является то, что количество диацетила и ацетона с начала брожения увеличивается, а затем постепенно уменьшается (рис. 4—2).

Температура. С повышением температуры ускоряется рост дрожжей и увеличивается количество образовавшегося диацетила и ацетона в среде [295, 377]. Поддержание относительно высокой температуры в течение главного брожения обеспечивает получение бражки с низкими конечными концентрациями диацетила [103, 25]. Вероятно, чем быстрее закончится образование диацетила, тем больше его удалится к концу технологического процесса (рис. 4—3).

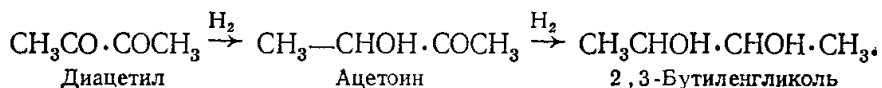
Повышение температуры брожения и количество посевных дрожжей не уменьшает образования ацетооксикислот, но ускоряет разрушение и удаление образовавшихся соединений [335], т. е. сокращает время созревания продукта без появления запаха диацетила. При короткой «тепло-холодной» выдержке бражки ее качество получается выше, чем в результате длительной выдержки при низкой температуре [294].

Анаэробные и аэробные условия. Диацетил и ацетон синтезируются в числе других продуктов в условиях как анаэробного брожения, так и аэробного превращения углеводов. Эти метаболиты образу-

ются, как уже отмечалось ранее, за счет продуктов превращения пировиноградной кислоты. Однако в анаэробных условиях пировиноградная кислота подвергается декарбоксилированию с образованием ацетальдегида, а в случае аэробного превращения сахара подвергается окислительному декарбоксилированию с превращением в уксусную кислоту. Ацетальдегид и ук-

сусная кислота, образовавшиеся в процессе анаэробного и аэробного превращения пировиноградной кислоты, затем с помощью кофермента А вовлекаются в дальнейшие биохимические превращения. При этом наряду с другими метаболитами постоянно синтезируются диацетил и ацетоин.

Количественные изменения этих метаболитов, претерпеваемые в процессе брожения, указывают на дальнейшее вовлечение их в биохимические превращения. При этом допускается возможность восстановления диацетила до ацетоина, а последнего до 2,3-бутиленгликоля:



Дрожжи в процессе жизнедеятельности легко восстанавливают альдегидную и кетонную группы до спиртовой. Диацетил может служить, вероятно, донором ацетильных групп. Этот метаболит может в известной мере характеризовать направленность, глубину и завершенность процесса брожения в целом. Поскольку диацетил является побочным продуктом в синтезе валина, его образование происходит наиболее интенсивно в первой стадии главного брожения, т. е. в процессе наиболее интенсивного структурного обмена дрожжей, когда валин синтезируется для построения внутриклеточных молекул и структур. Дображивание пива и дозревание вина связано, в частности, с восстановлением диацетила.

Итак, диацетил и ацетоин образуются в результате энергетического обмена дрожжей, и центральным звеном при этом является пировиноградная кислота. Их образование, вероятно, происходит на пути синтеза аминокислот из их кетоаналогов. Пути возникновения кетонов являются, вероятно, самостоятельными и непосредственно не взаимосвязаны.

Количественное содержание ацетоина и диацетила. При сбраживании 13%-ного суслу дрожжами *Sacch. carlsbergensis* 11 в условиях низкой температуры (8°С) содержание ацетоина составляло 14,61 мг/л в начале брожения и 6,34 мг/л в конце. В сладких винах его количество достигало максимальной величины (25—100 мг/л) в середине брожения, а затем оно уменьшалось до 5—20 мг/л; в хересе уровень ацетоина составлял 35 мг/л. Сусло с высоким содержанием валина задерживает образование диацетила.

Диацетила, например, в пиве содержится менее 1,0 мг/л; минимальное содержание его может составлять 0,02 мг/л. В концентрации 0,20—0,46 мг/л он уже влияет на вкус, тогда как ацетоин оказывает отрицательное действие на вкус лишь при высоких концентрациях. Диацетил и ацетоин содержат карбонильную группу и являются реакционноспособными соединениями. Например, диацетил подобно глиоксалу (СНО—СНО) взаимодействует с NH₃, аминами и альдеги-

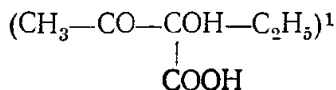
дами, образуя производные имидозола $\begin{array}{c} \text{HC} \text{---} \text{CH} \\ \parallel \qquad \parallel \\ \text{HC} \qquad \text{CH} \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{NH} \end{array}$, обладающего ароматическими свойствами.

Дефекты аромата в продуктах брожения, а также в молоке, уксусе вызываются часто излишними концентрациями диацетила. Содержание их в бражке варьирует в широких пределах в зависимости от длительности спиртового брожения. Так, например, за первые сутки брожения содержание диацетила составляло 0,32 мг/100 мл, а за последующие 4 сут брожения оно

снизились до 0,1 мг (см. рис. 4—2). За этот же период брожения количество ацетона снизилось с 0,47 до 0,32 мг/100 мл. Если диацетил специально внести в сбраживаемое сусло в начале опыта (1,32 мг%), то после 5-суточного брожения его сохранилось в бражке лишь около 15% от первоначального количества, т. е. 1,32 мг%. Образовавшийся в процессе главного брожения диацетил редуцируется за период дображивания на 49—53%.

СОЕДИНЕНИЯ, РОДСТВЕННЫЕ ДИАЦЕТИЛУ

К таким соединениям, обуславливающим вкус и аромат готовой продукции, относится также 2,3-пентадион ($\text{CH}_3, \text{CO.CO.C}_2\text{H}_5$). Этот метаболит образуется из α -ацето- α -оксимасляной кислоты



при участии «активного ацетальдегида» и α -кетомасляной кислоты. «Активный ацетальдегид» получается в результате декарбонирования активной формы пировиноградной кислоты, т. е. 2(α -окси- α -карбокси)-тиаминдифосфата. 2,3-Пентадион содержится в незначительных количествах, менее ароматичен и меньше влияет на аромат пива и вина.

Ацетальдегид (CH_3CHO). Ацетальдегид достигает максимальной величины на 2—3-и сутки брожения, а для разных рас его содержание варьировало в пределах от 1,55 до 2,42 мг/100 мл, а в конце брожения от 0,72 до 1,53 мг/100 мл (рис. 4—4). Для трех рас пивных дрожжей отмечалось практически одинаковое конечное содержание ацетальдегида (1,43—1,53 мг/100 мл). Кроме того, один из двух видов дрожжей синтезировал минимальное количество ацетальдегида (*Sacch. vini* Прикумская 80/9), а другой вид (*Sacch. cerevisiae* Одесская 4), наоборот, синтезировал максимальное количество, соответствующее 2,42 мг/100 мл [54]. Повышение температуры брожения вызывает значительное увеличение концентрации ацетальдегида [33]. Вкусовая граница для ацетальдегида 25 мг/л, но уже при содержании 12 мг/л вкус ухудшается.

Альдегиды. Образование альдегидов связано с ростом дрожжей и протеканием наиболее интенсивного спиртового брожения. Максимальное количество альдегидов (3,8 мг/100 мл) отмечалось при сбраживании сусла, содержащего 19% сухих веществ (рис. 4—5); оно достигалось за 3 сут брожения. Естественно, что при сбраживании сусла с низким содержанием сухих веществ (6,0%) максимальное образование альдегидов достигалось за 1-е сутки брожения и составляло лишь 1,1 мг/100 мл.

В процессе брожения образуются следующие альдегиды: уксусный, пропионовый, коричный, изомасляный, изовалериановый и др.

¹ Ацетооксимасляная кислота является промежуточным соединением в биосинтезе изолейцина, который путем механизма обратной связи вызывает угнетение образования пентадиона.

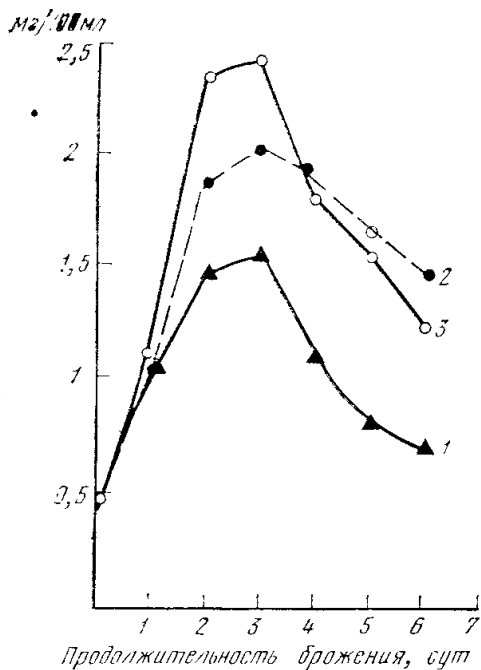


Рис. 4—4.

Динамика накопления ацетальдегида при анаэробном сбраживании охмеленного пивного суслу различными расами дрожжей: 1 — Sacch. vini Прикумская 80/9; 2 — Sacch. carlsbergensis 11 (а также расы 776 и S-Львовская); 3 — Sacch. cerevisiae Одесская 14 [102].

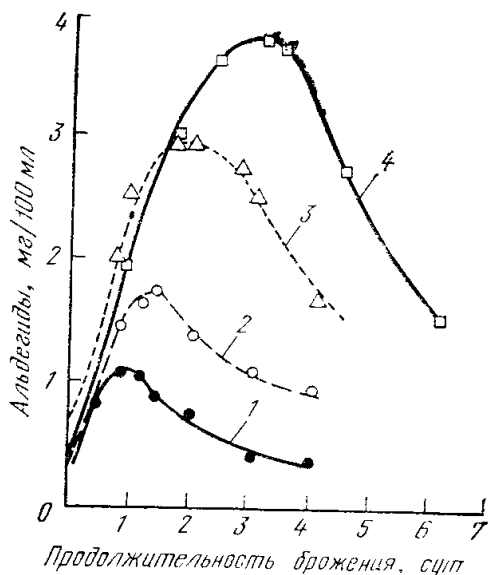


Рис. 4—5.

Динамика накопления альдегидов дрожжами Sacch. carlsbergensis 11 при сбраживании суслу с различной концентрацией сухих веществ [102]: 1 — 6%; 2 — 11%; 3 — 16%; 4 — 19%.

К этой группе соединений относится также 2,3-бутиленгликоль $[\text{CH}_3 \cdot \text{CH}(\text{OH}) \cdot \text{CH}(\text{OH}) \cdot \text{CH}_3]$, диацетилметилкарбинол $(\text{CH}_3 \times \text{CO} \cdot \text{COH} \cdot \text{CH}_3)$ и метилглюкозаль $(\text{CH}_3 \cdot \text{CO} - \text{CHO})$. Всего

обнаружено 12 альдегидов, содержащих от 2 до 12 атомов углерода. Все эти соединения в той или иной мере влияют на вкус и аромат готовой продукции (пива, вина) и являются очень реакционноспособными, вследствие чего следует ожидать их дальнейших превращений в процессе жизнедеятельности дрожжей. Поэтому не случайно они образуются в начале брожения как промежуточные продукты метаболизма на пути гликолитического превращения углеводов в этанол. При дображивании количество альдегидов снижается на 20—30% [102] и часто варьирует в пределах 10—35 мг/л.

ВЫСШИЕ СПИРТЫ

Синтез высших спиртов связан прежде всего с образованием валина, лейцина и изолейцина, и промежуточные продукты биосинтеза этих аминокислот служат предшественниками для возникновения этих спиртов и diketонов. Наиболее полная схема подобного синтеза представлена на рис. 4—6.

Образование побочных продуктов рассматривается как результат регуляции синтеза аминокислот [54, 238]. Так, например, из-

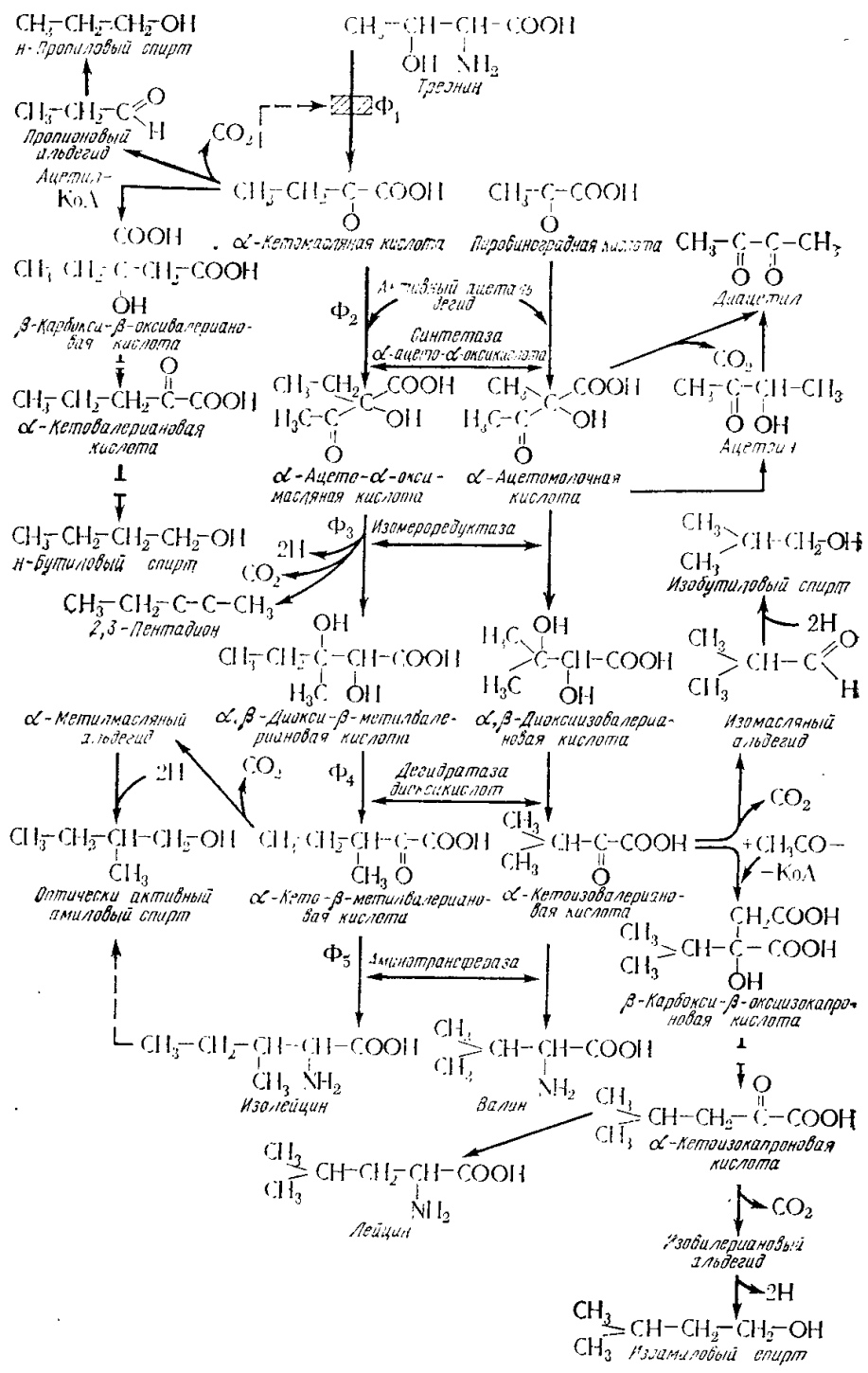


Рис. 4-6.

Схема образования высших спиртов и diketонов:
 Φ_1 — L-треониндеаминаза; $\Phi_2, \Phi_3, \Phi_4, \Phi_5$ — ферменты, катализирующие промежуточные стадии.

быток в среде конечного продукта — аминокислоты — вызывает ингибирование первого фермента в цепи реакций, т. е. по типу обратной связи. Ингибирование *L*-треониндезаминазы, т. е. первого фермента в цепи реакции, вызывается конечным продуктом этой цепи — *L*-изолейцином. Как следует из данных рисунка, биосинтез валина и изолейцина на четырех этапах осуществляется одинаковыми ферментами, различие заключается только в цепи биосинтеза изолейцина, где начальный момент процесса превращения треонина в α -кетомасляную кислоту осуществляется, как уже указывалось ранее, треониндегидратазой, являющейся точкой приложения «обратной связи» и ингибируемой *L*-изолейцином.

Ретроингибирование, т. е. ингибирование по типу обратной связи, соответствующих ферментов, репрессия биосинтеза аминокислот на различных стадиях процесса позволяет накапливаться в среде промежуточным продуктам, в частности кетокислотам, из которых может образоваться соответствующий дикетон. При этом, естественно, изменение состава среды и условий брожения может сказаться на биосинтезе побочных продуктов как результат регуляторных процессов клетки.

Положение побочных продуктов в общем азотистом обмене веществ у дрожжей можно наглядно представить по схеме, данной автором [110]. По-видимому, биосинтез побочных продуктов связан с регуляторными функциями клетки. Следовательно, их образование должно зависеть от состава среды, уровня азота и углерода в среде, условий культивирования дрожжей и генетических особенностей микроорганизма. Вследствие частичного ингибирования активности ферментов метаболизма обеспечивается накопление промежуточных продуктов, включая и кетокислоты, которые в цикле спиртового брожения могут служить исходным продуктом для образования высших спиртов [103].

Максимальное количество высших спиртов в бражке варьирует от 5,91 мг/100 мл (*Sacch. cerevisiae*) до 8,75 мг/100 мл (*Sacch. carlsbergensis* — раса 11, раса 776 и др.). Разница в содержании суммарного количества высших спиртов определялась в основном колебанием в содержании изоамилового спирта от 3,36 до 4,10 мг/100 мл. Количество других индивидуальных спиртов колебалось: *n*-пропанола от 0,83 до 1,38; изобутанола от 0,72 до 1,40 и активного амилового спирта от 0,80 до 2,0 мг/100 мл [103]. Наивысшая скорость образования высших спиртов совпадает с периодом экспоненциальной фазы роста популяции дрожжей и постепенно возрастает до конца брожения (см. рис. 4—2).

С повышением концентрации сухих веществ сусла с 6 до 19% возрастает и количество высших спиртов — с 6,02 до 17,42 мг/100 мл, т. е. в 2,9 раза. Следовательно, образование высших спиртов всецело связано с ростом дрожжей, накоплением их биомассы и длительностью брожения [55, 274]. Разные виды и штаммы дрожжей образуют неодинаковое количество высших спиртов (табл. 5). Даже качественный состав спиртов зависит от вида и физиологического состава дрожжей (табл. 6).

Таблица 5

Содержание основных и побочных продуктов метаболизма дрожжей, полученных в конце сбраживания пивного сусла [103]

Вид и раса дрожжей	Время брожения, сут.	Клетки, млн./мл	Содержание на 100 мл							
			CO ₂ , г	этанола, г	редуцирующих веществ, г	высших спиртов, г	диацетила, мг	ацетонна, мг	ацетальдегида, мг	общих сахаров, г
Sacch. carlsbergensis 11	6	44	2,97	3,02	1,70	8,75	0,11	0,27	1,50	4,62
776	6	46	3,15	3,25	1,60	6,80	0,10	0,31	1,53	4,47
Sacch. cerevisiae Одес-кая 14	6	68	2,92	2,92	2,15	5,91	0,11	0,30	1,24	4,80
Sacch. vini Прикум-ская 80	9	90	1,61	1,92	3,44	6,88	0,13	0,24	0,72	5,60

Примечание. Исходное сусло содержало: общих сахаров 9,54 г, редуцирующих веществ 7,96 г, диацетила 0,02 мг, ацетонна 0,078 мг, ацетальдегида 0,33 мг на 100 мл.

Таблица 6

Образование высших спиртов пылевидными и хлопьевидными дрожжами [78]

Дрожжи	Общее количество высших спиртов, мл/л	Высшие спирты, % к общему количеству				
		n-пропанола	изобутанола	n-бутанола	2-метилбутанола	3-метилбутанола
Хлопьевидные	58	10,0	11,3	0,2	16,2	63,3
Пылевидные	55	4,2	8,8	0,1	29,0	66,0

Итак, центральное место в процессе образования вторичных продуктов занимают кетокислоты, решающая роль при этом принадлежит пировиноградной кислоте. Именно превращение этой кислоты является исходным материалом для биосинтеза предшественников дикетонов и других вторичных продуктов [273, 377]. При использовании раствора пировиноградной кислоты, MgSO₄, тиаминдифосфата и дрожжевой пируватдекарбоксилазы в строго анаэробных условиях было синтезировано 2,2 мг/л диацетила. Одновременно была обнаружена и ацетомолочная кислота.

Далее было показано, что дрожжевой мутант, неспособный образовывать ацетомолочную кислоту (в результате отсутствия синтетазы ацетооксиацетата), одновременно не синтезировал и диацетила. Как уже отмечалось ранее, превращение ацетомолочной кислоты в диацетил является, вероятно, неэнзиматическим, осуществляется вне дрожжевой клетки и поэтому трудно доказуемо [383]. В то же время образование ацетомолочной кислоты происходит ферментативным путем. Образование пировиноградной кис-

лоты и ацетооксикилот коррелируется с бродильной энергией дрожжей. Условия, благоприятные для образования ацетальдегида, ацетил-КоА и ацетонна, могут теоретически уменьшать синтез ацетооксикилот.

Образование высших спиртов тесно связано с количеством полевных дрожжей, аэрацией и температурой. При стимуляции роста дрожжей образуется больше высших спиртов и меньше эфиров.

При дображивании — созревании пива, вина — количество спиртов сивушного масла возрастает на 10—20% и достигает 60—90 мг/л. Не только количественный, но и качественный состав высших спиртов зависит от вида и расы, а также физиологического состояния дрожжей.

Изменение температуры может влиять на соотношение между высшими спиртами в пиве (табл. 7). Показано, что повышение

Таблица 7
Образование высших спиртов (в мг/л) в зависимости от температуры [274]

Спирт	Температура брожения, °С		Увеличение, %
	10	25	
Пропанол	9,5	14,5	53
Изобутанол	8,1	9,6	19
2-Метилбутанол	15,3	20,7	35
3-Метилбутанол	30,4	47,5	56
3-Фенилэтанол	4,6	28,5	520

температуры увеличивает образование высших спиртов дрожжами. К образованию сивушных спиртов имеют отношение кетокислоты, образующиеся в процессе брожения: пируват, α -ацетолактат, α -кетобутират, α -кетоиэвалериат, α -ацетогидроксibuтират, α -кето- β -метилвалериат. Как правило, усиление аэрации приводит к увеличению образования высших спиртов, но при средней интенсивности их синтеза. На вкус продукта больше влияют ароматические спирты, чем алифатические.

ЛЕТУЧИЕ ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ

Одной из важнейших составных частей сброженных сред являются летучие жирные кислоты, содержание которых и их соотношение представляются одной из определяющих качественных характеристик готовой продукции и прежде всего пива и вина. Поэтому изучение влияния условий среды и технологических приемов на закономерности образования различных метаболитов дрожжей представляет исключительный интерес.

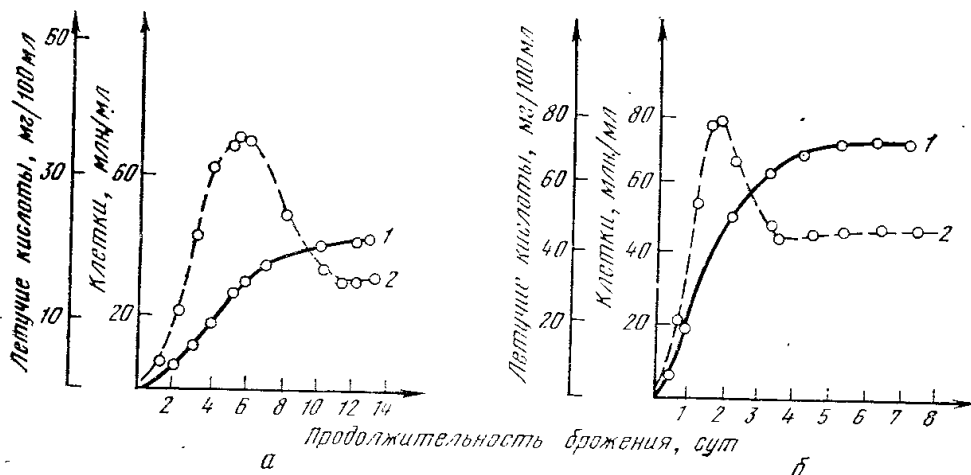


Рис. 4—7.

Размножение дрожжей (1) и образование летучих жирных кислот (2) в условиях анаэробного сбраживания 11%-ного охмеленного пивного сусла дрожжами *Sacch. carlsbergensis* S-Львовская при 6° С (а) и 20° С (б) [79].

В частности, экспериментально установлено, что динамика накопления летучих кислот носит экстремальный характер независимо от расы используемых дрожжей и температуры спиртового брожения. В то же время максимальное их содержание в некоторой мере зависит от расы дрожжей, а скорость образования — от температуры брожения. Если в процессе брожения при 6° С максимальное образование летучих кислот заканчивается за 3—

Таблица 8

Накопление летучих кислот при сбраживании 11%-ного охмеленного пивного сусла дрожжами *Sacch. carlsbergensis* 776 [79] (в мг/100 мл)

Летучие кислоты	Температура спиртового брожения, °С								
	6			12			16		
	Посевные дрожжи, млн. клеток/мл								
	26,4	340,5	360,0	23,5	327,2	362,5	20,0	310,8	358,0
Уксусная	26,87	19,43	19,02	27,92	23,11	20,6	30,77	26,94	24,43
	97,4	97,0	97,3	95,9	97,2	94,7	94,9	96,9	97,35
Пропионовая	0,18	0,21	0,20	0,22	0,19	0,19	0,28	0,27	0,26
	0,66	1,04	1,17	0,72	0,81	0,90	0,87	0,98	1,02
Изомасляная	0,20	0,18	0,12	0,32	0,19	0,15	0,46	0,22	0,18
	0,74	0,88	0,70	1,05	0,78	0,70	1,43	0,81	0,74
Масляная	0,10	0,10	0,05	0,22	0,10	0,06	0,31	0,12	0,07
	0,37	0,05	0,03	0,72	0,44	0,28	0,95	0,45	0,28
Изовалериановая	0,22	0,22	0,14	0,47	0,18	0,15	0,60	0,24	0,18
	0,81	1,07	0,80	1,56	0,77	0,72	1,85	0,86	0,71
Сумма летучих кислот	27,58	20,04	19,54	29,1	23,78	21,15	32,42	27,80	25,10

Примечание. Продолжительность брожения варьировала от 0,18—0,5 до 4,2—5,9 сут.

107*

6 сут, при 20° С оно заканчивается за 1—2 сут (рис. 4—7). Количественное содержание суммы летучих кислот возрастает от повышения температуры брожения (от 6 до 16° С) на 17—28% в зависимости от количества посевных дрожжей, однако содержание отдельных кислот, например масляной, возрастает при указанных условиях опыта в 2,3 и 1,5 раза (табл. 8).

Следовательно, с повышением температуры брожения не только сокращается продолжительность максимального накопления жирных кислот, но и возрастает их количество в бражке. Хотя отдельные расы дрожжей *Sacch. carlsbergensis* и образуют относительно небольшое количество летучих кислот (расы II и S-Львовская) по сравнению с другими расами (например, раса А), в целом значения конечного содержания летучих кислот близки и мало зависят от расы дрожжей [79].

Итак, независимо от температуры брожения и расы дрожжей максимум накопления летучих кислот по времени совпадает с серединой экспоненциальной фазы роста дрожжей, т. е. с периодом их интенсивного почкования и размножения. Экстремальное значение суммы летучих кислот по времени совпадает с наибольшей скоростью роста дрожжевых клеток. Дальнейший спад в образовании летучих кислот объясняется, вероятно, резким снижением прироста биомассы, особенно в стационарной фазе роста дрожжей.

ОБРАЗОВАНИЕ ЛЕТУЧИХ КИСЛОТ ПРИ ИНТЕНСИВНОМ РЕЖИМЕ СПИРТОВОГО БРОЖЕНИЯ

Брожение охмеленного сусле осуществлялось дрожжами *Sacch. carlsbergensis* 776 при температуре 6, 12 и 16° С и количестве посевных дрожжей от 20 до 362 млн. клеток в 1 мл. Сбраживание проводилось до содержания этилового спирта 2,76—2,90 г/100 мл. Оказалось, что за счет увеличения посевной дозы дрожжей в указанном диапазоне достигалось сокращение сроков брожения в 5,8—13,9 раза, тогда как варьирование температуры брожения от 6 до 16° С обеспечило сокращение сроков брожения в 1,4—6,0 раза.

В процессе дображивания концентрация летучих жирных кислот уменьшилась с повышением посевной дозы дрожжей. Так, например, при внесении посевных дрожжей в количестве 26,4 млн. клеток в 1 мл и температуре 6° С (контроль) концентрация летучих жирных кислот в среде составила 27,4 мг/100 мл, при количестве дрожжей 340,5 млн. клеток в 1 мл — 20,036 мг/100 мл, а при количестве посевных дрожжей 360 млн. клеток в 1 мл — 19,543 мг/100 мл летучих кислот (см. табл. 8).

При повышении температуры брожения с 6 до 16° С содержание летучих кислот при одинаковом практически количестве посевных дрожжей возрастало. Следовательно, повышение температуры брожения приводило к повышению количества летучих кис-

лот в среде, в то же время повышение дозы посевных дрожжей понижало концентрацию летучих кислот, что в целом приводило в конечном итоге к равнокачественным характеристикам.

ВЛИЯНИЕ АЭРАЦИИ И ПЕРЕМЕШИВАНИЯ НА ОБРАЗОВАНИЕ ЛЕТУЧИХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ

Установлено влияние аэрации на образование летучих кислот и других метаболитов дрожжами *Sacch. carlsbergensis* 776. Степень аэрации и перемешивания определялась по сульфитному числу K_v , соответствующему 6,4—8,8 и 16,82 мг O_2 на 1 л среды. Температура культивирования при этом равнялась 20° С. С увеличением уровня растворенного кислорода в среде, естественно, рез-

Таблица 9

Образование продуктов метаболизма дрожжей *Sacch. carlsbergensis* 776 в условиях анаэробного сбраживания пивного сусла [79]

Продукты метаболизма	Длительность культивирования, сут							
	0,4	0,8	1,2	1,6	2,0	2,4	2,8	3,0
<i>Аэрация, соответствующая K_v 6,4 мг O_2 на 1 л среды в минуту</i>								
Количество клеток, млн./мл	17	48	84	110	129	142	151	153
Летучие кислоты, мг/100 мл	5,0	27,5	17,5	16,0	15,8	16,8	17,4	17,5
Пировиноградная кислота, мг/100 мл	13,2	20,1	24,8	35,2	38,4	56,6	58,4	(56,2)
α -Кетоглутаровая кислота, мг/100 мл	1,1	1,5	1,8	2,2	3,0	3,5	4,4	(4,4)
Этиловый спирт, г/100 мл	0,7	1,3	1,5	1,7	1,9	2,3	2,4	(2,5)
<i>Аэрация, соответствующая K_v 8,80 мг O_2 на 1 л среды в минуту</i>								
Количество клеток, млн./мл	31,2	80,5	115,0	141,4	159	173	179	180
Летучие кислоты, мг/100 мл	3,6	16,7	12,5	13,5	14,9	15,1	15,2	15,2
Пировиноградная кислота, мг/100 мл	1,4	26,8	38,7	72,1	80,0	78,5	75,0	74,4
α -Кетоглутаровая кислота, мг/100 мл	1,4	1,8	2,5	3,4	5,2	5,4	5,4	5,4
Этиловый спирт, г/100 мл	0,5	1,0	1,2	1,5	1,6	1,9	1,9	2,0
<i>Аэрация, соответствующая K_v 18,82 мг O_2 на 1 л среды в минуту</i>								
Количество клеток, млн./мл	74,0	106	138	165	188	222	240	—
Летучие кислоты, мг/100 мл	7,9	7,5	9,7	11,5	12,5	—	—	—
Пировиноградная кислота, мг/100 мл	25,1	100	114	117	101,5	—	—	—
α -Кетоглутаровая кислота, мг/100 мл	1,6	2,5	3,5	6,0	5,85	—	—	—
Этиловый спирт, г/100 мл	0,25	0,72	1,0	1,5	1,4	—	—	—
Примечание. Цифры в скобках относятся к длительности брожения 3,2 сут.								

ко возрастает прирост биомассы, однако общее количество летучих кислот при этом заметно снижается. Если за 1,2 сут брожения при сульфитном числе среды, равном 6,4 мг O₂ на 1 л среды в минуту, количество летучих кислот составляло 17,53 мг/100 мл, то в тех же условиях брожения, но при сульфитном числе 18,82 мг O₂ на 1 л среды в минуту их содержание соответствовало лишь 9,75 мг/100 мл, т. е. в 1,8 раза ниже (табл. 9). В условиях анаэробного брожения, как было показано ранее, общее количество летучих кислот часто достигало 25—32 мг/100 мл.

В то же время следует отметить, что по мере повышения степени аэрирования сбраживаемых сред возрастает образование α -кетоглутаровой кислоты, например за 2 сут опыта с 3,0 до 5,8—6,0 мг/100 мл, а содержание пировиноградной кислоты за это же время возросло еще значительно — с 38,4 до 101,46 мг/100 мл.

Эти данные говорят об изменениях направленности обменных процессов при аэрации в сторону образования более окисленных продуктов метаболизма дрожжей.

Добавление к сбраживаемому суслу железа, свинца или марганца приводит к увеличению синтеза пировиноградной кислоты на 3,2 мг/100 мл, в то же время трехвалентное железо тормозит синтез α -кетоглутаровой кислоты.

В период максимального накопления пировиноградной кислоты содержание уксусной кислоты значительно снижается, тогда как ее количество в 1-й период брожения наибольшее. Около $\frac{2}{3}$ образуемой пировиноградной кислоты потребляется дрожжами к концу брожения. При усилении аэрации образование кислот усиливается и соответственно снижается уровень pH. Содержание кислот, например, в лагерном пиве варьирует в следующих пределах (в мг/л): уксусной от 10 до 160, янтарной от 30 до 180, молочной от 40 до 280. Дрожжи *Saccharomyces* образуют до 70—80 мкг/л β -оксиглутаровой кислоты.

ОРГАНИЧЕСКИЕ КИСЛОТЫ, ОБРАЗУЮЩИЕСЯ ПРИ НЕПРЕРЫВНОМ КУЛЬТИВИРОВАНИИ ДРОЖЖЕЙ НА СРЕДЕ С *n*-ПАРАФИНАМИ

При непрерывном культивировании дрожжей *Candida guilliermondii* НП-4 на средах с *n*-парафинами в среде обнаруживается около 100 мг/л органических кислот. Однако при нарушении оптимальных условий культивирования количество их увеличивается до 300 мг/л. При длительном непрерывном выращивании дрожжей их содержание в культуральной жидкости возрастает и может варьировать от 360 до 850 мг/л [95]. Качественный анализ показал, что в культуральной жидкости присутствуют нормальные жирные кислоты: пропиевая, каприловая, пеларгоновая, каприновая, ундекановая, лауриновая, миристиновая, пальмитиновая, маргариновая, стеариновая и ряд других. Кроме кислот с прямой цепью в культуральной жидкости было обнаружено большое количество изокислот (до 30% от общего количества кислот), а именно: изовалериановая, изомасляная, изокапроновая, изоэнантовая [53]. Многие дрожжи, и в частности, *Candida lipolytica*, накапливают в среде лимонную и изолимонную кислоты при росте с *n*-алканами [149, 147, 85]. «Сверхсинтез» этих кислот дрожжами происходит при лимитировании роста культуры источником азота и избытке источ-

ника углерода. Процесс кислотообразования сильно зависит от кислотности среды: рН среды 6,0 наиболее благоприятен для синтеза лимонных кислот. Концентрация железа в среде существенно влияет на соотношение образующихся кислот. При низкой концентрации ионов железа (0,005 мг Fe/l) образуются равные количества цитрата и изоцитрата, повышенные начальной концентрации в среде сдвигает соотношение в сторону преимущественного образования изоцитрата [85].

Если органические кислоты с относительно небольшим количеством атомов углерода образуются в результате гликолиза и цикла Кребса, то кислоты жирного ряда образуются другим путем, однако одним из предшественников и в этом случае является ацетил-КоА (для затравки).

ЖИРНЫЕ КИСЛОТЫ

Синтез насыщенных жирных кислот, осуществляемый в растворимой части цитоплазмы, катализируется синтетазой. В митохондриях и эндоплазматической сети (фракции микросом) содержатся ферменты, способные удлинить цепи жирных кислот, уже имеющих от 12 до 16 атомов углерода.

Рост цепи при синтезе жирной кислоты начинается с карбоксильной группы ацетил-КоА, который является только начальной затравкой, или инициатором. К карбоксильной группе ацетил-КоА последовательно присоединяется следующий ацетильный остаток, но уже от малонила-КоА (КоА — S — CO — CH₂ — COOH). Третий атом углерода неэтерифицированной карбоксильной группы теряется в виде CO₂, а образуется при этом производное β-кетожирной кислоты, которое затем восстанавливается при участии НАДФ.Н в β-оксигирную кислоту. Затем оксигирная кислота подвергается дегидратации с образованием производного α-, β- или Δ^{2,3}-ненасыщенной жирной кислоты, которое в свою очередь восстанавливается второй молекулой НАДФ.Н до остатка насыщенной жирной кислоты (рис. 4—8). Этот цикл повторяется еще 6 раз и завершается образованием молекулы пальмитиновой кислоты.

Следует отметить, что ацетильные промежуточные продукты в этом процессе представляют собой не тиоэфиры КоА, как при окислении жирных кислот, а тиоэфиры низкомолекулярного белка, называемого ацилпереносящим белком (АПБ). Этот белок может образовывать комплекс или комплексы с одним или несколькими из 6 других ферментных белков, необходимых для синтеза пальмитиновой кислоты. В клетках дрожжей все 7 белков мультиэнзимного синтетазного комплекса, катализирующего синтез жирных кислот, тесно связаны друг с другом и имеют общую молекулярную массу 2 300 000. При диссоциации этого комплекса на индивидуальные пептидные субъединицы последние лишаются ферментативной активности.

Синтез малонил-КоА. Малонил-КоА, непосредственный предшественник 14-го и 16-го атомов углерода молекулы пальмитиновой кислоты, образуется из цитоплазматического ацетил-КоА¹ и

¹ Ацетил-КоА образуется в митохондриях, переносчиком его в цитоплазму служит цитрат.

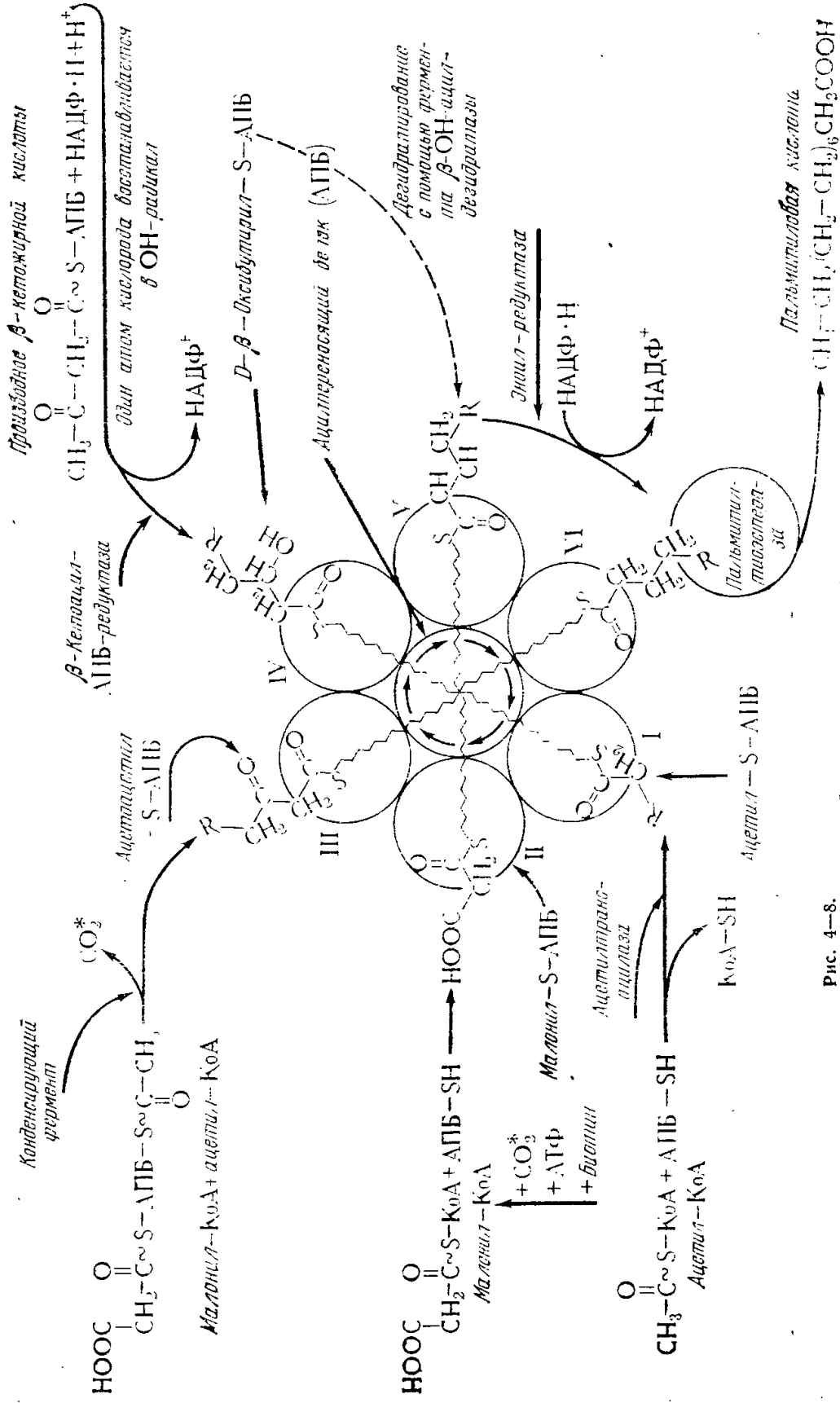
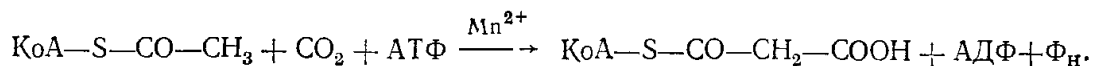


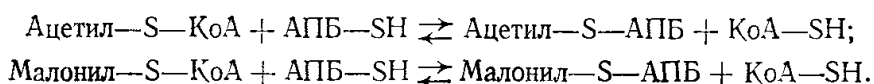
Рис. 4-8.
 Биосинтез жирных кислот с участием мультиэнзимной системы у дрожжей:
 I — перенос ацильной группы; II — перенос малонильной группы; III — конденсация; IV — первое восстановление; V — дегидратация; VI — второе восстановление.

CO₂ под действием ацетил-КоА-карбоксилазы, катализирующей реакцию

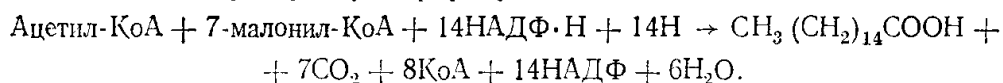


Фермент содержит в качестве простетической группы биотин. Этот фермент имеет регуляторные функции и тем самым лимитирует весь процесс синтеза жирных кислот. Положительными аллостерическими модуляторами оказались цитрат, изоцитрат, а также α -кетоглутарат.

АПБ принимает на свои тиоловые группы ацильные группы ацетил-КоА и малонил-КоА. Катализируется этот процесс ацетилтрансацилазой и малонилтрансацилазой:



Стадии синтеза жирных кислот. Происходит последовательное образование: 1) ацетил-КоА; 2) малонил-КоА (ацетил-КоА-карбоксилаза); 3) ацетоацетил-АПБ (тиолаза); 4) β -оксибутирил-S-АПБ (β -кетоацил-АПБ-редуктаза); 5) кротонил-S-АПБ или $\Delta^{2,3}$ -ненасыщенное ацильнопроизводное АПБ (β -кетоацил-АПБ-редуктаза); 6) бутирил-S-АПБ (кротонил-АПБ-редуктаза). Образованием бутирил-S-АПБ завершается первый из 7 циклов, в каждом из которых молекула малонил-S-АПБ присоединяется к карбоксильному концу растущей цепи жирной кислоты. Таким образом, синтетазная система ответственна за следующую суммарную реакцию:



ЭФИРЫ

Эфиры образуются при действии ферментов дрожжей. Даже в отсутствие интактных клеток происходит процесс эфиروобразования. Например, осуществлен синтез этилацетата (CH₃COOC₂H₅) бесклеточным препаратом дрожжей *Sacch. cerevisiae* в присутствии этанола и ацетил-КоА [232].

При повышении концентрации исходного суслу с 10 до 19,3% синтез этилацетата и изоамилацетата увеличился в 4—8 раз. Концентрация эфиров при дображивании увеличивается на 30—100% по сравнению с содержанием их в бражке на стадии главного брожения. Увеличение количества посевных дрожжей уменьшает содержание в бражке эфиров и в том числе этилацетата.

При повышении температуры брожения с 10 до 25°С количество этилацетата, например, в пиве, возрастает с 12 до 21 мг/л. При непрерывном способе брожения количество эфиров увеличивается. Максимальное количество эфиров образуется при ускоренных способах брожения с перемешиванием. Например, при повышении степени аэрации с 0,9 до 9,32 мг O₂ на 1 л суслу увеличивается содержание изобутилацетата с 11,3 до 17,8 мг/л, а изоамилацетата — с 1,90 до 2,80 мг/л, тогда как содержание этилацетата в этих же условиях, наоборот, снижается с 16,1 до 10,0 мг/л.

Эфиры являются положительными компонентами пива и вина. Только слишком высокая концентрация изоамилацетата в бражке может отрицательно влиять на качество продукта.

СЕРОСОДЕРЖАЩИЕ ВЕЩЕСТВА

Серосодержащие вещества образуются как метаболиты дрожжей. Например, меркаптаны образуются путем присоединения серы (H_2S) вместо кислорода; так из этанола получается этилмеркаптан (C_2H_5SH). Аналогичным путем образуется метилэтилмеркаптан и т. д. Количество меркаптанов в готовом продукте (пиво, вино) может варьировать в пределах от 4 до 56 мг/л. Механизм их образования связан с жизнедеятельностью дрожжей [230]. Так, например, при размножении дрожжей в сусле сернистых веществ образовалось около 200 мкг/л, а в тех же условиях культивирования клеток, но в присутствии в среде антибиотика актидинона, подавляющего рост и размножение, этих веществ было обнаружено лишь 20 мкг/л, т. е. в 10 раз меньше.

Меркаптаны являются летучими веществами, они обладают неприятным запахом. Образование CO_2 при брожении способствует их удалению из среды. Содержание H_2S , например, в пиве колеблется в пределах 3—15 мг/л. При интенсивном брожении и повышенной температуре количество H_2S увеличивается, особенно при наличии в среде ионов меди и цинка. При дображивании, т. е. достижении 75%-ной степени сбраживания, синтез серосодержащих веществ прекращается.

* * *

Итак, рассмотренные вторичные и побочные продукты метаболизма дрожжей относятся к летучим веществам: они принадлежат к 5 группам химических соединений, а именно: 1) альдегидам и их производным; 2) эфирам; 3) летучим кислотам; 4) высшим спиртам и 5) серосодержащим веществам. В результате диссимиляции сахара в процессе спиртового брожения образуются главные продукты — спирт и CO_2 — и вторичные — пировиноградная кислота, глицерин, ацетальдегид, другие кислоты. Побочные же продукты образуются не из сахара, а из других ингредиентов среды и главным образом аминокислот.

АМИНОКИСЛОТНЫЙ И БЕЛКОВЫЙ ОБМЕН ДРОЖЖЕЙ

Жизнедеятельность дрожжей, как и других микроорганизмов, связана с синтезом белка, одного из наиболее важных компонентов клетки. Более половины массы клетки приходится на долю белков. Без белков не может совершаться обмен веществ, так как для осуществления в клетке важнейших химических процессов необходимо прежде всего присутствие ферментов, которые также представляют собой белковые вещества.

Обмен веществ начинается с ассимиляции азотсодержащих соединений. Дрожжи усваивают лишь две формы азота: аммиачный и азот органических веществ. Из неорганических форм азота дрожжи эффективно используют в качестве источника азота сернистый и фосфорносернистый аммоний, а также аммиачные соли уксусной, молочной, яблочной, янтарной и других кислот.

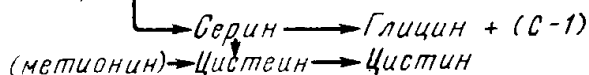
Питательная ценность различных аммиачных солей в значительной мере обуславливается изменением реакции среды вследствие накопления в субстрате соответствующей кислоты, освобождающейся при расщеплении соли. Следовательно, аммиак является ближайшим предшественником органического азота. Окисленные неорганические формы азота (нитраты, нитриты и др.), вероятно, всегда подвергаются предварительно восстановлению в аммиак. Первыми продуктами биологической ассимиляции азота являются аминокислоты.

БИОСИНТЕЗ АМИНОКИСЛОТ

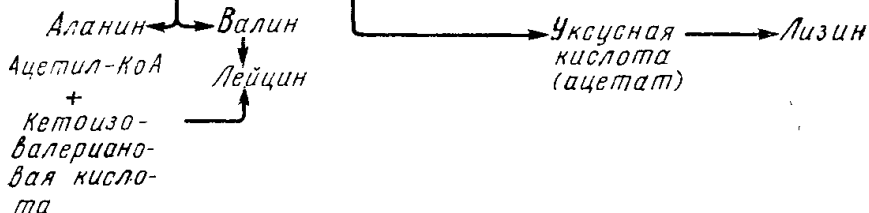
Дрожжевые клетки подобно автотрофным организмам способны синтезировать все аминокислоты, входящие в состав их белка, непосредственно за счет неорганических форм азота. В то же время дрожжи, как и все гетеротрофы и организмы, неспособные к фото- или хемосинтезу, в состоянии использовать в качестве источника углерода лишь органические соединения. Биосинтез аминокислот может идти только в результате диссимиляции углеродсодержащих соединений, а также за счет энергии, освобождающейся при этом в процессе дыхания и брожения.

Таким образом, дрожжевые клетки могут синтезировать аминокислоты и белки из неорганического азота и органического угле-

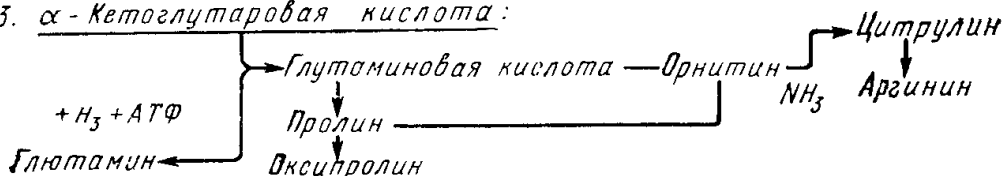
1. 3-Фосфоглицериновая кислота:



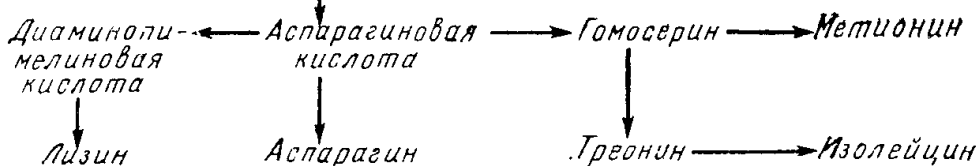
2. Пировиноградная кислота:



3. α-Кетоглутаровая кислота:



4. Щавелевоуксусная (или fumarовая) кислота:



5. Пентозы и другие соединения:

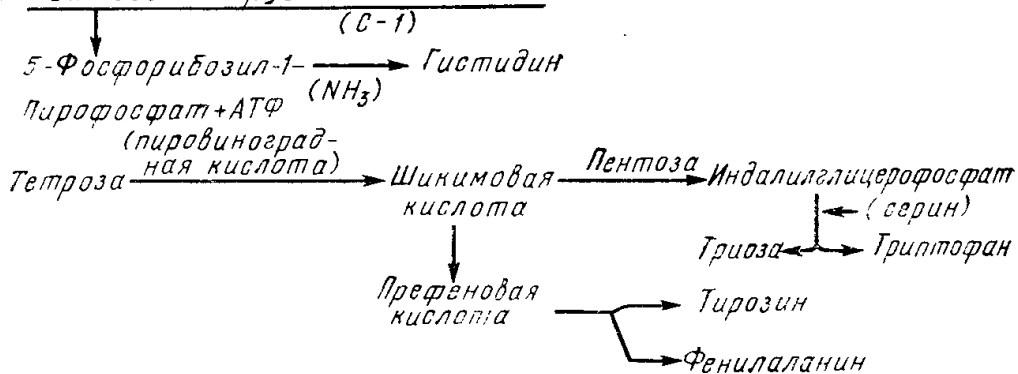


Рис. 5-1. Предшественники аминокислот, образующиеся в результате анаэробного или аэробного распада углеродсодержащего соединения.

рода, следовательно, азотный и углеводный обмен взаимосвязаны. Так, например, глюкоза при анаэробном или аэробном окислении служит не только источником энергии, необходимой для жизнедеятельности дрожжевой клетки, но и источником различных соеди-

нений, образующихся в качестве промежуточных продуктов обмена веществ и используемых клеткой для многочисленных синтетических реакций.

Следовательно, предшественником для биосинтеза аминокислот является промежуточное соединение хорошо известных цепей метаболизма углеводов: гликолитического, пентозофосфатного и цикла ди- и трикарбоновых кислот. Взаимосвязь между различными путями биосинтеза аминокислот и основными путями метаболизма углеводов показана на схеме (рис. 5—1).

Пути биосинтеза аминокислот обычно отличаются от путей их распада. Аминокислоты служат не только строительными блоками при синтезе белков, но и предшественниками многих биомолекул, выполняющих различные специализированные функции.

Биосинтез большинства аминокислот постоянно регулируется по принципу обратной связи благодаря функционированию регуляторных ферментов. Более того, регулируется также синтез ферментов, катализирующих образование аминокислот: в условиях, когда клетки обильно снабжаются аминокислотами из экзогенных источников, синтез этих ферментов может подавляться (репрессироваться). Обе эти формы регуляции служат выражением характерной экономичности синтеза и использования аминокислот [110, 111, 141].

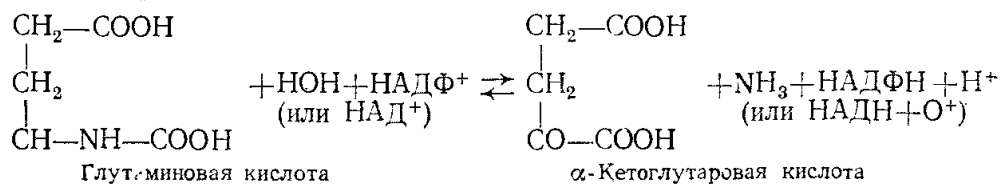
Итак, биосинтез аминокислот как основных структурных единиц белка складывается из многих реакций и в первую очередь из восстановительного аминирования некоторых кетокислот с образованием соответствующих аминокислот.

Поэтому одно из главных звеньев ассимиляции минеральных форм азота представляет собой реакция восстановительного аминирования соответствующих кетокислот. В связи с этим ключевым этапом азотного обмена дрожжей является биосинтез глутаминовой и аспарагиновой кислот, а также аланина и образование при этом α -аминогрупп непосредственно из аммиака.

Катализируют эти реакции ферменты, называемые дегидрогеназами аминокислот. Из них важнейшими ферментами азотного обмена являются глутаматдегидрогеназа, аспартатдегидрогеназа и аланиндегидрогеназа.

ГЛУТАМИНОВАЯ КИСЛОТА

Синтез глутаминовой кислоты из кетоглутаровой кислоты как основного продукта диссимиляции сахара является наиболее широко распространенной ферментативной реакцией аминирования. Фермент глутаматдегидрогеназа (ГДГ) катализирует следующую обратимую реакцию:



Следовательно, ГДГ катализирует как реакцию окислительного дезаминирования глутаминовой кислоты, так и реакцию восстановительного аминирования α -кетоглутаровой кислоты. Как следует из уравнения, *L*-глутаматдегидрогеназа может использовать в качестве акцептора электронов как НАД⁺, так и НАДФ⁺.

В приведенной выше реакции каждому из субстратов — глутамату и α -кетоглутарату, а также каждому из кофакторов — окисленному и восстановленному НАД — соответствует своя константа Михаэлиса — K_m . В этом случае кофермент НАД формально ведет себя как субстрат.

Бесклеточные экстракты, полученные из различных дрожжей, обладают активностью ГДГ как в присутствии НАД (НАДН₂), так и в присутствии НАДФ (НАДФН₂). При этом активность ГДГ в присутствии НАД в основном выше в реакции дезаминирования, а в присутствии НАДФ — в реакции аминирования (табл. 10).

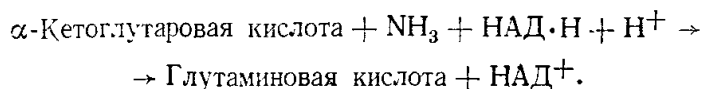
Таблица 10

Активность глутаматдегидрогеназы в различных дрожжах
(по Третьяковой, 1975)

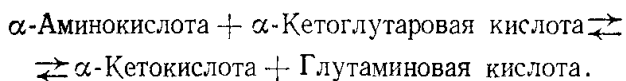
Дрожжи	Удельная активность, ед./мг белка			
	НАД—ГДГ · 10 ³		НАДФ—ГДГ · 10 ³	
	с НАД	с НАДН ₂	с НАДФ	с НАДФН
Спиртовые <i>Sacch. cerevisiae</i> , раса XII	14,5	13,3	12,4	113,0
Пивные <i>Sacch. carlsbergensis</i> , штамм 11	75,4	22,6	22,7	126,5
Хлебопекарные прессованные <i>Sacch. cerevisiae</i> 14	35,5	29,0	39,8	189,0
Хлебопекарные <i>Sacch. cerevisiae</i> , раса Томская-7	29,4	34,6	25,9	135,0
Винные <i>Sacch. vini</i> , раса Прикумская 80/9	43,4	16,6	33,3	151,0
Шампанские <i>Sacch. vini</i> , раса Московская	76,5	17,4	12,1	89,1
Кормовые <i>Candida tropicalis</i> , раса Краснодарская-14	4,0	13,0	8,0	246,0

В кормовых и спиртовых дрожжах показано наличие двух специфических ГДГ: НАД- и НАДФ-зависимые, тогда как в клетках шампанских, хлебопекарных, пивных и винных дрожжей отмечается наиболее высокая активность НАДФ—ГДГ. Только для одной аминокислоты, а именно для глутаминовой кислоты, существует столь специфичная и активная дегидрогеназа. Глутаматдегидрогеназа является аллостерическим ферментом. Активность его подавляется такими эффекторами, как АТФ, ГТФ и НАД · Н, и повышается в присутствии АДФ и некоторых аминокислот.

В ходе катаболизма аминокислот образующийся аммиак может реутилизироваться в результате реакции, катализируемой глутаматдегидрогеназой:



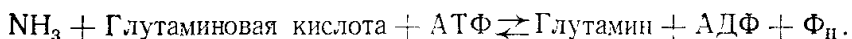
Равновесие этой реакции сильно смещено вправо, поэтому наличие аммиака способствует удалению α -кетоглутаровой кислоты из цикла трикарбоновых кислот. На определенной стадии катаболизма по меньшей мере у 11 аминокислот α -аминогруппа отщепляется в результате ферментативной реакции трансминирования. Известны две наиболее важные трансминазы, а именно аланин-трансминаза, как будет показано ниже, и глутаматтрансминаза, катализирующая реакцию



Реакции, катализируемые трансминазами, легкообратимы, и их константы равновесия обычно близки к единице [128, 141].

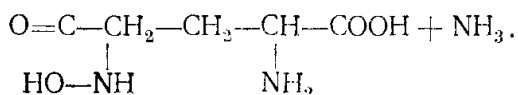
Итак, образование глутаминовой кислоты имеет фундаментальное значение в биосинтезе всех аминокислот у всех организмов, поскольку эта реакция служит главным, если не единственным, значимым путем образования α -аминогруппы непосредственно из аммиака. Трансминирование α -кетокислот с использованием глутаминовой кислоты в качестве донора аминогруппы представляет собой основной путь введения α -аминогруппы при биосинтезе большинства других аминокислот.

Образование глутаминна из глутаминовой кислоты катализируется глутаминсинтетазой:



Эта реакция довольно сложна и включает две или больше промежуточные стадии. Было показано, что γ -глутамилфосфат функционирует как высокоэнергетический промежуточный продукт, связанный с ферментом [141].

Наряду с синтетазной активностью глутаминсинтетаза обладает и трансферазной активностью, т. е. катализирует реакцию между глутамином и гидроксиламином с образованием γ -глутамингидроксамовой кислоты:



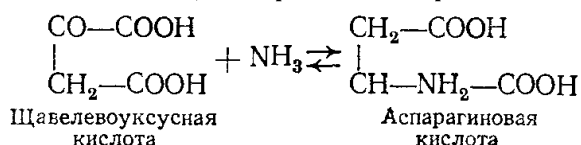
Глутаминсинтетаза является сильно кислотным белком с изоэлектрической точкой рН 4,9 [203]. Двухвалентные катионы Mg^{2+} , Mn^{2+} и Ca^{2+} являются не только активаторами фермента, но и стабилизаторами его активной конформации [129]. Глутамин сам непосредственно регулирует свой синтез, являясь мощным ретрорегулятором глутаминсинтетазы. Абсолютное количество глутаминна в клетках дрожжей хотя и невелико [213], однако роль его как донора аминогрупп для многих метаболитических продуктов очень велика.

Природа двухвалентного катиона существенно влияет на свойства глутаминсинтетазы. Фермент, вероятно, имеет различную конформацию в присутствии различных двухвалентных катионов. Находясь в определенном конформационном состоянии, глутаминсинтетаза имеет и определенные свойства, в частности определенное расположение и экранированность SH-групп, которые могут участвовать в создании и поддержании третичной структуры, а также каталитической функции фермента [129, 182]. Установлено, что *p*-хлормеркурибензоат оказывает ингибирующее воздействие на глутаминсинтетазу [214].

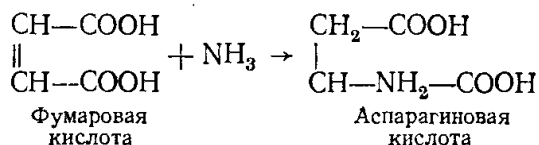
АСПАРАГИНОВАЯ КИСЛОТА

Признаются два пути биосинтеза аспарагиновой кислоты в присутствии аммиака. Один из них предусматривает прямое ами-

нирование щавелевоуксусной кислоты при участии дегидрогеназы аспарагиновой кислоты (аспартатдегидрогеназы):



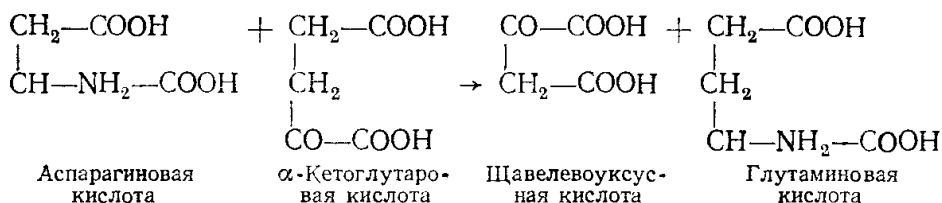
Второй путь связан с аминированием фумаровой кислоты под действием аспартазы (аспартатаммиаклиазы):



Аспартазная реакция является важным процессом фиксации неорганического азота, происходящим к тому же в аэробных условиях при pH 7,0—7,5.

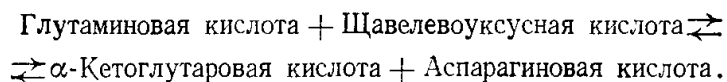
У многих микроорганизмов аммиак отщепляется от аспарагиновой кислоты непосредственно, под действием аспартазы, что приводит снова к образованию фумаровой кислоты.

Образующаяся аспарагиновая кислота может вступать в реакцию трансаминирования с α -кетоглутаровой кислотой, в результате чего получается щавелевоуксусная кислота:



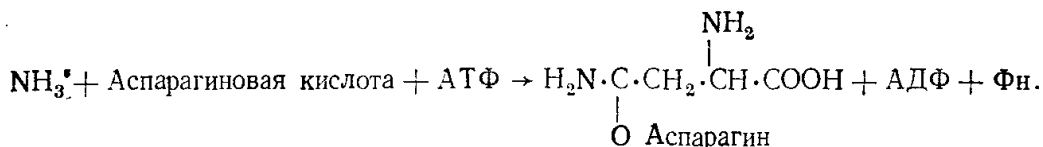
Таким образом, все четыре атома углерода аспарагиновой кислоты могут включаться в цикл трикарбоновых кислот.

Кроме того, у микроорганизмов аспарагиновая кислота образуется путем трансаминирования щавелевоуксусной кислоты:



Однако чаще всего аспарагиновая кислота образуется путем восстановительного аминирования, как это было указано ранее.

Аспарагиновая кислота является прямым предшественником аспарагина. Чаще всего аспарагин образуется в результате реакции, сходной с реакцией, катализируемой глутаминсинтетазой:



Не исключена и альтернативная реакция, в которой амидная аминогруппа глутаминна переносится на аспарагиновую кислоту:

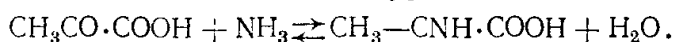


Аспарагиновая кислота является предшественником пиримидинов (урацила, тимина и цитозина), входящих в состав нуклеотидов.

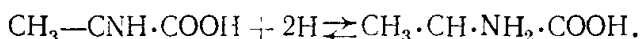
АЛАНИН

Наряду с глутаминовой и аспарагиновой кислотами, первыми продуктами связывания ассимилируемого аммиака, исключительную роль в этом процессе играет аланин.

Эта аминокислота образуется в результате восстановительного аминирования пировиноградной кислоты аммиаком, причем реакция протекает в две стадии и катализируется ферментом аланиндегидрогеназой. На первом этапе из NH_3 и кетокислоты образуются иминокислота и вода согласно уравнению



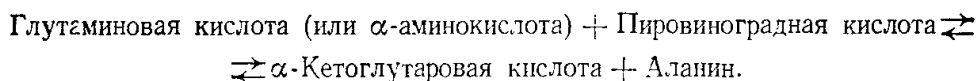
На втором этапе иминокислота восстанавливается НАД· H_2 с образованием аланина:



Образование аланина путем аминирования пировиноградной кислоты было обнаружено у ряда микроорганизмов, в том числе и у дрожжей.

Фермент аланиндегидрогеназа был впервые выделен из *Bacillus subtilis*, лишённого глутаматдегидрогеназы. У дрожжей действие аланиндегидрогеназы сопряжено как с НАД, так и с НАДФ. Таким образом, следует признать две формы аланиндегидрогеназы, нуждающиеся для проявления активности в присутствии как НАД, так и НАДФ.

Возможность синтеза аланина из пировиноградной кислоты и NH_3 дрожжами подтверждается многими исследователями. В частности, он образуется дрожжами в процессе спиртового брожения, наблюдался синтез аланина при инкубации суспензии азотом дрожжей *Torulopsis utilis* в среде с сульфатом аммония в отсутствие сахара и при аэрировании. Образование аланина в этих условиях объясняется реакцией переаминирования между первично образовавшейся глутаминовой кислотой и пируватом дрожжевых клеток согласно уравнению



Катализируется эта реакция ферментом аланинтрансферазой.

Введение фосфата аммония в суспензию дрожжей в среде, не содержащей сахара, вызывало интенсивный синтез аминокислот, а затем и белков. При этом синтетические процессы сопровождались быстрым увеличением потребления O_2 и распадом внутриклеточных углеводов, главным образом гликогена и маннана. Образование аминокислот в этих условиях может идти как путем прямого восстановительного аминирования кетокислот, так и путем реакции переаминирования с другими аминокислотами. Хлебопекарные дрожжи, суспендированные в растворе фосфата аммония, интен-

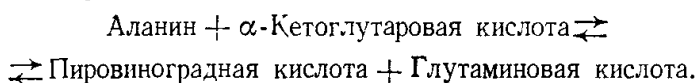
сивно синтезируют аланин, причем образующаяся при этом пировиноградная кислота обеспечивает связывание аммиака, вследствие чего добавление этой кислоты извне не усиливает процесса синтеза аланина. Установлено, что в присутствии пирувата дрожжи образуют не только аланин, но и другие аминокислоты: гистидин, аспарагиновую кислоту, серин, гликокол, глутаминовую кислоту, валин, аминокислотную кислоту, лейцин.

Итак, пировиноградная, α -кетоглутаровая, фумаровая и щавелевоуксусная кислоты являются важными продуктами превращения углеводов дрожжевых клеток и других организмов. Как отмечалось ранее, в первичной ассимиляции аммиака обычно принимают участие *L*-глутаматдегидрогеназа и *L*-аланиндегидрогеназа, катализирующие восстановительное аминирование α -кетокислот. Третья первичная реакция аминирования представляет собой реакцию, обратную дезаминированию, под действием тонко специфической аспартазы, катализирующей обратимое присоединение иона аммония по двойной связи фумаровой кислоты, ведущей к образованию α -аспарагиновой кислоты. Эта реакция с помощью того же фермента аспартазы протекает в обратном направлении, т. е. из аспарагиновой кислоты образуется фумаровая кислота с освобождением NH_3 . Наконец, аммиак при участии глутаминсинтетазы через АТФ-зависимую реакцию используется для синтеза глутамин. Реакции образования аминокислот путем прямого аминирования кетокислот аммиаком подтверждают непосредственную связь между обменом углеводов и обменом аминокислот и белков.

Все остальные аминокислоты получают свою аминогруппу в результате переаминирования с одной из «первичных» аминокислот. Исходным материалом, или углеродным «скелетом», для синтеза аминокислот служат промежуточные продукты обмена: пируват, α -кетоглутарат, оксалоацетат или фумарат, эритрозо-4-фосфат, рибозо-5-фосфат и АТФ. В большинстве случаев аминогруппа вводится только на последнем этапе синтеза путем переаминирования. Эта реакция катализируется трансаминазами.

Наряду с дегидрогеназами, катализирующими аминирование соответствующих кетокислот, важную роль в азотном обмене играют и ферменты трансаминазы. В результате трансаминазных реакций суммарного дезаминирования не происходит, поскольку дезаминирование α -аминокислоты сопровождается аминированием α -кетокислоты, выполняющей роль акцептора аминогрупп. В итоге трансаминирования различных аминокислот все их аминогруппы собираются в общий фонд клетки в виде одной аминокислоты, обычно в виде глутаминовой кислоты, а иногда в виде аспарагиновой кислоты или аланина. Например, аланинтрансаминаза может накапливать в форме аланина аминогруппы из различных аминокислот, если только в наличии имеется пировиноградная кислота.

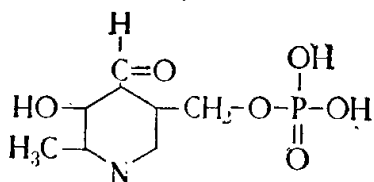
Глутаматтрансаминаза также обеспечивает накопление аминогрупп в форме глутаминовой кислоты. Если в клетках доминирует аланинтрансаминаза и α -аминогруппы накапливаются в виде аланина, то в дальнейшем перенос этих аминогрупп от аланина может осуществляться не на пировиноградную кислоту, а на α -кетоглутаровую кислоту, причем эта реакция катализируется специфической аланин-глутаматтрансаминазой:



Таким образом, конечным акцептором аминогрупп большинства аминокислот является α -кетоглутаровая кислота, которая служит каналом для передачи аминогрупп в заключительную серию реакций, обеспечивающих образование конечных продуктов азотистого обмена.

Трансаминазы содержатся как в митохондриях, так и в цитоплазме, причем эти формы ферментов различаются по своим физико-химическим свойствам. В то же время процессы дезаминирования аминокислот протекают в клетке координированно. Считают, что накопление аминогрупп в форме глутаминовой кислоты происходит в цитоплазме, после чего эта аминокислота попадает внутрь митохондрий. В матриксе митохондрий содержится специфическая аспартатглютаматтрансаминаза.

Полагают, что все трансаминазы содержат один и тот же кофермент, а именно пиридоксальфосфат, производное витамина В₆. Комплекс пиридоксальфосфат — фермент принимает аминогруппу от аминокислоты, образуя уже комплекс пиридоксаминфосфатфермент.



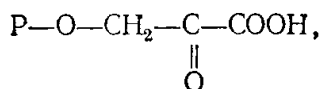
Таким образом, непрерывно переходя из альдегидной формы в аминированную форму и обратно, кофермент при этом действует как переносчик аминогрупп от аминокислоты к кетокислоте.

ПРОЛИН

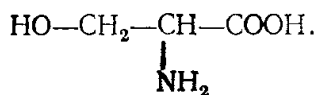
У микроорганизмов и в животных клетках глутаминовая кислота и пролин взаимопревращаются. При распаде, например, глутаминовой кислоты, глутаминна и пролина образуется α -кетоглутарат. Пролин действует как аллостерический ингибитор, выключающий первый этап его биосинтеза, т. е. превращение глутаминовой кислоты в γ -полуальдегид глутаминовой кислоты [128, 141, 110].

СЕРИН И ГЛИЦИН

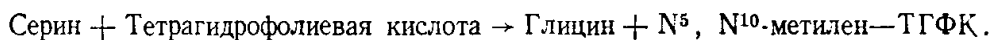
Как показано на схеме, серин является предшественником глицина. Главный путь образования серина начинается с 3-фосфоглицериновой кислоты, промежуточного продукта спиртового брожения. На первой стадии α -гидроксильная группа 3-фосфоглицериновой кислоты окисляется НАД⁺ с образованием 3-фосфооксипириновинной кислоты



В результате трансаминирования с использованием глутаминовой кислоты в качестве донора аминогруппы образуется 3-фосфосерин [P—O—CH₂—CH(NH₂)—COOH], который гидролизуется серинфосфатазой с образованием серина



При образовании глицина от серина должен отщепляться β -углеродный атом. Перенос одноуглеродного фрагмента осуществляется с помощью фолиевой или птероилглутаминовой кислоты. Сначала этот витамин превращается в активную форму — кофермент тетрагидрофолиевую кислоту. И уже тетрагидрофолиевая кислота (ТГФК) служит акцептором β -углеродного атома, который отщепляется от серина в результате реакции, происходящей с участием пиридоксальфосфата (производного витамина В₆) и ведущей к образованию глицерина. Атом углерода, отщепляющийся от молекулы серина, образует метиленовый мостик между атомами азота тетрагидрофолиевой кислоты в положениях 5 и 10 [141]. Суммарная реакция этого процесса изображена ниже:

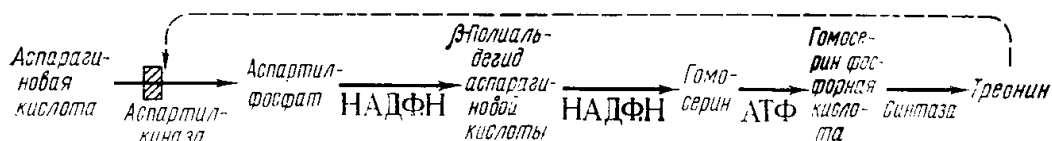


Одноуглеродный фрагмент, отщепляющийся от серина, может переноситься в форме метильной группы к различным акцепторам.

МЕТИОНИН И ТРЕОНИН

Считают, что пути биосинтеза незаменимых аминокислот (метионин, треонин, лизин, изолейцин, валин, лейцин и др.) являются более сложными и включают от 5 до 15 стадий, тогда как пути биосинтеза заменимых аминокислот (глутаминовая и аспарагиновая кислоты, аланин, пролин, тирозин, серин, глицин и др.) протекают менее чем в 5 стадий. Кроме того, промежуточные продукты биосинтеза незаменимых аминокислот служат предшественниками многих других типов биомолекул.

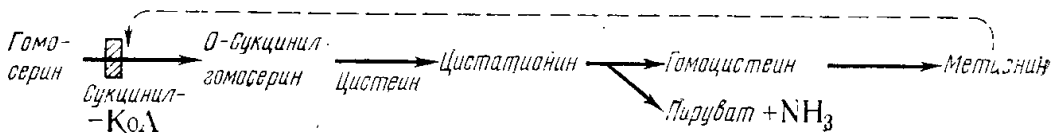
Углеродные скелеты метионина и треонина образуются из гомосерина $[\text{CH}_2(\text{OH})-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}]$, который синтезируется в результате превращения аспарагиновой кислоты. Последовательный ряд реакций включает:



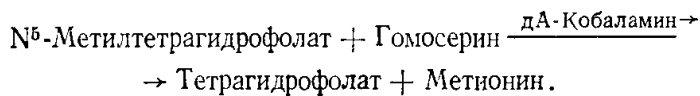
Механизм восстановления β -карбоксовой группы аспарагиновой кислоты в альдегидную группу напоминает реакции восстановления 1,3-дифосфоглицериновой кислоты в глицеральдегид-3-фосфат при гликолизе. Образовавшийся гомосерин фосфорилируется далее за счет АТФ до гомосеринфосфата, который затем превращается в треонин в результате реакции, катализируемой пиридоксальзависимой треонинсинтазой. На треонинсинтазной стадии процесса α -аминогруппа гомосеринфосфата связывается с альдегидной группой пиридоксальфосфата фермента, вероятно, в виде шиффова основания. Конечный продукт, треонин, является ингибиторным модулятором первого фермента системы — аспартилки-

назы (показано прерывистой стрелкой), которая представляет собой регуляторный фермент.

Преобразование гомосерина в метионин начинается с ферментативного образования *O*-сукцинилгомосерина в результате переноса сукцинильной группировки сукцинил-КоА. Затем из *O*-сукцинилгомосерина и цистеина образуется цистатионин, расщепляющийся затем на гомоцистеин, пировиноградную кислоту и NH₃. Цистатионин может расщепляться двумя способами, т. е. с любой стороны от атома серы, в частности, он может служить промежуточным продуктом в процессе превращения цистенна в метионин, как это показано схематично:



При этом атом серы метионина происходит из цистенна, а углеродная цепь — из гомосерина; метилирование гомоцистеина до метионина осуществляется путем переноса метильной группы от N⁵-метилтетрагидрофолата:



Для этой реакции необходим дезоксиаденозилкобаламинкофермент, содержащий витамин B₁₂.

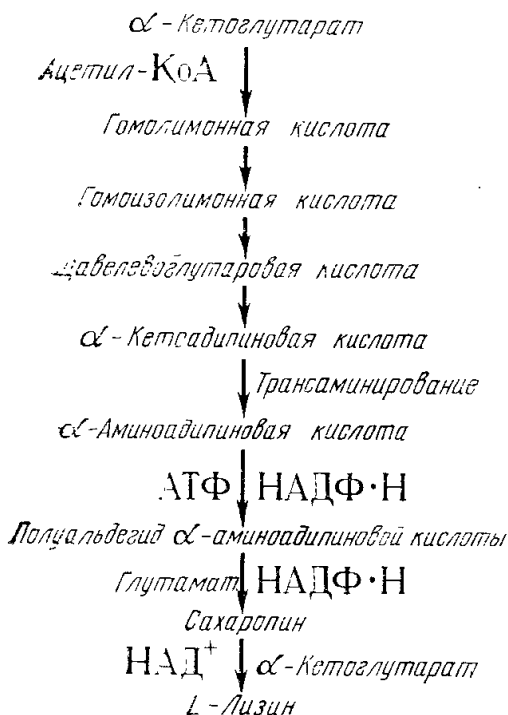
ЛИЗИН

Как показано на схеме (см. рис. 5—1), лизин может образоваться как через диаминопимелиновую кислоту (у бактерий), так и через α -аминоадипиновую кислоту (у грибов). Схематично два пути биосинтеза лизина представлены на с. 153.

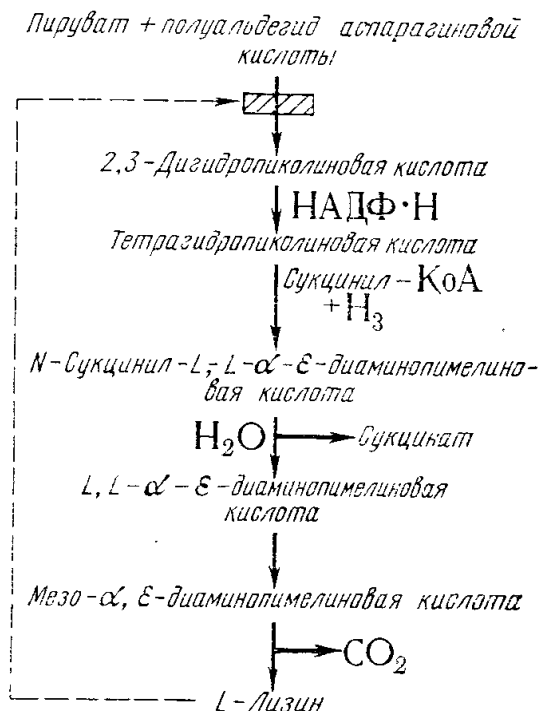
Путь биосинтеза лизина через диаминопимелиновую кислоту начинается с альдольной конденсации полуальдегида аспарагиновой кислоты и пировата с потерей воды. В результате образуется циклический промежуточный продукт — 2,3-дигидропиколиновая кислота. На более поздней стадии образуется *L*, *L*- α -диаминопимелиновая кислота, которая превращается в мезо-форму и затем декарбоксилируется с образованием *L*-лизина.

Путь биосинтеза лизина через аминокадипиновую кислоту начинается с ацетил-КоА и α -кетоглутарата. В качестве промежуточного продукта образуется гомоизолимонная кислота, далее α -аминоадипиновая кислота, восстанавливаемая в конечном счете в *L*-лизин.

Путь через α -аминоадипиновую кислоту



Путь через диаминопимелиновую кислоту



ИЗОЛЕЙЦИН, ВАЛИН, ЛЕЙЦИН

Биосинтез этих трех аминокислот с разветвленной алифатической цепью начинается с пирувата. Пути биосинтеза изолейцина и валина очень сходны между собой. Оба они начинаются с образования активной ацетальдегидной группировки из пирувата, связанного с тиаминпирофосфатом. Активный ацетальдегид присоединяется к кетокислоте и образуются соответствующие α -ацето- α -оксикислоты, которые далее восстанавливаются, что сопровождается миграцией метильной или этильной группы (рис. 5—2).

Образование лейцина начинается конденсацией α -кетоизовалериановой кислоты (которая является предшественником и валина) и ацетил-КоА, происходящего из пирувата, так что образуется α -изопропилаблочная кислота. Последующие стадии аналогичны реакциям образования α -кетоглутаровой кислоты из лимонной в цикле трикарбонных кислот.

ГИСТИДИН

Биосинтез гистидина включает несколько необычных и сложных реакций. Особенно необычна 1-я стадия, в которой 5-фосфорибозилпирофосфат реагирует с АТФ, в результате чего пирофосфатная группировка отщепляется, а 5-фосфорибозил образует N-гликозидную связь с первым атомом азота пуринового кольца АТФ. Трехуглеродная боковая цепь и 2 атома углерода имидазольного кольца гистидина возникают из 5-фосфорибозильной ча-

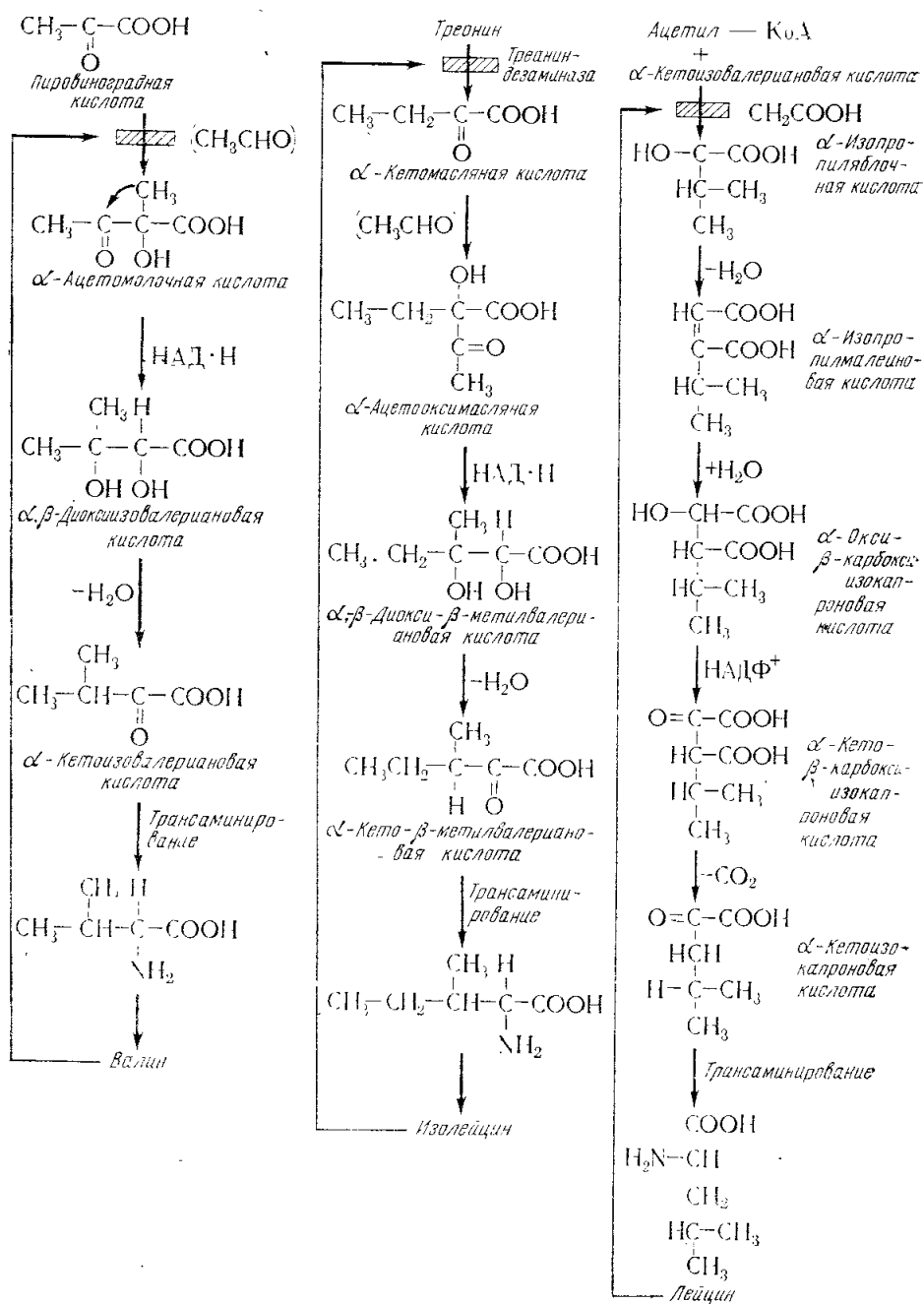


Рис. 5—2.

Пути биосинтеза валина, изолейцина и лейцина (механизм ингибирования по принципу обратной связи показан стрелкой, а место ингибирования — прямоугольником).

сти. Один из фрагментов — $\text{N}=\text{C}$ -имидазольного кольца происходит из аденина АТФ, а другой атом кольца — из амидного азота глутамина (рис. 5—3). Фрагмент кольца аденина служит предшественником пуринов. Следовательно, биосинтез гистидина тесно сопряжен с биосинтезом пуринового кольца. Кроме того, карбоксильная группа гистидина образуется путем окисления соответствующего α -аминоспирта.

Гексозомонофосфатный, или
аллтомиический, путь

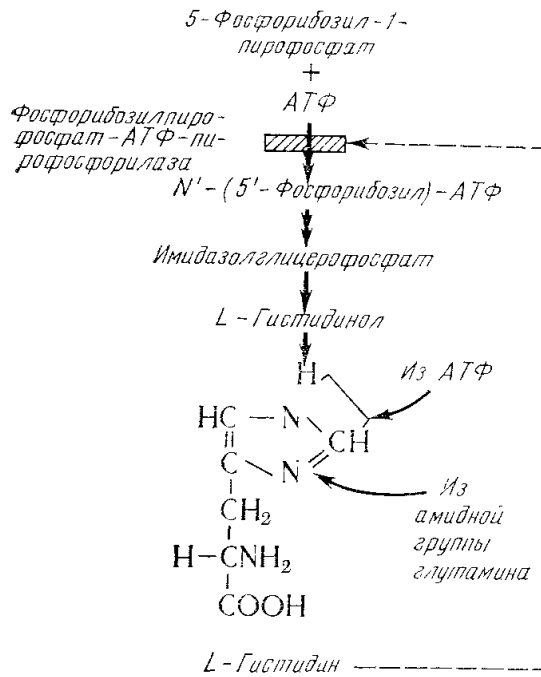


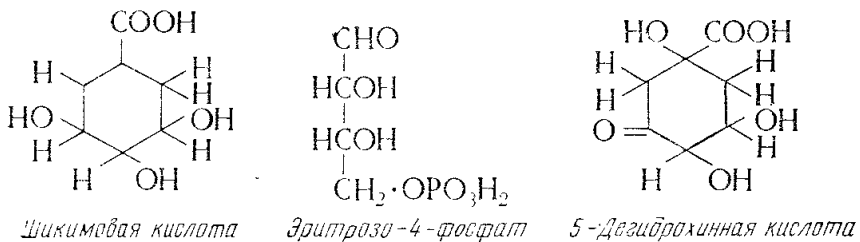
Рис. 5—3.

Биосинтез гистидина (механизм ингибирования по принципу обратной связи показан прерывистой стрелкой, а место ингибирования — прямоугольником).

Фермент 1-й степени реакции ингибируется конечным продуктом — гистидином, при этом репрессируются и все остальные ферменты пути биосинтеза гистидина.

ФЕНИЛАЛАНИН, ТРИПТОФАН И ТИРОЗИН

Механизм образования ароматических колец основан на использовании шикимовой кислоты.



Через шикимовую кислоту образуется лигнин, кофермент Q, пластохинон. В свою очередь она образуется из фосфорилированного четырехуглеродного сахара — эритрозо-4-фосфата, который, реагируя с фосфоенолпируватом, дает фосфорилированную семиуглеродную кетосахарную кислоту, циклизирующуюся в 5-дегидрохинную кислоту, которая превращается в шикимовую, а затем в хоризмовую кислоту. Из хоризмовой кислоты образуются, с од-

Гексозомонофосфатный, или
алатамический, путь

D-Эритрозо-4-фосфат

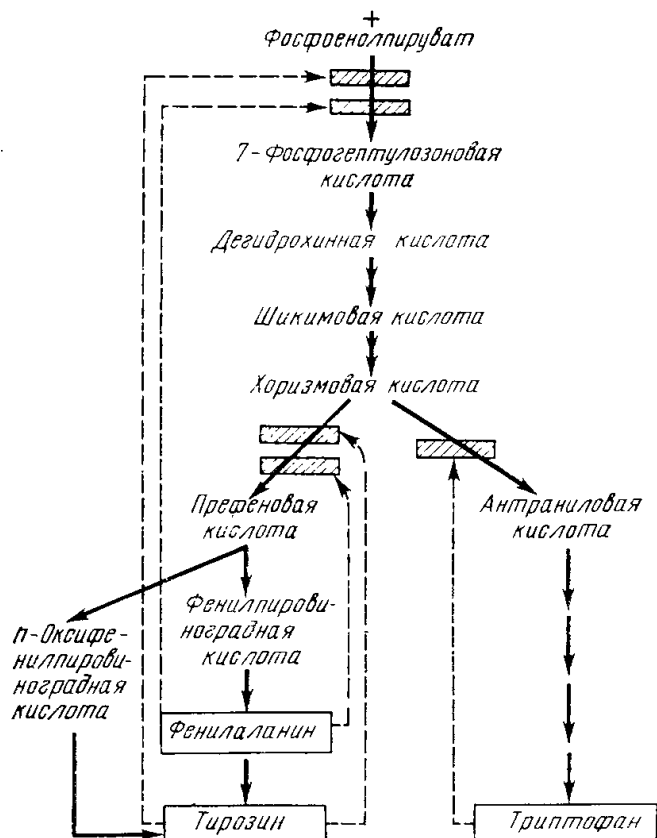
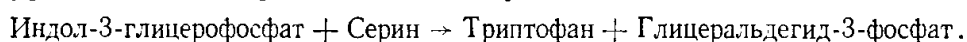


Рис. 5—4.
Регуляция биосинтеза ароматических аминокислот по принципу обратной связи.

ной стороны, антраниловая, а с другой — префеновая. Из префеновой кислоты ароматические продукты могут образовываться двумя способами: 1) в результате дегидрирования и одновременного декарбоксилирования; при этом образуется предшественник тирозина — *n*-оксифенилпировиноградная кислота; 2) путем дегидрирования и декарбоксилирования; при этом образуется предшественник фенилаланина — фенилпировиноградная кислота (рис. 5—4).

Конечная стадия образования триптофана катализируется триптофансинтазой, являющейся пиридоксальфосфатзависимым ферментом с молекулярной массой около 135 000; фермент получен в кристаллической форме; он катализирует реакцию, суммарное уравнение которой имеет следующий вид:



На 1-й стадии индол остается связанным с активным центром фермента; на 2-й стадии ферментный комплекс взаимодействует с серином, в результате чего образуется триптофан. Молекула триптофансинтазы содержит 4 полипептидные цепи (две α -цепи и две β -цепи), которые удается разделить. Каждая цепь в отдельности

катализирует соответствующие реакции, но с низкой скоростью. Если смешать α - и β -цепи, то скорость реакций возрастает. Расшифрована аминокислотная последовательность этих цепей.

РЕГУЛЯЦИЯ БИОСИНТЕЗА АМИНОКИСЛОТ

Наиболее важным и «тонким» механизмом регуляции биосинтеза аминокислот является ингибирование по типу обратной связи, т. е. подавление первого фермента в цепи реакций конечным продуктом всей последовательности реакций. Первая реакция, которая обычно необратима, катализируется аллостерическим ферментом. Аллостерическое ингибирование ферментативной активности проявляется очень быстро и обеспечивает гибкое изменение скорости биосинтеза аминокислот. Регуляция с помощью аллостерических ферментов позволяет микробной клетке всегда располагать внутриклеточным запасом аминокислот. В настоящем разделе было отмечено ингибирование треониндезаминазы изолейцином (см. рис. 5—2); фосфорибозилпирофосфат-АТФ-пирофосфорилазы — гистидином (см. рис. 5—3); аспартилкиназы — треонином; сукцинил-КоА — метионином и т. д.

Второй, более «грубый» тип регуляторных механизмов связан с генетической репрессией и дерепрессией синтеза ферментов. Этот тип регуляции достигается изменением скорости транскрипции ДНК. Хотя репрессии и дерепрессии очень важны, они протекают относительно медленно по сравнению с процессами ингибирования регуляторных ферментов по принципу обратной связи. В связи с этим основное назначение репрессии синтеза ферментов состоит, по-видимому, не в регуляции скорости синтеза данного продукта, а в обеспечении максимальной экономии использования аминокислот и энергии путем ограничения синтеза неиспользуемых ферментов.

СВОБОДНЫЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫЕ АМИНОКИСЛОТЫ

В дрожжевых клетках, плесневых грибах и других микроорганизмах постоянно содержатся свободные внутриклеточные аминокислоты, причем количество их заметно меняется и всецело зависит от жизнедеятельности организма, определяемой как фазами роста, так и условиями культивирования. Это можно иллюстрировать результатами опыта, в котором дрожжи размножались на синтетической среде, содержащей в качестве источника азота аминокислоты. При этом учитывалось размножение клеток и прирост биомассы, определяемой по сухой массе (табл. 11 и 12).

Данные табл. 11 подтверждают резкие изменения в количественном содержании свободных внутриклеточных аминокислот в различные фазы роста дрожжевых клеток. Если посевные дрожжи содержат 2,14% свободных аминокислот на массу сухой биомассы, то клетки, находящиеся в экспоненциальной фазе роста, содержат свободных аминокислот, извлекаемых этиловым спиртом, уже

Таблица 11

Изменение содержания свободных внутриклеточных аминокислот у дрожжей
Sacch. cerevisiae, раса XII в процессе их роста
 (в % на массу сухой биомассы) [110]

Аминокислоты	Продолжительность роста, ч				
	0	3	6	24	72
Аланин	0,60	0,58	0,64	0,63	0,56
Аргинин	0,16	0,31	0,23	0,17	0,11
Глутаминовая	0,60	1,31	0,95	0,65	0,58
Лейцин	0,18	0,39	0,25	0,17	0,19
Тирозин	0,11	0,87	0,16	0,10	0,14
Фенилаланин	0,10	0,26	0,15	0,09	0,13
Валин + метионин	0,10	0,17	0,13	0,09	0,08
Серин + гликокол	0,13	0,20	0,12	0,12	0,05
Лизин + гистидин	0,16	0,26	0,17	0,16	0,07
Сумма	2,14	4,35	2,80	2,18	1,91

Примечание. Количество клеток варьировало по фазам роста от 12 до 95 млн./мл, а содержание биомассы — от 100 до 698 мг/100 мл.

Таблица 12

Изменение содержания свободных внутриклеточных аминокислот у *Asp. flavus* 74
 (в % на массу сухой биомассы) [67]

Аминокислоты	Продолжительность роста, ч									
	0	12	18	24	30	36	42	48	60	72
Аланин	0,15	0,49	1,55	1,57	1,56	1,02	0,81	0,32	0,18	0,18
Аргинин	0,00	0,28	0,38	0,28	0,35	0,22	0,15	0,07	0,04	0,04
γ-Аминомас- ляная	0,17	0,00	0,00	0,00	0,15	0,13	0,19	0,15	0,15	0,18
Аспарагино- вая	0,04	1,00	0,99	0,84	0,95	0,60	0,43	0,19	0,18	0,18
Глицин	0,00	0,29	0,20	0,35	0,42	0,34	0,31	0,11	0,08	0,06
Глутамин	0,71	0,68	0,50	0,46	0,43	0,24	0,18	0,12	0,05	0,00
Глутаминовая	0,52	3,82	3,80	3,68	3,52	2,66	1,67	0,75	0,43	0,45
Лизин + ги- стидин	0,04	0,24	0,35	0,37	0,38	0,23	0,26	0,14	0,13	0,21
Метионин + + валин	0,00	0,07	0,08	0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Пролин	0,00	0,10	0,00	0,00	0,00	0,00	0,09	0,06	0,03	0,00
Серин	0,04	0,51	0,32	0,31	0,42	0,39	0,30	0,08	0,06	0,04
Тирозин	0,02	0,35	0,19	0,13	0,12	0,14	0,19	0,13	0,14	0,15
Треонин	0,00	0,36	0,38	0,32	0,32	0,20	0,16	0,10	0,10	0,11
Фенилала- нин + изолей- цин	0,04	0,60	0,40	0,32	0,21	0,18	0,23	0,16	0,15	0,18
Цистеин	0,00	0,35	0,28	0,26	0,24	0,14	0,10	0,05	0,04	0,05
Сумма	1,72	10,07	9,34	8,89	9,07	4,99	5,07	2,47	1,76	1,83

4,35%, т. е. в 2 раза больше. Содержание тирозина за это время возрастает в 8 раз. По мере старения клеток и затухания их жизнедеятельности содержание в них свободных аминокислот резко снижается и составляет в фазе затухания роста 1,91% [69, 110].

Приведенные данные были получены при росте дрожжей в анаэробных условиях, т. е. при сравнительно «умеренном» проявлении их жизнедеятельности.

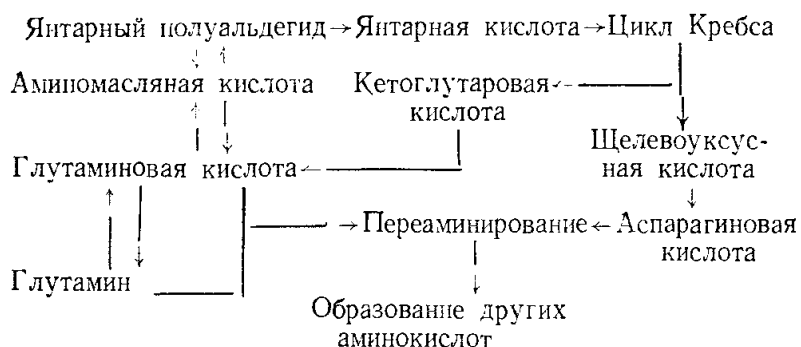
При культивировании плесневого гриба в условиях аэробноза отмечаются резкие изменения содержания свободных внутриклеточных аминокислот по фазам его роста. Например, конидии, взятые в качестве посевного материала, содержат лишь 1,72% свободных аминокислот. Клетки же мицелия, находящиеся в экспоненциальной фазе роста, содержат свободных аминокислот почти в 5—6 раз больше, чем клетки конидий или старые клетки мицелия, находящиеся в фазе затухания роста. Весьма характерно, что клетки конидий содержат лишь 8, а мицелиальные клетки 20 протейногенных аминокислот. Из 8 аминокислот, содержащихся в конидиальных клетках, на долю глутаминовой кислоты (0,52%), γ -аминомасляной кислоты (0,17%) и глутамин (0,71%) приходится 82% от общего их количества. По мере прорастания конидий отмечается интенсивный синтез 18 аминокислот. Исключение составляет только γ -аминомасляная кислота и глутамин. В течение первых 12 ч роста гриба количество глутаминовой кислоты увеличивается в 6,2 раза, а аспарагиновой почти в 18 раз. Содержание других аминокислот — аланина, серина, тирозина, треонина, цистеина, аргинина — также увеличилось в 10—27 раз.

В количественном отношении доминируют три аминокислоты: глутаминовая (3,82%), аланин (1,49%) и аспарагиновая (1,00%). По механизму биосинтеза эти аминокислоты, как отмечалось ранее, отличаются от всех других. Количественное соотношение свободных аминокислот в мицелиальных клетках, находящихся в экспоненциальной фазе роста, приближается к тому соотношению, которое существует в белке биомассы гриба. С прекращением роста мицелия гриба снижается, как уже отмечалось ранее, и содержание свободных внутриклеточных аминокислот. Их количество в фазе затухания роста достигает минимума (1,83%) и в течение последующих 12 ч опыта остается без изменения.

Количественные изменения в содержании глутамин и γ -аминомасляной кислоты по фазам роста гриба отличаются от тех изменений, которые наблюдаются у других аминокислот. Если в конидиях эти две аминокислоты содержатся в наибольшем количестве, то через 12 ч после прорастания конидий γ -аминомасляная кислота исчезает полностью, а содержание глутамин снижается на 4—7%, а в отдельных опытах с *Asp. oryzae* 79 на 30%, т. е. с 0,62 до 0,42%. Возможно, это объясняется тем, что конидии *Asp. oryzae* 79 содержат глутамин относительно меньше (0,62%), чем, например, конидии гриба *Asp. niger* 50 (0,84%). По мере последующего роста мицелия содержание глутамин постепенно снижается, и в фазе прекращения роста микроорганизма он или полностью отсутствует, или его количество сводится к минимуму (0,02—0,04% на массу сухой биомассы). Эти данные дополнительно, хотя и косвенно, подтверждают важную биохимическую роль глутамин в обмене аминокислот. Одновременно устанавливается взаимосвязь глутамин с γ -аминомасляной кислотой и их важная роль в образовании других аминокислот. Особо выделяется глутаминовая кислота, исключительно высоким содержанием которой отличаются как конидиальные, так и мицелиальные клетки.

Именно эти 3 азотистых соединения — глутамин, глутаминовая и γ -аминомасляная кислоты — обеспечивают биосинтез многих других аминокислот и жизнедеятельность конидиальных клеток. Тем самым наши данные подтверждают мнение о том, что в живой клетке существует взаимосвязь между указанными аминокислотами и что их физиологическая роль весьма серьезна. В частности, взаимопревращения глутаминовой и γ -аминомасляной кислот и глутамин обеспечивают, по мнению В. Л. Кретовича, синтез многих других аминокислот в созревающем колосе пшеницы и при росте дрожжевых клеток.

На основании полученных нами данных можно взаимосвязь указанных аминокислот представить в виде следующей схемы:



Из приведенной схемы следует, что обмен аминокислот и глутаминовой кислоты и глутамин взаимобусловлен, а через образование янтарного полуальдегида они могут «самостоятельно», т. е. независимо от процесса диссимиляции углеводов, включаться в цикл Кребса. Этим, по-видимому, и объясняется то, что γ -аминомасляная кислота за первые 12 ч прорастания конидий расходуется полностью, а глутамин — в значительной степени на образование других аминокислот, без которых не может проявляться жизнедеятельность микроорганизмов.

Достоверность этой схемы, отражающей биохимические процессы при росте клеток микроорганизмов, подтверждается другими наблюдениями. Так, например, в настоящее время хорошо изучена реакция переаминирования γ -аминомасляной кислоты с кетоглутаратом, в результате которой образуются янтарный полуальдегид и глутаминовая кислота. Высказываются мнения о возможности протекания реакции переаминирования янтарного полуальдегида с аминокислотами. Установлена реакция непосредственного аминирования за счет аминогруппы глутамин многих кетокислот. В частности, у некоторых видов дрожжей глутамин за счет своей аминной группы, меченной по азоту, обеспечивает непосредственное переаминирование пировиноградной кислоты с образованием большого количества аланина. Следовательно, полученные нами данные [65, 110] еще раз подтверждают, что живая клетка в зависимости от условий жизнедеятельности может использовать промежуточные продукты обмена различными путями.

Таким образом, отмечается прямая коррелятивность между ростом микроорганизма, его жизнедеятельностью и образованием свободных внутриклеточных аминокислот. Активная жизнедеятельность микроорганизма полностью совпадает не только с максимальным содержанием свободных внутриклеточных аминокислот, но и с процессами накопления биомассы и синтезом ферментов и прежде всего индуцированного происхождения. В свободном внутриклеточном фонде могут преобладать различные аминокислоты, однако очень часто относительно доминируют дикарбоновые аминокислоты и прежде всего глутаминовая, а также аланин, аргинин [12, 65, 70, 110, 195]. По-видимому, как исключение, в клетках *Candida lipolytica* при росте на среде с *n*-алканами и дефицитом V_1 количественно преобладающей оказалась γ -аминомасляная кисло-

та наряду с аспарагиновой и аланином [195]. Подмечено, что содержание в среде ионов кальция (CaCl_2) благоприятствует синтезу основных аминокислот и декарбоксилированию глутаминовой кислоты с образованием γ -аминомасляной кислоты.

Влияние условий культивирования микроорганизма. Внешние условия культивирования могут оказывать влияние на состав аминокислотного пула. Однако это влияние носит все же относительный характер. Условия внешней среды могут в большей мере оказывать влияние на биосинтез «первичных» аминокислот — глутаминовой, аспарагиновой и аланина, т. е. тех аминокислот, образование которых связано с прямым аминированием соответствующих кетокислот. Этим и можно объяснить то положение, что в присутствии глюкозы в среде для культивирования *Candida tropicalis* органические кислоты цикла Кребса оказывали решающее влияние на состав пула. Содержание в среде α -кетоглутаровой и пировиноградной кислот приводит к значительному увеличению в пуле соответственно глутаминовой кислоты и аланина [12].

Содержание в среде глюкозы благоприятствует синтезу наиболее полноценного по составу пула дрожжевых клеток, однако при их выращивании на парафинах в составе фонда не найдено каких-либо существенных различий. Однако на образование аминокислот, обладающих щелочными свойствами, эффективное действие оказывают все же парафины, применяемые в качестве единственного источника углеродного питания [100]. На суммарное образование внеклеточных аминокислот оказывает влияние не только источник углерода, но и вид микроорганизма.

В условиях хемостата при различных лимитирующих факторах и различных скоростях разбавления (D) получены данные, свидетельствующие, что изменение D от 0,1 до 0,7 ч^{-1} ведет к увеличению фонда аминокислот от 5,5 до 14,7 мМ, причем на долю глутаминовой кислоты приходится 5,3 мМ, аланина — 2,7, валина — 0,7. Было показано, что введение в среду 0,25 М NaCl вызывает увеличение содержания глутаминовой кислоты. Вероятно, NaCl служит причиной сдвига рН внутри клетки в щелочную область, что приводит к активации глутаматдегидрогеназы, ответственной за синтез глутаминовой кислоты. При достижении определенного уровня глутаминовой кислоты в пуле внутриклеточное значение рН падает, а активность глутаматдегидрогеназы понижается. При низких значениях рН среды происходит весьма интенсивная трансформация глутаминовой кислоты, приводящая к дополнительному образованию аргинина, орнитина, γ -аминомасляной кислоты, биохимическим предшественником которых является глутаминовая кислота.

В условиях лимита по нитрату были получены с другим микроорганизмом аналогичные результаты: 5-кратное увеличение скорости разбавления привело почти к 5-кратному увеличению содержания глутаминовой кислоты [249].

Состав аминокислотного пула *Sacch. cerevisiae* характеризовался высоким содержанием в пуле глутаминовой кислоты

Таблица 13

Концентрация внутриклеточных аминокислот (в мМ) в пуле *Sacch. cerevisiae* [249]

Аминокислота	Лимит по аммониию	Лимит по глюкозе	
	Скорость разбавления, ч ⁻¹		
	0,1	0,1	0,25
Глутаминовая кислота	35,6	135,4	146,8
Треонин	13,5	25,8	30,6
Аспарагиновая кислота	10,7	11,2	16,3
Лизин	11,5	25,8	76,5
Изолейцин	5,7	—	10,5
Серин	15,1	13,2	34,8
Глицин	8,6	12,0	40,1
Аланин	17,9	54,9	63,9
Валин	9,3	24,0	26,4
Аргинин	6,4	45,5	67,5
Лейцин	7,2	1,9	7,9
Гистидин	2,8	11,2	8,4
Сумма	144,3	380,9	529,2

(табл. 13). При лимите по глюкозе содержание пула было значительно выше, чем при лимите аммония. Все ингредиенты среды и условия культивирования, направленные на повышение жизнедеятельности микроорганизма, увеличивают содержание свободных внутриклеточных аминокислот. Как уже отмечалось ранее, клетки

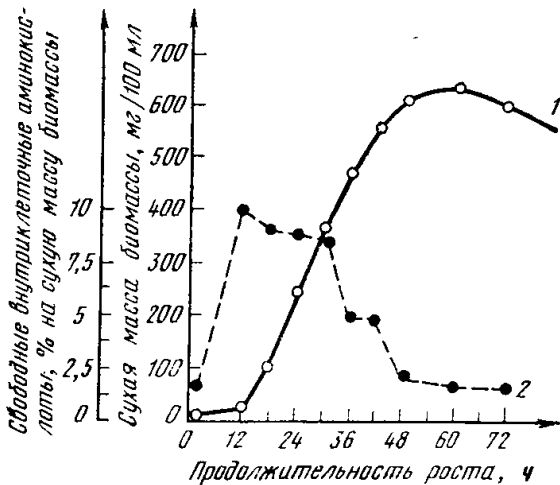


Рис. 5—5. Изменение содержания свободных внутриклеточных аминокислот у *Asp. flavus* 74 в процессе его роста, учитываемого по сухой массе биомассы:

1 — биомасса; 2 — аминокислоты [69].

мицелия различных видов плесневого гриба рода *Aspergillus* содержат свободных внутриклеточных аминокислот в экспоненциальной фазе роста в 4—6 раз больше, чем клетки конидий или старые клетки, находящиеся в фазе затухания [65, 69].

На рис. 5—5 показано, что процессы роста плесневого гриба и образование свободных внутриклеточных аминокислот между собой взаимосвязаны [65, 69]. Взаимосвязь этих процессов была показана на мутанте. В результате комбинированного использования химических и физических фак-

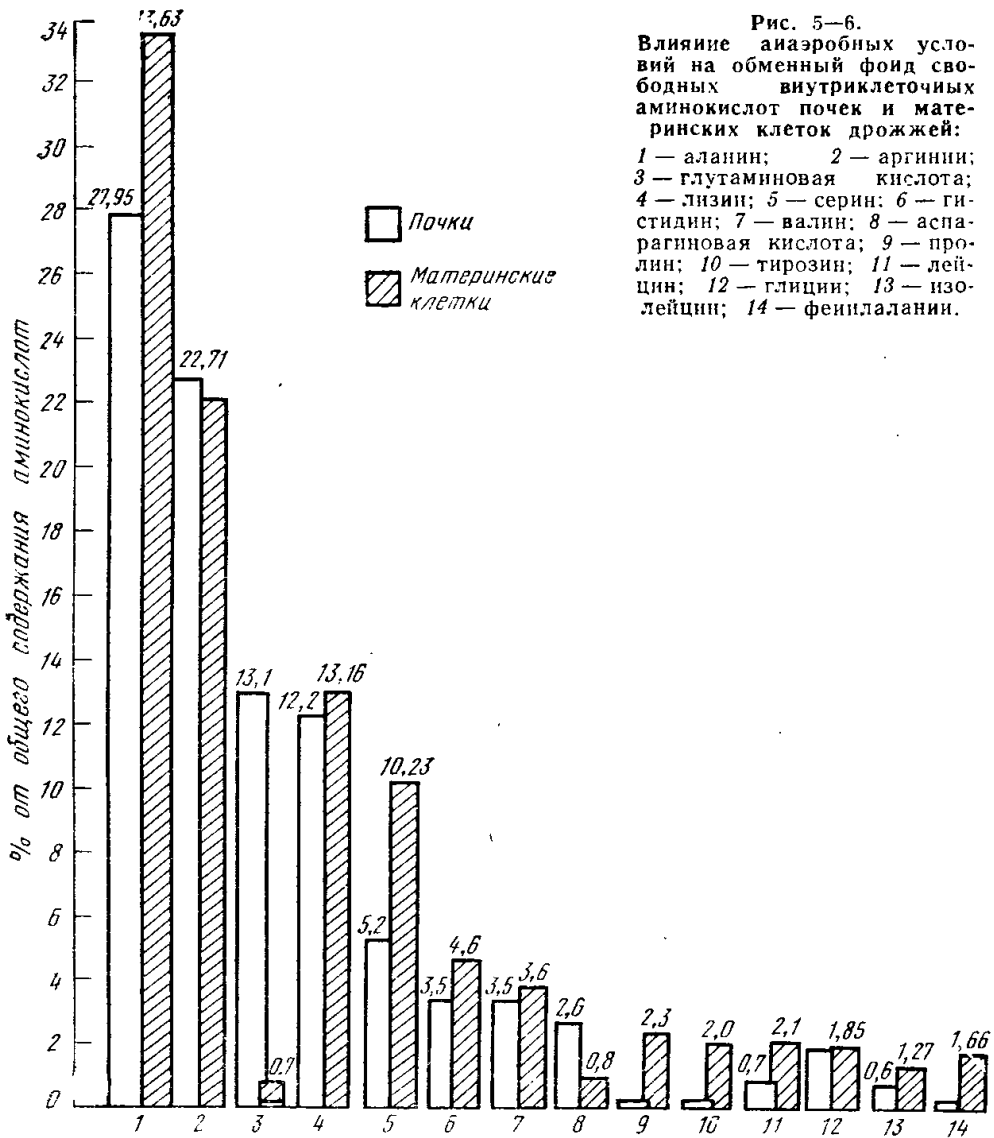


Рис. 5—6.
Влияние анаэробных условий на обменный фонд свободных внутриклеточных аминокислот почек и материнских клеток дрожжей:
1 — аланин; 2 — аргинин; 3 — глутаминовая кислота; 4 — лизин; 5 — серин; 6 — гистидин; 7 — валин; 8 — аспарагиновая кислота; 9 — пролин; 10 — тирозин; 11 — лейцин; 12 — глицин; 13 — изолейцин; 14 — фенилаланин.

торов отобран новый мутант *Asp. oryzae* 251-90, активность протеиназы которого в 5 раз превышает активность исходного штамма. Мутантный штамм обладает и более высоким содержанием как суммы свободных аминокислот, так и отдельных из них, таких, как глутаминовая, аспарагиновая, аланин. Так, например, в молодых клетках мицелия мутанта содержание этих аминокислот в 1,5—2,0 раза выше, чем в клетках природного штамма [83, 84]. Аналогичная закономерность отмечается и у другого мутанта [58], а также у мезофильной и термофильной бактериальных культур — продуцентов нейтральной и щелочной протеиназы [76] и актиномицетов — продуцентов лизоферментов [41]. То же самое отмечается и в клетках дрожжей *Candida utilis*. Как правило, многие аминокислоты (глутаминовая, аланин, аргинин, серин, треонин) количественно преобладают в экспоненциальных клетках по сравнению с клетками, находящимися в фазе затухания роста.

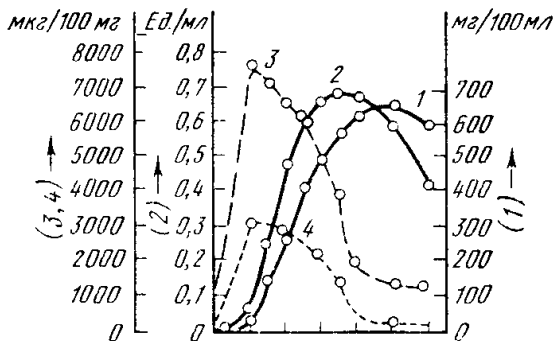


Рис. 5—7.

Динамика синтеза кислой протеиназы и свободных внутриклеточных аминокислот:

1 — биомасса дрожжей; 2 — активность протеиназы; 3 — суммарное содержание 20 аминокислот; 4 — содержание глутаминовой кислоты.

как в материнских клетках, так и в почках. Исключением оказались лишь две аминокислоты — глутаминовая и аспарагиновая, содержание которых в 2—3 раза преобладало в почках по сравнению с материнскими клетками [29]. Эти данные обобщены на рис. 5—6. При выращивании дрожжей на среде, содержащей C^{14} -фруктозу, было обнаружено, что на долю свободных аминокислот приходилось 12—14% меченого углерода из фруктозы.

Функция внутриклеточных аминокислот. Количество свободных внутриклеточных аминокислот лимитируется на определенном уровне. При этом их синтез в клетке саморегулируется и прежде всего ретронингибируется. В свою очередь с помощью свободных аминокислот микробная клетка регулирует синтез ферментов. При этом одни из них выступают как индукторы, а другие — как репрессоры синтеза ферментов.

При экзогенном аминокислотном питании ферментная система клетки соответственно перестраивается и координируется с учетом количественного содержания внутриклеточных аминокислот.

В условиях, обеспечивающих интенсивное воспроизводство пула и в первую очередь повышенное содержание глутаминовой кислоты, отмечался весьма активный синтез фермента. Высокое содержание свободных внутриклеточных аминокислот у многих видов *Aspergillus* предопределяет рост микроорганизма и синтез кислой протеиназы. При этом исключительную роль играет глутаминовая кислота.

Синтез кислой протеиназы, как следует из данных, приведенных на рис. 5—7, может происходить при условиях, обеспечивающих относительно высокую концентрацию свободной глутаминовой кислоты [69]. Снижение глутаминовой кислоты в процессе роста продуцента с 2630 до 1428, а затем до 534 мкг на 100 мг биомассы привело к резкому снижению, а потом к полному прекращению синтеза кислой протеиназы.

Аминокислоты пула оказываются источниками для синтеза протеолитических ферментов и у *Vac. megaterium*.

Таким образом, специфическое влияние отдельных внутриклеточных аминокислот на образование фермента представляет собой важный биологический механизм, при помощи которого регулируются в живой клетке процессы синтеза.

Исключением оказалась лишь одна аминокислота — лейцин [198].

Представляют интерес данные, характеризующие содержание свободных внутриклеточных аминокислот в материнских клетках и почках. Оказалось, что содержание многих аминокислот (аланин, серин, гистидин, пролин, тирозин, лейцин, изолейцин, фенилаланин) превалирует в материнских клетках. Количество отдельных аминокислот (аргинин, лизин, валин, глицин) практически одинаковое или близкое

ПРЯМАЯ АССИМИЛЯЦИЯ АМИНОКИСЛОТ

Дрожжевые клетки в состоянии не только синтезировать аминокислоты из неорганических азотистых соединений, но и потреблять их в готовом виде. До недавнего времени считали дезаминирование основным способом использования азота аминокислот. Однако оказалось, что это не единственный путь превращения аминокислот. Экспериментально установлено, что при культивировании дрожжевых клеток на питательной среде, содержащей полную смесь аминокислот, происходит их прямая ассимиляция [110].

Размножение клеток протекает наиболее интенсивно на средах, содержащих смесь аминокислот. И наоборот, на средах, содержащих отдельную аминокислоту, используемую путем дезаминирования, размножение протекает относительно слабо. Затем было показано, что при культивировании дрожжей на среде, содержащей полную смесь аминокислот, их ассимиляция соответствует содержанию этих аминокислот в белке дрожжевых клеток (рис. 5—8). Это подтверждается и другими данными. Например, при размножении дрожжей на синтетической среде, содержащей 18 аминокислот, отмечается избирательная способность клеток в потреблении этих аминокислот. Это можно заметить и по относительному убыванию аминокислот из питательной среды [110], причем они усваиваются дрожжами в неодинаковых количествах. Такая закономерность наблюдается и по результатам определения аминокислот методом распределительной хроматографии на бумаге (табл. 14).

Прежде всего было замечено, что в наибольшем количестве в лаг-периоде потребляются такие аминокислоты, как метионин, серин, цистеин. Если данные, представленные в табл. 13, рассчитать в процентах, то получится, что указанные три аминокислоты усваиваются в лаг-периоде на 49—60% от общего их количества, усвоенного за весь цикл развития.

При размножении дрожжей на среде, содержащей помимо других аминокислот S^{35} -метионин, максимальная радиоактивность отмечается также у дрожжей, находящихся в лаг-периоде. Если радиоактивность 100 млн. клеток за 3 ч составляла 400 имп./мин, а максимальная — 635 имп./мин, то, следовательно, 63% метионина усваивалось в лаг-периоде. Цистеин и серин

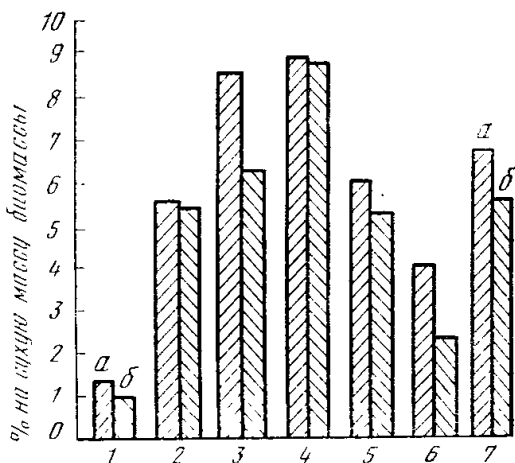


Рис. 5—8. Зависимость между аминокислотами дрожжей (б) и аминокислотами, ассимилированными из питательной среды (а): 1 — метионин; 2 — лейцин; 3 — глутаминовая кислота; 4 — аспарагиновая кислота; 5 — фенилаланин; 6 — серин; 7 — аланин + тирозин [110].

Таблица 14

Потребление аминокислот дрожжами (в мкг на 1 мл сбраживаемого субстрата) [110]

Аминокислоты	Потребление аминокислот				
	в лаг-периоде	в экспоненциальной фазе	в стационарной фазе	в фазе затухания	всего
Аланин	76	81	53	41	251
Глутаминовая кислота	132	259	133	73	598
Лейцин	139	194	39	23	395
Аминомасляная	22	78	23	0	123
Метионин	55	32	5	0	92
Серин	152	140	0	0	292
Тирозин	59	108	40	14	221
Цистеин	54	22	34	0	110
Фенилаланин	158	233	30	3	424
Лизин + гистидин	42	139	0	0	181
Аспарагиновая + гликокол	156	295	65	30	546
Сумма	1046	1581	422	184	3233

усваивались в этот период на 49—52%. Эти аминокислоты, по-видимому, ответственны не только за биосинтез и действие ферментов, но и за процесс почкования и деления клеток. В частности, сульфгидрильные аминокислоты и прежде всего цистеин ответственны за биосинтез глутатиона, роль которого рассматривается ниже.

Другая группа аминокислот в наибольшей степени ответственна за обеспечение биосинтеза белка в процессе интенсивного размножения клеток. К этой группе относятся: лейцин, лизин, тирозин, аминомасляная кислота, глутаминовая кислота. Если эти аминокислоты в лаг-периоде усваиваются только на 18—37%, то в экспоненциальной фазе они ассимилируются на 44—77%.

Если потребление аминокислот выразить в абсолютных значениях, то в наибольшем количестве как в лаг-периоде, так и в экспоненциальной фазе усваиваются глутаминовая кислота, фенилаланин и лейцин. Таким образом, по участию в цикле развития дрожжевых клеток аминокислоты можно распределить на группы.

Прямая ассимиляция аминокислот, естественно, предполагает использование их целиком, т. е. как азота, так и углеродистого остатка [109], вследствие чего при этом снижается расход сахара среды на питание дрожжей и тем самым обеспечивается некоторое увеличение выхода этанола при спиртовом брожении. Если, например, на среде с лейцином, глутаминовой кислотой или аргинином на образование углеводов дрожжей тратилось соответственно 3,72; 4,32 и 4,67 г глюкозы в 1 л субстрата, то при росте дрожжей в среде с гидролизатом казеина расходовалось лишь 2,97 г глюкозы, т. е. меньше на 1,28 г/л.

Возможность непосредственного усвоения аминокислот под-

тверждается также данными об относительной потребности дрожжей в пиридоксине при размножении их на средах с различными источниками азота. Известно, что пиридоксин (витамин В₆), или, точнее, его производное в виде фосфорнокислого эфира (пиридоксаль), входит в состав ферментов, катализирующих декарбоксилирование и переаминирование. Если в среде содержится аммиак или полный набор аминокислот, усваиваемых без дезаминирования, то присутствие пиридоксина в среде не обязательно; потребность в нем должна сводиться к минимуму, при этом потребность дрожжей в пиридоксине различна. Дрожжи, культивируемые на среде с одной аминокислотой, проявляют большую чувствительность к недостатку пиридоксина, чем на среде с аммиаком или гидролизатом казеина.

Итак, если дрожжи при размножении обеспечивать смесью всех аминокислот, необходимых для биосинтеза белка, то они потребляют их без предварительного дезаминирования, причем рост клеток достигает максимума. Это подтверждается данными, представленными на рис. 5—9. За первые 3 ч дрожжами ассимилировалось в 1,5 раза больше азота, чем на среде, обедненной питательными веществами.

ГЛУТАТИОН

Он представляет собой трипептид γ -глутамилцистеинилглицин и существует в двух формах: восстановленной — G-SH — и окисленной (дисульфидной) — G-S-S-G . Глутатион (наряду с липоевой кислотой, коэнзимом А, тиоредоксином) относится к числу тиоловых кофакторов. Тиоловые кофакторы являются переносчиками ацильных групп, простетической группой которых является 4-фосфопантотеин. Роль SH-группы в глутатионе и других тиоловых кофакторах во многих отношениях аналогична роли SH-групп цистеиновых остатков, выполняющих каталитические функции в активных центрах некоторых ферментов.

Выделение дрожжами глутатиона в процессе спиртового брожения. Содержание глутатиона в дрожжах может достигать 1% на сухую массу дрожжей. В процессе брожения дрожжи *Sacch. cerevisiae* и др. выделяют часть глутатиона в окружающую среду, причем накопление его в инкубационной смеси зависит как от интенсивности брожения [130], так и от особенностей расы дрож-

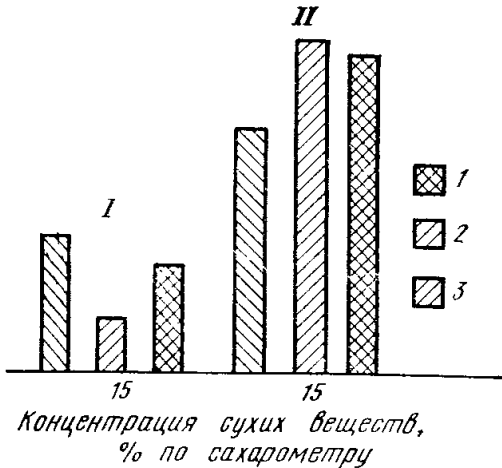


Рис. 5—9. Скорость ассимиляции азота дрожжами, культивируемыми в течение 3 ч на полноценной и обедненной крахмалных средах: I — осахаривание ферментами солода; II — то же + амиллитические и протеолитические препараты ферментов; 1 — азот популяции клеток, мг/мл; 2 — количество клеток, млн./мл.; 3 — биомасса, мг/100 мл [109].

жей [130]. Содержание внеклеточного глутатиона достигает 9,6—13,2 мкг/мл при разных методах его определения, или от 0,32 до 1,20 мг в пересчете на 1 г сухой массы дрожжей [229].

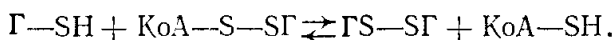
Интенсивность выделения глутатиона всецело связана с активно функционирующими молодыми клетками. Поэтому, выделение дрожжами глутатиона в процессе брожения — физиологический процесс, связанный с обменом бродящей дрожжевой клетки. Внесение в состав питательной среды сульфата аммония в качестве источника азота усиливает выделение глутатиона в сброживаемую среду в 1,5 раза с лишним и составляет, например, 27,0—33,5 мкг/мл вместо 15,6—21,7 мкг/мл, полученных в среде без сульфата. В присутствии в среде метионина, являющегося также источником усвояемой серы, количество выделяющегося глутатиона после 4 ч брожения возрастает почти в 3 раза. Следовательно, источник азота, в состав которого входит сера, усиливает, вероятно, синтез глутатиона и выделение его в окружающую среду.

Выделение глутатиона связано, вероятно, с его участием в транспорте аминокислот через наружную мембрану, т. е. с функционированием γ -глутаминового цикла [229].

Физиологическая роль глутатиона. Роль глутатиона весьма разнообразна и еще не вполне выяснена. Уже один факт универсального распространения глутатиона в сравнительно высоких концентрациях во многих клетках (от 0,4 до 12 мМ, преимущественно в форме $\Gamma-SH$) уже подтверждает его важную роль. В частности, считают, что роль глутатиона заключается в защите SH-групп внутриклеточных ферментов от окисления и блокирования ионами тяжелых металлов и другими ядами.

Возможно, что дисульфидная форма глутатиона реагирует с SH-группами белков и что эта реакция имеет значение в регуляции активности ферментов. Кроме того, полагают, что дисульфид глутатиона участвует в регуляции белкового синтеза [392, 393], а также в окислительном фосфорилировании [353, 352, 240].

Превращение глутатиона связано с метаболизмом коэнзима А. По-видимому, образуется смешанный дисульфид глутатиона и коэнзима А, а также фермент, который катализирует реакцию между этим дисульфидом и свободным глутатионом:



Глутатин проявляет специфические коферментные функции. В частности, он является коферментом глиоксилазы, катализирующей превращение метилглиоксаля $[CH_2=C(OH)=CO]$ в молочную кислоту.

Сходную функцию глутатин выполняет в качестве кофермента формальдегиддегидрогеназы (КФ 1.2.1.1.), как на это указывалось ранее.

БИОСИНТЕЗ БЕЛКА

Высокое содержание белка в дрожжах и других микроорганизмах представляет исключительный интерес. В связи с этим весьма ценны исследования, характеризующие возможность усиления биосинтеза белка и обогащения его аминокислотного состава в зависимости как от таксономической группы микроорганизма, так и от состава питательной среды, уровня минерального питания и условий культивирования.

Как известно, синтез белка в микробной клетке регулируется

генетическим аппаратом и фактором внешней среды, или в конечном итоге метаболитами, которые при этом могут действовать или как индукторы, или как репрессоры. Действуя на определенный участок молекулы ДНК (ген), в котором заключена наследственная информация о синтезе белка, индуктор или репрессор тем самым влияет на последующий синтез матричной (информационной) РНК, передающей в рибосомы информацию, необходимую для синтеза.

Внутриклеточные белки, как и другие биомолекулы, происходят из простых низкомолекулярных предшественников, получаемых из питательной среды. Следовательно, молекулярная организация клетки начинается с простых молекул. Три элемента — углерод, кислород и азот — вместе с фосфором и серой образуют важнейшие ковалентные связи, «скрепляющие скелет» всех органических соединений, и создают их многообразие.

БИОСИНТЕЗ БЕЛКА МИКРООРГАНИЗМАМИ РАЗЛИЧНЫХ ТАКСОНОМИЧЕСКИХ ГРУПП

Различный генетический аппарат микробных клеток обуславливает неодинаковую их способность к синтезу белка. Это подтверждается экспериментальными данными. Так, например, некоторые термотолерантные микроорганизмы, относящиеся к различным таксономическим группам, различаются между собой по количественному содержанию белка. Наиболее богаты им бактерии: при росте на *n*-алканах и дизельном топливе количество «сырого» протеина у *Pseudomonas desmolyticum* составляет 58,5% и выше. У дрожжей содержание «сырого» протеина варьирует в широком диапазоне — от 48 до 63%, однако чаще 52—56%. Количество истинного белка варьирует от 30 до 49% (рис. 5—10), причем трудноусвояемый углерод (ксилоза) и азот (KNO_3 , NH_4NO_3) относительно замедляют образование истинного белка.

Хотя в дрожжах белка содержится часто меньше, чем в бактериальных клетках, их биомасса в равной мере содержит полноценные по аминокислотному составу белки. В то же время необходимо отметить, что белки дрожжей и бактерий различаются между собой по растворимости в водных, солевых и щелочных растворах. Так, например, белки бактерий *Ps. desmolyticum* и *Chromobacterium parhatalani* характеризуются преобладающим количеством альбумина, т. е. водорастворимой фракции, которая составляет 50,7—38,0% к сухой биомассе. У дрожжей количество водорастворимых белков составляет лишь 8,37% [347].

Обратная закономерность отмечается и в содержании щелочнорастворимых белков, т. е. глютелинов. Самая незначительная часть белка на эту фракцию приходится у бактерий (1,58—4,7%) и преобладающая часть, достигающая 38,04% — у дрожжей. Если эти данные рассчитать в процентах к общему содержанию белка в клетке, то в соотношении указанных групп белков полу-

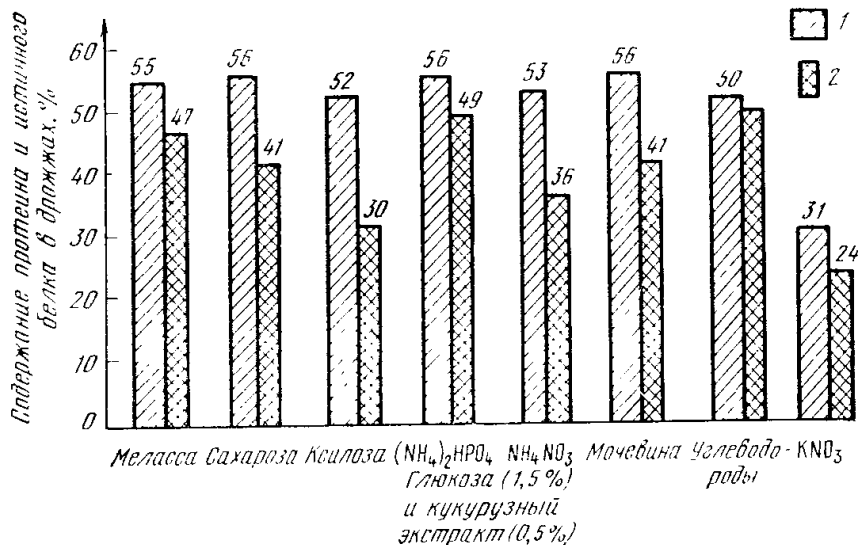


Рис. 5—10.
Образование сырого протеина и истинного белка дрожжами *Candida scottii* и *C. guilliermondii* при выращивании на среде с различными источниками углерода и азота: 1 — сырой протеин; 2 — истинный белок [189].

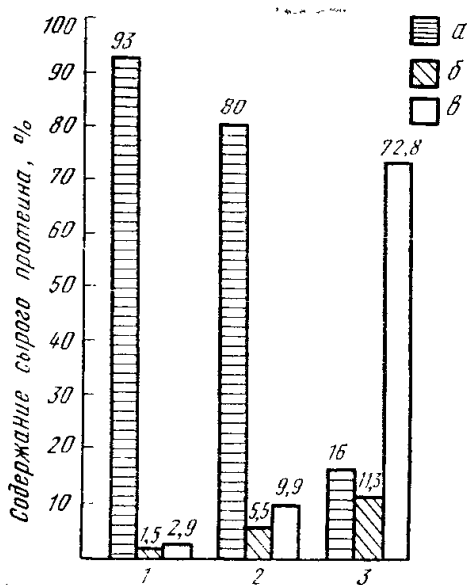


Рис. 5—11.
Соотношение белковых фракций в сыром протеине бактерий и дрожжей (в %): 1 — *Pseudomonas desmolyticum*; 2 — *Chromobacterium parvum*; 3 — *Candida guilliermondii*; а — альбумин; б — глобулин; в — глутелин.

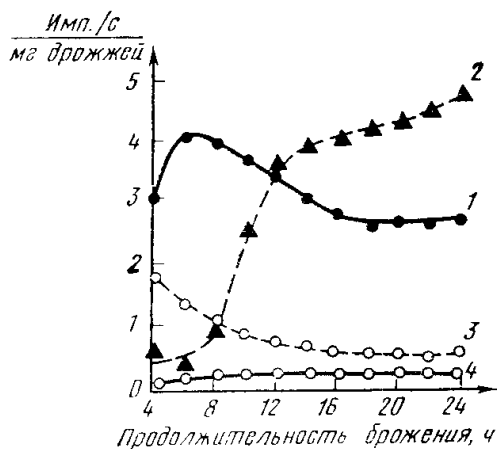


Рис. 5—12.
Кинетические кривые распределения ¹⁴C-белковых фракций дрожжей в онтогенезе: 1 — водорастворимые белки; 2 — щелочерастворимые; 3 — солерастворимые; 4 — спирторастворимые [189].

чится контраст (рис. 5—11). У бактерий максимальное количество приходится на альбумины (93—80%), а у дрожжей, наоборот, наибольшее количество — на глутелины (72,8% от «сырого» протеина). Количество щелочерастворимого белка у дрожжей может достигать 77% [189] и даже 80%.

Представляют интерес данные, характеризующие кинетические кривые распределения ¹⁴C-белковых фракций дрожжей в онтогене-

зе. Для получения кинетических кривых из суспензии дрожжей, культивируемых на среде с 1 C^{14} -октадекана, отбирали пробы, в которых измеряли радиоактивность белка. На основании кинетических кривых распределения углерода белковых фракций можно предусмотреть закономерности перераспределения в содержании белковых фракций в процессе онтогенеза.

Оказалось, что в начале логарифмической фазы роста в дрожжах в наибольшем количестве содержатся водо- и солерастворимые белки (рис. 5—12). По мере роста культуры их количество снижается, достигая к середине логарифмической фазы постоянного уровня. Количество щелочерастворимых белков в начале логарифмической фазы незначительно, но после 8—10 ч роста их содержание резко возрастает и к этому времени примерно соответствует количеству водорастворимого белка. Затем количество щелочерастворимого белка увеличивается, а водорастворимого, наоборот, снижается, например до 18-часового роста дрожжей. Изменения в содержании спирторастворимых белков во время роста дрожжей не отмечалось.

Интересно отметить, что содержание общего белка в дрожжах в процессе их роста не изменяется, происходит лишь количественное перераспределение в содержании указанных фракций [189]. Следовательно, удельное содержание белка в клетке остается примерно на одном уровне в процессе всего онтогенеза [109]; оно может колебаться в пределах от 57 до 52% на сухую биомассу, соответствующую клеткам экспоненциальной и стационарной фаз роста [109].

Образование «сырого» протенина не столь существенно отличается при использовании различных источников углерода (51,5—56,2%) и источников азотистого питания (51,8—56,0%). Исключением оказались лишь 3 источника нитратной формы азота — NaNO_3 , KNO_3 и $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, которые не обеспечивали высокого уровня образования как сырого протенина (31—21%), так и истинного белка (16—24%). Трудноусвояемые источники углерода (кислота) и азота (KNO_3 , NH_4NO_3) снижают синтез истинного белка, и его содержание в дрожжах варьирует от 24 до 30—36%.

АМИНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ БЕЛКА

Белки дрожжей и бактерий по содержанию и составу аминокислот являются полноценными и сходными с белками мяса, за исключением лишь содержания метонина, которым они относительно бедны. Что касается белков растительного происхождения, то питательная ценность является относительно низкой вследствие отсутствия в их составе какой-либо ценной аминокислоты: лизина, треонина, триптофана или метионина. Содержание и состав аминокислот в гомогенных высокомолекулярных фракциях глобулинов и глютелинов дрожжей представлены в табл. 15. Количество незаменимых аминокислот весьма велико и позволяет отметить, что по этому показателю и глобулины, и особенно глютелины являются высокоценными белковыми веществами.

Показано, что белки являются гликопротеидами. Например, глобулины и глютелины включают в свой состав углеводы, которые химически связаны с

Таблица 15
Содержание и состав аминокислот

Аминокислоты	Дрожжи рода <i>Candida</i>		Бактерии	
	глобулин	глютелин	<i>Proactinomyces</i> sp. II	<i>Mycobacterium mucosum</i>
	в % на сухое вещество		% от сырого протеина	
Лизин	2,74	6,21	5,65	5,49
Гистидин	0,92	2,50	1,15	1,14
Аргинин	1,74	6,00	3,00	4,61
Аспарагиновая кислота	8,72	10,19	5,99	6,97
Треонин	4,71	5,05	1,85	2,94
Серин	—	5,08	1,05	2,60
Глутаминовая кислота	10,42	10,09	6,65	7,60
Пролин	3,36	3,92	1,93	2,57
Глицин	4,30	4,70	3,75	3,25
Аланин	6,92	5,22	4,97	5,21
Валин	3,96	4,25	3,81	3,23
Метионин	0,14	Следы	0,36	0,58
Изолейцин	3,49	4,76	3,13	2,62
Лейцин	5,82	8,26	4,81	5,45
Тирозин	3,04	3,29	0,66	2,77
Фенилаланин	3,92	5,66	2,56	2,99
Норлейцин	+	+	—	—
Триптофан	+	3,60	—	—
Цистин	+	+	0,80	Следы

Примечание. Дрожжи выращивались на гидролизатах древесины, бактерии на среде с *n*-алканами [183].

пептидной цепью. Препараты глобулинов дрожжей содержат около 15% углеводов (глюкозы 6,43%, маннозы 5,14, ксилозы 1,81 и рибозы 1,68%), а углеводный комплекс глютелинов включает 6% сахаров (глюкозы 1,98%, маннозы 3,96% на сухое вещество). Эти сахара были определены после кислотного гидролиза белков в мягких условиях (0,5 н. раствор соляной кислоты при 100°С). Предполагают, что связь белок—углевод осуществляется через один из сахаров и аспарагиновую кислоту полипептида.

Различные виды и роды дрожжей, так же как и бактерии, различаются между собой по способности к биосинтезу белков. Так, например, новый штамм *Candida pevellus* (ATCC 20275), выделенный из проб почв, очень хорошо ассимилирует углеводороды, растет с большой скоростью [4,2 г/(л·ч)], продуцирует биомассу с высоким содержанием белка (58,1%) и поэтому пригоден для получения ее в промышленном масштабе. Этот штамм дрожжей нуждается в биотине (3—10 мкг/л). Замена витамина на кукурузный (0,2%) или дрожжевой (0,05%) экстракты, а также на мелассу (0,1%) существенно не повлияло на выход дрожжей (101,5—106,0% от массы парафина), скорость образования биомассы [4,0—4,7 г/(л·ч)] и на содержание сырого белка (56,8—58,2%). Другие виды дрожжей обладают относительно небольшой скоростью роста и дают невысокий выход биомассы с низким содержанием белка (44,5—46,5%).

Таким образом, количественное образование белка и его аминокислотный состав находятся в зависимости от особенностей генотипа¹ и конкретных условий размножения микроорганизма.

¹ Генотип — набор генов, определяющих наследственную конституцию данного микроорганизма или данной особи.

В свою очередь регуляторами синтеза белка являются не только ингредиенты среды, но и скорость размножения микроорганизма, всецело определяемая условиями культивирования.

ОСНОВНЫЕ ЭТАПЫ БИОСИНТЕЗА БЕЛКА

Исследования в бесклеточной системе позволили определить, что местом белкового синтеза являются рибосомы. Именно на них происходит соединение аминокислот в полипептидную цепь. Сами по себе рибосомы не обладают активностью. Чтобы включиться в синтез белков, они должны присоединиться к мРНК¹ в присутствии ионов магния. Ионы магния требуются для обеспечения стабильности рибосом и их прикрепления к мРНК.

Была показана центральная роль АТФ в процессе биосинтеза белка. Затем была открыта тРНК и установлены основные этапы этого процесса и его последовательность. При этом установлены 4 основные стадии.

Активация аминокислот

На первой стадии белкового синтеза аминокислоты активируются, т. е. этерифицируются, соответствующими тРНК при помощи ферментов, известных под названием аминоацил-тРНК-синтетаз. Каждый из этих ферментов специфичен в отношении одной определенной аминокислоты. Эта реакция протекает в растворимой части цитоплазмы.

Все активирующие аминоацил-тРНК-синтетазы получены из бактериальных клеток в высокоочищенном состоянии. Все они характеризуются молекулярной массой около 100 000, за исключением синтетазы, специфичной для фенилаланина, молекулярная масса которой составляет 180 000. Все ферменты нуждаются в ионах Mg^{2+} , и все содержат одну или несколько сульфгидрильных групп, которые существенны для ферментативной активности.

Все аминсинтетазы находятся в цитоплазме и не связаны ни с одним из структурных элементов клетки. Они катализируют реакцию аминокислоты с АТФ, приводящую к образованию аминокциладениловой кислоты (aa-АМФ) и к освобождению неорганического пирофосфата². Образовавшийся аминокцил-АМФ не переходит в раствор, а остается связанным с активирующим ферментом. Комплекс аминокцил-АМФ — фермент вступает затем во взаимодействие со специфической для данной аминокислоты молекулой тРНК; реакция сопровождается высвобождением фермента, который может быть снова использован в реакции; кроме того, образуется АМФ (рис. 5—13).

Для каждой аминокислоты имеется по крайней мере одна специфическая молекула тРНК. Аминокислота присоединяется к мо-

¹ Наряду с обозначениями мРНК (матричная РНК) широко используют также иРНК (информационная РНК).

² Аналогичная реакция протекает при активации ацетата и жирных кислот.

лекуле тРНК своей карбоксильной группой, образуя эфирную связь с 2- или 3-гидроксильной группой рибозы концевго аденозина молекулы тРНК. Полагают, что аминоацильная группа переходит из одного положения (2) в другое (3) с большой скоростью [64, 259]. Доказано существование ковалентной связи между аминокислотой и тРНК.

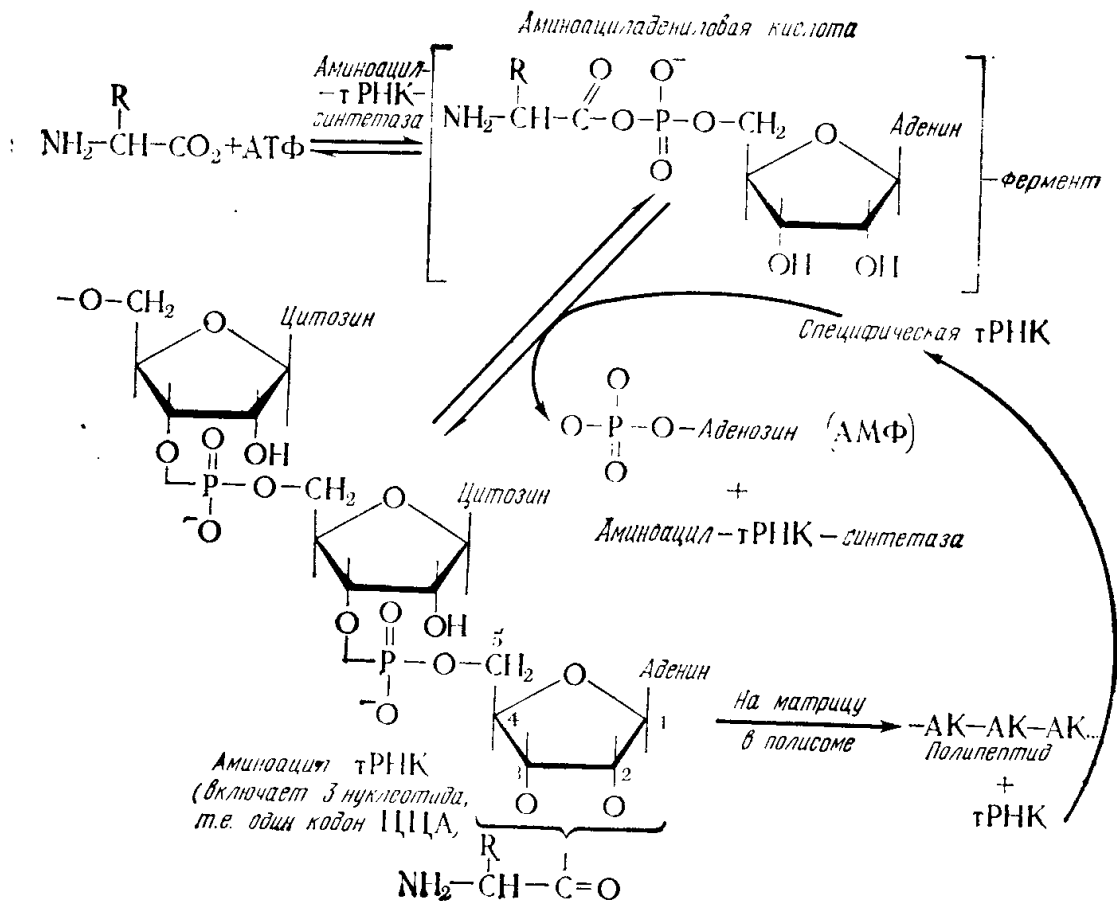


Рис. 5—13.

Активация аминокислоты и ее прикрепление к тРНК (АК — аминокислота, ЦЦЦА — активный участок прикрепления аминокислоты).

Итак, специфические аминоацил-тРНК-синтетазы катализируют реакцию образования aa-АМФ, а также перенос аминокислоты с aa-АМФ на тРНК, следовательно, фермент синтетаза «распознает», с одной стороны, аминокислоту, а с другой — соответствующую тРНК. Это их свойство чрезвычайно важно, поскольку образовавшаяся аминоацил-тРНК распознается в дальнейшем не по ее аминокислотному компоненту, а исключительно по триплету антикодона тРНК. Поэтому в молекулах аминоацил-тРНК-синтетаз должно иметься два весьма специфичных центра связывания: один для субстрата, т. е. аминокислоты, а другой — для соответствующей тРНК; фермент должен иметь и третий центр для связывания АТФ.

Все молекулы тРНК имеют на одном конце одну и ту же последовательность расположения нуклеотидов: фЦфЦфА. Концевой триплет этой последовательности, остаток адениловой кислоты, и есть то звено, по которому образуется эфирная связь с аминокислотной группировкой. Каждая тройка нуклеотидов определяет включение одного определенного аминокислотного остатка в соответствии с генетическим кодом, при помощи которого в иРНК записана информация. В полинуклеотидной цепи каждой тРНК выявлены триплеты, которые являются антикодонами иРНК.

Нуклеотидная последовательность антикодона в аминокислот-тРНК такова, что обеспечивает образование специфических водородных связей с соответствующим кодоном иРНК; благодаря этому транспортируемая аминокислота может занять правильное положение в растущей полипептидной цепи.

Инициация полипептидной цепи

На второй стадии образуется иницирующий комплекс, состоящий из мРНК и первой, или иницирующей, аминокислот-тРНК, с одной стороны, и свободной рибосомы 40(30) — субъединицы — с другой. Иницирующая аминокислот-тРНК участвует в реакции в форме *N*-ацилпроизводного, чем, по-видимому, обеспечивается «старт» синтеза полипептидной цепи от начального участка мРНК. Функция рибосомы состоит в том, чтобы создать такое взаиморасположение аминокислот-тРНК, мРНК и растущей полипептидной цепи, которое обеспечивало бы возможность правильного считывания генетического кода матрицы, т. е. мРНК.

Установлено, что у бактерий синтез белка начинается с аминокислоты метионина. Иницирующий остаток метионина включается не в виде метионил-тРНК, а как *N*-формилметионил-тРНК (фМет—тРНКф) [141, 260]. Структурная формула этого соединения представлена на рис. 5—14.

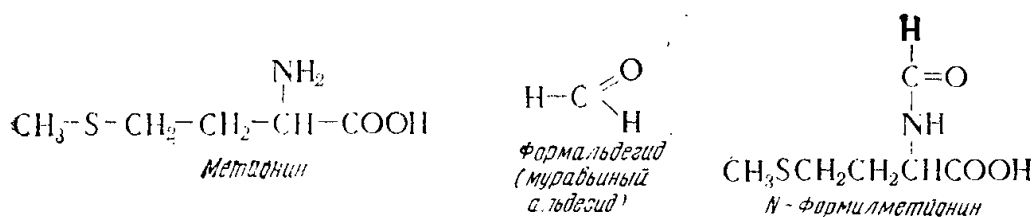


Рис. 5—14.

Структурная формула *N*-формилметионина.

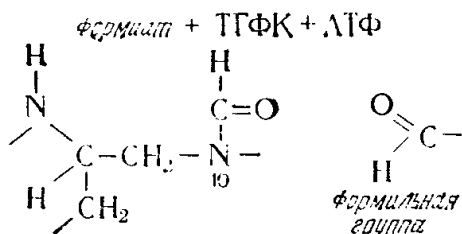
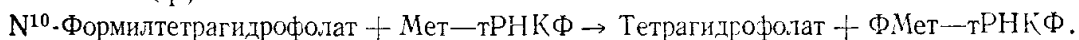


Рис. 5—15.

N-Формилтетрагидрофолат.

N-формилметионил-тРНК образуется путем ферментативного трансформирования; формильная группа ($\begin{matrix} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C} - \\ \diagup \\ \text{H} \end{matrix}$) переносит-

ся от *N*¹⁰-формилтетрагидроfolата (рис. 5—15) на метионил-тРНК_{Мет}. Известны два вида метионил-тРНК_{Мет}; та, которая способна акцептировать *N*-формильную группу, обозначается метионил-тРНКф;



Свободный метионин и связанный с тРНК_{Мет} фермент не способны формилировать. Вероятно, фМет-тРНК инициирует

синтез пептидных цепей у бактерий, дрожжей и других эукариотов. Предполагают, что синтез всех белков у бактерий начинается с *N*-концевой последовательности *N*-формилмет-ала-сер. Однако *N*-формильная группа в готовом белке отсутствует; она удаляется при помощи фермента. Полагают, что от синтезированной белковой молекулы могут отщепляться две или даже все три аминокислоты: формилметионин, аланин и серин — в инициирующей последовательности.

Экспериментально было показано, что в норме 70S-рибосомы постоянно подвергаются диссоциации на субъединицы и что эти субъединицы произвольно постоянно реассоциируют. Оказалось, что условием связывания мРНК и инициирующей аминокетил-тРНК является предварительная диссоциация 70S-рибосомы на 50S- и 30S-субъединицы. Затем 30S-субъединица связывает мРНК и фМет-тРНК, образуя инициирующий комплекс, который потом прочно связывается с 50S-субъединицей с образованием функциональной 70S-рибосомы (рис. 5—16).

Диссоциация 70S-рибосом на субъединицы, связывание фМет-тРНК и иРНК с 30S-субъединицей и последующее образование

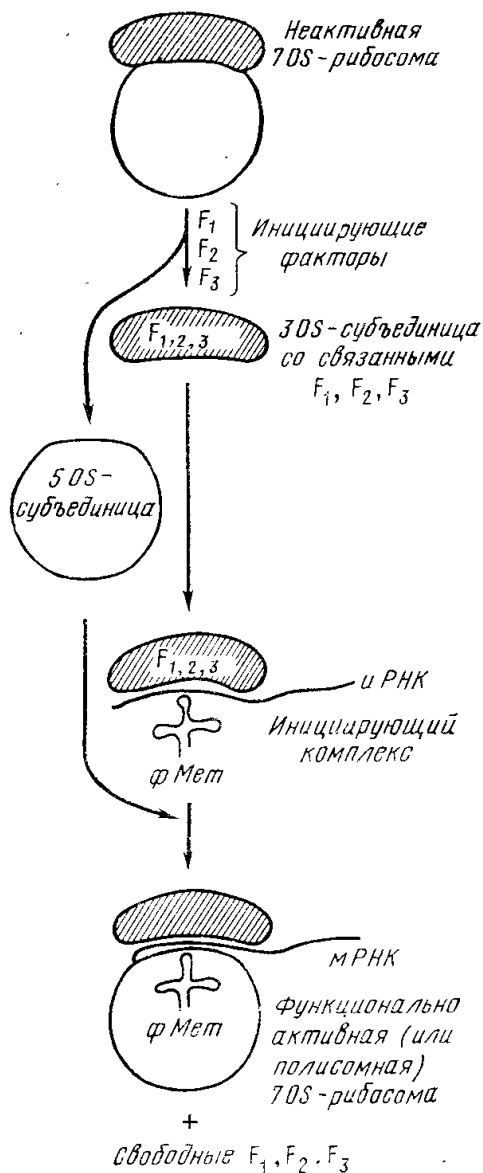


Рис. 5—16.

Образование инициирующего комплекса и 70S-рибосомы, способных осуществлять элонгацию цепи (F₁, F₂, F₃—факторы инициации).

полной, функционально активной 70S-рибосомы осуществляются только в присутствии иницирующих факторов, обозначаемых F_1 , F_2 и F_3 (или соответственно А, С и В), а также ГТФ. Этим, по-видимому, обеспечивается то, что рибосомы начинают синтез пептидной цепи с конца, а не с середины. После начала синтеза факторы инициации высвобождаются из иницирующего комплекса и снова используются для инициации синтеза новых цепей.

Элонгация — удлинение пептидной цепи

На третьей стадии белкового синтеза пептидная цепь удлиняется путем последовательного присоединения новых аминокислотных остатков, доставляемых соответствующими аминокислот-тРНК. Каждый такой сложный эфир специфически отбирается данным кодоном мРНК. После образования очередной пептидной связи как молекула мРНК, так и цепи пептидил-тРНК транслоцируются, т. е. перемещаются на рибосоме так, чтобы следующий кодон занял рабочее положение. Этот процесс требует затраты энергии, которая поставляется в форме ГТФ.

Этот цикл элонгации цепи протекает в 3 этапа. На 1-м происходит связывание вновь поступающей аминокислот-тРНК с аминокислотным участком 70S-рибосомального комплекса, расположенным возле следующего по порядку кодона мРНК. Для процесса связывания требуется ГТФ и специфичный цитоплазматический белок, называемый фактором Т, который может диссоциировать на две субъединицы: на нестабильный T_u -белок (молекулярная масса 42 000) и стабильный T_s -белок (молекулярная масса 67 000).

Факторы T_u и T_s имеют тенденцию соединяться между собой с образованием комплекса. Этот комплекс взаимодействует затем с ГТФ, что приводит к образованию нового комплекса T_u -ГТФ и высвобождению фактора T_s . Количество образующегося комплекса T_u -ГТФ зависит от количества имеющегося T_u , а T_s играет в этом процессе роль катализатора. На следующем этапе комплекс T_u -ГТФ взаимодействует с аминокислот-тРНК, в результате чего образуется комплекс аминокислот-тРНК- T_u -ГТФ. Именно в этой форме аминокислот-тРНК взаимодействует с аминокислотным участком рибосомы иницирующего комплекса. При связывании с рибосомой фактор T_u высвобождается, а ГТФ расщепляется на ГДФ и P_i . После всех этих стадий места на рибосоме занимает аминокислот-тРНК, несущая остаток следующей аминокислоты, которая должна присоединиться к растущей пептидной цепи. Факторы T_u и T_s отделяются от рибосомы и могут функционировать повторно, а источником энергии служит при этом новая молекула ГТФ [89]. Фактор Т был получен в чистом кристаллическом виде.

На 2-м этапе элонгации происходит образование самой пептидной связи. При этом осуществляется взаимодействие аминокислотной группы вновь пришедшей аминокислот-тРНК с этерифицированной карбок-

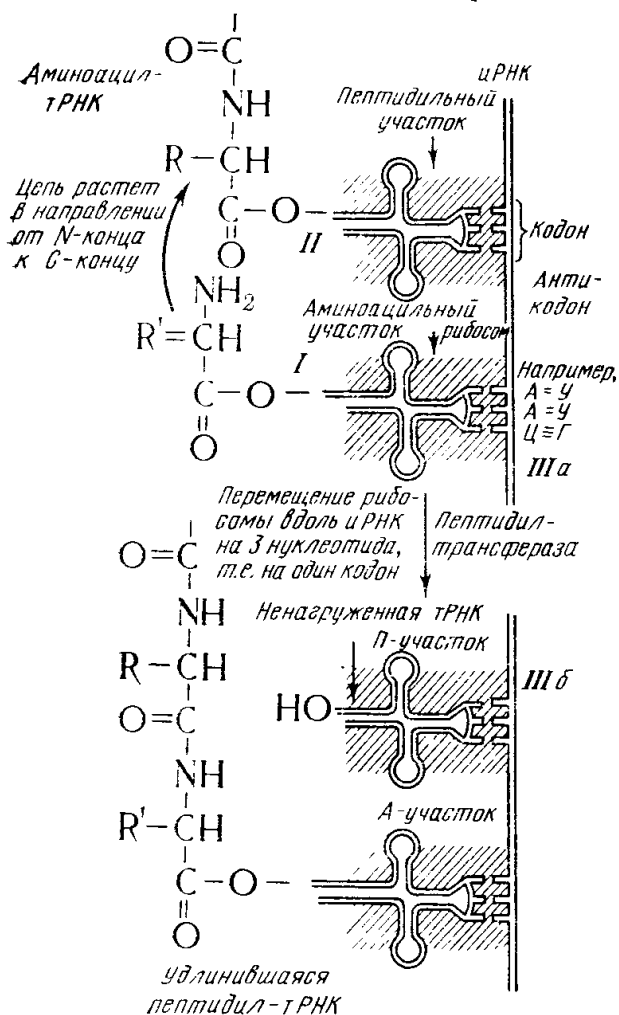


Рис. 5—17.

Пептидилтрансферазная реакция (пептидная связь образуется по механизму нуклеофильного замещения):

I — рост пептидных цепей с N-концевого остатка; II — присоединение новых остатков аминокислот к концевой COOH-группе аминоацил-тРНК; IIIа—IIIб — транслокация, т. е. высвобождение тРНК и перемещение пептидил-тРНК из аминоацильного участка на рибосоме (IIIа) в пептидный участок (IIIб).

удлинившаяся пептидил-тРНК, хотя больше и не нагружена аминокислотой, в то же время остается связанной с пептидным участком; эта тРНК обозначается тРНК_п. В результате такого замещения удлинившаяся пептидил-тРНК оказывается связанной с рибосомой в аминоацильном участке. Ни АТФ, ни ГТФ не нужны для образования новой пептидной связи, которая, по-видимому, создается за счет энергии сложноэфирной связи аминоацил-тРНК. Однако для катализа этой реакции требуется, как отмечалось ранее, фермент.

Не исключено, что в образовании пептидной связи принимает участие не один, а несколько ферментов [89].

сильной группой С-концевого аминокислотного остатка пептидил-тРНК. Следовательно, растущая полипептидная цепь переносится со своей тРНК к аминогруппе вновь пришедшей аминоацил-тРНК.

Говоря о новообразованном иницирующем комплексе, имеют в виду перенос N-формилметионина от соответствующей тРНК на аминогруппу аминокислоты для растущей пептидной цепи. Продукт, представляющий собой либо пептидил-аминоацил-тРНК, либо N-формилметиониламиноацил-тРНК, находится на этой стадии в аминоацильном участке, т. е. А-участке рибосомы. Фермент, катализирующий образование пептидной цепи, носит название пептидилтрансферазы и является частью 50S-субчастицы рибосом.

Пептидилтрансферазная реакция схематически представлена на рис. 5—17. Как показано на рисунке, освободившаяся

С помощью антибиотика пурамицина дополнительно было доказано, что полипептидные цепи растут в результате присоединения к их С-концу все новых молекул аминоксил-тРНК, осуществляемого в результате реакции нуклеофильного замещения. Структура пурамицина очень сходна со структурой концевой остатка АМФ в аминоксил-тРНК. Однако вместо сложноэфирной связи между 2- или 3-гидроксильной группой рибозы и карбоксильной группой аминоксилы, присутствующей в аминоксил-тРНК, пурамицин содержит амидную связь с фенилаланином. Антибиотик останавливает процесс элонгации пептидной цепи вследствие способности заменять собой вновь поступающую аминоксил-тРНК (рис. 5—18). Пептидилпурамицин не способен участвовать в реакции замещения с аминоксил-тРНК, так как его амидная связь не может атакаться. Кроме того, пептидилпурамицин после обра-

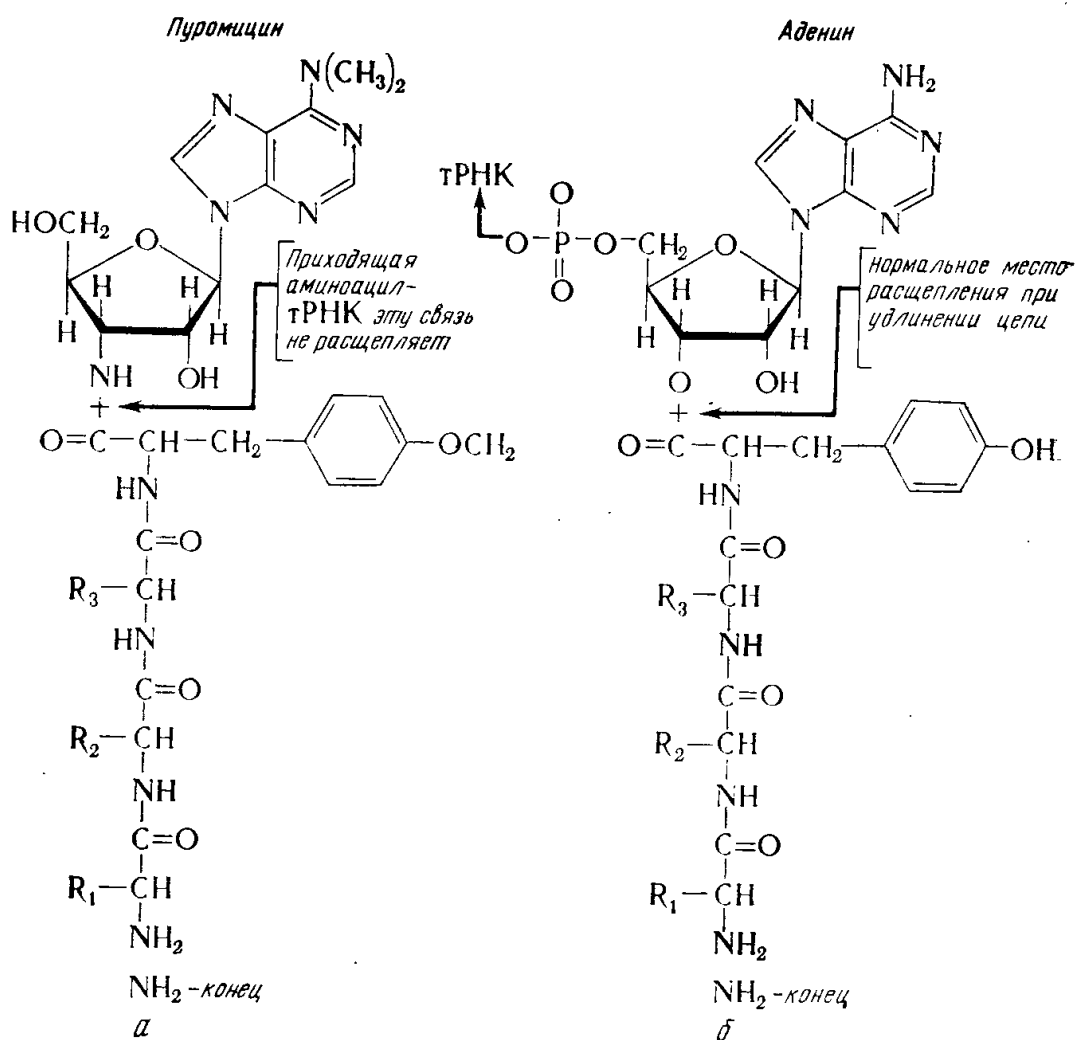


Рис. 5—18.

Механизм ингибирования пурамицином:

а — пептидилпурамицин (сходен по строению с аминоксил-тРНК), цепь которого далее не удлиняется; б — пептидин-тРНК; приходящая аминоксил-тРНК вытесняет тРНК из комплекса пептидин-тРНК.

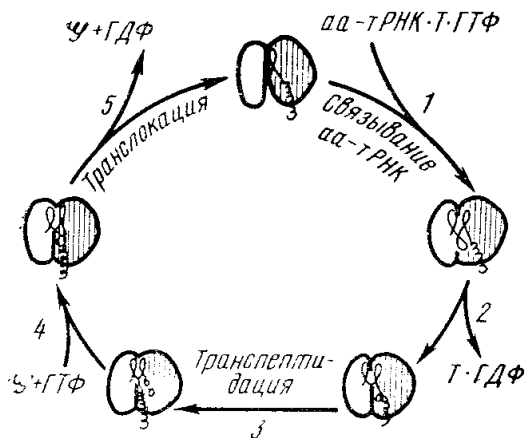


Рис. 5—19.
 Схема рабочего цикла рибосомы в процессе трансляции (элонгации) [206, 207] (aa-тРНК—аминоацил-тРНК; Т—Т-фактор; G—G-фактор). 1 — связывание комплекса аминоксил-тРНК-Т-фактора-ГТФ с рибосомой; 2 — расщепление ГТФ и освобождение Т-факторов с ГТФ и ортофосфата; 3 — транспептидация (пептидный остаток переходит на aa-тРНК, в результате получается новая удлиненная пептидил-тРНК и деацилированная тРНК); 4 — связывание G-фактора и ГТФ с рибосомой; 5 — расщепление ГТФ, освобождение G-фактора и сопряженная трансляция.

зования отделяется от рибосомы, поскольку он не содержит антикодона и имеет низкую молекулярную массу.

Третьим, завершающим этапом элонгации — роста полипептидной цепи — является процесс транслокации. При этом происходит высвобождение той молекулы тРНК, которая только что отделилась от растущей пептидной цепи, и перемещение пептидил-тРНК из аминокислотного А-участка на рибосоме в пептидилный участок.

Рибосома при этом должна переместиться вдоль матрицы на 3 нуклеотида, т. е. на один кодон.

Предполагают, что этот сложный процесс транслокации является результатом изменения конформации рибосомы, осуществляемого за счет энергии гидролиза ГТФ и при участии G-фактора (молекулярная масса 84 000), который (как ГДФ) в конце данного этапа покидает рибосому. Поскольку значительная часть цепи мРНК в полирибосомах недоступна для действия рибонуклеазы, можно думать, что молекула мРНК «протягивается» через «туннель», образуемый рибосомными субъединицами. В рибосомном «туннеле» могут разместиться около 60 нуклеотидов. Участок строящейся полипептидной цепи, соответствующий защищенной части цепи мРНК, защищен и от действия протеолитических ферментов.

После завершения транслокации система готова к присоединению следующей аминоксил-тРНК рибосомами.

Итак, элементарный рабочий цикл рибосомы подразделяется на 5 последовательных шагов (рис. 5—19). В результате этого цикла образуется удлиненная пептидил-тРНК, деацилируется тРНК, покидая рибосому, которая после шага 5-го вновь компетентна к связыванию аминоксил-тРНК. Именно многократное повторение таких циклов и создает процесс трансляции (элонгации) [207, 206]. Этот цикл повторяется до тех пор, пока в процессе передвижения вдоль цепи иРНК рибосома не достигнет терминирующего кодона. Затем следует этап терминации, который будет рассмотрен ниже.

Терминация — отделение свободной полипептидной цепи

Сигналами терминации служат определенные участки иРНК — три специальных терминирующих кодона. Даже после присоединения последней, т. е. С-концевого аминокислотного остатка, полипептидная цепь все еще остается ковалентно связанной (с помощью сложноэфирной связи) с тРНК, которая в свою очередь нековалентно связана с рибосомой благодаря взаимодействию антикодона с кодоном иРНК.

Отделение полипептидил-тРНК от рибосомы по достижении терминирующего кодона, находящегося на молекуле мРНК, осуществляется при помощи специфического фактора освобождения (фактора R_1 и R_2), который связан с рибосомой и облегчает гидролиз сложноэфирной связи между полипептидом и тРНК. Высвобождающий фактор R_1 включается в реакцию при наличии тринуклеотидов УАА и УАГ, а фактор R_2 — при наличии УАА или УГА.

Оказалось, что эти высвобождающие факторы являются белками, а не молекулами тРНК, как предполагалось ранее. Оба высвобождающих фактора нечувствительны к действию рибонуклеазы, но подвергаются разрушению под влиянием протеиназ (пепсина), а также инактивируются ингибиторами сульфгидрильных групп.

Таким образом, процесс терминации происходит с участием белка, который не только узнает специфическую последовательность в тринуклеотиде, связанном с рибосомой, но и гидролизует сложноэфирную связь между полипептидной цепью и тРНК. Затем свободная 70S-рибосома сходит с мРНК и после диссоциации на 50S- и 30S-субъединицы может включаться в новый цикл (рис. 5—20).

Завершенная полипептидная цепь покидает рибосому, по-видимому, не в виде неупорядоченного клубка, а в виде молекулы с нативной, функционально активной конформацией.

Вероятно, в процессе синтеза полипептидных цепей на рибосомах они самопроизвольно сворачиваются по мере роста, начиная с NH_2 -конца, причем каждый вновь присоединившийся аминокислотный остаток быстро находит конформацию, соответствующую минимальной свободной энергии. Спиральное закручивание и свертывание полипептидной цепи обусловливается как определенной аминокислотной последовательностью цепи, так и природой боковых цепей аминокислот (гидрофобные и гидрофильные группы). Кроме того, известно, например, что рибосомы содержат многочисленные виды ферментов помимо тех, которые имеют непосредственное отношение к механизму синтеза пептидной связи.

Таким образом, нуклеотидная последовательность ДНК представляет собой код, определяющий при участии иРНК структуру специфического белка. Представление о переносе информации от ДНК через РНК на белок называют основным постулатом или центральной догмой молекулярной биологии. ДНК определяет нуклеотидную последовательность иРНК. Каждые 3 нуклеотида в иРНК кодируют включение в белок специфической аминокислоты.

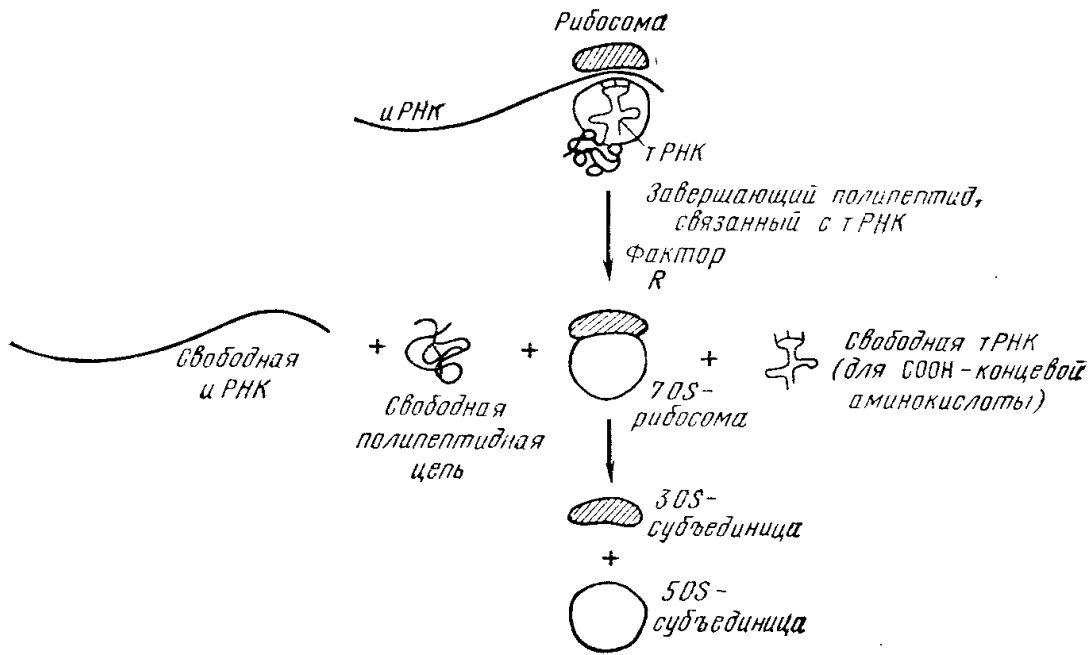


Рис. 5—20.

Терминация, т. е. отделение свободной полипептидной цепи и диссоциация рибосомы на 30S- и 50S-субъединицы.

Триплет иРНК комплементарен триплету тРНК. Следовательно, в молекуле тРНК имеется участок (антикодон), комплементарный кодону иРНК.

Соединение аминокислот в полипептидную цепь происходит на рибосоме, которая перемещается вдоль иРНК начиная с 5'-ОН. При каждом ее перемещении очередная аминокислота устанавливается тРНК в нужное положение и присоединяется своей аминогруппой к карбоксильной группе предшествующей аминокислоты. Законченная полипептидная цепь — одна или в соединении с другими цепями — образует белок, спецификация которого первоначально содержалась в ДНК.

Итак, все признаки организма должны в конечном счете возникать на основе биохимических признаков. При этом, естественно, исключительное значение имеет не только синтез ДНК и РНК, последовательность расположения в их молекулах азотистых оснований, но и образование белков. Все эти процессы взаимосвязаны, взаимообусловлены и всецело определяют наследственность.

ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА СКОРОСТЬ СИНТЕЗА БЕЛКА

Итак, рассмотрен процесс трансляции, включающий инициацию, элонгацию и терминацию. Оказалось, что их параметры различаются между собой по степени эффективности регуляции биосинтеза белка. Эти параметры определяются степенью (долей)

рибосом в полирибосомах¹ и абсолютной скоростью синтеза белка².

Показано, что инициация является более чувствительным этапом регуляции, чем терминация. Действительно, во многих нормальных, патологических и экстремальных ситуациях регуляция трансляции осуществляется путем изменения скорости инициации, оказывающей большое воздействие на свойства белоксинтезирующей системы. Средняя скорость синтеза полипептидных цепей *in vivo* приблизительно в 2,5 раза выше в клетках бактерий по сравнению с животными клетками: при 37°С соответственно 16—17 аминокислот в секунду [140] и 6—7 аминокислот в секунду. Причина этого различия пока не выяснена. Возможно, что высокая эффективность синтеза белка в бактериях объясняется сопряжением транскрипции и трансляции, большей транслирующей активностью рибосом либо большей концентрацией или активностью белковых факторов трансляции.

Скорость синтеза полипептидов в бесклеточных системах прокариотов и эукариотов в 1,5—10 раз меньше, чем в интактных клетках. Вероятно, этот факт объясняется неоптимальными условиями синтеза белка *in vitro*. Скорость синтеза полипептида в суспензиях клеток эукариотов обычно меньше, чем в культурах клеток и в клетках *in vivo*.

Скорость элонгации полипептидной цепи на различных участках мРНК зависит от многих причин, и в частности от дефицита одной или нескольких аминокислот, входящих в состав данного полипептида.

Скорость деления клеток и рост клеточной популяции. Переход клеточной популяции от экспоненциальной к стационарной фазе роста характеризуется уменьшением абсолютной скорости синтеза белка и сдвигом полирибосомного профиля от тяжелых полирибосом к легким полирибосомам и одиночным рибосомам. Изменения этих свойств белоксинтезирующей системы обусловлены увеличением среднего времени инициации трансляции.

Выращивание клеток на среде без какого-либо необходимого для биосинтеза белка ингредиента вызывает дезагрегацию полирибосом и уменьшение абсолютной скорости его синтеза. Однако сдвиг полирибосомного профиля в сторону легких агрегатов свидетельствует о параллельном увеличении среднего времени инициации трансляции, т. е. регуляция биосинтеза белка в данных условиях определяется изменениями двух параметров.

Инкубация клеток на среде, сбалансированной по питанию, увеличивает абсолютную скорость биосинтеза белка, а также относительное содержание и размер полирибосом.

Влияние температуры. Скорость инициации трансляции обладает ярко выраженным температурным оптимумом. Так, например, понижение температуры микроорганизмов до 0—8°С вызывает

¹ Доля рибосом в полирибосомах равна числу рибосом в полирибосомах, деленному на общее число рибосом.

² Абсолютная скорость синтеза белка выражается числом рибосом, удаляемых из полирибосом за интервал времени Δt .

уменьшение абсолютной скорости синтеза белка и дезагрегацию полирибосом, что в совокупности с данными об увеличении времени синтеза свидетельствует об ингибировании инициации трансляции. Повышение температуры выше оптимальной также приводит к уменьшению скорости инициации и к дезагрегации полирибосом. Например, у мутантных дрожжей абсолютные скорости синтеза белка и мРНК, а также размер и процентное содержание полирибосом больше при 21°С, чем при 37°С. По-видимому, происходит ингибирование инициации при 37°С.

Антибиотик этионин ингибирует инициацию трансляции, циклогексимид при небольших концентрациях ингибирует элонгацию, а при высоких — инициацию.

Пути регуляции метаболизма рибосом на уровне трансляции определяются до некоторой степени способом поступления мРНК из ядра в цитоплазму. Полагают, что мРНК может поступать или в виде комплекса с меньшей рибосомной субчастицей, либо путем «вытягивания» мРНК рибосомами через поры ядерной мембраны, либо в виде специфических мРНК-комплексов, т. е. вне связи с рибосомами, наконец, либо в виде свободной («голой») мРНК.

Возможно, что могут существовать различные механизмы транспорта и включения в полирибосомы для короткоживущих (1,0—1,5 ч) и долгоживущих (5—6 ч) мРНК и для мРНК, свободных и связанных с мембранами полирибосом. На основании обнаружения на 3'-конце мРНК дрожжей некодирующих последовательностей (состоящих в основном из полиадениловой кислоты — поли-А) было высказано предположение, что поли-А определяет время жизни мРНК и скорость движения рибосом по мРНК.

Регуляторная функция тРНК в биосинтезе белка. Подтверждается правомочность гипотезы об участии тРНК в регуляции биосинтеза белка на уровне трансляции генетической информации. Среди тРНК имеется некоторое число модуляторных тРНК, выполняющих регуляторные функции в клетке¹. Одни из них могут вызывать замедление, а другие усиление синтеза белка. Так, например, на стадии высокой жизнедеятельности организма акцепторная способность для многих аминокислот, участвующих в синтезе белка, возрастает во много раз. В это же время отмечается резкое увеличение содержания соответствующих аминоксил-тРНК-синтетаз. Таким образом, жизнедеятельность клетки связана с существенными изменениями наборов тРНК и соответствующих синтетаз. Эти изменения коррелируют с аминокислотным составом соответствующих белков. Вероятно, происходит смена состава тРНК и набора аминоксил-тРНК-синтетаз по стадиям роста микроорганизма.

Модификация структуры тРНК является основой для регулирования биологической активности модуляторных тРНК, а через них и биосинтеза белка. Изменение структуры молекулы тРНК связано прежде всего с модификацией оснований, с их метилированием (минорностью). В тРНК содержится намного больше минорных оснований, чем в любой другой нуклеиновой кислоте. Содержание их в тРНК сильно возрастает по мере усложнения организма и достигает 20%. Примером физиологической роли модифицированных оснований могут служить функции риботимидина, расположенного в петле универсального олигонуклеотида вторичной структуры тРНК. Исключение из этого правила представляют только молекулы инициаторных тРНК^{Met} эукариотов и, по-видимому, мутанты микроорганизмов. Полагают, что риботимидин присутствует и у мик-

¹ Модулятор, или эффектор, может либо ингибировать, либо стимулировать реакцию при любой данной концентрации субстрата.

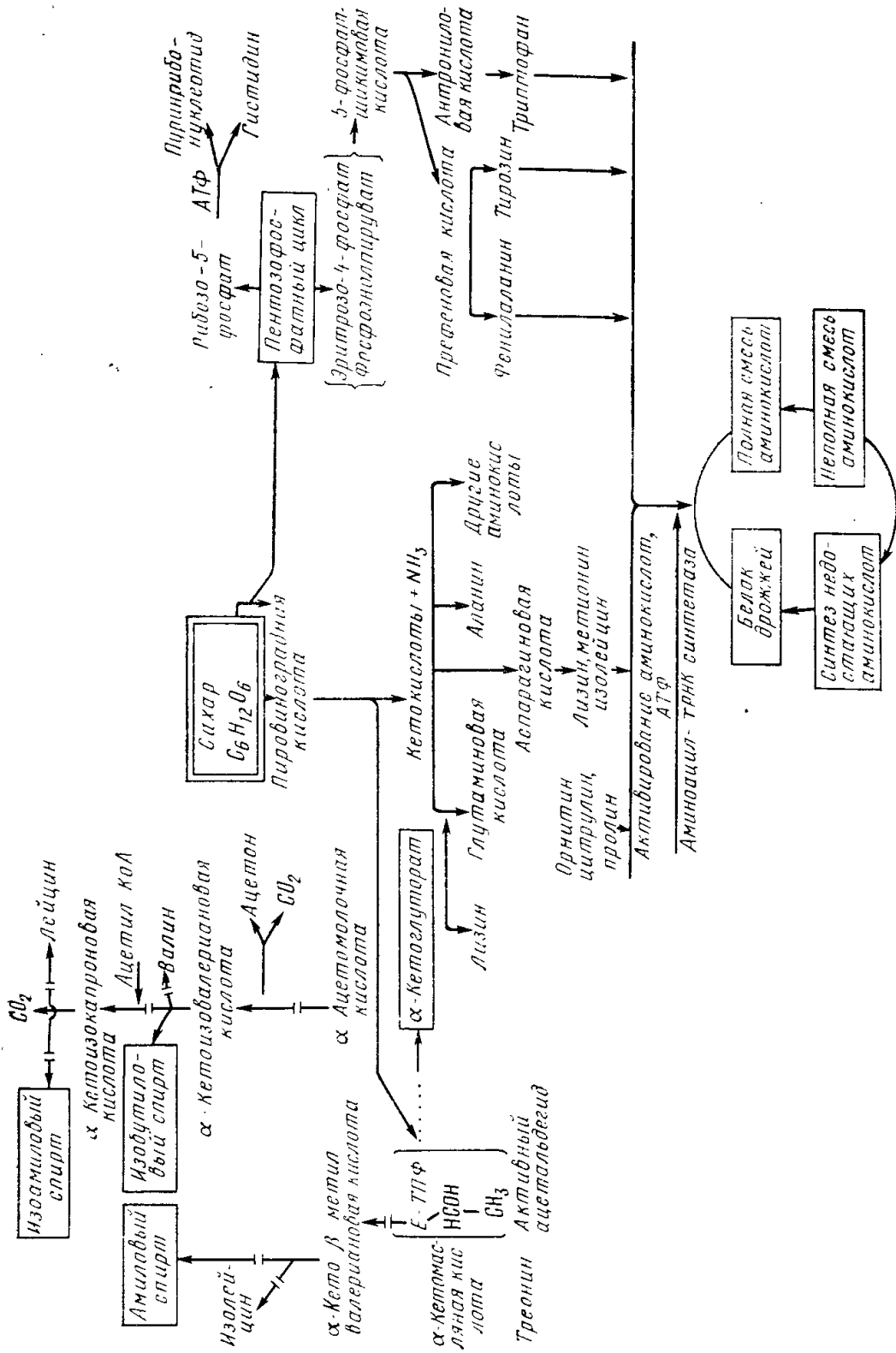


Рис. 5-21. Схема взаимосвязи синтеза аминокислот, высших спиртов и белка (E—фермент, ТПФ—тиаминпирофосфат).

роорганизмов и также участвует в связывании тРНК с рибосомой. Это связывание служит звеном регулирования биологической активности тРНК. Универсальный олигонуклеотид ТЦГ связывается комплементарно с тетрауклеотидом ЦГАА, входящим в состав РНК, и через него — с большой субъединицей рибосомы. Специфические тРНК, включающие урацил, также участвуют в регулировании белкового синтеза на уровне трансляции. У голодающих по метионину бактерий снижается образование риботимидина. Для микроорганизмов установлено, что на 1 моль тРНК приходится 1 моль риботимидина, тогда как в тканях животных содержится только 0,5 моль.

Модификация структуры молекулы тРНК проявляется и у антикодона, а также у соседнего с антикодоном пуринового основания. Эти модификации являются инструментом регулирования биологической активности индивидуальных тРНК.

В заключение приводим общую схему биосинтеза аминокислот и белка (рис. 5—21). Она предусматривает возможность прямой ассимиляции клетками аминокислот из естественных сред при биосинтезе белка, а также образования побочных продуктов брожения.

ОБМЕН НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Нуклеиновые кислоты представляют собой сложные макромолекулы, являющиеся важнейшими компонентами всех живых клеток. Хотя белки служат основными компонентами биологических клеточных структур, сами они своим существованием обязаны нуклеиновым кислотам, несущим всю информацию о строении живой материи. Эти молекулы хранят наследственные признаки, передающиеся из поколения в поколение на протяжении многих веков, и воплощают их в реальные жизнеспособные организмы.

Нуклеиновые кислоты являются полимерными соединениями, молекулы которых построены путем многократного повторения нескольких основных (мономерных) единиц, называемых нуклеотидами. Предшественниками при синтезе нуклеиновых кислот являются мононуклеотиды, которые представляют собой строительные блоки. Однако мононуклеотиды используются не только как строительные блоки нуклеиновых кислот, но также как коферменты и вещества — аккумуляторы энергии. Следовательно, они выполняют не одну, а несколько функций. Более 1000 нуклеиновых кислот микроорганизмов построены всего из 8 мононуклеотидов. Постоянство каждого вида организма сохраняется благодаря наличию лишь ему свойственного набора нуклеиновых кислот и белков [72, 72 а, 129, 141, 39].

МОНОНУКЛЕОТИДЫ И ИХ БИОЛОГИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

СОСТАВ И СТРОЕНИЕ МОНОНУКЛЕОТИДОВ

Мононуклеотиды состоят из трех главных компонентов: 1) азотистого основания (аденин, цитозин, гуанин, тимин, урацил); 2) сахара пентозы; 3) фосфорной кислоты. Схематически их можно представить в следующем виде (рис. 6—1). В составе нуклеотидов, таким образом, встречаются три главных пиримидиновых основания: урацин, тимин и цитозин, обозначаемые соответственно У, Т и Ц, и два главных пуриновых основания: аденин и гуанин, обозначаемые А и Г. Указанные два класса азотистых оснований являются производными двух ароматических гетероциклических соединений: пиримидина и пурина (рис. 6—2). В свою очередь пурин является производным пиримидина: его молекула состоит из конденсированных колец пиримидина и имидазола.

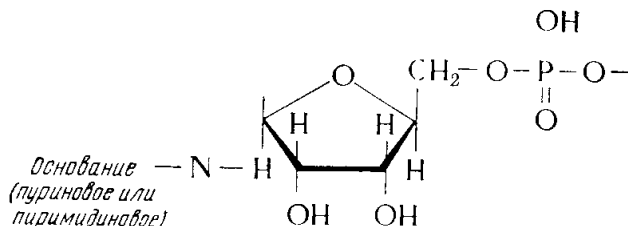


Рис. 6—1.
Схематическое строение мононуклеотидов.

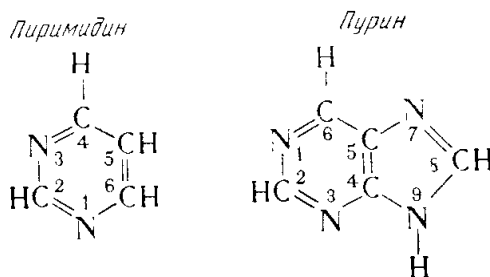


Рис. 6—2.
Химическое строение пурина и пиримидина.

Кроме главных пиримидиновых оснований — тимина (5-метил-2,4-диоксипиримидин), урацила (2,4-диоксипиримидин), цитозина (2-окси-4-аминопиридин) — и главных пуриновых оснований — аденина (6-аминопурин) и гуанина (2-амино-6-оксопурин) — встречаются также минорные основания, которые обнаруживаются реже, чем остальные, но играют исключительную роль в жизнедеятельности микробной клетки. В связи с этим минорные пиримидиновые и пуриновые основания выделены нами особо (рис. 6—3), причем в сопоставлении с соответствующими главными основаниями.

Свободные пиримидиновые и пуриновые основания очень сходны по своим свойствам. Они слабо растворимы в воде; существуют в таутомерных формах. Атомы азота в кольцах пиримидинов и пуринов имеют слабоосновный характер; значения pK^1 для них лежат в области pH от 9 до 10. При более высоких значениях pH они теряют свои протоны. Все пуриновые и пиримидиновые основания нуклеиновых кислот интенсивно поглощают в ультрафиолетовой области спектра при 260—280 нм.

Главные, или обычные, рибонуклеотиды и дезоксирибонуклеотиды приведены на рис. 6—4. В дезоксирибонуклеотидах имеются только два положения, по которым в 2-дезоксирибозе может образоваться сложноэфирная связь с фосфорной кислотой, а именно 3'- и 5'-положения. В биологических системах встречаются как 3'-, так и 5'-дезоксирибонуклеотиды.

В рибонуклеотидах фосфорная группа может находиться в 2'-, 3'- и 5'-положениях.

¹ Константа, характеризующая буферную емкость pH.

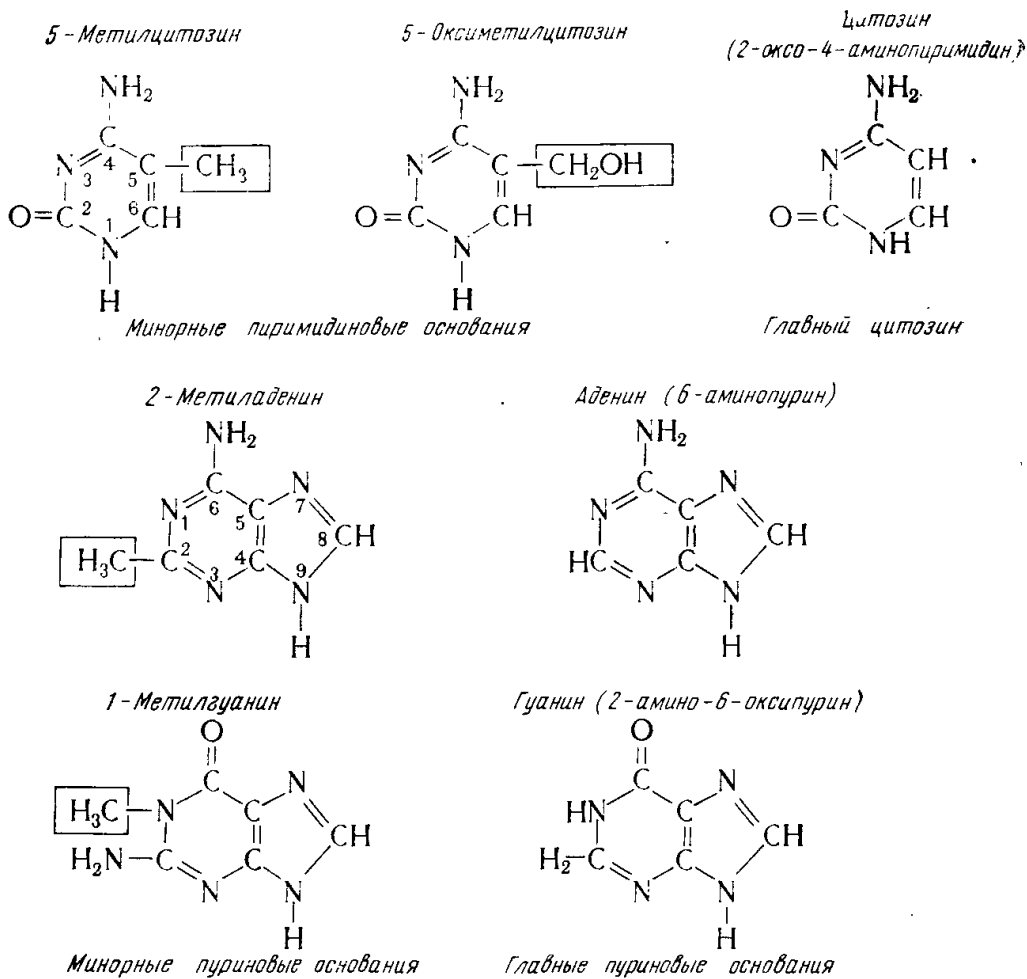


Рис. 6-3. Минорные пиримидиновые и пуриновые основания и сопоставление их структуры с соответствующими главными основаниями (отличительные группы даны в рамках).

Количества некоторых рибонуклеотидов в метаболическом фонде дрожжей представлены в табл. 16. В наибольшем количестве в дрожжах обнаружены АТФ, АДФ и АМФ. Относительно меньше содержится гуниловой, а также уридиловой кислоты. В минимальных (следовых) количествах обнаружена цитидиловая кислота. Высокое содержание АТФ характерно для всех дрожжей

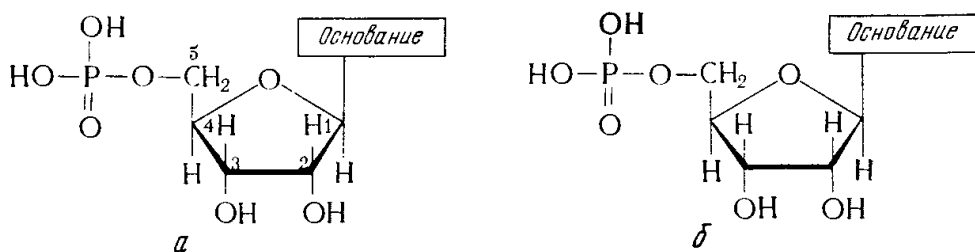


Рис. 6-4. Главные или обычные рибонуклеотиды (а) и дезоксирибонуклеотиды (б).

Таблица 16

Содержание некоторых нуклеотидов в клетках дрожжей *Candida guilliermondii* при различных концентрациях железа в среде (в мг на 1 г сухой массы)

Нуклеотиды	Фаза роста дрожжей в среде			
	содержащей 0,2 мкг железа в 1 мл		обедненной железом	
	логарифмическая, 18 ч	стационарная, 60 ч	стационарная	
			36 ч	60 ч
АМФ (адениловая кислота, или аденозин-5-фосфорная кислота)	1,12	1,09	0,55	0,56
АДФ (аденозиндифосфат)	1,49	1,28	1,61	1,53
АТФ (аденозинтрифосфат)	2,80	1,18	4,51	4,56
ГМФ (гуаниловая кислота, или гуанозин-5-фосфорная кислота)	0,31	0,23	Следы	Следы
ГДФ (гуанозиндифосфат)	1,13	0,39	0,89	0,40
ГТФ (гуанозинтрифосфат)	1,10	0,35	0,88	0,77
ЦМФ (цитидиловая кислота, или цитидин-5-фосфорная кислота)	Следы	Следы	Следы	Следы
УМФ (уридилловая кислота, или уридин-5-фосфорная кислота)	0,46	0,43	0,17	0,13

и отличает эти организмы от остальных исследованных грибов [12]. Другой особенностью состава фракций нуклеотидов у дрожжей является довольно высокое содержание ГДФ-маннозы, которая вместе с УДФ-сахарами принимает участие в построении клеточной стенки.

Для дрожжей *Sacch. cerevisiae* характерен максимум в логарифмической фазе роста с понижением в стационарной.

Мононуклеотиды обоих типов — рибонуклеотиды и дезоксирибонуклеотиды — представляют собой сильные кислоты: значение pK для двух способных к диссоциации ОН-групп остатка фосфорной кислоты соответствует приблизительно 1,0 и 6,2. Поэтому при pH 7,0 свободные нуклеотиды находятся главным образом в форме $R-O-PO_3^{2-}$, где R — остаток нуклеозида.

В связи с тем что в состав мононуклеотидов входят пиримидиновые или пуриновые основания, все они интенсивно поглощают свет в области 260 нм.

Связь с содержащимся в мононуклеотидах 5-фосфатным остатком относительно устойчива при кислотном гидролизе. Однако фермент 5'-нуклеотидаза способен гидролитически отщеплять фосфатную группу в 5'-положении, не затрагивая N -гликозидной связи (рис. 6—5) [141]. При этом, как показано на рисунке, образуется нуклеозид. Следовательно, нуклеозиды — это N -гликозиды пиримидиновых или пуриновых оснований, в которых 1-й углеродный атом пентозы связан гликозидной связью с N -1 пиримидина или N -9 пурина. Гликозидная связь в природных нуклеозидах —

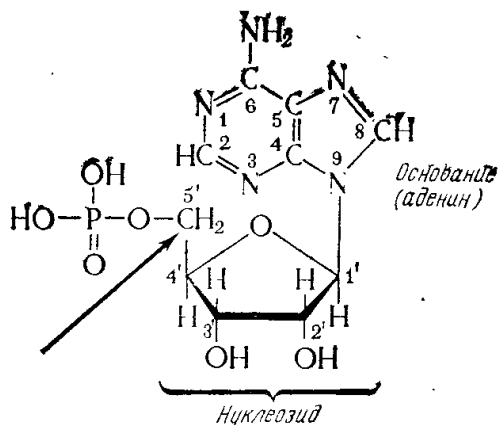


Рис. 6—5.
Образование нуклеозида и фосфорной кислоты в результате действия фермента 5-нуклеотидазы на мононуклеотид.

это всегда β -связь, а пентозы всегда присутствуют в фуранозной форме. Тривиальные названия четырех главных рибонуклеозидов и четырех дезоксирибонуклеозидов следующие: аденозин, гуанозин, цитидин и уридин; 2-дезоксаденозин, 2-дезоксигуанозин, 2-дезоксцитидин и 2-дезокситимидин. Подобно всем гликозидам, нуклеозиды относительно устойчивы к щелочам, но легко гидролизуются при нагревании в кислоте. При гидролизе нуклеозидов образуются свободные основания и свободные пентозы. Пиримидиновые нуклеозиды значительно более устойчивы к гидролизу, чем пуриновые. Оба типа нуклеозидов гидролизуются специфическими нуклеозидазами (рис. 6—6).

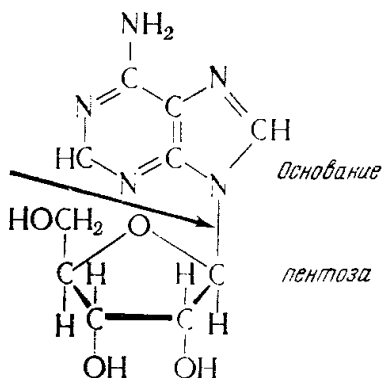


Рис. 6—6.
Образование основания и пентозы в результате действия на нуклеозид нуклеозидазы (показано стрелкой).

БИОЛОГИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ МОНОНУКЛЕОТИДОВ

Одна из наиболее важных функций, выполняемых мононуклеотидами в клетке, состоит в том, что они служат, как отмечалось ранее, строительными блоками при синтезе нуклеиновых кислот и тем самым участвуют в молекулярных механизмах, с помощью которых генетическая информация хранится, реплицируется и

транскрибируется. В то же время мононуклеотиды выполняют в клетке и многие другие биохимические функции. Прежде всего они играют важную роль в реакциях обмена веществ и энергетического обмена. Многие нуклеотиды участвуют в качестве коферментов в реакциях переноса энергии и в реакциях переноса остатков уксусной кислоты, сахаров, аминов и других биомолекул. Они служат также коферментами в окислительно-восстановительных реакциях.

Роль АТФ в биологическом окислении. Для клетки исключительное биохимическое значение имеет АТФ, т. е. аденозинтрифосфат, представляющий собой не что иное, как адениннуклеотид (аденозинрибозонуклеотид), к которому присоединены еще 2 остатка фосфорной кислоты. Вся молекула АТФ содержит в общей сложности три фосфатные группы:

Аденин + Рибоза + Фосфорная кислота + Фосфорная кислота + Фосфорная кислота.
(Аденозин)

Именно связь между второй и третьей фосфатной группой нуклеотида особенно богата химической энергией — это так называемая макроэргическая связь. Химическая энергия фосфатной связи может быть легко передана другому химическому соединению. Эта энергия используется прежде всего на всевозможный внутриклеточный синтез. Так, например, присоединение свободной аминокислоты к тРНК обеспечивается за счет химической энергии, заимствованной у АТФ. Теряя одну фосфатную группу, АТФ превращается в АДФ (аденозиндифосфат), который уже беднее энергией, а химическая энергия третьей фосфатной связи (АМФ) расходуется на образование связи между аминокислотой и тРНК.

Унифицирующим аккумулятором энергии в дрожжевой клетке, а также в клетке других организмов является система АДФ — АТФ. Процессы, сопровождающиеся высвобождением свободной энергии, связаны с синтезом АТФ. С другой стороны, процессы, протекающие с потреблением энергии, связаны с расщеплением АТФ. Следовательно, АТФ представляет собой связующее звено между процессами поглощающими и дающими энергию, и содержание АТФ в клетках имеет важное значение с точки зрения энергетического обмена.

Содержание АТФ в дрожжах. Как уже отмечалось ранее, количество АТФ значительно варьирует в зависимости от возраста культуры и среды, на которой выращивается микроорганизм. Дрожжевые клетки, которые ассимилируют в качестве источника углерода *n*-парафин, содержат меньше АТФ, чем клетки, выращенные на глюкозе. Особенно велика эта разница в начале экспоненциальной фазы роста дрожжей. В то же время выращенные на парафине дрожжи содержат в 2 раза больше полифосфатов по сравнению с клетками, выращенными на глюкозе. В связи с этим высказывается предположение о том, что недостаток АТФ покрывается избытком энергетически богатых соединений — полифосфатов и, возможно, последние каким-то образом принимают участие в окислении парафинов.

В литературе имеются сведения о кратковременном повышении содержания АТФ в клетках дрожжей, развивающихся в условиях периодического и непрерывного культивирования при супраоптимальных (выше оптимальных) темпера-

турах [180]. Оказалось, что хотя содержание адениловых нуклеотидов (АТФ, АДФ, АМФ) у дрожжей рода *Candida* при повышении температуры возрастает, однако рост клеток при этом ингибируется. При этом было показано, что на образование АТФ в клетках не влияли различные источники углерода, а именно этанол, глюкоза, глицерин [228]. Однако под воздействием субмаксимальной температуры содержание АТФ в дрожжах возрастало с 0,96—1,05 до 1,5—5,0 мкг на 1 мг сухой биомассы [228]. Такое явление, по-видимому, связано со снижением активности фосфогидролаз (АТФаз). При этом одновременно происходит уменьшение содержания в дрожжах АДФ и АМФ (табл. 17).

Т а б л и ц а 17

Влияние субмаксимальной температуры на рост и содержание нуклеотидов в клетках хемостатной культуры дрожжей *Candida utilis* ВКМ У—1668 при $D=0,1 \text{ ч}^{-1}$ в стационарном и переходном состояниях [228].

Температура культивирования, °С	Длительность культивирования, ч	Биомасса, г/л	Фосфогидролазная активность, мкг Р на массу (в г) всей биомассы	Нуклеотиды, мкг на массу (в мг) всей сухой биомассы			εС на всю биомассу
				АТФ	АДФ	АМФ	
Стационарное состояние							
30	96	2,3	480	1,04	0,36	0,75	0,57
Переходное состояние							
40	1	2,0	420	1,20	0,33	0,68	0,62
40	3	1,6	255	1,74	0,21	0,44	0,77
40	5	1,6	180	2,10	0,11	0,32	0,85

Примечания: 1. Если количество АТФ рассчитать на мг живых высушенных клеток, то оно составит в переходном состоянии 1,32—2,96 и 4,20 мкг.

2. Энергетический заряд клетки (εС) высчитывали по общепринятой формуле:

$$\frac{\text{АТФ} + 0,5 \text{ АДФ}}{\text{АТФ} + \text{АДФ} + \text{АМФ}} = \text{εС} [46].$$

Извлечение нуклеотидов производили из 5 мл культуральной жидкости с дрожжевыми клетками путем добавления 5 мл кипящей дистиллированной воды и кипячения смеси с обратным холодильником в водяной бане 10 мин. Содержание АТФ в дрожжах определяли с использованием люциферин-люциферазного метода.

Таким образом, при неблагоприятных условиях культивирования дрожжей, и в частности повышенной температуре, отмечается увеличенное содержание в них АТФ, что объясняется, вероятно, инактивацией фермента фосфогидролазы (АТФазы).

РОЛЬ НУКЛЕОТИДНЫХ КОФЕРМЕНТОВ В ОБМЕНЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Мононуклеотидные коферменты. В связывании и последующей передаче отдельных фрагментов субстрата: водорода (электрона), ацильных групп и т. п.—участвуют наряду с ферментами некото-

рые низкомолекулярные соединения, так называемые коферменты и простетические группы. Они соединены с ферментами не одинаково прочно.

Вещества, которые на белке присоединяют фрагмент субстрата, а затем отделяются, чтобы передать этот фрагмент на другом ферментном белке второму соединению, называют коферментами. Низкомолекулярные соединения, прочно связанные с белковой частью фермента и не отделяющиеся от нее во время присоединения и передачи фрагментов субстрата, называются простетическими группами. Примером может служить гемогруппа цитохрома с, ковалентно связанная с его пептидной цепью. К мононуклеотидным коферментам относятся прежде всего НМН (никотинамидмононуклеотид), ФМН (флавиномононуклеотид, или рибофлавинфосфат) и кофермент А (рис. 67).

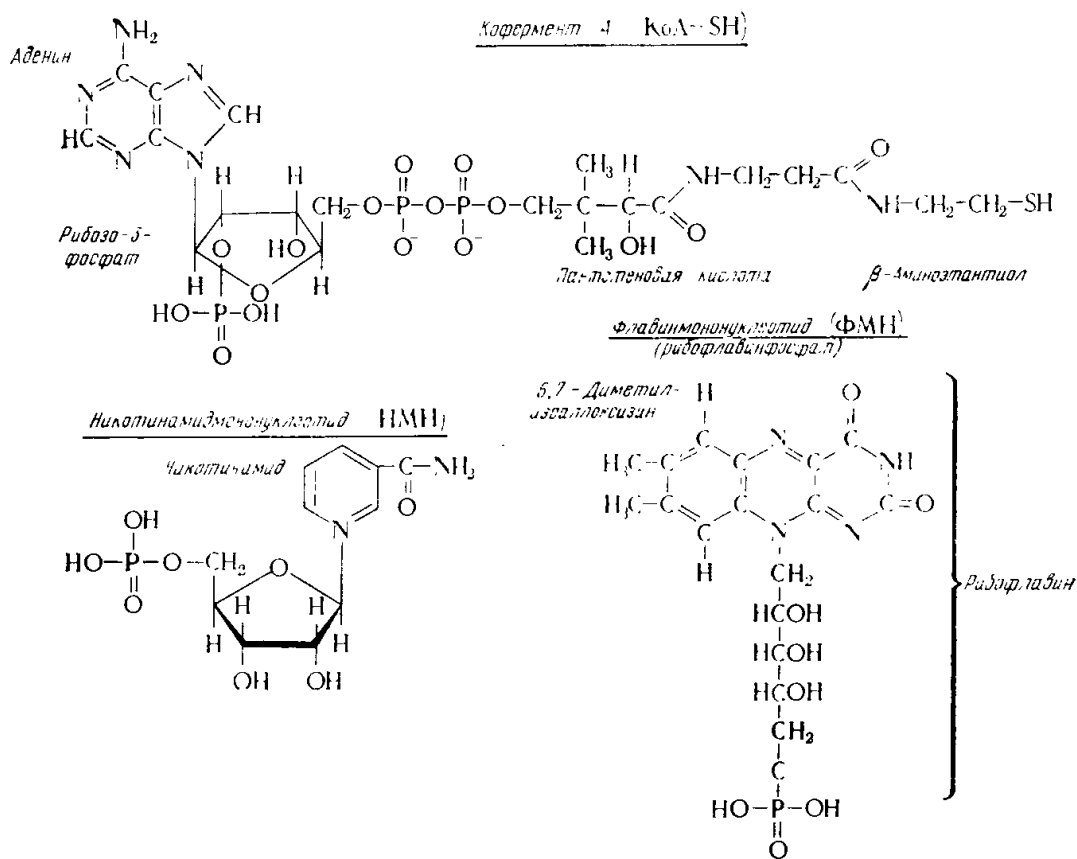


Рис. 6—7.
Мононуклеотидные коферменты.

Следует отметить, что содержащиеся в некоторых мононуклеотидах (НМН, ФМН) азотистые основания отличаются от тех, которые обнаружены в нуклеиновых кислотах. Флавиномононуклеотид (ФМН) — это 5-фосфорный эфир рибофлавина, или витамина В₂, необходимый часто для дрожжей. ФМН, содержащий в качестве пятиуглеродного сахара не рибозу, а ее производное — сахаро-

спирт *D*-рибит, выполняет важную функцию окислительно-восстановительного кофермента, участвуя в клеточном дыхании; изоаллоксазиновое кольцо претерпевает при этом обратимое окислительно-восстановительное превращение. Кроме того, ФМН служит предшественником в синтезе другого важного окислительно-восстановительного кофермента — флавинадениндинуклеотида (ФАД). В молекулах НМН и кофермента А азотистое основание связано β -*N*-гликозидной связью с *C*-1*D*-рибозы. Азотистое основание в НМН и ФМН¹ — это соответственно никотинамид и 6,7-диметилизоаллоксазин. Никотиновая кислота — это витамин, в котором нуждаются многие дрожжи. НМН служит предшественником никотинамидадениндинуклеотид (НАД).

Кофермент А содержит аденин, связанный β -гликозидной связью с *C*-1*D*-рибозы. В 5'-положении *D*-рибозы имеется пирофосфатная группа, этерифицированная пептидоподобным соединением пантотенил- β -аминоэтанттиолом. Пантотеновая кислота — это еще один витамин группы В, являющийся необходимым компонентом для питательной среды при культивировании дрожжей. Функция кофермента А заключается в переносе ацильных групп, связывающихся сложноэфирной связью с его тиоловой группой. Эта группа коферментов содержит в своей молекуле какой-либо витамин группы В.

Динуклеотидные коферменты. Динуклеотиды состоят из двух мононуклеотидных единиц, соединенных фосфатным мостиком. Они образуются, как правило, в результате ферментативного гидролиза нуклеиновых кислот. Пример такого динуклеотида представлен на рис. 6—8.

Однако у некоторых динуклеотидов фосфатный мостик между мононуклеотидами образован не за счет 3'-, 5'-фосфодиэфирной, а за счет какой-либо иной связи. Такие динуклеотиды образуются не из нуклеиновых кислот, а содержатся в клетке в свободном состоянии. Часто такие нуклеотиды являются коферментами. К ним относятся прежде всего флавинадениндинуклеотид (ФАД), никотинамидадениндинуклеотид (НАД) и никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФ)², содержащий в своем составе третью фосфатную группу (см. рисунок). Все эти три кофермента — динуклеотиды содержат аденозин-5-фосфат. В состав НАД и НАДФ входит также никотинамиднуклеотид. Во всех трех коферментах две мононуклеотидные единицы связаны между собой ангидридной связью; их фосфатные группы образуют 5'-, 5'-пирофосфатный мостик. НАДФ — это производное НАД, в котором имеется еще одна молекула фосфорной кислоты, связанная сложноэфирной связью с *C*-2 аденинмононуклеотида. НАД и НАДФ служат коферментами в ферментативных окислительно-восстановительных реакциях; пиридиновое кольцо никотинамида способно претерпевать обратимое окисление.

¹ Этот нуклеотид неправильно назван флавиномононуклеотидом.

² НАД и НАДФ ранее также обозначали соответственно ДПН (дифосфопиридиннуклеотид) и ТПН (трифосфопиридиннуклеотид).

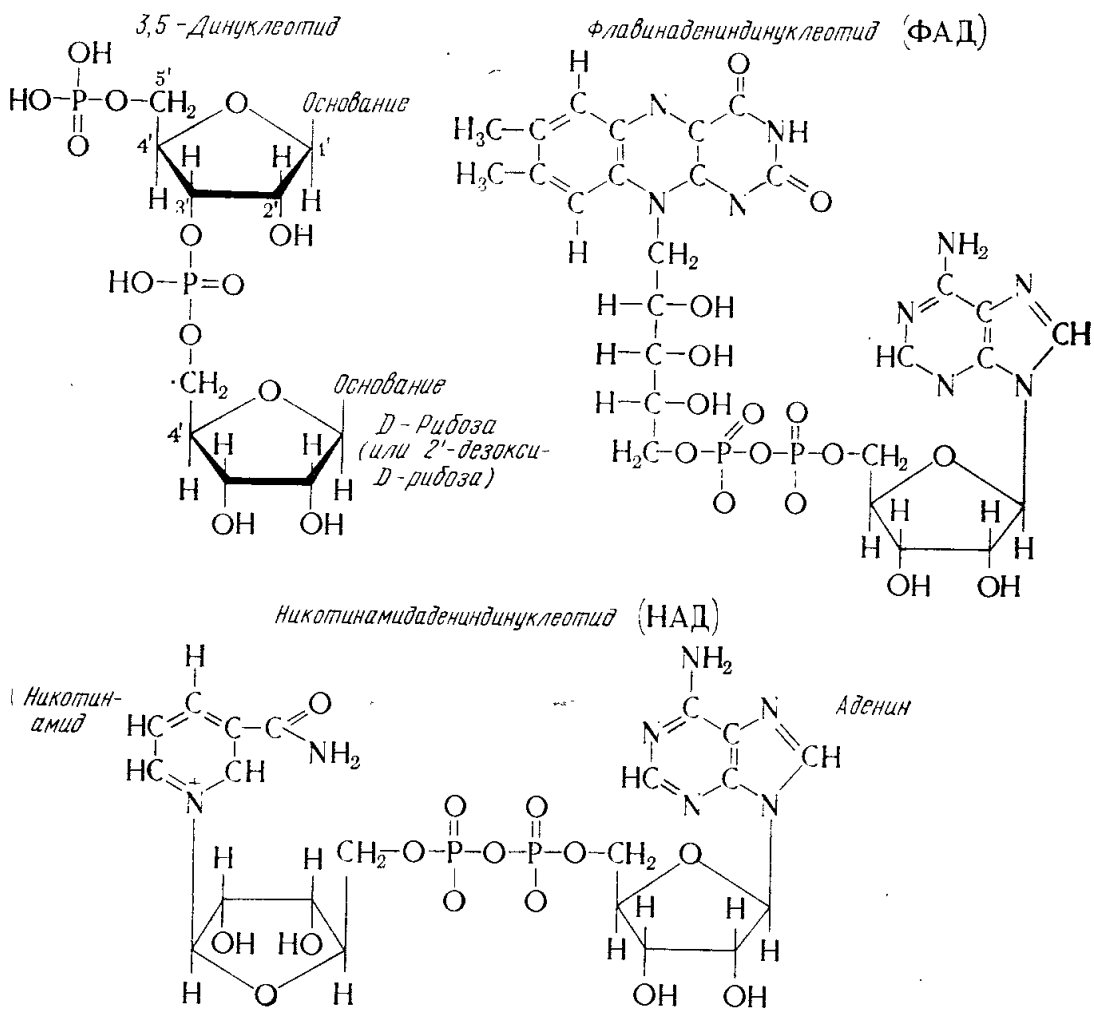


Рис. 6—8.
Динуклеотидные коферменты.

Молекула ФАД по строению аналогична НАД. Она состоит из одного остатка аденинрибонуклеотида и одного остатка флавинонуклеотида, соединенных между собой ангидридной связью по 5-фосфатным группам. Изааллоксазиновое кольцо ФМН и ФАД претерпевает обратимое окислительно-восстановительное превращение. ФМН и ФАД служат простетическими группами для определенного класса окислительно-восстановительных ферментов, известных под названием флавинодегидрогеназы.

Моно- и динуклеотидные коферменты приведены ниже. Здесь же приводятся и другие наиболее важные коферменты, переносящие не только электроны, но и некоторые атомы и функциональные группы. Следует также отметить, что многие коферменты содержат в качестве активных компонентов вещества, присутствующие в клетках в следовых количествах (рибофлавин, тиамин, пантотеновая кислота, никотинамид), и в то же время эти вещества абсолютно необходимы для нормальной жизнедеятельности

клеток; они являются для многих микроорганизмов витаминами, т. е. организм должен получать их из питательной среды.

Наиболее важные коферменты, переносящие электроны, некоторые атомы или функциональные группы

Коферменты	Группы, подлежащие переносу
Никотинамидмононуклеотид (НМН)	Атомы водорода (электроны)
Флавиномононуклеотид (ФМН) (рибофлавинфосфат)	Атомы водорода (электроны)
Кофермент А (КоА—SH)—	Ацильные группы
Никотинамидадениндинуклеотид (НАД+)	Атомы водорода (электроны)
Никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФ+)	То же
Флавинадениндинуклеотид (ФАД)	»
Кофермент Q	»
Тиаминпирофосфат (ТПФ)	Альдегиды
Липоамид	Ацильные группы
Кобамидные коферменты	Алкильные группы
Пиридоксальфосфат	Аминогруппы
Биоцитин	Двуокись углерода

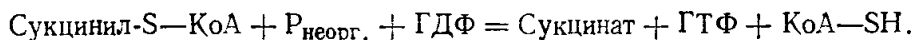
Таким образом, нуклеотиды представляют собой не только исходный материал для построения полимерных молекул нуклеиновых кислот, но и входят в состав различных коферментов или сами являются коферментами, участвующими в синтезе и превращениях важнейших компонентов клетки — белков, углеводов и липидов.

Так, например, функционирование рибосом обеспечивается ГТФ, т. е. гуанозин-5'-фосфатом, а синтез фосфатидов, полисахаридов клеточной стенки и другие процессы протекают с участием цитидиновых и уридиновых нуклеотидов в качестве коферментов.

Известно и участие отдельных свободных пуриновых и пиримидиновых нуклеотидов в процессе обмена веществ. Например, нуклеотиды урацила и прежде всего УМФ, УДФ, УТФ принимают непосредственное участие в превращениях глюкозы — галактозы, в синтезе гликогена, в образовании глюкуроновой кислоты и синтезе глюкуронидов, в построении клеточной стенки и т. п.

В частности, найдены в дрожжах УДФ-глюкоза, УДФ-галактоза, УДФ-ксилоза, УДФ-арабиноза, УДФ-галактуроновая кислота и многие другие.

Нуклеотиды гуанина — ГМФ, ГДФ, ГТФ — и их производные участвуют в синтезе белка, в частности, ГТФ обеспечивает присоединение активированной аминокислоты к РНК микросом. В процессе дыхания они воспринимают энергию, которая высвобождается при образовании сукцината из сукцинилкоэнзима А по формуле



Эти нуклеотиды участвуют в биосинтезе пурина, а производные ГДФ участвуют в качестве коферментов в превращениях сахаров группы маннозы. Поэтому не случайно обнаружены соединения ГДФ-маннозы, ГДФ-маннуровой кислоты, ГДФ-фукозы, ГДФ-рамнозы, ГДФ-d-глицеро-d-манногептозы, ГДФ-галактозы.

Нуклеотиды цитозина — ЦМФ, ЦДФ, ЦТФ — и их производные также играют важную роль в процессе обмена веществ клетки. В частности, они принимают участие в биосинтезе фосфатидов, в значительной мере определяющих жизнедеятельность дрожжевой клетки. В настоящее время обнаружены такие физиологически активные соединения, как ЦДФ-этаноламин, ЦДФ-глицерин, ЦДФ-глюкоза, ЦДФ-рибит.

Роль нуклеотидов аденина — АМФ, АДФ, АТФ — и их производных уже отмечалась ранее. При этом подчеркивалось, что система АДФ — АТФ представляет собой основной аккумулятор энергии в клетке. По современным данным, АТФ способен принимать участие в различных реакциях двояким образом:

- 1) $\text{АТФ} + x \rightleftharpoons \text{АДФ} + x\text{-фосфат}$ (фосфорилирование глюкозы);
- 2) $\text{АТФ} + y \rightleftharpoons \text{АМФ} - y + \text{пирофосфат}$.

Здесь энергия фосфатной связи, освобождающаяся при отщеплении от АТФ пирофосфата, остается в связи смешанного ангидрида, например аминоациладенилаты. Как уже отмечалось ранее, производные АМФ и АДФ могут участвовать в качестве коферментов в биосинтезе различных веществ. Например, АМФ-пептиды — в биосинтезе пептидов, АДФ-глюкоза — в биосинтезе углеводов, включая гликоген.

Обращает на себя внимание значительное преобладание адениловых нуклеотидов, особенно АМФ и АДФ. Это объясняется, по-видимому, тем, что адениловые нуклеотиды являются обязательными и необходимыми донаторами фосфатных групп в процессе фосфорилирования всех других нуклеотидов.

Обнаружено в дрожжевых клетках также большое количество УДФ-производных, которые, как известно, принимают участие в биосинтезе цитоплазматических полисахаридов, а также полисахаридов клеточных стенок. Кроме того, оказалось, что «глюкозные» дрожжи содержат относительно больше нуклеотидов, чем дрожжи, выращенные на среде с парафинами. Отмечается и другая особенность в содержании нуклеотидов в дрожжах, полученных в разных вариантах опыта. Содержание их с развитием культуры в глюкозном варианте увеличивается, тогда как парафиновые варианты содержат приблизительно одинаковое количество нуклеотидов, рассчитанных на 1 г сухой биомассы.

Интерес представляет наличие относительно повышенного содержания ЦДФ-производных в парафиновом варианте культуры дрожжей.

Таким образом, во всех вариантах полученных клеток отмечено преобладание содержания адениловых нуклеотидов по сравнению с остальными нуклеотидами. В дрожжах, выращенных на парафине, обнаружены ЦДФ-производные — коферменты, участвующие, вероятно, в синтезе соединений типа тейхоевых кислот.

Нуклеиновые кислоты, как уже отмечалось ранее, являются полимерными соединениями, построенными путем многократного повторения нуклеотидов.

РОЛЬ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТИ КЛЕТКИ

Нуклеиновым кислотам, как и белкам, приписывается ведущая роль в онтогенезе микроорганизмов. Они служат главными носителями генетической информации, обеспечивают синтез белка и молекулярную организацию цитоплазмы. Этими общебиологическими функциями нуклеиновые кислоты связаны со всеми важнейшими жизненными процессами: делением и ростом клеток, сохранением и передачей свойств и признаков в потомстве и т. д. Установлено, что в процессе онтогенеза прежде всего синтезируются и накапливаются нуклеиновые кислоты и только после этого такие вещества, как сахара, гликоген, белки, липиды, а также общая сумма веществ, составляющих сухое вещество биомассы.

СОСТАВ И СТРОЕНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Долгое время полагали, что существует только две нуклеиновые кислоты: одна, содержащая сахар рибозу и называемая рибонуклеиновой кислотой (РНК), и другая, содержащая сахар дезоксирибозу и называемая дезоксирибонуклеиновой кислотой (ДНК). Сравнительная характеристика ДНК и РНК представлена в табл. 18. Однако в настоящее время обнаружено много различных видов РНК и ДНК, различающихся деталями строения и ролью в обмене веществ.

Таблица 18
Сравнительная характеристика ДНК и РНК

Нуклеиновые кислоты	Химический состав		Макромолекулярная структура	Локализация в клетке	Функция
	углевод	азотистые основания			
ДНК	Дезоксирибоза	Адеин, гуанин, тимин, цитозин	Двойная полинуклеотидная спираль	Ядро	Хранение генетической информации
РНК	Рибоза	Адеин, гуанин, урацил, цитозин	Одинарная полинуклеотидная цепь, образующая складки	Цитоплазма, ядро	Передача информации до ДНК на белок, обеспечение специфического синтеза белка

ДНК содержится в хромосомах клеточного ядра, а также в гораздо меньшем количестве в митохондриях. Она служит главным носителем генетической информации. РНК содержится в ядре, рибосомах и в меньших количествах в других частях клетки. В то же время ДНК и РНК имеют много общих химических и физических свойств, так как представляют собой цепи из моионуклеотидных единиц, ковалентно связанных между собой с помощью фосфодиэфирных мостиков, соединяющих 3'-положение одного мононуклеотида с 5'-положением его соседа.

Общее строение нуклеиновых кислот схематично представлено ниже.

Нуклеиновые кислоты (полинуклеотиды)

Мононуклеотиды



В этой схеме обозначены наряду с обычными основаниями (А, Г, Ц и У) также и модифицированные мононуклеотиды, т. е. содержащие не главные, а минорные основания — метилцитозин, метилгуанин, 5-оксиметилцитозин и 2-метиладенин. Содержание нуклеотидов, имеющих модифицированные основания, доходит, например, в тРНК до 10% общего содержания оснований. Кроме того, молекулы тРНК содержат другие необычные мононуклеотиды, такие, как псевдоуридиловая кислота (гликозидная связь находится в положении 5 урацила, а не в обычном положении 3) или риботимидиловая кислота (минорный тимин, являющийся компонентом ДНК, а не РНК).

Нуклеиновые кислоты плохо растворимы в водных растворах кислот. Однако их можно экстрагировать из клеток растворами нейтральных солей или фенолом.

Существующее ныне представление о структуре ДНК сложилось только в начале 1950-х годов. Установлено, что все молекулы ДНК из клеток всех типов построены из четырех основных мононуклеотидных единиц, а именно дАМФ, дГМФ, дТМФ и дЦМФ, связанных в различной последовательности 3'-, 5'-фосфодиэфирными мостиками. Препараты ДНК, выделенные из различных организмов, различаются как по соотношениям и последовательности этих четырех мононуклеотидных единиц, так и по молекулярной массе. Наряду с обычными основаниями — аденина, гуанина, тимина и цитозина, содержащимися во всех препаратах ДНК, обнаруживаются одновременно в небольших количествах метилированные производные этих оснований. В большинстве клеток размеры молекул ДНК настолько велики, что выделить их в интактном виде нелегко. Как в дрожжевых, так и в других эукариотических клетках, содержащих несколько хромосом, присутствует и несколько молекул ДНК, каждая из которых также имеет очень большую молекулярную массу.

У бактерий имеется только одна хромосома и одна молекула ДНК с молекулярной массой более $2 \cdot 10^9$, на долю которой прихо-

дится около 1% биомассы [115] и которая локализована в ядерной зоне; она часто прикреплена к особому «впячиванию» клеточной мембраны, называемому мезосомой. ДНК, очевидно, не связана с белками. Иногда в цитоплазме бактерий обнаруживаются молекулы внехромосомной ДНК; эти молекулы, значительно уступающие хромосоме по размерам, называются плазмидами или эписомами в зависимости от их генетических взаимоотношений с хромосомной ДНК.

В диплоидных дрожжевых клетках преобладающая часть ДНК сосредоточена в ядре, где она связана с белками основного характера — гистонами и распределена между хромосомами. Наряду с ядерной ДНК дрожжи содержат в небольших количествах (0,1—0,2% всей клеточной ДНК) еще цитоплазматическую, или сателлитную, ДНК, локализованную в митохондриях. Эта ДНК отличается от ядерной по составу оснований и молекулярной массе. Установлено, что в дрожжевых клетках содержится около $6 \cdot 10^{-9}$ мг ДНК на одно ядро, или 0,2—0,3% от биомассы дрожжей [109].

СИНТЕЗ ДНК И ХАРАКТЕРИСТИКА ФЕРМЕНТОВ

Скорость биосинтеза ДНК не зависит от образования РНК и белка. Так, например, при переводе клеток со среды, содержащей только глюкозу, на среду с глюкозой и аминокислотами скорость синтеза РНК резко повышается, в то время как скорость синтеза ДНК и белка увеличивается постепенно.

Синтез ДНК можно объяснить лишь исходя из структуры ее молекулы. Как известно, молекулы ДНК представляют собой двухтяжевую структуру, каждая из тяжей которой состоит из чередующихся нуклеотидов. Двухтяжевая структура ДНК обусловлена комплементарностью ее цепей: аденину всегда соответствует тимин, а гуанину — цитозин. Биосинтез ДНК, как и РНК, имеет матричный характер. При репликации — процессе удвоения ДНК — двойная спираль раскручивается, обе ее нити становятся матрицами, на

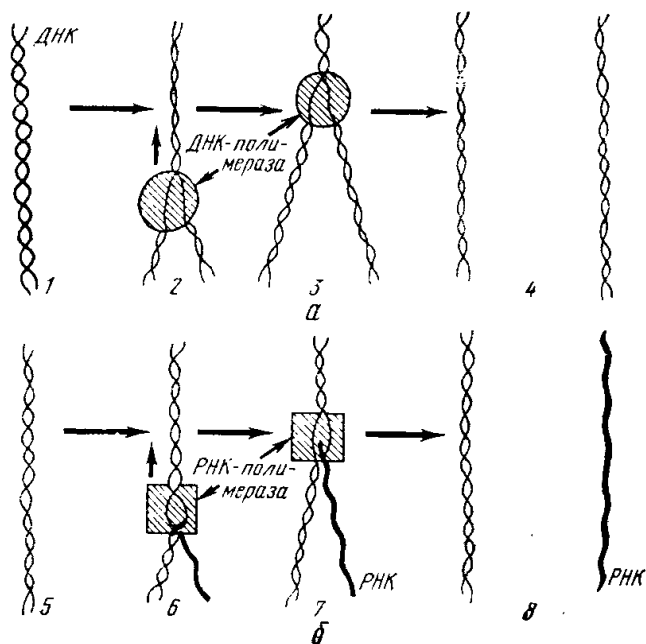


Рис. 6—9
Сравнение двух форм матричного синтеза нуклеиновых кислот:
а — репликация; б — транскрипция.

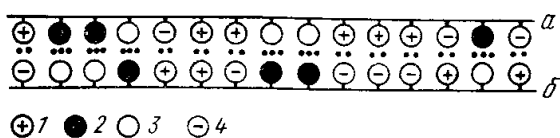


Рис. 6—10.

Схематическое изображение двухтяжевой структуры ДНК, обусловленной комплементарностью ее цепей: 1 — аденин; 2 — цитозин; 3 — гуанин; 4 — тимин; .. — две водородные связи; ... — три водородные связи между тяжами (а, б)

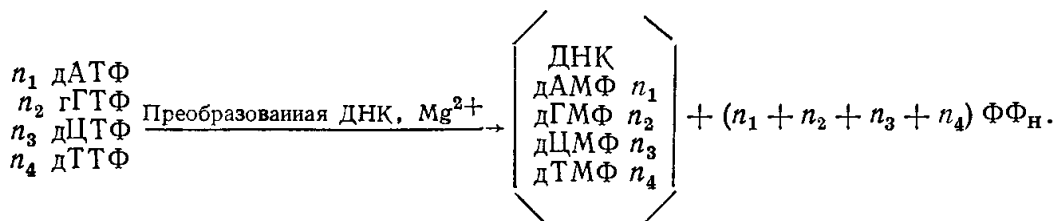
которых при участии фермента ДНК-полимераза строятся две новые комплементарные нити ДНК.

Фермент ДНК-полимераза, катализирующий этот процесс, сначала прикрепляется к молекуле ДНК и затем начинает двигаться вдоль

молекулы ДНК-матрицы (рис. 6—9). Вновь синтезирующийся нуклеотид занимает на поверхности молекулы фермента положение, комплементарное очередному основанию ДНК-матрицы. Схематическое изображение двухтяжевой структуры ДНК, обусловленной комплементарностью ее цепей, показано на рис. 6—10. Когда фермент пройдет вдоль всей молекулы ДНК, возникнут две молекулы ДНК, каждая из которых будет содержать по одной новой и по одной старой цепи, причем обе молекулы будут идентичны той молекуле ДНК, из которой они образовались.

Таким образом, в общих чертах показан возможный механизм репликации ДНК.

ДНК-полимераза. Очищенный фермент ДНК-полимераза, выделенный из бактериальных клеток, катализирует синтез межнуклеотидных связей ДНК в системах, содержащих смесь дАТФ, дГТФ, дЦТФ и дТТФ¹. Суммарная реакция может быть представлена в следующем виде:



Реакция протекает только в присутствии некоторого количества преобразованной ДНК². Фермент специфически нуждается в 5-трифосфатах дезоксирибонуклеозидов в качестве предшественников. Кроме того, реакция осуществляется только в присутствии 5-трифосфатов всех четырех дезоксирибонуклеозидов, обычно входящих в состав ДНК.

ДНК-полимераза катализирует присоединение мононуклеотидных единиц к свободному 3'-гидроксильному концу цепи ДНК. Следовательно, синтез ДНК происходит в направлении 5'→3' (рис. 6—11). Вероятно, реакция осуществляется путем нуклеофильного замещения, при котором нуклеофильная 3'-гидроксиль-

¹ д — дезоксирибонуклеозиды.

² Это характерная особенность фермента. Эта ДНК, вероятно, служит затравкой и матрицей.

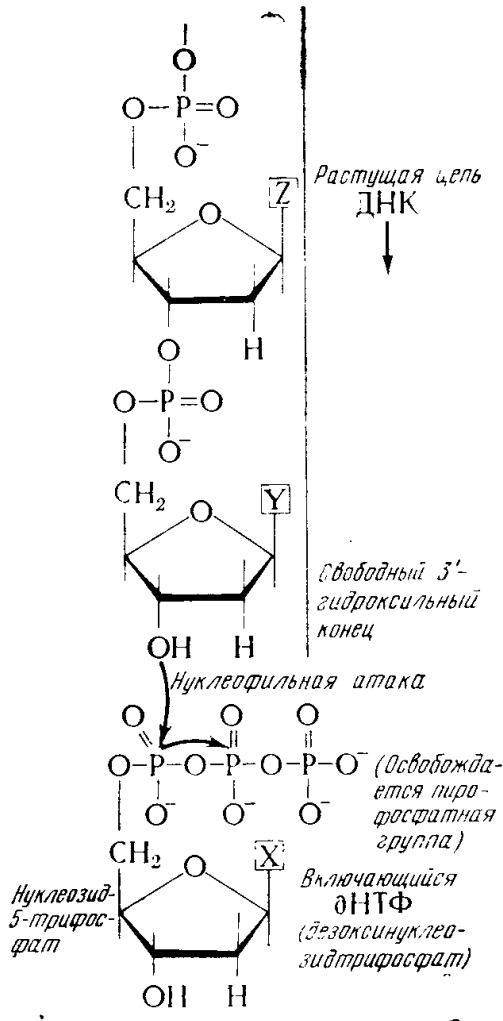
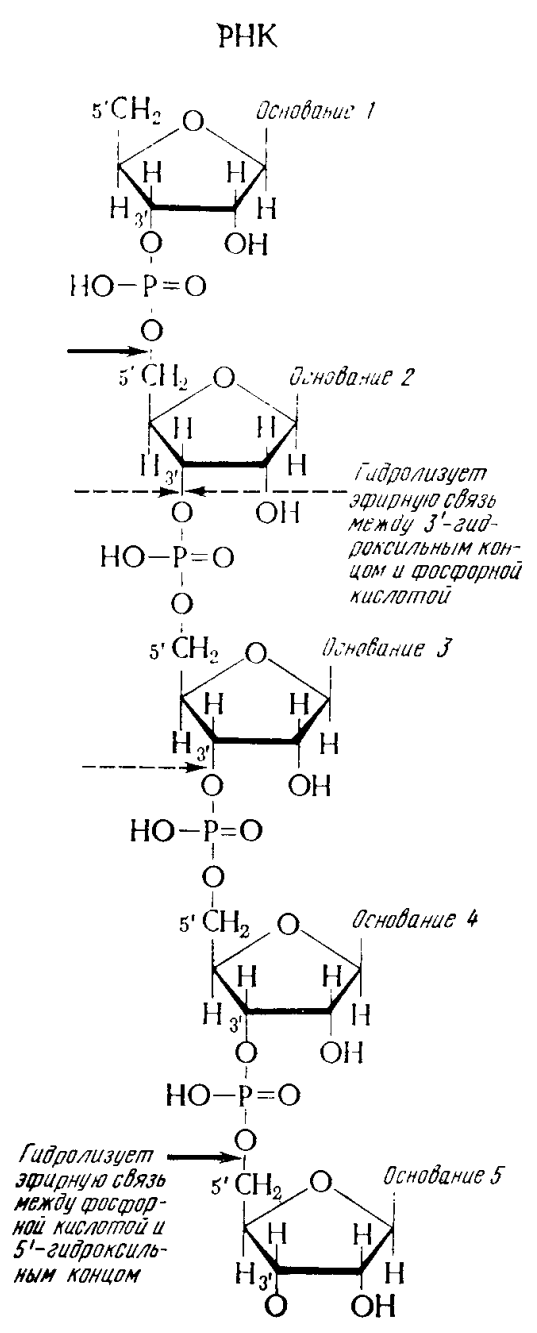


Рис. 6—11.

Механизм наращивания цепи ДНК при действии ДНК-полимеразы.

Рис. 6—12.

Структура полинуклеотида и действие на него эстераз; действие РНКазы из поджелудочной железы или фосфодиэстеразы из селезенки показано сплошной стрелкой, действие фосфодиэстеразы змеиного яда или актиномицетов — пунктирной.



ная группа конечного мононуклеотидного остатка на растущем конце цепи атакует атом фосфора в α -фосфатной группе присоединяющегося нуклеозид-5'-трифосфата (дНТФ), вытесняя пирофосфатную группу с образованием межнуклеотидной связи. При этом образуется второй продукт — пирофосфат, быстро гидролизуемый пирофосфатазой до ортофосфата, вследствие чего в целом ДНК-полимеразная реакция сильно экзергонична. Однако уменьшение свободной энергии, обусловленное образованием двойной спирали за счет появившейся при этом одиночной цепи ДНК, является

причиной того, что полимеразная реакция в норме протекает в прямом направлении.

Интересно отметить, что ДНК-полимераза наряду с основной полимеразной активностью обладает способностью функционировать еще и как экзонуклеаза.

Таким образом, чистая ДНК-полимераза способна катализировать деградацию ДНК путем последовательного гидролитического отщепления мононуклеотидных остатков с любого (5'- или 3'-) конца цепи с образованием дезоксирибонуклеозидмонофосфатов. Следовательно, полимеразы фактически катализируют обратную реакцию полимеризации. Известны два типа экзонуклеаз:

1) фосфоэстераза змеиного яда, которая разрывает связи в молекуле ДНК (РНК), начиная гидролиз с 3'-конца, и образует в конечном гидролизате сумму 5'-нуклеотидов; аналогичное действие проявляет экзонуклеаза A_5 актиномицетов [151, 13, 14];

2) фосфодиэстераза (РНКаза) из селезенки быка или поджелудочной железы, которая осуществляет разрыв молекулы нуклеиновой кислоты, начиная катализ с 5'-конца.

Распад РНК под действием РНКаза поджелудочной железы и фосфодиэстеразы змеиного яда схематично показан на рис. 6—12. Установлено, что единственным типом связи между мононуклеотидными единицами в ДНК и РНК является 3', 5'-фосфодиэфирная связь. Поэтому в результате действия экзонуклеаз могут образоваться нуклеотидные единицы в форме нуклеозид-5'-фосфатов и нуклеозид-3'-фосфатов. Указанные экзонуклеазы могут проявлять действия при наличии свободной 3'-гидроксильной группы на конце полинуклеотидной цепи (экзонуклеаза змеиного яда) или 5'-гидроксильной группы (экзонуклеаза селезенки).

Бактериальная полимеразы имеет молекулярную массу 109 000. Очевидно, молекула фермента состоит из одной полипептидной цепи, построенной приблизительно из 1000 аминокислотных остатков. Она имеет, вероятно, форму, близкую к сферической (диаметр около 6,5 нм, а двухцепочечной ДНК около 2 нм). Фермент содержит одну сульфгидрильную группу, которая, однако, не существенна для его активности. Одна молекула фермента способна осуществлять присоединение приблизительно 1000 нуклеотидных остатков в минуту, причем молекулярная масса синтезированных цепей может достигать до нескольких миллионов. В клетках дрожжей и других эукариотов она локализована главным образом в ядре, и только незначительная часть — в митохондриях.

В молекуле фермента имеется один участок (предположительно в активном центре), способный связывать любой из четырех дезоксирибонуклеозид-5-трифосфатов, которые могут конкурировать между собой. В другом участке молекулы полимеразы связываются в линейные или кольцевые одноцепочечные ДНК, которые служат матрицами. Полимераза связывает кольцевую двухцепочечную ДНК лишь после того, как цепи ее начинают расходиться. Если, например, кольцевую двухцепочечную ДНК

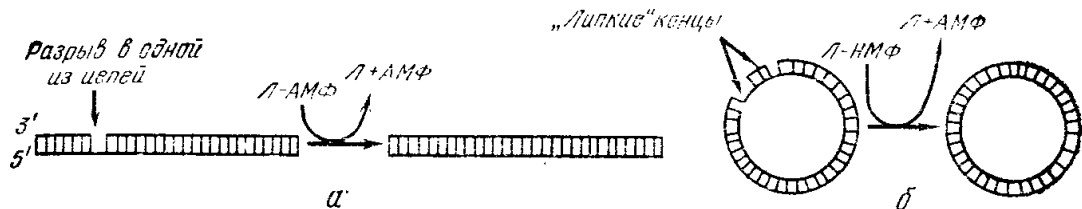
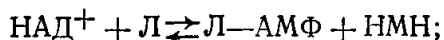


Рис. 6—13.
 Действие ДНК-лигазы при репарации разрыва в одной из цепей (а) и при замыкании кольцевой молекулы (б); Л — лигаза.

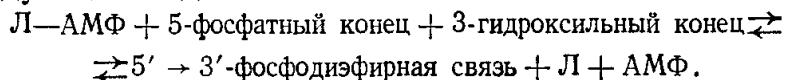
«разрезать» в одной точке одной из цепей с помощью панкреатической дезоксирибонуклеазы с освобождением 3'- и 5'-фосфатных концов, то такая ДНК обретает способность легко «связываться» полимеразой.

ДНК-лигаза. Из бактериальных клеток получен фермент способный соединять концы двух цепей ДНК или концы одной и той же цепи ДНК с образованием кольцевой молекулы. Однако фермент не способен реплицировать всю цепь. Этот фермент назвали соединяющим ферментом, или ДНК-лигазой. Реакция осуществляется в 2 этапа:

1) фермент взаимодействует с НАД⁺ с образованием ковалентного комплекса аденил—фермент (Л—АМФ)¹ и никотинамид-мононуклеотида (НМН):



2) 5'- и 3'-концы двух участков ДНК ковалентно связываются с комплементарной цепью. Суммарное уравнение этого процесса имеет следующий вид:



Так, например, происходит устранение разрыва при репарации в одной из цепей в результате спаривания комплементарных оснований репарируемой цепи с основанием матричной цепи, как это схематично показано на рис. 6—13.

Аналогичным путем могут соединяться концы линейной двухцепочечной молекулы ДНК с образованием кольцевой структуры. ДНК-лигаза требует присутствия интактной комплементарной цепи ДНК, в результате спаривания с которой два соединенных конца оказываются рядом и при этом может образоваться новая фосфодиэфирная связь. Освобождение АМФ из АМФ-лигазы при его взаимодействии с ДНК является качественной и количественной пробой на наличие 5'PO₄- и 3'ОН-разрывов в двухспиральной ДНК. Если фермент находится в клетке в активированном состоянии в виде АМФ-лигазы, то он способен связывать концы разрывов полинуклеотидных цепей без добавления кофакторов, в частности НАД. Отмечено, что часть ДНК-лигазы, ассоциированная с хроматином ядра, находится в виде АМФ-лигазы и спо-

¹ Лигаза — АМФ.

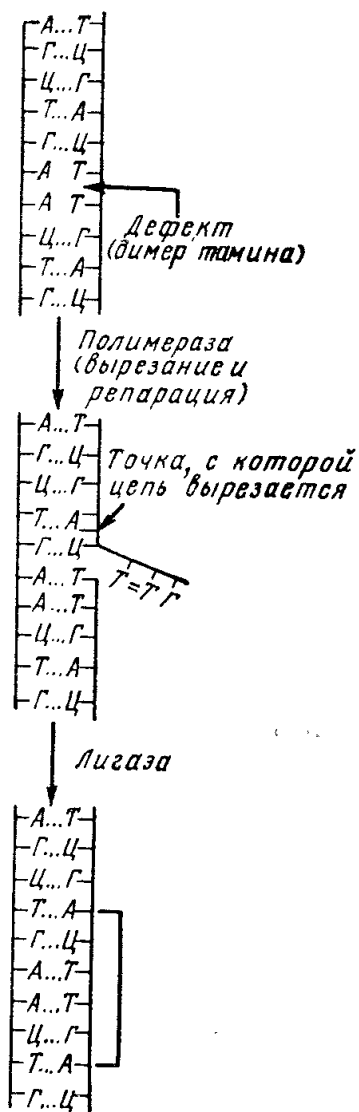


Рис. 6—14.
Вырезание участка цепи ДНК, содержащего димеры тимина, возникшие при облучении ультрафиолетом (вырезанный участок полностью восстанавливается и поддается репликации).

собна восстанавливать однонитевые разрывы в ДНК без добавок кофактора [281].

Необходимо отметить, что АМФ связывается лигазами через ϵ -аминогруппу лизина фосфоамидной связью: АМФ—(5'→N ϵ -лизин) (рис. 6—14). Следовательно, первым этапом ДНК-лигазной реакции является нуклеофильная атака ϵ -аминогруппы остатка лизина в молекуле фермента фосфорной группой НАД (или АТФ) с образованием АМФ-лигаз посредством Р-N-связи [288]. Место связи АМФ с ДНК удается доказать с помощью экзонуклеазы.

Как уже отмечалось, экзонуклеаза I специфично атакует ДНК с 3'ОН-конца. Этот фермент с 3'ОН-конца разрушает одиночные нити последовательно на 5'-моонуклеотиды, оставляя 5'-конечные динуклеотиды интактными. АМФ может соединяться с ДНК по двум концам: 5'РО₄ или 3'ОН. Оказалось, что после расщепления комплекса ДНК—АМФ экзонуклеазой I был обнаружен (³H)—АМФ, соединенный с 5'-динуклеотидом, что свидетельствует об образовании структуры ДНК-5'РО₄—АМФ [292]. Таким образом, АМФ в промежуточном продукте ДНК—АМФ лигазной реакции связывается с 5'РО₄-концом разрыва.

Не все известные ДНК-лигазы требуют в качестве кофактора только НАД. Некоторые лигазы проявляют строгую специфичность не к НАД, а к АТФ [233, 317, 341], который распадается с выходом 5'-АМФ и пирофосфатом. К такой АТФ-зависимой относится

фагоиндуцируемая лигаза, способная соединять разрыв в ДНК—РНК-гибридах [323]. АТФ- и НАД-зависимые лигазы активируются в присутствии ионов Mg и SH-соединений. Избыток несвязанных с ДНК гистонов в реакционной смеси значительно ингибирует активность лигазы [46, 47]. Активность ДНК-лигазы подавляется в присутствии актиномина D в реакционной среде с концентрацией 3 мкг/мл. Блеомицин дает тот же эффект в более низких концентрациях (0,1 мкг/мл) [346]. Ингибирующее действие блеомицина на ДНК-лигазу обусловлено, вероятно, способностью этого вещества вызывать деструктивное изменение в ДНК-субст-

пате в результате неспецифических для лигазы разрывов или путем связывания с 5'PO₄- и 3'ОН-концами полинуклеотидных цепей [289].

Функционирование лигаз в клетке. В связи с тем что ДНК-лигаза катализирует соединения двухспиральных разрывов ДНК, высказывают предположение, что этот фермент может играть важную роль в генной дупликации, генной конверсии и в механизмах генетической рекомбинации [371]. Активно размножающиеся клетки содержат достаточное количество ДНК-лигаз для регулирования многих процессов метаболизма ДНК. Одна клетка *E. coli*, например, содержит до 2000 молекул ДНК-лигаз с молекулярной массой (9—10) 10⁴. Это в 5 раз превосходит количество ДНК-полимераз, которое составляет 400 молекул на одну клетку *E. coli*. По-видимому, значительная часть лигаз локализована в ядерной фракции. В связи с наличием в клетке свободного пула НАД или АТФ высказывают предположение, что активная часть ДНК-лигазы находится, как отмечалось ранее, в виде аденнлатного комплекса АМФ-лигазы.

Активность ДНК-лигаз варьирует в ходе митотического цикла клеток. Оказалось, однако, что максимальная активность ДНК-лигазы не совпадает с синтезом ДНК. В то же время соотношение между эндонуклеазой и лигазой в клетке существенно для синтеза ДНК, и активность лигазы в разных фазах размножения клеток должна регулироваться. Поскольку одонитевые лигазо-специфические разрывы необходимы для начала репликативного синтеза ДНК, высокий уровень лигазы может ингибировать инициацию репликации, а понижение ее активности будет тормозить связывание вновь синтезированных низкомолекулярных фрагментов в высокомолекулярные структуры ДНК [205, 378, 354]. Итак, образующиеся в процессе репликативного синтеза низкомолекулярные фрагменты ДНК объединяются в высокомолекулярные с помощью ДНК-лигазы [305, 314, 343]. Таким образом, ДНК-лигаза необходима для нормального функционирования ДНК и поддержания жизнедеятельности клетки.

При наличии в клетке большого количества одонитевых и двунитевых разрывов, индуцированных, например, ионизирующей радиацией, часть концов этих разрывов имеет 5'PO₄- и 3'ОН-группы. Когда между этими концами нет свободных брешей, они легко связываются ДНК-лигазами [184, 311]. По-видимому, ДНК-лигазы восстанавливают без участия других ферментов часть двунитевых поломок. Вместе с тем 5'PO₄- и 3'ОН-концы — специфические субстратные точки на ДНК не только для лигаз, но и для ДНК-полимераз и экзонуклеаз [225].

Вероятно, между этими ферментами возникает конкуренция за субстрат, и не все разрывы сразу связываются лигазой [48, 46]. Это приводит к изменению в скорости репликации ДНК [205].

Применение ДНК-лигаз. Прежде всего фермент находит применение в исследованиях белкового синтеза, генетической инженерии. Лигаза позволяет синтезировать высокополимерные полинуклеотидные цепи с контролируемой последовательностью нуклеотидов. С помощью ДНК-лигазы синтеризован ген дрожжевой РНК [231], а также синтезирован *in vitro* ген ДНК *Bac. subtilis* большой молекулярной массы, обладающий трансформирующей активностью. Наконец, с помощью лигазы синтезирован фрагмент двунитевой ДНК, кодирующий аналог S-пептида рибонуклеаз А [298]. Кроме того, специфичность действия лигазы позволяет анализировать количественно число разрывов с 5'PO₄- и 3'ОН-концами в двунитевой молекуле ДНК.

Этот фермент найдет широкое применение в молекулярной биологии [46].

Репарация ДНК. Итак, разрывы в ДНК, возникающие под влиянием различных воздействий, репарируются ДНК-лигазой. Например, повреждения, возникающие в результате действия УФ-излучения и связанные с образованием димера тимина, репарируются с помощью особой системы ферментов, способной вырезать дефектный нуклеотид—тимин—тимин. При этом из цепи путем гидролитического расщепления межнуклеотидных связей вырезается участок по обе стороны димера на расстоянии одного или двух нуклеотидов от него. На место вырезанного участка ферментативным путем вставляются нуклеотиды, комплементарные соответствующим нуклеотидам «исправленной» цепи [141, 184, 209, 47].

Если дефекты появляются только в одной из цепей, то они легко репарируются и порядок транскрипции не нарушается.

Специфические эндонуклеазы. Ферменты расщепляют только одну из цепей ДНК и только на каком-то определенном участке [89]. В частности, эндонуклеазы обеспечивают одноцепочечный разрыв у двухцепочечной ДНК и тем самым инициируют стартовый сигнал репликации. Если, например, в ходе репликации возникают разрывы в цепях ДНК и они не устраняются процессом репарации, то эти «метаболические» разрывы могут стать, как уже указывалось, «стартовыми» точками эндоплазматических атак, которые обуславливают частичную деградацию ДНК и образование брешей. В то же время нерепарированные бреши могут быть причиной гибели клеток. Специфическая эндонуклеаза (или рестриктаза) защищает бактериальную клетку от проникновения в нее чужеродных ДНК. Это один из примеров, подтверждающих наличие строгого узнавания белками нуклеотидных последовательностей [31a, 170].

Метилаза. Наряду с обычными основаниями (А, Г, Ц, У и Т) в определенных типах нуклеиновых кислот, особенно в тРНК и в больших молекулах рРНК, обнаруживаются модифицированные или минорные основания. Метилирование ДНК в клетках бактерий и, по-видимому, других микроорганизмов высоко специфично и имеет существенное структурное и функциональное значение [37]. Небольшая часть метильных групп локализована в определенных нуклеотидных основаниях в виде N⁶-метиладенина и 5-метилцитозина. Метилирование нуклеотидов обеспечивает устойчивость по отношению к эндо- и экзонуклеазам. Например, было показано, что эндонуклеаза не способна расщеплять ДНК некоторых фагов, растущих в бактериях. Оказалось, что ДНК, устойчивая к эндонуклеазе, содержит в одной из цепей метилированный участок (остаток аденина замещен на 6N-метиламинопурин). Эта модификация катализируется специфической метилазой, способной узнавать ту же нуклеотидную последовательность, что и эндонуклеаза.

Установлено, что метилаза из *E. coli* состоит из двух субъединиц с молекулярной массой 60 000 и 55 000. В эндонуклеазе обнаружены те же две субъединицы и, кроме того, еще третья субъединица с молекулярной массой 135 000. Предполагают, что одна из

малых субъединиц ответственна за узнавание ДНК, а большая субъединица — за расщепление ее двойной спирали. Более того, установлена последовательность нуклеотидов участка ДНК, узнаваемого метилазой и эндонуклеазой.

ОСОБЕННОСТИ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК И ЕЕ СИНТЕЗА

Открытие ДНК в митохондриях [202, 48] послужило основанием для признания цитоплазматических генов. Это было подтверждено и результатами генетического анализа мутаций немейделевского типа, а также наличием в мДНК собственного аппарата, обеспечивающего процесс транскрипции и трансляции. Это позволило сделать предположение о возможности известной генетической автономии цитоплазмы.

Митохондриальная ДНК охарактеризована как двухцепочечная, с высокой молекулярной массой и своеобразным составом оснований. Она достаточно отличается и по среднему нуклеотидному составу от ядерной ДНК, и тем самым эти типы ДНК можно разделить в градиенте плотности хлористого цезия. В частности, ионы ртути в градиентах сульфата цезия присоединяются преимущественно к аденину и тимину и тем самым увеличивают плотность ДНК по сравнению с ДНК, богатыми гуанином и цитозином. Именно по характерной плотности и удалось идентифицировать митохондриальную ДНК.

Значительное количество ДНК представлено кольцевой формой. Установлено, что кольцевые двойные цепи, замкнутые ковалентными связями, обнаруживают большую плавучую плотность в хлористом цезии, чем «открытые» кольца тех же размеров и состава. Ковалентно замкнутые кольцевые молекулы, закрученные в спираль второго порядка, повышают плотность ДНК. Даже небольшого разрыва одной из цепей достаточно для того, чтобы разрушить эту вторичную спирализацию, что позволяет сверхзакрученному кольцу развернуться. Ковалентно замкнутые кольца более устойчивы к денатурирующему действию щелочей и нагреванию, чем «открытые» кольца и линейные молекулы. Замкнутые кольца из-за своей сверхзакрученности присоединяют меньше красителя (бромистый этидий, йодистый пропидий), чем «открытые» кольца или линейные молекулы, поэтому в градиенте плотности они оказываются тяжелее других форм.

Если митохондриальные ДНК из животных клеток имеют среднюю молекулярную массу около $1 \cdot 10^7$, то у дрожжей и микроскопических грибов молекулы мДНК примерно в 3—5 раз крупнее. Например, кольцевая молекула ДНК дрожжей *Saccharomyces* по величине составляет около 25—30 мкм в окружности, что соответствует молекулярной массе $(5 \div 6) \cdot 10^7$. Возможно, такие кольца представляют нативное состояние мДНК, в то же время на каких-то стадиях клеточного цикла в митохондриях имеются также и линейные молекулы.

Кольцевая структура ДНК может играть важную роль в регулировании процесса репликации.

Показано, что мДНК дрожжей удваивается полуконсервативным способом и не одновременно с ядерной ДНК, т. е. в другой момент клеточного цикла. Возможно, что репликация мДНК и яДНК находится под контролем независимых регуляторных систем. Так, например, антибиотик циклогексимид блокирует преимущественно репликацию ядерной ДНК, но не полностью подавляет синтез мДНК у дрожжей.

У дрожжей, выращиваемых в анаэробных условиях, соотношение между мДНК и яДНК такое же, как и в контрольной культуре при аэробном росте [202]. В то же время у некоторых мутантов дрожжей мДНК может необратимо исчезать [284, 355].

Хлебопекарные дрожжи, как факультативные анаэробы, могут обходиться без функций митохондрий.

Пока неизвестно, почему митохондриальная ДНК уцелела в ходе эволюционного процесса, в то же время ее материальный вклад в биогенез мито-

хондрий, вероятно, невелик. Это в какой-то мере подтверждается вышеприведенным примером, связанным с исчезновением у мутантов митохондрий. Обширный материал о митохондриальных ДНК обобщен Р. Сэджером (1975) и Г. Гаузе (1977).

СИНТЕЗ РНК И ХАРАКТЕРИСТИКА ФЕРМЕНТОВ

Известны три главных типа рибонуклеиновых кислот: информационная, или матричная, РНК (мРНК), транспортная РНК (тРНК) и рибосомная РНК (рРНК). Все три типа РНК характеризуются определенной молекулярной массой (от 25 000 до 1 000 000) и определенным нуклеотидным составом (число нуклеотидных остатков может варьировать от 75 до 3000). Молекулы у всех трех типов РНК одноцепочечные. В свою очередь каждый из типов РНК включает несколько молекулярных видов. Для рРНК известно три основных вида (молекулярная масса 35 000—55 000 и 1 000 000); число видов тРНК доходит до 60, а число видов мРНК достигает сотен и даже тысяч. В дрожжевых клетках содержание РНК во много раз (от 5—10 до 20—40 и даже 65) превышает содержание ДНК, как это можно заметить из данных, приведенных в табл. 19.

Таблица 19
Содержание РНК и ДНК в дрожжах *Sacch. cerevisiae* расы XII на различных фазах их роста (в % на сухую массу биомассы) [109]

Время от начала опыта, ч	РНК	ДНК	Время от начала опыта, ч	РНК	ДНК
0	8,95	0,18	24	8,90	0,17
3	11,12	0,17	36	8,30	0,18
6	11,71	0,18	48	7,75	0,17
9	11,52	0,17	72	7,23	0,18
12	11,30	0,18			

В дрожжевых клетках почти вся РНК обнаруживается в цитоплазме [307]. Исключение составляет лишь некоторая часть мРНК, которая синтезируется в ядре, а затем переходит на рибосомы.

Информационная, или матричная, РНК. Она содержит 4 основания: А, Г, Ц и У. Синтезируется мРНК в ядре в процессе транскрипции. При этом нуклеотидная последовательность одной из цепей хромосомной ДНК ферментативным путем «переписывается» (транскрибируется) с образованием одиночной цепи мРНК, причем ее основания комплементарны основаниям соответствующей цепи ДНК. На рибосомах мРНК используется в качестве матрицы, определяющей с помощью нуклеотидных триплетов (кодонов) последовательность аминокислот в синтезируемом белке.

В генетическом коде каждую из 20 аминокислот кодирует группа из трех нуклеотидов — кодонов. В дрожжевой клетке

мРНК содержится около 3% от всей РНК [286], но, несмотря на это, ее молекулы представлены многими видами, обеспечивающими синтез тысячи различных белков.

Транспортная (адапторная) РНК. Выполняет основную функцию, связанную с переносом на рибосому аминокислот, необходимых в ходе белкового синтеза [10]. Молекулярная масса разных тРНК варьирует от 23 000 до 30 000, что соответствует лишь 75—90 мононуклеотидных единиц, вследствие чего молекулы этой РНК не оседают при центрифугировании микросомных частиц. Каждой из протеиногенных аминокислот соответствует, как правило, несколько тРНК. Например, известны пять различных тРНК, специфически переносящих лейцин, и пять различных тРНК, переносящих серин. Образование ковалентной связи между молекулами аминокислоты и тРНК происходит вне рибосомы. Эта реакция двухстадийна: сначала аминокислота реагирует с молекулой аденозинтрифосфорной кислоты (АТФ), образуя аминоациладенилат, а последний потом реагирует с тРНК. Каждая аминокислота по очереди реагирует сначала с молекулой АТФ, а затем с молекулой своей тРНК. Катализирует соединение аминокислоты с тРНК аминоксил-тРНК-синтетаза (кодаза). Нагруженная аминокислотой тРНК переносит аминокислоту на полирибосомы (полисомы), где осуществляется синтез белка.

Митохондриальная тРНК обеспечивает перенос всех аминокислот [275]. В митохондриях дрожжей обнаружена *N*-формилметионил-РНК, которая, как известно, регулирует инициацию матричного синтеза полипептидных цепей в бактериальных системах, но не в цитоплазме клеток с истинными ядрами. Эти данные служат дополнительным средством независимой регуляции митохондриального и цитоплазматического синтеза белка.

Рибосомная РНК. На долю рибосомной РНК приходится до 65% массы рибосомы. Установлено, что на всех этапах сбалансированного роста микроорганизмов независимо от условий культивирования рибосомальная РНК составляет около 80% от суммарной клеточной РНК [116]. Поскольку основная масса клеточной РНК представлена рРНК и тРНК, то отношение рРНК/суммарная клеточная РНК является постоянной величиной, не зависящей от фазы и условий роста клеток, и составляет 0,8. Следовательно, в любой период сбалансированного роста клеток существует строгая координация синтеза рРНК и тРНК.

Показано, что минимальное число рибосом содержится в клетке в стационарной фазе роста (в среднем $19,3 \cdot 10^3$), а максимальное число — в конце лаг-фазы (в среднем $95,4 \cdot 10^3$) [117]. Аналогичная закономерность отмечается и в отношении образования рРНК.

Итак, содержание рибосом и рРНК в клетке сильно варьирует в зависимости от фазы роста, а следовательно, жизнедеятельности микроорганизма. При переходе клеток из неактивного состояния к активному росту содержание рибосом и рРНК в них резко увеличивается и сохраняется на высоком уровне в течение

всего периода активного роста. Вероятно, и наибольшая интенсивность биосинтеза белка в клетке будет наблюдаться в период, когда содержание рибосом и рРНК в них будет максимальным [117, 160].

Митохондриальные рибосомные РНК дрожжей [202, 48] и других эукариотов [261] обладают более рыхлой конфигурацией молекул по сравнению с РНК цитоплазматических рибосом проявляют меньшую термостабильность и большую чувствительность к небольшим изменениям ионных концентраций. Эти отличия можно связать отчасти и с составом оснований мРНК, в которых меньше гуанина и цитозина, и с другими особенностями, влияющими на их вторичную структуру в растворе.

В митохондриях дрожжей и других эукариотов обнаружены различные РНК, которые по величине их молекул разделяют на 3 обособленные группы: 1) рибосомные; 2) транспортные и 3) гетерогенные, в состав которых входят, вероятно, информационные [202, 48].

Биосинтез РНК. Показано, что содержание РНК у дрожжей, бактерий и грибов варьирует в зависимости от фазы роста культуры. Наибольшее количество РНК содержится, как отмечалось ранее, в клетках микроорганизмов в период их активного роста. Аналогичная закономерность отмечается и при росте бактерий (рис. 6—15).

В течение лаг-фазы содержание РНК в клетках увеличивается почти в 1,5—2,0 раза; в стационарной же фазе роста содержание РНК в клетках, наоборот, становится наименьшим. Итак, при переходе клеток из неактивного состояния к активному росту как в синхронной, так и в накопительной культуре биосинтез РНК происходит со скоростью, превышающей скорость биосинтеза белка. Это свидетельствует о том, что в течение лаг-фазы происходит накопление РНК в количестве, необходимом для поддержания интенсивности биосинтетических процессов, адекватной условиям роста [109, 110, 116]. Экстраполируя полученные данные,

Таблица 20

Содержание рибосом в клетках *Mucosoccus D-5* при культивировании в МПБ с аэрацией [116]

Номер опыта	Количество рибосом в клетке (10^3)						Стационарная фаза
	лаг-фаза		первая генерация		вторая генерация		
	начало	конец	начало	конец	начало	конец	
1	27,4	40,3	28,5	61,5	21,2	15,1	8,3
2	81,0	189,9	102,0	125,0	106,2	50,2	30,3
3	70,5	93,5	77,8	90,5	70,8	31,3	21,9
4	43,2	94,7	89,4	113,9	81,6	50,4	—
5	48,2	58,8	48,0	62,9	47,9	30,1	16,7

Примечание. Продолжительность лаг-фазы 40 мин, генерации — 30 мин.

можно заключить, что оптимальной стадией для перевода накопительной культуры на непрерывное выращивание является период, когда клетки обладают максимальным количеством РНК, а также рибосом (табл. 20), обеспечивающим наиболее высокий выход белка при заданном режиме проточной культуры. Итак, наиболее интенсивный синтез белка в клетках наблюдается в условиях максимального содержания в них РНК и рибосом.

Синтез всех клеточных РНК осуществляется на ДНК-матрице. Катализирует этот процесс РНК-полимераза и начинается он с присоединения фермента к специфическому участку ДНК, получившему название промотора [31a]. Строение участков ДНК-промоторов, ответственных за связывание РНК-полимеразы, пока с достоверностью не установлено. Однако удалось обнаружить σ -фактор, т. е. субъединицу фермента, ответственную за связывание РНК-полимеразы с промотором и обеспечивающую образование так называемого иницирующего комплекса [243]. Показано, что фермент взаимодействует сразу с достаточно большим участком (примерно, из 50 нуклеотидных остатков) двойной спирали ДНК. Структура промотора в значительной мере связана с исключительно сложным строением РНК-полимеразы.

РНК-полимеразы. Несмотря на сложность фермента за последнее время получены данные, характеризующие свойства и функциональные особенности различных форм ДНК-зависимой РНК-полимеразы и ее роль в процессах регуляции транскрипции, т. е. биосинтезе мРНК на ДНК. Различают три основные формы ДНК-зависимой РНК-полимеразы (КФ 2.7.7.6): ядрышковая, нуклеоплазматическая и митохондриальная, которые различаются между собой не только по локализации, но и по некоторым свойствам [211]. РНК-полимеразы А и В¹ имеют молекулярную массу 450 000—500 000 [335]. Каждый изофермент состоит из нескольких субъединиц [315]. С помощью иммунологического метода впервые дрожжевые РНК-полимеразы были охарактеризованы. Оказалось, что антисыворотка подавляла активность только РНК-полимеразы, в то время как другие две формы фермента (А и С) проявляли полную резистентность к антисыворотке, что свидетельствует о различиях в их антигенной структуре [357].

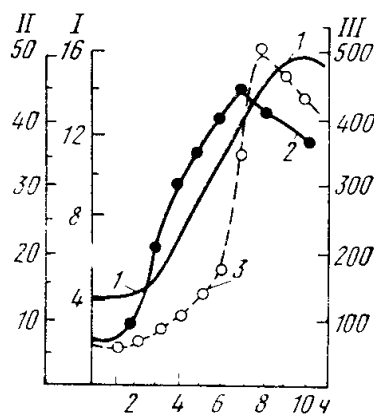


Рис. 6—15.
Кинетика содержания РНК и белка при культивировании клеток *Muscosoccus D-5* в условиях интенсивного массообмена:
1 — сухая биомасса цельной культуральной жидкости, г/л (I); 2 — содержание РНК, мгк на 1 мг сухой биомассы (II); 3 — содержание белка, мгк на 1 мг сухой массы (III) [116].

¹ Вторая и третья фракция, т. е. А и В, получаемые при фракционировании на ДЭАЭ-целлюлозе и ДЭАЭ-сефадексе.

Видимо, антигенные свойства РНК-полимеразы обусловлены в первую очередь малыми субъединицами и в меньшей мере — большими. Из-за несоответствия с данными других исследователей [367] вопрос об иммунологических свойствах различных РНК-полимераз остался пока открытым.

Показано, что активность индивидуальных РНК-полимераз зависит от концентрации ионов двухвалентных металлов и ионной силы [363]. РНК-полимеразы А и В проявляют максимальную активность при 0,01—0,05 и 0,10—0,14 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ соответственно. Возможно, стимулирующее действие соли заключается в освобождении новосинтезированных цепей РНК с ДНК и в депротенизации хроматина, используемого в качестве матрицы. Известно, что в хроматине бактерий 35—50% ДНК не маскировано белками и доступно для транскрипции [308]. При этом установлено, что бактериальную РНК-полимеразу связывали и транскрибировали различные участки ДНК и хроматина, причем у очищенной ДНК и у ДНК хроматина обнаружено одинаковое число участков, связывающих бактериальную РНК-полимеразу. В отличие от РНК-полимеразы высших организмов бактериальная РНК-полимераза проявляет неспецифичность в действии на хроматин и ДНК ядра. Показано, что токсин α -аманитин (высших грибов) представляет собой специфический ингибитор РНК-полимераз высших организмов [277], взаимодействуя непосредственно с ферментом, а не с ДНК [336].

Установлено, что одна молекула ингибитора связывается с одной молекулой РНК-полимеразы [310] и что блокирующее действие его направлено на процесс элонгации, т. е. удлинения полипептидной цепи.

Из животных тканей (печени) выделены белки с различной молекулярной массой (70 000, 30 000, 20 000), стимулирующие скорость синтеза РНК (в 8—10 раз) на нативной двухспиральной матрице РНК-полимеразой [369, 368]. Тем самым эти факторы стимуляции РНК-полимеразы регулируют синтез РНК; этот синтез отражает физиологическое состояние клетки. Поэтому любые воздействия на организм, приводящие к нарушению его состояния, должны влиять на синтез РНК. Подобные изменения могут возникать как при нарушении баланса в составе питательной среды, так и при отклонении от оптимального значения условий культивирования микроорганизма. РНК-полимеразная активность при этом может изменяться в результате модификации хроматиновой матрицы и функциональной активности фермента, причем последнее может происходить в основном по типу аллостерической регуляции.

Бактериальная РНК-полимераза осуществляет взаимосвязь с ДНК [29, 301]. По-видимому, количество связанной РНК-полимеразы зависит от числа одиночных разрывов и дефектов ДНК, и, вероятно, существует даже пропорциональность связывания количеству разрывов в ДНК [278].

Митохондриальная РНК-полимераза почти всегда обнаруживается в виде комплекса, стабильность которого нарушается детергентами.

Цитоплазматические ДНК-полимеразы, существующие в виде моно- и олигомеров с молекулярной массой от 54 000 до 220 000, отличаются по чувствительности к ингибиторам и проявлению активности на нативных и денатурированных матрицах [328]; это характерно и для митохондриальных РНК-полимераз [211]. Наряду с ДНК-зависимыми РНК-полимеразами, участвующими в синтезе митохондриальных РНК, обнаружены в митохондриях и другие РНК-полимеразы, нечувствительные, в частности, к рифамицину, актиномицину D и панкреатической РНКазе [310]. Известно, что рифамицин и актиномицин D

специфически ингибируют синтез РНК: первый за счет образования комплекса с РНК-полимеразой, а второй в результате способности связываться с матрицей. В то же время актиномицин D и кордицепин угнетают в митохондриях синтез РНК, но не влияют на образование полиаденилатов-(поли-А) РНК [82a], тогда как в ядрах кордицепин ингибирует именно полиаденилирование, а не транскрипции. РНК-полимеразы *N. crassa* очень эффективно используют в качестве матрицы синтетическую поли-Д (АТ), что отражает присутствие богатых АТ-участков в митохондриальном геноме [310]. Однако РНК-полимеразы ядра также обнаруживают высокое сродство к указанной матрице [327, 359]. Установлено, что синтез митохондриальной РНК-полимеразы осуществляется на цитоплазматических полисомах и на РНК-матрице, кодируемой ядерным геномом, причем оба эти процесса контролируются митохондриальным синтезом белка.

Такие ингибиторы, как хлорамфеникол и бромид этидия, сильно стимулируют активность митохондриальной РНК-полимеразы в бесклеточной системе на матрице поли-Д (АТ), вследствие чего в митохондриях может возникать избыток этого фермента и выведение его в цитоплазму.

Следовательно, РНК-полимераза в клетках эукариотов представлена множественными формами; они имеют различную локализацию, обусловленную сферой их действия (ядрышко, нуклеоплазма, митохондрии). Изоферменты РНК-полимераз различаются по оптимальным для проявления их активности концентрациям ионов двухвалентных металлов и ионной силе, чувствительности к ингибиторам, α -аманитину, отношению к нативности матрицы и участкам связывания с ней.

Изоформы РНК-полимераз ядра нуждаются в специфических факторах белковой природы, стимулирующих процесс транскрипции на разных этапах.

* * *

Итак, основные функции нуклеиновых кислот в клетке определяются их участием в синтезе белка и в молекулярной организации цитоплазмы. Эти общебиологические функции нуклеиновых кислот связаны со всеми важнейшими жизненными процессами: делением и ростом клеток, передачей свойств и признаков в потомстве и т. д. В процессе онтогенеза организма прежде всего синтезируются и накапливаются нуклеиновые кислоты, которые как бы определяют синтез других соединений клетки, а следовательно, и ее жизнедеятельность.

ОТЛИЧИТЕЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ОБМЕНА ВЕЩЕСТВ У ДРОЖЖЕЙ, КУЛЬТИВИРУЕМЫХ В ПРОТОЧНЫХ СРЕДАХ

Непрерывный способ размножения микроорганизмов представляет собой важное достижение для многих производств. Проточное культивирование позволяет выращивать организмы в постоянных, установившихся условиях. Такие наиболее важные факторы, как концентрация питательных веществ, содержание продуктов обмена, наличие O_2 , значение рН и др., неизбежно и резко изменяются в процессе периодического культивирования, тогда как при непрерывном методе они сохраняются относительно постоянными, а при необходимости их можно изменять в желаемую сторону. Применение метода проточных культур позволяет устранять лаг-период в развитии микроорганизмов, сокращая тем самым общую продолжительность процесса, и наиболее рационально использовать оборудование, организовать автоматический контроль и регулирование технологического режима.

Метод непрерывного культивирования — одно из наиболее эффективных средств управления обменом веществ микроорганизмов, исследования законов их роста и развития и получения новых, полезных для промышленности мутантов. Теоретические и практические обоснования непрерывного метода культивирования всесторонне освещены в исследованиях многочисленных авторов, и они хорошо известны специалистам, вследствие этого здесь нет необходимости их дополнительно рассматривать.

Необходимо лишь еще раз отметить, что наиболее широкое применение нашли два метода культивирования микроорганизмов: 1) гомогенно-непрерывный и 2) градиентно-непрерывный. В качестве аппаратов для гомогенно-непрерывного культивирования организмов часто используют два типа приборов: турбидостат и хемостат, или бактоген. Эти аппараты определяют два основных метода непрерывного ведения культуры: турбидостатический и хемостатический.

Градиентно-непрерывный, или многоступенчато-батареиный, метод используется при двухфазных процессах. Сущность этого метода заключается в том, что в разных частях аппарата или непрерывной батареи устанавливаются неидентичные условия, создаются определенные градации в химическом составе среды и физиологическом состоянии клеток по направлению тока жидкости.

Известны три типа ферментации с целью образования и накопления продуктов метаболизма.

В первом и наиболее простом типе ферментации требуемый продукт синтезируется вместе с образованием биомассы клеток, т. е. условия максимального синтеза продукта и максимальной продуктивности по биомассе совпадают (кормовые дрожжи из *n*-парафинов нефти и гидролизатов растительного сырья, некоторые ферменты).

Образование основного продукта во втором типе ферментации не связано с ростом микроорганизмов, а зависит от превращения ими энергетического субстрата.

И, наконец, в третьем типе ферментации нужный продукт является продуктом вторичного биосинтеза и не связан с ростом микроорганизма и накоплением биомассы (лизин, глутаминовая кислота, триптофан, α -кетоглутаровая кислота, антибиотики, спиртовое брожение и др.) [3, 15, 24, 35, 36, 38, 94, 230а, 143, 179, 220].

Если для осуществления процесса первого типа используют, как правило, ферментаторы одноступенчатого принципа действия, то в остальных случаях применяют две ступени или батареи из большего количества ферментаторов.

Во многих отраслях бродильной промышленности широко используется многоступенчатый батарейный метод. Ниже этот метод вкратце рассматривается применительно к спиртовой, винодельческой и пивоваренной отраслям промышленности.

НЕПРЕРЫВНОЕ БРОЖЕНИЕ В СПИРТОВОМ ПРОИЗВОДСТВЕ

Все известные схемы непрерывного сбраживания углеводов предусматривают разграничение двух основных процессов: размножения дрожжевых клеток и превращения сахара в спирт. При этом на стадии размножения дрожжей сбраживается лишь около 35—40% всех сахаров [230а].

Следовательно, размножение клеток протекает в нескольких аппаратах с низким содержанием спирта в среде (2—3%). Поэтому наиболее энергичное, или главное, брожение начинается не с головного, а с какого-то последующего аппарата батареи. Таким образом, размножение клеток и интенсивное сбраживание сахара протекают в разное время. Это объясняется несоответствием между интенсивностью размножения клеток и скоростью разбавления бражки. Для того чтобы устранить это несоответствие и обеспечить сбраживание сахара, прибегают к увеличению непрерывной батареи до 8—12 бродильных аппаратов. Однако это не исключает разграничения двух процессов: размножения клеток и главного брожения.

СОЧЕТАНИЕ РАЗМНОЖЕНИЯ ДРОЖЖЕЙ С ИХ БРОДИЛЬНОЙ ФУНКЦИЕЙ

Принято считать, что даже невысокое содержание спирта в сбраживаемой среде тормозит и даже приостанавливает размножение дрожжевых клеток. Это положение в значительной степени справедливо лишь для периодического процесса. При определенном режиме непрерывного метода брожения создаются иные по

сравнению с периодическим способом условия для жизнедеятельности дрожжей. При соответствующей скорости притока суслу в бражке головного аппарата постоянно обеспечивается высокое содержание спирта, равное 5—8 об. %. При этом наряду с энергичным сбраживанием сахара происходит одновременно и размножение дрожжевых клеток (табл. 21).

Оказалось, что при непрерывном способе брожения в одном головном аппарате за 10—12 ч превращается в спирт до 80% углеводов. Следовательно, головной аппарат непрерывной батареи выполняет одновременно как бы две функции: в нем протекает главное брожение, т. е. энергичное превращение сахара в спирт, и в то же время происходит интенсивное размножение дрожжей, чем обеспечивается постоянно высокое содержание клеток.

Тем самым подтверждается возможность сочетания двух процессов спиртового брожения: размножения дрожжевых клеток с энергичным превращением сахара в спирт. При этом регули-

Таблица 21
Непрерывное размножение дрожжей в головном аппарате при высокой концентрации спирта в бражке [106]

Номер опыта	Продолжительность брожения, ч	Содержание спирта, %	Содержание мальтозы, %	Концентрация сухих веществ, град по сахарометру	Кислотность, град	Количество дрожжевых клеток в 1 мл, млн.	Суточная оборачиваемость бражки в аппарате
1	21	3,88	4,67	3,0	0,3	90,5	0,8
	43	7,24	0,86	3,0	0,3	81,5	0,8
	69	6,13	1,85	5,8	0,22	118,5	1,0
	93	6,10	1,91	4,5	—	108,0	1,2
	117	6,80	1,10	3,3	0,5	112,5	0,9
5	Среднее	6,03	2,08	4,1	0,33	102,2	0,9
	Начальное	7,8	5,4	5,7	0,4	80,0	—
	51	8,4	4,2	4,0	0,5	140,0	0,8
	144	7,7	5,0	5,0	0,5	110,0	1,4
	218	5,9	8,2	8,0	0,5	85,0	1,4
	260	7,7	4,3	4,2	0,4	112,6	2,0
	Среднее	7,5	5,4	5,4	0,46	105,5	1,4

Примечания: 1. Содержание сахара определялось после кислотного гидролиза и рассчитывалось на глюкозу.

2. В опыте 1-м применялся ржаной затор, приготовленный на опытном заводе. После стерилизации осуществлялось дополнительное осахаривание. В опыте 5-м использовали сусло, содержащее 20% сухих веществ; оно дополнительно осахаривалось ферментами грибной культуры. Бражка непрерывно перемешивалась.

рующим фактором, обеспечивающим в значительной мере интенсивное размножение клеток, оказалась высокая концентрация питательных веществ сбраживаемого затора (сусла).

Мультиэнзимный комплекс амилалитических и протеолитических ферментов солода и грибной культуры позволил глубоко гидролизовать как крахмал, так и белки затора. Следовательно, скорость размножения дрожжей на богатых питательных средах в значительной степени зависит от скорости протока среды, а не от концентрации спирта в бражке.

Размножение дрожжей в условиях высокой концентрации спирта в бражке осуществлялось в отдельных опытах в течение 13 сут, причем процесс, судя по результатам, имел стабильный характер (рис. 7—1). Следовательно, при непрерывном способе брожения вследствие постоянного поступления в достаточном количестве питательных веществ с субстратом и перемешивания бражки проявляется отличительная особенность дрожжевой клетки, заключающаяся в том, что она размножается в период энергичного сбраживания сахара при условии высокой концентрации спирта.

ИЗМЕНЕНИЕ ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА КЛЕТОК

Установлено, что дрожжевые клетки разных фаз роста различаются между собой по содержанию как азотистых, так и фосфорных соединений. Внутриклеточная концентрация этих соединений возрастает в лаг-период весьма существенно по сравнению с концентрацией их в клетках посевной культуры. Так, например, в лаг-периоде 10 млрд. клеток содержали 63 мг азота, в экспоненциальной фазе — 68 мг, а в посевной культуре 58 мг. Радиоактивность дрожжей, размножение которых производилось в среде с меченым метионином, достигала макси-

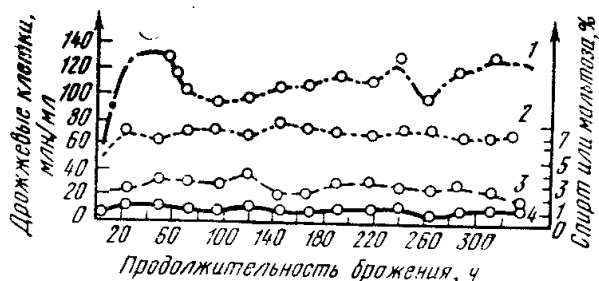


Рис. 7—1
Размножение дрожжей и содержание в бражке спирта и мальтозы при непрерывном способе сбраживания сусла в головном ферментаторе батареи:

1 — дрожжевые клетки; 2 — содержание спирта; 3 — содержание мальтозы; 4 — почкующиеся клетки.

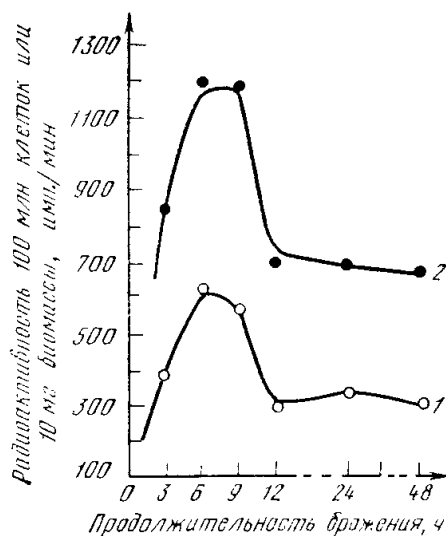


Рис. 7—2.
Потребление меченой аминокислоты (метионина) дрожжами:

1 — радиоактивность 100 млн. клеток; 2 — радиоактивность 10 мг сухой биомассы [109].

Изменение химического состава дрожжевых клеток [109]

Компоненты клеток	Посевная культура	Лаг-период
Свободные внутриклеточные аминокислоты, % на сухую массу	2,19—3,1	3,8—5,4
Аминокислоты полипептидов, % на сухую массу	0,93—1,3	1,5—2,2
РНК, % на сухую массу	9,0	11—12
Растворимые полифосфаты, мг на 10 млрд. клеток	0,13	0,39

мального значения также в лаг-периоде и в начале экспоненциальной фазы (рис. 7—2). Аналогичная закономерность отмечается и в отношении других компонентов клетки (табл. 22).

При достижении определенного и довольно высокого содержания указанных компонентов дрожжевые клетки начинают почковаться. Этот процесс начинается после того, как будет достигнут некий критический уровень в содержании определенных «ключевых веществ».

С изменением условий культивирования и химического состава клеток они вступают в следующую фазу роста.

ОСОБЕННОСТИ ПОТРЕБЛЕНИЯ АЗОТА И ФОСФОРА ДРОЖЖАМИ, КУЛЬТИВИРУЕМЫМИ В ПРОТОЧНЫХ СРЕДАХ

При культивировании дрожжей в проточной среде удалось в головном ферментаторе поддерживать длительное время их рост на определенной, желаемой фазе. При этом устанавливалась относительно постоянная скорость почкования дрожжей и их размножения, что позволяло поддерживать содержание клеток на уровне 110—140 млн./мл. При этом, естественно, потребление азота и содержание его в популяции дрожжевых клеток также колебалось в узких пределах [109, 106].

Потребление азота. Если при периодическом брожении физиологическая активность дрожжей, судя по потреблению ими азота и количеству почкующихся клеток, ограничивается небольшим периодом брожения (рис. 7—3), а затем снижается и синтетические процессы в клетке приходят в равновесие с гидролитическими процессами или даже уступают им, то в проточной среде этого не наблюдается.

В условиях непрерывного главного брожения в одном ферментаторе дрожжи постоянно потребляют азот с одновременным энергичным сбраживанием сахара. Процессы при этом стабилизируются. Потребление азота и, по-видимому, других компонентов среды дрожжами связано с расходом в них кислоторастворимых полифосфатов как источников энергии [107].

Потребление фосфора дрожжами. При периодическом способе брожения потребление фосфора заканчивается в течение первых 6—12 ч. Затем, во второй половине логарифмической фазы и в стационарной фазе, потребление фос-

фора протекает очень слабо, лишь в результате роста дрожжевых клеток, а затем прекращается. В это время, особенно в стадии затухания, содержание фосфора в дрожжах постепенно снижается вследствие автолиза части клеток, а также в результате частичного использования запасных веществ клетки.

Таким образом, жизнедеятельность клетки наиболее активно проявляется лишь в экспоненциальной фазе, затем биохимическая активность клетки снижается и совсем затухает.

При непрерывном методе брожения в противоположность периодическому жизнедеятельность дрожжей протекает в постоянных, установившихся условиях. При обеспечении в непрерывном ферментаторе постоянного и максимального содержания дрожжевых клеток устанавливается и постоянная фаза их роста. Она соответствует, судя по результатам, представленному на рис. 7—4 переходному периоду, включающему конец экспоненциальной и начало стационарной фазы. Уровень радиоактивности дрожжей при непрерывном процессе и количество в них общего фосфора немного выше, чем радиоактивность дрожжей, развивающихся при периодическом способе размножения.

Эти данные позволяют считать, что дрожжи непрерывного брожения находятся где-то на грани перехода из экспоненциальной фазы в стационарную, соответствующую периодическому способу их размножения [109].

Постоянно поддерживаемое главное брожение, обеспечивающее содержание 5—8 об. % спирта в субстрате, подтверждает наличие и стационарной фазы роста [106, 108].

Изменения фаз роста дрожжей в зависимости от условий их культивирования, которые мы наблюдали при изучении фосфорного обмена, а также азотистого, как это было показано ранее, аналогичны.

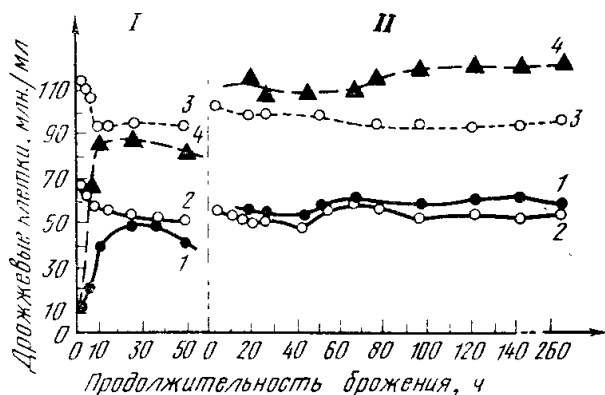


Рис. 7—3.
Потребление азота при периодическом (I) и непрерывном (II) брожении:

1 — содержание азота в дрожжах, отцентрифугированных из 100 мл; 2 — количество азота, усвоенного 10 млрд. клеток; 3 — содержание азота в 1 г сухих дрожжей; 4 — количество дрожжевых клеток.

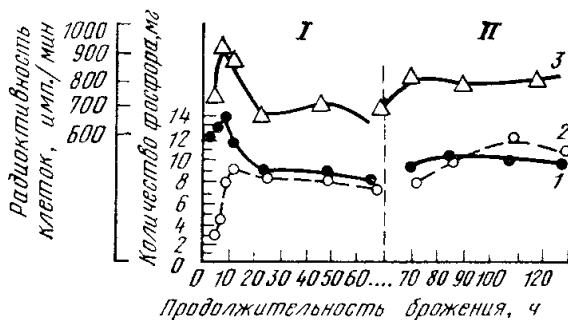


Рис. 7—4.
Потребление фосфора дрожжами при периодическом (I) и непрерывном (II) брожении:
1 — усвоено фосфора 10 млрд. клеток мг;
2 — усвоено фосфата в 100 мл субстрата, мг;
3 — радиоактивность дрожжей, рассчитанная на 10 мг сухой массы [109].

МАКСИМАЛЬНОЕ СОДЕРЖАНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В КЛЕТКАХ

С определенностью было показано, что содержание РНК в дрожжах в условиях периодического культивирования резко изменяется в зависимости от фазы роста популяции. Однако в проточной культуре количественное содержание РНК колеблется в узких пределах (рис. 7—5). Тем самым дополнительно подтверждается, что РНК обладает «индикаторными» свойствами, определяющими малейшие колебания условий жизнедеятельности дрожжей [106, 16, 111]. С повышением скорости роста содержание РНК и соотношение РНК/белок увеличивается. При этом ее количество зависит не только от скорости разбавления, т. е. удельной скорости роста, но и от лимитирующего фактора [111, 126], а следовательно, и состава питательной среды, определяющей скорость роста микроорганизма [109, 186, 268, 271]. Наиболее высокая и оптимальная скорость

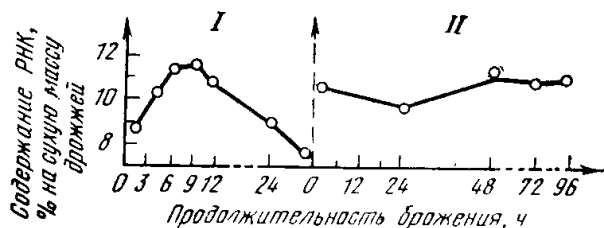


Рис. 7—5.
Содержание РНК в дрожжах, полученных в условиях периодического (I) и непрерывного (II) брожения.

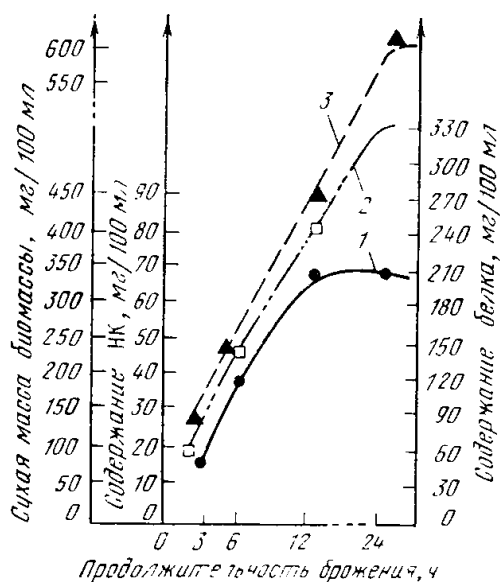


Рис. 7—6
Взаимосвязь между синтезом нуклеиновых кислот (НК) и синтезом белка дрожжей в логарифмической фазе их развития:
1 — НК; 2 — белок; 3 — биомасса [109].

роста дрожжей и других микроорганизмов взаимосвязана с максимальным синтезом РНК.

Микроорганизмы, которые быстро размножаются и вследствие этого чрезвычайно быстро синтезируют собственные белки, например дрожжи, бактерии, как раз и отличаются весьма высоким содержанием РНК. Достоверно установлено, что интенсивный синтез РНК в микробной клетке предшествует увеличению скорости белкового синтеза. Так, например, за период с 3 до 12 ч экспоненциальной фазы роста количество РНК в популяции дрожжевых клеток возросло в 4,4 раза, биомасса дрожжей за это время увеличилась в 3,3 раза, а содержание в ней белка утроилось (3,1 раза) (рис. 7—6). Еще в большей мере это проявляется у бактерий (рис. 7—7). Таким обра-

зом, синтез РНК опережает образование других соединений клеток. Замечено, например, что образование пуринов и РНК происходит в дрожжевой клетке в несколько раз быстрее, чем синтез аминокислот и белка.

В то же время отмечено, что колебания в содержании рибосомной РНК не всегда зависят от скорости роста микроорганизма, а количество транспортной РНК вообще не зависит от скорости роста [116].

Однако соотношение рибосомной РНК/ДНК меняется пропорционально скорости роста [116]. Таким образом, синтез рибосомной РНК и транспортной РНК регулируется по-разному. В частности, содержание РНК в клетках увеличивается с изменением температуры культивирования.

Наиболее стабильным компонентом клетки является ДНК [109].

СБАЛАНСИРОВАННОСТЬ ПРОЦЕССОВ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ИСТОЧНИКАХ УГЛЕРОДА

Максимально возможная скорость размножения микроорганизма возможна лишь при обязательной и строгой сбалансированности процессов анаболизма и катаболизма. Только сопряженность энергетических и биосинтетических реакций обеспечивает скорость размножения микроорганизмов и высокий уровень биосинтеза белка. Корреляция между этими двумя противоположно направленными процессами обеспечивает наиболее эффективное использование энергии, а именно на размножение микробных клеток и на осуществление ими синтетических процессов. Однако в процессе культивирования микроорганизмов последние подвергаются воздействию различных неблагоприятных факторов, которые, как правило, тормозят в первую очередь размножение клеток, но могут не оказывать отрицательного влияния на скорость потребления энергетического субстрата и на образование продуктов метаболизма [180]. При торможении скорости размножения, а следовательно, и синтеза белка без соответствующего снижения

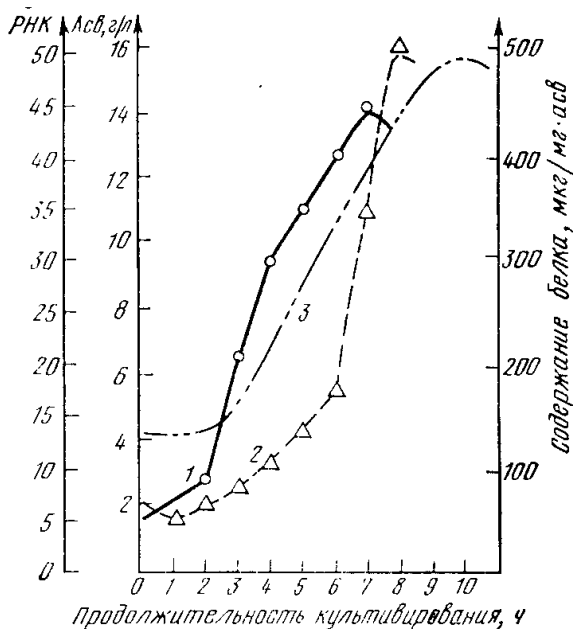


Рис. 7-7.
Кинетика биосинтеза РНК и белка у бактерий рода *Mucosoccus* при периодическом культивировании:
1 — РНК, мкг на 1 мг сухой биомассы; 2 — белок, мкг на 1 мг биомассы; 3 — биомасса, г/л [116].

катаболизма в клетке образуется избыточная, или «несцепленная с ростом», энергия, которая используется на другие процессы, в частности на усиление термогенеза, образование недоокисленных продуктов метаболизма, на биосинтез веществ запасного характера и вторичных метаболитов и пр. [185, 43, 106, 107, 299].

Факторы, тормозящие скорость роста микроорганизмов, могут быть самыми разнообразными [382]. Прежде всего они могут быть связаны с несбалансированностью состава питательной среды. Так, например, при избыточном содержании глюкозы или других легко ассимилируемых источников углерода и недостатке других ингредиентов отмечается торможение роста клеток с одновременным увеличением термогенеза. Полагают, что «избыточная» энергия может рассеиваться непосредственно в виде тепла или через образование АТФ и полифосфатов. Эта энергия, не пошедшая на размножение клеток, может расходоваться также на дополнительное образование липидов, гликогена, летучих продуктов.

Таким образом, увеличение в среде источника углерода и энергии при отсутствии сбалансированности остальных компонентов среды ведет к активизации процессов катаболизма при торможении синтеза биомассы. Неиспользованная на процессы размножения клеток энергия рассеивается в виде тепла, аккумулируется в запасных и недоокисленных продуктах метаболизма.

Наличие в среде *n*-алкана, являющегося высококалорийным источником энергии и углерода, приводит также к малоэффективному использованию энергии, судя по образованию биомассы на электрон и на общую энергию, поглощенную из среды, в сравнении с энергией глюкозы, как это можно видеть из приведенных ниже данных, обобщенных И. Н. Позмоговой и другими исследователями.

Показатели	Значение при использовании	
	глюкозы	<i>n</i> -алкана
Калорийность субстрата, кДж/г-моль	2830	48300
Урожай сухих клеток, г на 1 моль использованного энергетического субстрата	46,2	219,2

Как следует из этих данных, углеводород может снабдить клетку примерно в 4 раза большим количеством энергии, чем углевод. Если энергия, заключенная в углеводороде, окажется биологически малодоступной формой, то она будет или аккумулирована в виде гранул липидного характера и «скопления» гликогена, или выведена из клетки одним из путей образования недоокисленных продуктов, или, наконец, выделена в виде образования дополнительного тепла.

Если же энергия углеводорода окажется биологически доступной, то при использовании ее на конструктивные процессы клетка должна размножаться с гораздо большей скоростью, чем при культивировании на среде с глюкозой.

При содержании в среде различных источников углерода — этанола, ацетата — отмечается явление диауксии — поочередное их использование, что связано с синтезом соответствующих ферментов. Один из источников углерода может репрессировать синтез ферментов в присутствии другого субстрата. Это явление позволяет судить о регуляторных механизмах на уровне ферментных систем.

Рассмотрены двухсубстратные системы глюкоза—галактоза и глюкоза—ксилоза с хемостатной культурой. При подключении глюкозы начинается моментальное усваивание, а при подключении галактозы или ксилозы требуется лаг-период. По-видимому, это необходимо для синтеза соответствующих ферментов после снятия репрессии. Если глюкоза содержится в незначительных концентрациях, оба субстрата используются одновременно, т. е. отсутствует репрессия глюкозой.

Установлено, что дрожжи *Candida utilis* усваивают сначала глицерин, потом молочную кислоту, а дрожжи *Trich. cutaneum* сначала молочную кислоту, затем глицерин. Это позволяет совместно выращивать эти культуры в проточных системах, где глицерин и молочная кислота — основные источники энергии.

ПРОТОЧНЫЙ СПОСОБ БРОЖЕНИЯ В ВИНОДЕЛИИ

В практике производства вина находит применение двухступенчатый способ сбраживания сусла. Этот метод, разработанный С. Х. Абдуразаковой, находит практическое применение на многих заводах Узбекской ССР [1, 2].

На первой ступени непрерывного брожения создаются оптимальные условия для роста дрожжей. Такие условия обеспечиваются прежде всего путем поддержания равновесной системы при коэффициенте разбавления $D=0,2 \text{ ч}^{-1}$. При этом обеспечивается экспоненциальная фаза роста дрожжей. В этой фазе протекает максимальное размножение клеток, а также образование вторичных и побочных продуктов брожения, участвующих в создании свойств конечного продукта. В головном ферментаторе наряду с размножением дрожжей протекает и интенсивное брожение, в результате чего достигается относительно высокая концентрация спирта, часто превышающая 2,0—2,5% при содержании в бражке 14—15% сахара. На первой ступени брожения одновременно образуются внеклеточные липолитические ферменты, продуктами гидролиза которых являются жирные кислоты, а также холин, стимулирующий биосинтетические процессы. Поступление сусла в головной аппарат и отток культуры из аппарата происходит с одинаковой скоростью. Поэтому объем культуры в аппарате остается постоянным.

Более ранними исследованиями была показана принципиальная возможность применения одинарного аппарата для проточного брожения виноградного сусла при выработке столовых, шампанских и коньячных виноматериалов. При этом в одинарном аппарате рекомендовалось осуществлять главное брожение (до 4% остаточного сахара) с последующим дображиванием в крупных технологических емкостях [50]. Как правило, вторая ступень брожения осуществляется одновременно во многих ферментаторах, постепенно заполняющихся бражкой, непрерывно поступающей (в течение 20—30 сут) из головного аппарата. Следовательно, вторая ступень брожения происходит стационарно.

Основная часть сахара (75—80%) сбраживается на второй ступени брожения, причем этот процесс протекает медленно [1, 2].

Рост дрожжей на второй ступени брожения соответствует стационарной фазе. Размножение клеток при этом лимитируется недостатком сахара и избытком этанола. Длительная стабилизация стационарной фазы роста дрожжей благоприятствует образованию внеклеточных ферментов: эстераз, β -фруктофуранозидазы, полигалактуроназы, протеазы и др. Эти ферменты обеспечивают регулирование биохимических процессов, происходящих при брожении и выдержке вин [1, 2]. Они прежде всего стабилизируют вина от белково-коллоидных помутнений и ускоряют процессы созревания и старения вин. Указанные гидролитические ферменты проявляют свое заметное действие лишь на 4—5-е сутки брожения, когда содержание сахара в сбраживаемом сусле составляет 1—2%, а спирта 9,5—10 об. %. В этих условиях максимальная активность внеклеточной β -фруктофуранозидазы превосходила в 2,7 раза, ацетилэстеразы — в 3,6 раза, а протеазы — в 6 раз по сравнению с их активностью, получаемой при периодическом способе брожения.

Длительное культивирование предавтолизных дрожжей (в течение 15—30 сут) в условиях замедленного их роста обуславливает как образование внеклеточных гидролаз, так и обогащение состава бражки аминокислотами, полипептидами, витаминами, фосфорными соединениями, оказывающими влияние на метаболизм дрожжей и на улучшение качества вина. Так, например, экзогенная β -фруктофуранозидаза способна частично связываться с высшими спиртами с образованием алкилфруктозидов. Тем самым создаются возможности регулирования количественного содержания в винах многоатомных спиртов, определяющих в значительной мере вкус и аромат многих спиртных напитков.

Образование внеклеточных ферментов происходит, по-видимому, как в результате индуцированного синтеза, так и вследствие автолиза дрожжей, так как отмечается, что количество мертвых клеток при длительном непрерывном брожении виноградного сусла достигает 30—50%.

Таким образом, двухступенчатый полунепрерывный метод брожения позволяет не только интенсифицировать весь технологический процесс, но и наиболее эффективно использовать ферменты дрожжей, обеспечивающие получение при дображивании готового высококачественного вина, не требующего дополнительного его созревания.

НЕПРЕРЫВНОЕ БРОЖЕНИЕ В ПРОИЗВОДСТВЕ ПИВА

ГЛАВНОЕ СПИРТОВОЕ БРОЖЕНИЕ

Известно несколько способов непрерывного брожения. По одному из них, впервые реализованному в производстве, брожение пива осуществляется в герметически закрытом аппарате, имею-

шем цилиндрическую или прямоугольную форму и снабженном мешалкой. Непрерывная подача в бродильный аппарат смеси сусла и дрожжей производится снизу. Степень сбраживания регулируется скоростью поступления свежего сусла. После окончания брожения дрожжи отделяются от пива или в специальном отстойнике, или с помощью центрифуги. Часть отделенных дрожжей может быть возвращена обратно в бродильный аппарат. Освобожденное от дрожжей пиво промывается мелко диспергированной углекислотой. В случае необходимости в пиво вводятся вещества, способствующие более быстрому осветлению его. Затем пиво фильтруется и карбонизируется. Продолжительность брожения 18 ч. Ускорение процесса брожения достигается применением относительно повышенной температуры (13—24° С), высокой концентрации дрожжей (25—35 г/л) и перемешивания бродящего сусла [61, 62, 25, 71, 101, 102].

Известен способ непрерывного брожения, осуществляемого в ферментаторе башенного типа (английской фирмы AP). Брожение ведется при очень высокой концентрации дрожжей (150—250 г/л прессованных), которая создается путем задержания основной массы дрожжей в башне с помощью особого сепарирующего устройства; температура брожения 15° С. Эти два фактора — большая концентрация дрожжей и высокая температура — обеспечивают высокую эффективность процесса. Сбраживание сусла происходит за 4—8 ч. Известен и способ непрерывного брожения, осуществляемого по системе «Бишоп». Установка состоит из двух скомуницированных друг с другом аппаратов, снабженных мешалками для перемешивания бродящего сусла. В первый аппарат поступает стерильное, насыщенное O₂ сусло и одновременно происходит брожение и размножение дрожжей. Вытекающий из него субстрат должен быть сброжен наполовину; окончательное сбраживание происходит во втором аппарате при анаэробных условиях. Продолжительность брожения 15 ч. Для оседания дрожжей предусмотрена специальная емкость или сепаратор для осветления молодого пива. Производительность одной линии составляет 230—1000 гл/сут.

По другим схемам брожение сусла проводят, как правило, в батарее из трех или большего количества ферментаторов.

Одним из распространенных способов интенсификации непрерывного процесса получения пива является применение повышенной концентрации дрожжей. В этих условиях удельная скорость роста дрожжей уменьшается, а скорость сбраживания относительно увеличивается, что создает возможность сокращения длительности главного брожения. При этом большая часть углеводов сусла идет на брожение, и меньшая часть их используется для роста дрожжей и образования биомассы.

Высокая концентрация дрожжей в аппарате или аппаратах обеспечивается следующим образом: 1) непрерывным размножением дрожжей в аппарате или непрерывной подачей в него большого количества их; 2) частичным возвратом дрожжей, отделен-

ных после главного брожения, в систему; 3) рециркуляцией части бродящего сусла; 4) задержанием дрожжей внутри аппарата — так называемой закрытой системой. Задержание дрожжей в системе обеспечивается или сильно выраженной флокуляционной способностью дрожжей [27, 78, 90], или применением специальных устройств [5]. При полной задержке дрожжей система не достигает устойчивого состояния и не может функционировать долго. Поэтому часть дрожжей необходимо отводить с молодым пивом. При содержании в суспензии 150 г/л дрожжей продолжительность главного брожения сокращается до 6 ч, а в закрытых системах может составлять 2—8 ч при температуре брожения 15° С в зависимости от начальной плотности сусла и требуемой степени сбраживания. При содержании в бродящем сусле 100 г/л дрожжей количество получаемого пива в 3 раза больше, чем при концентрации дрожжей 25 г/л, и в 15 раз больше, чем при обычных условиях.

Многие ускоренные способы брожения и дображивания базируются на применении повышенных температур, а иногда в комбинации их, с увеличением концентрации дрожжей.

Оригинальный способ ускоренного производства пива разработан в последнее время. Брожение осуществляется пропусканьем потока сусла через слой дрожжей в биореакторе определенной конструкции. Слой дрожжей и диатомита намывается на пластины фильтр-картона, закрепленные в рамном фильтре. Длительность процесса получения готового пива 3—5 сут.

ДОБРАЖИВАНИЕ

При дображивании происходит созревание пива. Это сложный биохимический процесс, в течение которого молодое пиво с неприятным запахом и грубым вкусом превращается в тонкий и благородный напиток с характерным ароматом. Стадию дображивания осуществляют в разных по конструкции аппаратах по-разному. Например, проводят в цилиндрикоконических танках или в танках с коническим днищем. Оседание дрожжей происходит в результате осаждения при помощи змеевика [25]. Известны и такие лагерные танки, в которых имеются внутренние перегородки, слегка наклонные к центру для задержания взвесей. Перегородки вращаются на валу.

Применение тепло-холодной выдержки пива в течение 7 сут при 15—18° С и 7 сут при 0° С сокращает длительность стадии дображивания с 8 до 2 нед. Эффективным путем сокращения длительности стадии дображивания является так называемое форсированное снижение диацетила в пиве. Для этого используют различные способы. Из них можно отметить прежде всего способ, основанный на применении повышенных температур в конце главного брожения, сохранении в диспергированном состоянии определенного количества физиологически активных дрожжей, добавлении восстанавливающего вещества и т. п. Следовательно, дображивание при повышенной температуре, промывка молодого пива углекислым газом и карбонизация готового пива являются важным направлением в производстве пива.

МЕТАБОЛИТЫ ДРОЖЖЕЙ, УЧАСТВУЮЩИЕ В ФОРМИРОВАНИИ КАЧЕСТВА ПРОДУКТА

В ходе процесса созревания изменяется не только химический состав пива, но и его физико-химическое состояние. Эти сложные процессы сопровождаются окислительно-восстановительными пре-

вращениями веществ пива. Одним из многих факторов, предопределяющих качество пива, являются метаболиты дрожжей. Многочисленные соединения, участвующие в формировании вкуса и аромата пива, обычно делят на 4 группы: 1) высшие спирты, их предшественники, ароматические спирты; 2) эфиры; 3) карбонильные соединения и 4) летучие сернистые соединения. Некоторые метаболиты нами уже рассматривались ранее. Здесь же будет затронута лишь их количественная сторона и роль в формировании качества пива.

Высшие спирты. Из перечисленных выше летучих веществ значительную часть составляют высшие спирты. В готовом пиве обнаружено до 48 спиртов, в том числе пропанол, изопропанол, *n*-бутанол, изобутанол, вторичный бутанол, *n*-амилол, изоамилол, активный амилол, β -фенилэтанол и др. [23, 45]. Основным высшим спиртом является изоамилол, его количество достигает 60—70 и даже 82%, 2-метилпропанола — 11%, *n*-пропанола — 7% и остальных спиртов — от 1,5 до 8,0% от общей суммы их [55]. Количество активного амилола может составить 25% от общего количества сивушного масла. Кроме того, в пиве обнаружен β -фенилэтанол, который составляет 60—80% от общего количества ароматических спиртов [23, 56]. Содержание β -фенилэтанола в некоторых образцах пива московских заводов составляет 19,9—47,1 мг/л [57]. Примерно в таких же количествах фенилэтанол содержится в ирландском пиве — 25 мг/л, финском — 16 мг/л, шведском — 11—40 мг/л [25, 55, 103].

Количество высших спиртов в пиве зависит от условий брожения, используемой расы дрожжей, состава сбраживаемой среды [9]. Отклонение по сумме высших спиртов в образцах одного сорта пива с 25 заводов составляет от 39,8 до 146,1 мг/л. Высшие спирты, находясь в напитках брожения в очень малых количествах, оказывают значительное влияние на вкус и аромат пива. Порог вкусовых концентраций для *n*-пропанола составляет 50 мг/л, изобутанола — 100 мг/л, суммы изоамиловых спиртов — 50 мг/л, изоамилацетата — 1 мг/л, этилацетата — 25 мг/л, β -фенилэтанола — 75 мг/л и ацетальдегида — 25 мг/л. Повышенное содержание в пиве амилового, изоамилового и изобутилового спиртов создает так называемое «тяжелое пиво». Пропанол в концентрации до 50 мг/л (в пиве он не достигает такого количества) не оказывает влияния на вкус и аромат пива.

Применение новой технологии может влиять на характер метаболизма дрожжей и тем самым на вкус и качество продукта. Увеличение температуры при этом сопровождается возрастанием количества сивушного масла благодаря более интенсивному размножению дрожжей и более высокому использованию ими азотистых веществ сусле [9, 11, 55, 45, 103]. Повышение температуры брожения (до 20° С) особенно сильно сказывается на содержании изоамилола, активного амилола, *n*-пропанола и изобутанола, количество которых может увеличиться в 1,2—2,2 раза. При этом имеют значение особенности дрожжей.

Аэрирование сброживаемого сусла в свою очередь повышает количество высших спиртов (в 2,5—6,0 раз) по сравнению с пивом, полученным в обычных условиях, причем возрастает наиболее заметно содержание изоамилового и *n*-пропилового спиртов [9], а иногда изобутанола. По-видимому, повышение количества сивушного масла в условиях аэрирования зависит от используемых дрожжей. Иногда не отмечается его повышения и, в частности, остается без изменения β -фенилэтанол. Сведение к минимуму возможности размножения дрожжей приводит к значительному снижению интенсивности образования высших спиртов, однако синтез пропанола при этом может возрастать в 2 раза. При непрерывном получении пива в башенном ферментаторе при весьма высокой концентрации дрожжей (30% мас./об.) не происходило увеличения содержания сивушного масла в пиве, а количество этилацетата, *n*-пропилового и изобутилового спиртов поддерживалось ниже пороговых значений.

Альдегиды и эфиры. Наряду с высшими спиртами большую роль в образовании аромата пива играют альдегиды и эфиры.

В пиве обнаружены следующие альдегиды: уксусный, пропионовый, фурфурол, коричный, изомасляный, изовалериановый и др. Основным альдегидом, содержащимся в пиве, является ацетальдегид, количество которого в различных сортах пива варьирует от 10 до 35 мг/л. Разные штаммы дрожжей различаются по своей способности образовывать ацетальдегид. Находясь в пиве в большой концентрации, ацетальдегид придает привкусы, характеризующиеся терминами «зеленый», «травянистый» и т. п. Повышение температуры брожения, а также аэрирование и увеличение количества посевных дрожжей усиливают накопление в среде альдегидов, в том числе и ацетальдегида [45, 28]. При непрерывном способе брожения с хлопьевидными дрожжами ацетальдегида получается гораздо меньше, чем при периодическом брожении.

Для формирования органолептических свойств пива большое значение имеют эфиры. В пиве найдено 45 эфиров, в том числе этилформиат, этилацетат, *n*-пропилацетат, изобутилацетат, изоамилацетат, β -фенилацетат и др. Содержание этилацетата в разных сортах пива варьирует в пределах 9,2—28,2 мг/л, изоамилацетата — от 1,2 до 3,2 мг/л и β -фенилацетата — 8,0 мг/л. Этилацетат придает пиву незначительный посторонний запах, а в более высоких концентрациях — терпкий привкус и горечь. Наиболее сильное влияние на пиво оказывает изопентилацетат, который ухудшает вкус даже в небольших количествах. Изобутилацетат в смеси с изоамилацетатом усиливают аромат с преобладанием бананового запаха, а этилкапронат с этилкаприлатом дают яблочный аромат. Этилкапронат может способствовать появлению так называемого «фруктового пива», так как вкусовой порог ощущений его очень низок — 0,2 мг/л — и в процессе производства пива может быть легко превзойден.

Очень часто повышение температуры брожения усиливает образование эфиров и, наоборот, аэрирование уменьшает. В част-

ности, при аэрировании происходит снижение количества этилацетата в 2,2 раза, а изоамилацетата — в 10 раз; значительно понижается содержание в пиве и изобутилацетата.

* * *

Итак, при непрерывном методе сбраживания крахмалистых сред вследствие поступления питательных веществ с субстратом создаются благоприятные условия, обеспечивающие относительно равномерное размножение дрожжевых клеток. При этом проявляется отличительная особенность дрожжевых клеток, заключающаяся в том, что они в состоянии размножаться и осуществлять сбраживание сахара в условиях высокой концентрации спирта (7,6%) и сохранять при этом свою биохимическую активность до конца брожения. Следовательно, в проточной среде способность дрожжей к размножению и бродильная их функция проявляются одновременно. Эта физиолого-биохимическая особенность дрожжей позволяет в одном головном аппарате сбродить значительное количество углеводов, тем самым показана ведущая роль головного ферментатора. При непрерывном методе брожения в производстве пивоварения и виноделия также отводится важная роль головному аппарату. За счет относительно повышенной температуры (13—24°С), высокой концентрации дрожжей (25—35 г/л) и перемешивания обеспечивают главное брожение в одном ферментаторе за короткий период времени. Изменение метаболизма дрожжей в условиях проточной среды приводит к повышению качества получаемой продукции. Кроме того, установлено, что ни один из способов ускорения периодического брожения и дображивания не дает таких экономических и технологических преимуществ, как непрерывный процесс.

ОСНОВНЫЕ ИТОГИ СОВРЕМЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ БИОХИМИИ ДРОЖЖЕЙ И ПРАКТИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИХ ДЛЯ ИНТЕНСИФИКАЦИИ ПРОИЗВОДСТВА

Одной из важнейших проблем современной биохимии является изучение механизмов, регулирующих биосинтез ферментов, рост и размножение микроорганизмов и позволяющих на этой научной основе значительно повысить их продуктивность. Прежде всего необходимо повысить продуктивность дрожжей в условиях стационарного (классического) способа производства. Однако успехи современной биохимии наиболее кардинально можно реализовать на базе использования новой технологии и приемов. Продуктивность дрожжей представляется возможным значительно повысить с учетом достижений биохимии на основе:

1) повышения физиолого-биохимической активности их, достигаемой как в стационарных условиях, так и в проточных средах;

2) многократного использования дрожжевых клеток и их структур;

3) интенсификации катализа окислительно-восстановительных и других внутриклеточных ферментов для ускорения созревания вин и пива и повышения их качества;

4) более рационального использования богатого внутриклеточного состава и прежде всего белка.

Эти вопросы, как наиболее перспективные, рассматриваются ниже.

ИНТЕНСИФИКАЦИЯ КЛАССИЧЕСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ

Метаболическая активность клеток микроорганизма регулируется как на уровне ее генетического аппарата (индукции и репрессии), так и путем прямого угнетения или активации определенных ферментов при участии метаболитов или других биологически активных соединений.

Так, например, на биосинтез β -фруктофуранозидазы исключительное влияние оказывает исходная концентрация глюкозы в среде. Установлено, что содержание β -фруктофуранозидазы в клетках дрожжей обратно пропорционально концентрации глюкозы. Активность указанного фермента в расчете на единицу сухой массы клеток при концентрации глюкозы 0,003% в 55 раз больше, чем при концентрации глюкозы 2,0%. Катаболитная репрессия, вызываемая глюкозой, подавляет образование многих

индуцибельных ферментов. Она подавляет образование митохондрий и, вероятно, других органелл, определяющих уровень жизнедеятельности клеток.

Регуляция синтеза ферментов катаболитной репрессии (ферменты брожения, цитратного и глиоксилатного циклов и др.) осуществляется с участием аденозин-3,5-цикломонофосфата (цАМФ) и регуляторного белка¹. Мононуклеотид (цАМФ) является истинным эффектором катаболитной репрессии, регулирующим содержание промежуточных катаболитов; глюкоза и другие ингредиенты среды в свою очередь оказывают влияние на синтез ферментов. Одни из них оказывают лимитирующее действие, другие — ингибирующее. Лимитирование и ингибирование роста дрожжей замедляет синтез ферментов брожения, увеличивает содержание вторичных и побочных продуктов в бражке и соответственно снижает выход спирта. Снижение, например, лимитации по азоту и фосфору уменьшает синтез вторичных продуктов брожения (глицерина, высших спиртов, эфиров) и повышает выход спирта. Так, повышение концентрации сухих веществ сусле и прежде всего сахара обеспечивает увеличение выхода этанола и снижение образования альдегидов, сложных эфиров и глицерина.

Полный аминокислотный состав среды, обеспечиваемый действием на белки активных протеиназ, ускоряет рост дрожжей и повышает выход спирта благодаря экономии сахара на питание клеток [109].

Естественно, на процесс метаболизма дрожжей и на их жизнедеятельность исключительное влияние оказывает реакция среды. Так, например, при снижении рН сусле от 5,5 до 4,0 наблюдается ингибирование роста дрожжей ионами водорода. При этом масса дрожжей уменьшается соответственно с 37,5 до 22,4 г/л, а продолжительность спиртового брожения увеличивается с 24 до 30 ч. С повышением значения рН до 5,5 улучшается степень сбраживания сахара и одновременно повышается уровень размножения клеток. В то же время большое количество клеток расходует больше сахара как для углеродного питания, так и для повышенного образования вторичных и побочных продуктов. Например, при рН 5,5 глицерина образовалось 8,87 г/л, а при рН 4,0 количество его уменьшилось до 6,13 г/л. Поэтому при спиртовом брожении оптимальным является рН 4,5—4,7.

Как известно, каждый фермент, а также мультиферментная система в целом характеризуются определенным оптимумом рН и сродством фермента к своему субстрату и продуктам, а также к своему коферменту или активатору. Поэтому скорость ферментативных реакций есть функция ряда параметров [141, 322, 250, 326, 242]. Так, например, значение рН внутри клетки зависит от скорости всех процессов, сопровождающихся отщеплением и присоединением протонов.

¹ Регуляторный белок часто называют активатором катаболитных генов (АКГ); он образует, вероятно, с цАМФ комплекс (цАМФ-АКГ), который проявляет высокое сродство к ДНК.

От действия многих ферментов зависит и концентрация участвующих в реакциях ионов металлов. Показано, например, что повышение ионной силы среды за счет одновалентных катионов (K^+ , NH_4^+ и т. д.), а также повышение температуры роста способствует диссоциации частиц рибосом, а это приводит к ослаблению биосинтеза белка.

Известно, что биосинтез белка в условиях *in vivo* осуществляется только целой рибосомой. Для осуществления репарации (исправления) и дубликации (удвоения) ДНК необходимо поддерживать в оптимуме внутриклеточные физико-химические параметры: активность воды, рН, концентрацию солей, температуру и т. д. Эти внутриклеточные параметры зависят не только от цитоплазматической мембраны, но и от внеклеточных параметров. Изменение внутриклеточных концентраций катионов (K^+ , Na^+) проявляется в качестве пускового механизма для переключения активности с редупликации на транскрипцию, т. е. с процесса удвоения молекул ДНК на биосинтез информационной РНК. А трансмембранная разность потенциала играет, вероятно, ведущую роль в регуляции деления клеток. При определенных концентрациях Na^+ и Mg^{2+} обнаружено специфическое активирование нескольких сегментов на хромосомах, а отдельные ионы могут специфически стимулировать некоторые локусы хромосом и т. д.

Таким образом, отклонение от оптимума внешних технологических параметров вызывает нарушение внутриклеточных физико-химических параметров. Эти отклонения сказываются на образовании и активности многих ферментов, в том числе и зимазного комплекса, ответственного за спиртовое брожение. При недостаточности некоторых веществ, входящих в состав питательной среды, отмечается также падение активности многих внутриклеточных ферментов. В конечном итоге несоблюдение оптимальных условий культивирования может привести к разобщению энергетического и конструктивного обмена веществ, что обуславливает затухание или прекращение роста и деления клетки.

ПОВЫШЕНИЕ ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ДРОЖЖЕЙ В ПРОТОЧНОЙ СРЕДЕ

Изменение физиологического состояния клеток всецело связано со скоростью роста микроорганизма. В проточных средах представляется наибольшая возможность достигнуть максимальной скорости роста и размножения дрожжей, а следовательно, и максимального уровня метаболизма. Например, при скорости потока D , близкой к максимальной скорости роста μ_{max} и вымыванию, клетки практически почти не лимитированы каким-либо фактором (недостатком углерода, азота, минерального питания, кислорода). Показано, что при больших скоростях роста клеток значительно повышается активность ферментов, в частности гексозомонофосфатного пути. У дрожжей *Sacch. cerevisiae* и *Candida*

utilis значительная доля глюкозы в этих условиях используется по пентозному циклу, который, как известно, поставляет D-рибозу для синтеза нуклеиновых кислот. Эти кислоты, как информационные макромолекулы, определяют жизнедеятельность и продуктивность дрожжей. По мере ускорения роста дрожжей содержание РНК возрастает в 1,5 раза. При этом особенно возрастает количество рибосомальной РНК, определяющей белоксинтезирующую активность рибосом.

Одновременно отмечается повышение загрузки рибосом белковым синтезом [186]. Следовательно, повышение скорости роста клеток может происходить не только за счет увеличения числа рибосом, но и за счет повышения работоспособности существующих, но незагруженных [186].

В быстро растущих клетках, как правило, содержится больше белка и меньше углеводов и липидов, чем в медленно растущих. При использовании двух последовательно соединенных ферментаторов отмечается более быстрый рост, чем в экспоненциальной фазе периодической культуры. Во второй ферментатор подается культура из первого, содержащего продукты метаболизма, и, кроме того, свежая среда. В этих условиях скорость роста *Candida utilis* составляла $\mu = 1,7 \text{ ч}^{-1}$, тогда как в периодической культуре μ_{max} около $0,5 \text{ ч}^{-1}$.

Таким образом, максимальной продуктивности дрожжей можно достигнуть в оптимальных условиях проточной среды. Наглядным примером может служить процесс культивирования дрожжей на средах с *n*-парафинами. Если рост дрожжей с максимальным накоплением биомассы в стационарных условиях продолжается 40—48 ч, то в проточной культуре он заканчивается в течение 5—7 ч.

ПОВЫШЕНИЕ ПРОДУКТИВНОСТИ ДРОЖЖЕЙ ПУТЕМ МНОГОКРАТНОГО ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

Как уже отмечалось ранее, «начальная» клетка может образовать в зависимости от условий культивирования до 43 дочерних клеток. В условиях периодического брожения дрожжевая клетка практически размножается лишь 5—6 раз. Следовательно, она в весьма незначительной мере использует свои возможности к почкованию и образованию новых клеток. В связи с этим, естественно, возникла мысль о многократном использовании дрожжевых клеток. Методически это можно осуществить или путем их возврата снова на брожение, или путем иммобилизации клеток.

МНОГОКРАТНОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ДРОЖЖЕЙ ПРИ БРОЖЕНИИ

При многократном возврате дрожжей для сбраживания каждый раз новой порции солодового сула или зернового затора отмечается интересная закономерность. Оказалось, что за каждую кратность возврата популяции дрожжевых клеток наблюдается их прирост (в среднем 47 млн./мл). После второй крат-

Таблица 23

Характеристика дрожжей при многократном их использовании при брожении [109]

Показатели	Число возвратов дрожжей						
	1	2	3	4	5	6	7
Продолжительность брожения, ч	64	109	154	178	224	247	274
Прирост клеток за каждый цикл брожения, млн./мл	78	72	37	51	48	38	39
Общее количество клеток, млн./мл	78	150	187	238	286	324	363
Количество почкующихся клеток, %	42	25	7	5	8	5	6
Количество мертвых клеток, %	5—8	4	8	5	5	4	4,5
Радиоактивность 100 млн. клеток, имп./мин	1070	1050	1300	1250	1200	1220	1170
Потребление сахара дрожжами, г/100 мл	2,568	1,223	1,161	1,355	—	—	0,776
Усвоение азота дрожжами, мг/100 мл	33,6	30,8	25,2	28,0	23,0	22,4	11,2

Примечание. Исходное сусло содержало 16,5 г глюкозы в 100 мл.

ности возврата дрожжей прирост клеток колебался в пределах от 37 до 51 млн./мл, количество почкующихся клеток — в пределах 5—8%. Однако общее количество популяции клеток постоянно увеличивалось и после семикратного возврата оно составляло 363 млн./мл (табл. 23), причем содержание мертвых клеток находилось примерно на одном и сравнительно низком уровне, соответствующем 4—8%. Следовательно, прирост новых клеток «уравновешивался» отмиранием старых.

Эти данные подтверждают высокий уровень жизнедеятельности популяции клеток. Об этом говорят и данные по радиоактивности дрожжевых клеток. В процессе всех циклов брожения дрожжи интенсивно потребляли P^{32} и их радиоактивность практически оставалась на одном уровне, в среднем она соответствовала 1180 имп./мин.

Высокая плотность популяции ограничивает процесс почкования и размножения. Этот процесс одновременно тормозится также и брожением, интенсивно протекающим на всех этапах возврата дрожжей. Интенсификация процесса брожения отмечается прежде всего в начальной его стадии. Например, если при однократном использовании дрожжей по истечении 6 ч CO_2 еще не выделялась, то при двух- и трехкратном возврате дрожжей за это же время брожения было определено 2,4 и 4,0 г CO_2 на 100 мл культуральной среды. Следовательно, многократное использование дрожжей позволило устранить в развитии клеток лаг-фазу и даже логарифмическую фазу, а двухсуточное брожение сократить почти в 2 раза.

В то же время расход сахара на питание дрожжей при увеличении кратности их возврата постепенно снижается. При обычном периодическом брожении на питание дрожжей, культивируемых в 100 мл суслу, расходуется 2,07—3,06 г глюкозы, после трехкратного возврата они усваивают 1,161 г, а после семикратного — 0,776 г глюкозы. За счет снижения расхода сахара на питание дрожжей происходит и некоторое повышение количества образующегося спирта.

При многократном использовании дрожжей снижается и расход азотистых веществ на питание дрожжей [107].

Известны различные приемы многократного использования дрожжей. В частности, как это отмечалось ранее, их возврат можно осуществлять не только из конечной бражки [109]. Частично дрожжи можно возвращать и из «свежей» бражки, когда клетки находятся в экспоненциальной фазе роста¹.

ИММОБИЛИЗАЦИЯ КЛЕТОК

Для иммобилизации клеток используют почти все многообразные способы, применяемые для иммобилизации ферментов [22]. Некоторые из способов иммобилизации ферментов могут быть использованы для иммобилизации клеток. В частности, для иммобилизации клеток уже используются способы адсорбции, предусматривающие включение в органические и неорганические гели.

Микроорганизмы способны адсорбироваться и на других субстратах с развитой поверхностью. К таким сорбентам относятся не только гели, но и стекло, уголь, почвенные частицы и глинистые минералы [73, 127]. Доминируют работы по включению клеток в полиакриламидный гель и кремнекислые гели, а также в различные полупроницаемые мембраны (коллагеновые, целлюлозные) и другие искусственные матрицы [157]. Иммобилизованные на нерастворимых носителях клетки микроорганизмов могут иметь ряд преимуществ как перед обычными культурами, так и перед иммобилизованными ферментами [40, 373, 381, 361]. Иммобилизованные интактные клетки сохраняют ферментативную активность и ультраструктурную организацию в течение многих суток.

Так, с помощью иммобилизованных клеток *Sacch. cerevisiae* показана возможность осуществления многих биохимических реакций. Оригинальный способ ускоренного производства пива разработан в ФРГ [175]. Брожение осуществляется пропусканием потока суслу через слой дрожжей в биореакторе определенной конструкции. Слой дрожжей и диатомита намывается на пластины фильтркартона, закрепленные в рамном фильтре. Длительность процесса получения готового пива 3—5 сут. Длительность процесса производства пива по обычной технологии в лучшем случае составляет 23 сут и выше.

¹ Леднев В. П. Интенсификация процесса спиртового брожения крахмалистых сред с многократным использованием дрожжей. Автореф. канд. дисс. М.: ВНИИПрБ, 1978. — 29 с.

В настоящее время уже рассматривается возможность практического использования клеток микроорганизмов для осуществления асимметричного гидролиза рацемических смесей эфиров аминокислот, изомеризации глюкозы, трансформации fumarата аммония в аспарагиновую кислоту, восстановления жирных кислот, сбраживания сахаров и др.

Таким образом, бактериальные, грибные и дрожжевые клетки, иммобилизованные на твердой матрице, способны к жизнедеятельности. Полученные результаты указывают на принципиальную возможность направленной регуляции биохимической активности микроорганизмов путем их иммобилизации, т. е. многократного использования в технологии. Тем самым открываются возможности создания непрерывно действующих колоночных процессов с использованием интактных клеток, без применения кофакторов, часто весьма мало доступных и дорогостоящих.

Иммобилизацию клеток можно рассматривать как один из путей получения активной полиферментной системы. В связи с развитием исследований микробных литических ферментов, разрушающих клеточные стенки одноклеточных, открываются широкие возможности практического осуществления иммобилизации не только интактных клеток, но и клеточных органелл. Многие внутриклеточные ферменты, представленные в виде сложных многобелковых комплексов [113], не могут проявлять каталитическое действие вне органеллы. Поэтому иммобилизация «специализированных» органелл представляет исключительный научный и прикладной интерес.

УСКОРЕНИЕ СОЗРЕВАНИЯ ВИН И ПИВА И ПОВЫШЕНИЕ ИХ КАЧЕСТВА

Созревание вин является сложным физико-химическим и биохимическим процессом. При созревании виноматериала вино приобретает тот или иной тип: портвейна, мадеры, столового, шампанского виноматериала и т. д. Свои качества по вкусу и букету виноматериал приобретает в результате ферментативных реакций, обусловленных комплексом ферментов, переходящих в вино из дрожжей при завершении ими спиртового брожения. Обычно процесс созревания является длительным, виноделы стремятся путем применения различных обработок вина сократить его. Один из эффективных способов интенсификации процессов формирования качественных показателей вин связан с использованием дрожжевых лизатов. С помощью литических ферментов, специфически разрушающих клеточные стенки дрожжей, представляется возможным как бы высвободить внутриклеточные ферменты или по крайней мере повышать их контакт с окружающей средой [113].

Ускорение процесса шампанизации. Добавление в тиражную смесь лизатов или полученного из них ферментного концентрата позволило значительно повысить биохимические и физико-хими-

ческие показатели качества вина. В опытных образцах по сравнению с контрольным (без добавки лизатов) был ниже ОВ-потенциал вина, меньшее содержание альдегидов и диацетила, более высокая активность ряда ферментов и т. д.¹ При дегустационной оценке отмечено, что вина, в которые добавлены ферменты лизатов, обладают хорошо выраженным тоном выдержки с приятным, подсолнечным оттенком. Таким образом, полученные данные позволили сделать заключение, что добавление дрожжевых лизатов к тиражной смеси способствует интенсификации происходящих при послетиражной выдержке биохимических процессов и ускоряет созревание шампанского, придает его букету оттенки выдержанного вина в более короткий срок.

Ускорение процесса дображивания пива. Дображивание пива происходит часто в течение 15 сут. При этом осуществляются сложные биохимические превращения, обуславливающие изменения некоторых продуктов метаболизма дрожжей (диацетила, альдегидов, высших спиртов, этилацетата), определяющих вкус и аромат пива. Сокращение длительности выдержки пива за счет интенсификации биохимических превращений может быть достигнуто путем использования определенного количества пивоваренных дрожжей, предварительно обработанных литическими ферментами. Внутриклеточные ферменты дрожжевых лизатов усиливают атакуемость субстратов пива и тем самым значительно сокращают длительность выдержки пива.

РАЦИОНАЛЬНОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ БЕЛКОВ

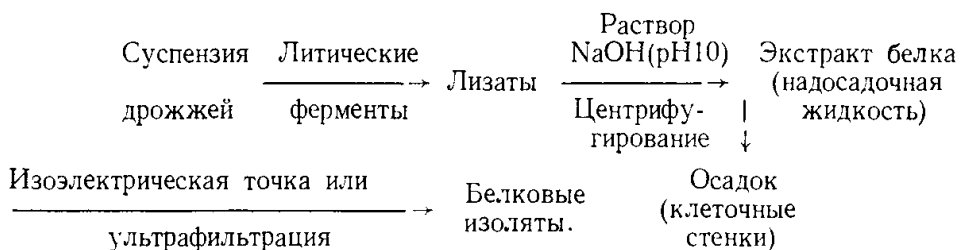
Белок является основным и наиболее дефицитным компонентом пищи человека. Считают, что мировой белковый дефицит по животному белку составляет не менее 2 млн. т. В связи с этим ученые всего мира ищут новые источники белка. Одним из таких источников белка могут быть дрожжи. С точки зрения темпов производства белка и его аминокислотного состава это направление является наиболее перспективным. Поэтому усилия исследователей направлены на изыскание способов получения микробного белка пищевого достоинства. Однако наибольшая сложность выделения белка из цитоплазмы клетки связана с защитой его клеточной стенкой. На сегодня предложено довольно много способов разрушения стенок клеток микроорганизмов и высвобождения белка. Однако каждый из них обладает порой весьма существенными недостатками. Наиболее перспективным методом является ферментативный.

ПОЛУЧЕНИЕ БЕЛКОВЫХ ИЗОЛЯТОВ

Препарат литических ферментов, полученный из культуры специально отселекционированного штамма *Actinomyces*

¹ Качейшвили Т. П. Интенсификация процессов формирования качественных свойств выдержанного Советского шампанского. Автореф. канд. дисс. — М.: МТИПП, 1977. — 16 с.

griseipus 11 [41, 42, 113], разрушает клеточные стенки дрожжей в такой степени, что цитоплазма становится доступной для количественного извлечения белка. Процесс выделения белковых изолятов схематично можно представить в следующем виде:



Препарат изолятов содержит в своем составе 78—80% нативного белка, 7—8% углеводов и 2—3% нуклеиновых кислот.

ПОЛУЧЕНИЕ ДРОЖЖЕВЫХ ЛИЗАТОВ ПИЩЕВОГО ДОСТОИНСТВА

Если лизаты получать из дрожжей, предварительно обработанных нуклеазой или слабым раствором кислоты, то они характеризуются низким содержанием нуклеиновых кислот. Все цитоплазматические соединения становятся доступными для атакующести пищеварительных ферментов. Такие лизаты с разрушенными клеточными стенками могут быть использованы в качестве белковых обогатителей пищи.

ПОЛУЧЕНИЕ ЛИЗАТОВ КОРМОВОГО ДОСТОИНСТВА

Литические ферменты позволяют получать лизаты, т. е. биомассу дрожжей с разрушенными клеточными стенками. Практически все цитоплазматические вещества клетки и прежде всего белки оказываются в лизатах доступными для действия пищеварительных ферментов желудочно-кишечного тракта. Если перевариваемость белков неразрушенных клеток дрожжей [219] лежит в пределах 70—75%, то у белков клеточных лизатов она составляет 80,6—85%, т. е. повышается на 10—15%. Усвояемость кормовых лизатов одновременно повышается и за счет перевода компонентов клеточной стенки в растворимое и доступное для пищеварительных ферментов состояние. Известно, что у дрожжей клеточная стенка составляет 25—30% массы сухой биомассы. Основными компонентами клеточной стенки дрожжей являются полисахариды — глюканы и маннаны, которые в сумме могут составлять до 90%. Таким образом, общая усвояемость лизатов за счет цитоплазмы (15%) и клеточных стенок (30%) может возрасти до 45% [113, 112]. Следовательно, усвояемость кормовых дрожжей с использованием литических ферментов возрастает почти в 1,5 раза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей книге обобщены исследования, объясняющие некоторые биохимические процессы, происходящие в дрожжевой клетке и определяющие ее жизнедеятельность. Для наиболее эффективного использования передовой технологии производства необходимо глубоко знать биохимию и молекулярную структуру дрожжевой клетки, на жизнедеятельности которой основаны эти процессы.

Теоретические знания биохимии дрожжевой клетки позволяют не только осуществлять контроль технологического процесса, но и управлять метаболизмом в определенных и желаемых пределах. Изучение и познание механизмов, регулирующих метаболизм у дрожжей, а также их рост и размножение, позволят повысить продуктивность организма.

У дрожжей имеются отличительные особенности, характерные только для них. Эти особенности дрожжей заключаются в необычной зависимости регуляции биохимических процессов от условий их культивирования, связанной прежде всего с составом питательной среды. Внешние условия определяют химический состав дрожжевых клеток, который в свою очередь обуславливает их биохимическую функцию. Эти функции в конечном итоге определяются ферментами, их биосинтезом и уровнем каталитического действия.

Известно, что количество различных ферментов и их активность в дрожжевых клетках фиксированы нестрого. При недостаточности некоторых веществ, входящих в состав среды, отмечается падение содержания многих внутриклеточных ферментов и, наоборот, синтез фермента может быть резко ускорен или вызван (индуцирован) тем или иным веществом, чаще всего соответствующим субстратом, на который действует данный фермент. Известно не менее 50 индуцированных ферментов, синтез которых многократно усиливается от соответствующего субстрата, вносимого в среду [1, 111, 112].

Так, например, при культивировании дрожжей на среде, содержащей в качестве источника углерода *n*-парафины, этанол или метанол, образуются соответствующие ферменты, совершенно отличные от тех, которые синтезируются этими же дрожжами, но при культивировании их на среде с углеводами. Следовательно,

в соответствии с источником углеродного питания дрожжевые клетки производят индуцированный синтез специфических ферментов (гексокиназы, алканоксигеназы, митохондриальной алкогольдегидрогеназы, метанолдегидрогеназы, формальдегиддегидрогеназы) и вырабатывают необходимые механизмы, обеспечивающие процесс диссимиляции субстрата.

При необходимости клетки дрожжей могут использовать запасные («резервные») метаболические пути. Например, при утилизации дрожжами *n*-парафинов образуется большое количество ацетильных остатков в результате β -окисления жирных кислот. Эти ацетильные соединения — ацетил—КоА — метаболизируются, по-видимому, через анаплеротическую (запасную) последовательность реакции глиоксилатного шунта, который при углеводном обмене если и проявляется, то в слабой степени. Соотношение активности ферментов шунта и ЦТК регулируется «константой сродства» к изоцитрату. Это касается прежде всего изоцитратлиазы (малое сродство) и изоцитратдегидрогеназы (большое сродство). Следовательно, изменение типа углеродного питания дрожжей сопровождается перестройкой действия основных метаболических путей. Клетки действуют по принципу максимальной экономии составных частей и процессов, поэтому они синтезируют только те ферменты, которые им необходимы в данный момент в соответствии с составом питательной среды.

При резкой смене источника углерода в среде, например с глюкозы на парафин, происходит увеличение активности ферментов, участвующих, в частности, в реакциях превращения яблочной кислоты в цитоплазме: фумаразы — более чем в 5 раз, а НАД-зависимой малатдегидрогеназы — в 4 раза. Многие соединения могут подавлять или репрессировать синтез ферментов. Этот тип регуляции биохимических процессов протекает на уровне генного аппарата — индукции и репрессии. Так, например, исходная концентрация глюкозы в среде влияет на биосинтез инвертазы при культивировании дрожжей, несущих ген «зис».

Оказалось, что содержание инвертазы в клетках обратно пропорционально концентрации глюкозы в среде. Активность фермента на единицу сухой массы клетки при концентрации глюкозы 0,003% в 55 раз больше, чем при концентрации глюкозы 2%. Указанная метаболитная репрессия, вызываемая глюкозой, подавляет образование наряду с инвертазой и многих других ферментов. Установлено, например, что пока концентрация глюкозы в среде не упадет до известного уровня, соответствующего 0,2—0,6%, мальтоза дрожжами не сбраживается. Наличие глюкозы, как можно полагать, активирует «мальтозимазную» репрессивную систему, ингибирующую синтез мальтазы. Сбраживание мальтозы начинается, как правило, после лаг-периода; дисахарид проникает в клетку с помощью пермеаз. Для синтеза ферментов, в том числе и пармеаз, часто необходимы свободные аминокислоты, пурины и пиримидины среды. Сбраживание мальтотриозы и раффинозы осуществляется в период дображивания и

зависит в значительной степени от содержания азота в дрожжах и от особенностей культуры.

При катаболитной репрессии повышается, вероятно, концентрация одного из продуктов катаболизма, репрессирующего биосинтез фермента.

Некоторые аминокислоты также подавляют или репрессируют синтез ферментов, особенно при внесении их в среду в повышенных концентрациях [110, 111, 65, 66, 67, 84]. Однако содержание в естественных средах богатой смеси всех протеиногенных аминокислот позволяет дрожжевым клеткам усваивать их в первой стадии размножения без дезаминирования. Прямая ассимиляция аминокислот, происходящая в экспоненциальной фазе роста, определяет скорость биосинтеза белка и размножение клеток, а также повышение выхода этанола за счет экономии сахара, расходуемого на питание микроорганизма [109].

Показано в то же время, что при лимитации роста дрожжей недостаточностью или отсутствием в среде источника азота или фосфора (и других ингредиентов) нарушается корреляция между скоростями катаболизма и анаболизма. При этом клетки могут потреблять источник углерода и энергии (глюкозу) и в то же время замедлять скорость размножения. Часть энергии, поступившей в клетку с потребленным субстратом и не пошедшей на размножение, выделялась в виде усилившегося термогенеза. При этом отмечается уменьшение экономичности использования на синтез биомассы энергии, содержащейся в потребленном клетками углеродсодержащем субстрате. Интересно отметить, что рассеивание тепла дрожжами на полноценной среде за 6 ч роста составило 1,38 Дж на 1 мг потребленной глюкозы, при лимитации размножения отсутствием азота в среде тепловыделение соответствовало величине 3,36 Дж на 1 мг потребленной глюкозы, а при лимитации фосфора — 2,27 Дж на 1 мг глюкозы [180].

Рассматривая влияние внешних факторов на физиологическое состояние дрожжей, необходимо иметь в виду, что многие внутриклеточные ферменты входят в мультиэнзимную систему. Каждый фермент этой системы характеризуется определенным оптимумом рН, определенным сродством к своему субстрату и продуктам метаболизма, а также к своему коферменту или активатору. Поэтому суммарная скорость данной последовательности реакций есть функция ряда указанных параметров. Так, например, значение рН внутри клетки зависит от скорости всех процессов, сопровождающихся отщеплением и присоединением протонов; на скорость этого метаболического процесса в свою очередь могут влиять другие внутриклеточные процессы, оказывающие влияние на уровень рН. Обмен промежуточных продуктов, т. е. их образование и потребление, зависит как от активности мультиферментной системы, так и от скорости других ферментных реакций, влияющих на образование и использование этих метаболитов.

Дрожжевые клетки, как и другие микроорганизмы, должны иметь некоторые «метаболические ловушки», позволяющие кон-

центрировать внутри клетки эндогенные резервные продукты обмена. К ним можно отнести гликоген, липиды, полифосфаты, поли- β -оксимасляную кислоту (у бактерий) и др. Эндогенные резервные продукты обмена обеспечивают микробным клеткам эндогенное питание и тем самым делают их менее зависимыми от условий внешней среды. Отсутствие сбалансированности метаболизма, усиление катаболизма субстрата среды без параллельно возрастающего синтеза биомассы может вызывать сверхсинтез экстрацеллюлярных ценных соединений: органических кислот, некоторых ферментов, полисахаридов, липидов и др. [111, 149].

Одним из наиболее важных условий регуляции клеточного метаболизма у дрожжей является поддержание на строго постоянном, сравнительно невысоком уровне концентрации различных метаболитов, особенно низкомолекулярных: АТФ, АДФ, АМФ, ацетил-КоА, никотинамидные коферменты, компоненты цикла Кребса и некоторые другие, — являющихся аллостерическими эффекторами многих ферментов. Уровень указанных и других (РНК, свободные внутриклеточные аминокислоты, пептиды и др.) метаболитов характеризует сбалансированность в клетке катаболизма и анаболизма, энергетического и конструктивного обменов.

Одним из показателей сбалансированности в клетке энергетических и биосинтетических реакций может служить АТФ-пул. При развитии микроорганизма на полноценной среде изменение АТФ-пула на разных физиологических стадиях происходит по-разному: во время лаг-периода и к началу экспоненциальной фазы уровень АТФ-пула достигает максимума, причем скорость образования АТФ превосходит скорость его использования. Затем в конце экспоненциальной фазы и особенно в стационарной фазе расход АТФ превышает скорость его биосинтеза, и общее содержание ее снижается [180].

Итак, физико-химические условия роста, состав питательной среды или низкомолекулярные метаболиты могут вызывать прямое активирование или угнетение определенных внутриклеточных ферментов и тем самым повышать или угнетать продуктивность микроорганизма. Таким образом, необходимо иметь прежде всего оптимальные, научно обоснованные технологические параметры; не менее важно строгое соблюдение этих параметров. Режим культивирования необходимо соблюдать прежде всего в процессе экспоненциального роста дрожжей, как определяющего последующий ход процесса, обеспечивающего выход и качество получаемого продукта. Процесс интенсивного размножения клеток в экспоненциальной фазе их роста связан с энергичным потреблением питательных веществ из среды и с максимальным содержанием в них белковых веществ, РНК, полифосфатов, внутриклеточных аминокислот, пептидов. Переход дрожжей в следующую, стационарную фазу роста обуславливает резкое уменьшение прежде всего полифосфатов, РНК, свободных аминокислот и пептидов. Одновременно в этой стационарной фазе роста дрожжи

характеризуются высокой способностью к брожению и образованию резервных веществ: трегалозы, гликогена, липидов.

Таким образом, существует непосредственная связь между химическим составом дрожжей и их жизнедеятельностью. Способность дрожжей к постоянно возрастающей скорости почкования и размножения, проявляемая в экспоненциальной фазе, сменяется функцией брожения, свойственной стационарной фазе роста. При этом отмечается подавление процесса дыхания брожением или преобладание анаэробного окисления над аэробным. Малый эффект окислительно-восстановительных реакций анаэробного обмена и является основной причиной затухания и прекращения процесса почкования и размножения клеток.

При многократном использовании дрожжей или при непрерывном методе брожения, когда постоянно поддерживается процесс энергичного превращения сахара в спирт, количество почкующихся клеток, как правило, не превышает 10—12% от общего их количества, хотя сбраживаемый субстрат при этом содержит еще много питательных веществ и мало спирта.

Количественные изменения в химическом составе дрожжей проявляются в фазе затухания еще более заметно, чем ранее. В этой фазе дрожжевая клетка использует почти все свои резервные вещества и прежде всего трегалозу и гликоген; во много раз снижается содержание кислоторастворимых фосфатов и полифосфатов, в 1,5—2 раза уменьшается количество РНК; наблюдается также снижение содержания свободных аминокислот и пептидов — в общем клетки находятся в состоянии предавтолиза. В то же время дрожжевая клетка имеет свой «золотой фонд», состоящий из ДНК и белка, которые она неизменно сохраняет в течение всего периода онтогенеза.

Если дрожжевые клетки, находящиеся в стадии затухания, перенести на новую питательную среду, то в их развитии наступает лаг-фаза, во время которой в клетке происходят существенные изменения, обеспечивающие в дальнейшем процесс размножения. Таким образом, в период лаг-фазы клетки в состоянии повысить содержание РНК, полифосфатов, аминокислот, пептидов и т. д., однако для этого дрожжи должны сохранить постоянные количества ДНК и белков.

При непрерывном методе проведения главного брожения в одном головном аппарате и при соответствующей скорости поступления питательной среды в развитии дрожжей можно устранить не только лаг-фазу, но и почти полностью экспоненциальную фазу. Тем самым одновременно проявляются две функции дрожжевых клеток: функция брожения и способность их к размножению. В соответствии с этими функциями находится и химический состав дрожжей, который поддерживается на одном постоянном уровне.

В проточной среде установлена отличительная особенность клетки, заключающаяся в том, что она в состоянии размножаться, усваивать азот, фосфор и сбраживать сахар в условиях высокой

концентрации спирта (7,6—8,5 об. %), сохраняя при этом свою биохимическую активность. Это позволяет значительно сократить длительность процесса непрерывного брожения.

Другая, также очень важная особенность дрожжей была выявлена в условиях многократного использования их при спиртовом брожении. Оказалось, что активность дрожжей при многократном использовании их при брожении не снижается, а даже возрастает. Эти данные служат основой для многократного использования микроорганизмов не только путем их возврата снова в производство, но и на основе иммобилизации клеток.

Таким образом, классическую технологию микробиологических процессов представляется возможным коренным образом усовершенствовать лишь на основе методов проточного культивирования. Именно в проточной среде создаются условия, позволяющие осуществлять управляемое культивирование дрожжей и обеспечивающие повышение их продуктивности.

Наиболее экономичным и перспективным представляется применение иммобилизованных дрожжевых клеток в бродильной и других отраслях промышленности. Иммобилизованные клетки имеют ряд преимуществ перед обычно применяемыми клетками: повышается стабильность при хранении, расширяется температурный оптимум, создается возможность действия непрерывных процессов. При многократном использовании дрожжей исключается расход сахара на молодые клетки, появляющиеся в процессе размножения, и обеспечивается повышение выхода основного продукта.

В свою очередь новое направление, связанное с получением иммобилизованных клеточных органелл (структур), отличающихся высокой активностью специфических ферментов, также представляет исключительный научный и практический интерес.

При этом предопределяется также и дальнейшее получение гибридов дрожжей, и внедрение наиболее активных из них в производство. Это позволяет эффективно использовать трисахарид раффинозу, содержащуюся в мелассе, на образование этанола и повышение его выхода на спиртовых заводах. Одновременно гибриды обеспечивают повышение качества спиртовых дрожжей, используемых после брожения для получения прессованных, пригодных для хлебопекарной промышленности.

Использование литических ферментов, специфически разрушающих клеточные стенки микроорганизмов, позволит значительно (в 1,4—1,5 раза) повысить усвояемость кормовых дрожжей в животноводстве. Одновременно открываются возможности выделения из дрожжей белковых изолятов пищевого достоинства и тем самым в значительной мере снижения белкового дефицита в питании людей.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абдуразакова С. Х., Саломов Х. Т. Пути повышения активности внеклеточной эстеразы, β -фруктофуранозидазы и протеазы винных дрожжей. — Прикл. биохим. и микробиол., 1975, XI, № 1, с. 30—34.
2. Абдуразакова С. Х. и др. Изучение активности ферментов в бродящей среде в условиях управляемого культивирования дрожжей / Абдуразакова С. Х., Саломов Х. Т., Фомичева Т. М., Ильясов Т. М. — Прикл. биохим. и микробиол., 1975, XI, № 3, с. 341—346.
3. Агабальянц Г. Г., Мержаниан А. А., Брусиловский С. А. Способ шампаннизации вина в непрерывном потоке и установка для осуществления способа. А. с. 122467 (СССР). — Б. И., 1966, № 23.
4. Айзенберг О. А. Зависимость стабилизации и репарации разрывов в цепях ДНК *in vivo* от скоростей синтеза ДНК и белка. Автореф. канд. дисс. — М.: ВНИИгенетика, 1975. — 27 с.
5. Андреев К. П. Применение метода проточных культур при сбраживании на спирт гидролизатов хвойной древесины. — Микробиология, 1959, 28, № 2, с. 264—271.
6. Андреева Е. А. и др. Влияние субмаксимальной температуры на свойства хемостатной культуры *Candida utilis* / Андреева Е. А., Позмогова И. Н., Ховрычев М. П., Шульговская Е. М. — Микробиология, 1977, 46, № 1, с. 29—32.
7. Афанасьев Ю. И., Ноздрин В. И. Регуляция структуры и функции клетки. — Усп. совр. биол., 1977, 83, № 3, с. 400—418.
8. Ахалкаци Р. Г. и др. Синтез РНК в изолированных ядрах ранних эмбрионов вьюна / Ахалкаци Р. Г., Симич М., Тимофеева М. Я., Кафмани К. А. — Биохимия, 1970, 35, № 6, с. 1193—1201.
9. Бабаева С. А. Роль азотного и углеводного состава среды и условий сбраживания в процессе образования высших спиртов дрожжами *Sacch. carlsbergensis* XI. Автореф. канд. дис. — М.: МТИПП, 1966. — 30 с.
10. Баев А. А. Структура и функции транспортной РНК. — Природа, 1969, № 4.
11. Бартнев Ю. С. Влияние величины засева дрожжей и температуры на процесс брожения и образование высших спиртов. Автореф. канд. дис. — М.: МТИПП, 1973. — 30 с.
12. Безбородов А. М. Метаболиты внутриклеточного фонда микроорганизмов. — М.: Наука, 1974. — 76 с.
13. Безбородова С. И. Рибонуклеазы микроскопических грибов и дрожжей. — В кн.: Нуклеазы микроорганизмов. М.: Наука, 1974, с. 188—256.
14. Безбородова С. И. Сравнительное изучение внеклеточных рибонуклеаз грибов. Автореф. докт. дис. — Пушкино-на-Оке: Ин-т биохим. и физиол. микрорг. АН СССР, 1977. — 67 с.
15. Бекер М. Е., Межиня Г. Р. Теория и практика получения вторичных продуктов при непрерывном культивировании. — В кн.: Микробиология, т. 4. — М.: ВИНТИ, 1975, с. 52—75.
16. Белозерский А. Н. Молекулярная биология — новая ступень познания природы. — М.: Советская Россия, 1970. — 189 с.
17. Белозерский А. Н. Биохимия нуклеиновых кислот и нуклеопротеидов. Избр. труды. — М.: Наука, 1976. — 372 с.

18. **Белицина Н. В., Розенблат В. А., Спирин А. С.** Действие различных катионов на стабильность ассоциации рибосомных субчастиц. — Молек. биол., 1971, 5, № 6, с. 898—907.
19. **Беляев В. Д.** Микробиологическая промышленность и перспективы ее развития. — Журн. Всесоюз. хим. об-ва им. Д. И. Менделеева, 1972, 17, № 5, с. 482—487.
20. **Беляева Р. Х.** Физико-химические свойства транскетотазы пекарских дрожжей и ее субъединичная структура. — М.: МГУ, 1978. — 28 с.
21. **Березин И. В.** и др. Образование первичных спиртов и пальмитиновой кислоты при микробиологическом окислении гексадекана / Березин И. В., Бонарцева Г. Н., Ольсинская Н. Л., Воробьева Л. И., Егоров Н. С., Угарова Н. Н. — Прикл. биохим. и микробиол., 1975, XI, № 5, с. 653—656.
22. **Березин И. В., Антонов В. К., Мартинек К.** Имобилизованные ферменты. Т. 1. — М.: МГУ, 1976. — 247 с.
23. **Беренцвейг И. А.** Содержание фенилэтилового спирта в пиве. — М.: ЦНИИТЭИпищепром, 1971, № 7, с. 11—13.
24. **Беренцвейг И. А.** Динамика летучих компонентов при непрерывном получении пива. — Ферментная и спиртовая промышленность, 1974, № 7, с. 39—41.
25. **Беренцвейг И. А.** Исследование образования основных побочных продуктов брожения с целью разработки технологии непрерывного брожения и дображивания пива. Автореф. канд. дис. — М.: МТИПП, 1975. — 33 с.
26. **Беренцвейг И. А., Исаева В. С., Крицкова Г. М.** Динамика накопления диацетила при производстве пива в непрерывном потоке. — М.: ЦНИИТЭИпищепром, № 1, 1971, с. 6—10.
27. **Беренцвейг И. А., Жвирблянская А. Ю.** Влияние концентрации дрожжей на процесс сбраживания пивного сусла в непрерывном потоке. — М.: ЦНИИТЭИпищепром, № 3, 1974. — 24 с.
28. **Беренцвейг И. А., Крицкова Г. М.** Изучение образования превращения диацетила для разработки технологии непрерывного получения пива. — М.: ЦНИИТЭИпищепром, 1974. — 24 с.
29. **Бибилашвили Р. А., Савочкина Л. П.** Комплексы РНК-полимеразы с ДНК. II. Получение комплексов, устойчивых к обработке ДНКазой I. — Молек. биол., 1973, 7, № 1, с. 93—104.
30. **Бирюзова В. И.** Мембранные структуры микроорганизмов. — М.: Наука, 1973. — 136 с.
31. **Бирюзова В. И., Волкова Т. М.** Электронномикроскопическое и цитохимическое исследование аппарата Гольджи в дрожжевых клетках. — ДАН СССР, 1963, 153, № 5, с. 1180—1182.
- 31а. **Богданов А. А.** Современное состояние проблемы нулеиново-белковых взаимодействий. — Усп. совр. биол., 1974, 77, № 2, с. 48—67.
32. **Богданов А. А., Спирин А. С.** Принципы структурной организации рибосом. — Журн. Всесоюз. хим. об-ва им. Д. И. Менделеева, 1975, 20, № 3, с. 271—279.
33. **Бородин В. М., Мейсель М. Н.** Опыт применения антибиотика оливомицина для выявления хромосом у дрожжей. — Микробиология, 1976, 45, № 2, с. 370—372.
34. **Брокерхоф Х., Дженсен Р.** Липолитические ферменты. — М.: Мир, 1978. — 396 с.
35. **Брусилловский С. А.** Разработка и производственное освоение технологии шампанских вин в непрерывном потоке. М., 1960.
36. **Былинкина Е. С., Штоффер Л. Д.** Непрерывная ферментация антибиотиков. — В кн.: Микробиология. т. 4. — М.: ВИНТИ, 1975, с. 107—123.
- 36а. **Брэдли С., Эквист Л.** Нуклеиновые кислоты. В кн.: Молекулярная микробиология. М., 1977, с. 54—112.
37. **Ванюшин Б. Ф.** Метилирование ДНК в клетках различных организмов. — Усп. совр. биол., 1974, 77, № 2, с. 67—90.
38. **Васильев Н. Ф.** и др. Непрерывное сквашивание молока, используемого в производстве маргарина / Васильев Н. Ф., Новотельнов Н. В., Шмелева Л. И., Яковлев Д. А., — В кн.: Теория и практика непрерывного культивирования микроорганизмов. М., 1973. — с. 46—48.
39. **Вилли К., Детье В.** Биология. — М.: Мир, 1975, — 822 с.

- 39а. Волкова М. В. и др. Изменение активности ферментов гликоксилатного цикла у дрожжей при углеводородном питании / Волкова М. В., Хускивадзе Б. К., Лапина М. В., Гололобов А. Д. — Прикл. биохим. и микробиол., 1975, XI, № 2, с. 157—161.
40. Воробьева Л. И. и др. Образование летучих кислот иммобилизованными клетками пропионовых бактерий / Воробьева Л. И., Алексеева М. А., Суркова И. Г., Гаган В. И. — Прикл. биохим. и микробиол., 1977, XIII, № 4, с. 531—538.
41. Воротило С. П. Биосинтез литических ферментов термотолерантным штаммом *Actinomyces griseinus* 11 и изучение их свойств. Автореф. канд. дис. — М.: МГУ, 1974. — 28 с.
42. Воротило С. П., Коновалов С. А., Максимов В. И. Муколитические ферменты термотолерантного штамма *Actinomyces* sp. 11. — Прикл. биохим. и микробиол., 1973, IX, № 5, с. 671—675.
43. Врана Д. Применение двухступенчатого непрерывного культивирования для исследования физиологического состояния популяции *Candida utilis*. — Микробиология, 1975, 44, 2, с. 214—218.
44. Врана Д., Беран К. Цитоморфологическая характеристика *Saccharomyces cerevisiae* и *Candida utilis* как показатель физиологического состояния культуры. — Микробиология, 1977, 46, № 1, с. 161—164.
45. Гаврилова Н. Н. Роль биомассы дрожжей в процессе образования высших спиртов при брожении. Автореф. канд. дис. — М.: МТИПП, 1970. — 26 с.
46. Газиев А. И. ДНК-лигазы. — Усп. совр. биол., 1974, 78, № 2(5), с. 171—187.
47. Газиев А. И., Уманский С. Р., Кузин А. М. Влияние гистонов на репарацию однонитевых разрывов ДНК полинуклеотидлигазой. — Биохимия, 1971, 201, № 4, с. 983—985.
48. Гаузе Г. Г. Митохондриальная ДНК. — М.: Наука, 1977. — 287 с.
49. Геворкян Д. А. Ассимиляция ациклических аминокислот и пролина в условиях аэробного выращивания *Candida albicans*. Автореф. канд. дис. — Ереван: Ереванск. гос. ун-т, 1970. — 26 с.
50. Гилядов М. Г. Разработка технологии поточного сбраживания виноградного сусла в одинарном аппарате. Автореф. канд. дис. — М.: МТИПП, 1967. — 25 с.
51. Глазунова А. М., Финогенова Т. В. Активность ферментов цитратного, гликоксилатного и пентозофосфатного цикла при синтезе лимонных кислот *Candida lipolytica*. — Микробиология, 1976, 45, № 3, с. 444—449.
52. Головлева Л. А. и др. Роль косубстратов при микробиологическом окислении изомерных ксилитов культурой *Pseudomonas aeruginosa* / Головлева Л. А., Головлева Е. Л., Гаибаров Х. Г., Скрябин Г. К. — Микробиология, 1977, 46, № 1, с. 5—9.
53. Градова Н. Б., Кручинина Л. К. Использование дрожжами, окисляющими углеводороды, кислородсодержащих производных углеводородов. — Прикл. биохим. и микробиол., 1967, 3, № 3, с. 315—323.
54. Грачева И. М. Исследование процесса образования высших спиртов дрожжами. Автореф. докт. дис. — М.: МТИПП, 1972. — 72 с.
55. Грачева И. М. Биосинтез высших спиртов дрожжами. — В кн.: Микробиология, т. 1. — М.: ВИНТИ, 1972, с. 97—120.
56. Грачева И. М. и др. Влияние углеводного состава сбраживаемой среды на процесс образования летучих кислот дрожжами *Saccharomyces carlsbergensis* 776 / Грачева И. М., Жирова В. В., Бабаева С. А., Ковалевич Л. С., Макеев Д. М. — Прикл. биохим. и микробиол., 1978, 14, № 4, с. 583—585.
57. Григорьева С. П. и др. Изучение полифосфатов, полисахаридов и нуклеиновых кислот в клетках *Candida guilliermondii*, ассимилирующих углеводороды нефти, при разных условиях культивирования / Григорьева С. П., Воробьева Г. И., Выслоух В. А., Максимова Г. Н., Кулаев И. С. — Прикл. биохим. и микробиол., 1973, IX, № 6, с. 805—812.
58. Григорян Д. Т. Изучение индуцированной изменчивости у гриба *Aspergillus fumigatus*, активного продуцента кислой протеиназы. Автореф. канд. дис. — Ереван: отд. биол. наук АН Арм. ССР, 1972. — 28 с.

59. Гулапова Т. В. Изучение внеклеточных рибонуклеаз. Автореф. канд. дис. — Л.: 1976.—30 с.
60. Де Дюв Х., Мюллер М. Немитохондриальные частицы в литохондриальных фракциях. — В кн.: Функциональная биохимия клеточных структур. М., 1970, с. 322—336.
61. Денщиков М. Т. Непрерывное брожение в пивоварении. — М.: Пищевая промышленность, 1965.
62. Денщиков М. Т., Жвирблянская А. Ю. Непрерывный процесс главного брожения пива. — М.: ЦИНТИпищепром, 1969, № 1. — 31 с.
63. Дертингер Г., Юнг Х. Молекулярная радиобиология. — М.: Атомиздат, 1973.
64. Диканская Э. М., Робышева З. Н. Образование эргостерина дрожжами рода *Candida*. — Прикл. биохим. микробиол., 1975, XI, № 1, с. 21—24.
65. Дорохов В. В. Биосинтез кислой протеиназы плесневыми грибами. Автореф. канд. дис. — М.: МТИПП, 1968. — 40 с.
66. Дорохов В. В., Коновалов С. А. Способ получения ферментного препарата кислой протеиназы. А. с. 210788 (СССР). — Б. И., 1969, № 3.
67. Дорохов В. В., Коновалов С. А. Биосинтез кислой протеиназы плесневыми грибами. — М.: ЦИНТИпищепром, 1968. — 74 с.
68. Дорохов В. В., Коновалов С. А. Специфическое действие кислой протеиназы *Asp. flavus* 74. — Микробиологическая промышленность, 1971, № 1, с. 33—35.
69. Дорохов В. В., Коновалов С. А. Содержание свободных внутриклеточных аминокислот и биосинтез кислой протеиназы грибами рода *Aspergillus*. — Прикл. биохим. и микробиол., 1969, 5, № 3, с. 265—272.
70. Дубицкая С. Л. Изучение аминокислотного фонда и субстратов эндогенного метаболизма *Candida tropicalis* Л-2. Автореф. канд. дис. — Алма-Ата: Ин-т микробиол. и вирусол., 1972. — 25 с.
71. Дылковский В. Методы производства пива в Польше. В кн.: Материалы выставки «Пивиндустрия». М., 1969, с. 24—26.
72. Дэвидсон Дж. Биохимия нуклеиновых кислот. — М.: Мир, 1976. — 412 с.
- 72а. Дэгли С., Никольсон Д. Метаболические пути. — М.: Мир, 1973. — 307 с.
73. Евстигнеев З. Г. и др. Иммунизация бактериоидов *Rhizobium lupini* в полиакриламидном геле/Евстигнеев З. Г., Асеева К. Б., Шапошников Г. Л., Кретович В. Л., Могильницкий Г. М., Кощеенко К. А., Скрыбин Г. К. — ДАН СССР, 1975, 222, № 2, с. 489—492.
74. Егоров А. М. и др. Микробные ферменты системы окисления метанола для регенерации кофакторов и получения водорода/Егоров А. М., Платененкова Л. С., Егорова О. А., Березин И. В. — В кн.: Микробиология, т. 9. Биосинтез ферментов микроорганизмами. М.: ВИНТИ, 1978, с. 134—167.
75. Егоров А. М. и др. Новый штамм метилотрофных бактерий *Pseudomonas oleovorans* — продуцент полисахарида/Егоров А. М., Платененкова Л. С., Захарова Е. В., Нетрусов А. И. — Прикл. биохим. и микробиол., 1976, XII, № 4, с. 524—527.
76. Емцева Т. В. Физиолого-биохимические исследования экспериментального получения мутанта *Bacillus mesentericus* и природного штамма *Bacillus subtilis* — продуцентов протеолитических ферментов. Автореф. канд. дис. — М.: МГУ, 1975. — 25 с.
77. Ермакова И. Т., Финогенова Т. В. Участие гликозилатного цикла в обмене веществ алканокисляющих дрожжей *Candida lipolitica* при биосинтезе α -кетоглутаровой кислоты. — Микробиология, 1971, 40, № 2, с. 223—226.
78. Жвирблянская А. Ю., Исаева В. С. Дрожжи в пивоварении. — М.: Пищевая промышленность, 1978. — 246 с.
79. Жирова В. В. Образование летучих кислот и других метаболитов дрожжей в условиях пивоварения. Автореф. канд. дис. — М.: МТИПП, 1977. — 25 с.
80. Залашко М. В. Биосинтез липидов дрожжами. — Минск: Наука и техника, 1971. — 215 с.
81. Звягильская Р. А. ДНК дрожжевых митохондрий. — Усп. биол. хим., 1974, 15, с. 3—23.
82. Звягинцев Д. Г. Взаимодействие микроорганизмов с твердыми поверхностями. — М.: МГУ, 1973.

- 82а. Зеров Ю. П. Последовательности полиадениловой кислоты в различных классах РНК. — Усп. совр. биол., 1976, 81, № 1, с. 21—36.
83. Зуева Р. В. Физиолого-биохимические особенности мутанта *Asp. oryzae*, активного продуцента кислой протеиназы. Автореф. канд. дисс. — М.: МТИПП, 1971. — 32 с.
84. Зуева Р. В. и др. Свободные внутриклеточные аминокислоты мицелия *Aspergillus oryzae* и синтез кислой протеиназы / Зуева Р. В., Коновалов С. А., Помазкова В. А., Рябчук В. А. — Прикл. биохим. и микробиол., 1974, 10, № 2, с. 207—211.
- 84а. Иванов В. Н., Подгорский В. С. Энергетика роста метанолюкисляющих дрожжей. — Микробиология, 1977, 46, № 2, с. 203—210.
85. Илларионова В. И., Финогенова Т. В., Глазунова Л. М. Изучение влияния условий культивирования на образование лимонной и изолимонной кислоты *Candida lipolytica* на среде с гексадеканом. — Прикл. биохим. и микробиол., 1975, IX, № 2, с. 172—178.
86. Ильченко А. П. Сравнительное изучение митохондрий дрожжей *Torulopsis candida*, выращенных на глюкозе и на гексадекане. — Микробиология, 1976, 45, № 6, с. 1028—1034.
87. Ильченко А. П., Тюрин В. С., Дмитриев В. В. Выделение и морфолого-биохимическая характеристика митохондрий дрожжей *Torulopsis candida*, выращенных на глюкозе и на гексадекане. — Прикл. биохим. и микробиол., 1975, XI, № 2, с. 162—166.
88. Имшенецкий А. А., Жильцова Г. К. Получение полиплоидных форм у бактерий. — Микробиология, 1978, 47, № 2, с. 283—285.
89. Ингрем В. Б. Синтез макромолекулы. — М.: Мир, 1975. — 416 с.
90. Исаева В. В., Жвирблянская А. Ю. Роль компонентов клеточной стенки пивоваренных дрожжей в явлениях флокуляции. — Усп. микробиол., 1976, № 11, с. 174—189.
91. Кавадзе А. В., Родопуло А. К., Егоров И. А. Исследование α -дикетонных и α -оксикетонных в винах. — Прикл. биохим. и микробиол., 1977, XIII, № 2, с. 199—204.
92. Казанская Т. Б., Анюхин Ю. Г., Федорова Т. А. Соотношение ацетона и валлина в культурах бактерий семейства *Enterobacteriaceae* на средах с глюкозой и глицерином. — Микробиология, 1975, 44, № 2, с. 245—247.
93. Казанская Т. Б., Анюхин Ю. Г. Внеклеточное накопление валлина бактериями семейства *Enterobacteriaceae*, образующими ацетон. — Микробиология, 1974, 43, № 3, с. 546—547.
94. Калунянц Н. П., Очнева И. Н., Соломатина Л. М. Влияние некоторых факторов на рост дрожжей в проточной культуре. — Прикл. биохим. и микробиол., 1974, X, № 1, с. 18—23.
95. Капальдин Р. Динамическая модель клеточных мембран. — В кн.: Молекулы и клетки, вып. 6. — М.: Мир, 1977, с. 184—198.
96. Капрелянц А. С. и др. Подвижность белковых молекул в мембранах бактерий *Micrococcus lysodeikticus* / Капрелянц А. С., Бинюкова В. И., Григорян Г. Л., Островский Д. Н. — Биохимия, 1974, 39, № 5, с. 1103—1109.
97. Кафиани К. А., Маленков А. Г. Роль ионного гомеостаза клетки в явлениях роста и развития. — Усп. совр. биол., 1976, 1, № 3, с. 445—463.
98. Кащенко В. Е. Исследование рибофлавинкиназы дрожжей *Pichia guilliermondii*. — Киев: Ин-т биохимии им. А. В. Палладина, 1978. — 27 с.
99. Квасников Е. И., Исакова Д. М. Физиология термотолерантных микроорганизмов. — М.: Наука, 1978. — 166 с.
100. Киреева Т. И., Упорова Т. В. Непрерывные процессы производства пивного сусле, брожения и дображивания пива. М., ЦНИИТЭИпищепром, 1971. — 21 с.
101. Кишковский З. Н. Биохимические основы виноделия. — В кн.: Техническая биохимия. М., 1973, с. 456.
102. Ковалевич Л. С. Образования диацетила и других побочных продуктов дрожжами при интенсифицированных режимах брожения. Автореф. канд. дисс. — М.: МТИПП, 1974. — 33 с.
103. Козлова Т. М. Структурная и ультраструктурная организация дрожже-

вых организмов и ее перестройка в зависимости от физиологического состояния. Автореф. канд. дис. — М.: Ин-т микробиологии АН СССР, 1969. — 28 с.

104. Козлова Т. М., Мейсель М. Н. О возможности участия митохондрий в образовании пероксида у дрожжевых организмов. — Микробиология, 1976, 46, № 6, с. 1113—1114.

105. Кокова В. Е., Лисовский Г. М. Непропорционально-проточная культура простейших. — Новосибирск: Наука. Сибирское отд. 1976. — 74 с.

106. Коновалов С. А. Особенности жизнедеятельности дрожжей при непрерывном способе брожения. — Микробиология, 1958, 27, № 1, с. 120—126.

107. Коновалов С. А. Потребление азота дрожжами при непрерывном методе брожения. — Микробиология, 1959, 28, № 5, с. 717—723.

108. Коновалов С. А. Выявление оптимальных условий для жизнедеятельности дрожжей в головном аппарате непрерывной батареи. — Спиртовая промышленность, 1961, № 6, с. 14—18.

109. Коновалов С. А. Биохимия дрожжей. — М.: Пищепромиздат, 1962. — 266 с.

110. Коновалов С. А. Биохимия бродильных производств. — М.: Пищевая промышленность, 1967. — 311 с.

111. Коновалов С. А. Биосинтез ферментов микроорганизмами. — М.: Пищевая промышленность, 1972. — 267 с.

112. Коновалов С. А. Достижения технической микробиологии. — М.: Знание, 1976. — 63 с.

113. Коновалов С. А., Воротилов С. П. Исследование литических ферментов и перспективы их использования. — Прикл. биохим. и микробиол., 1977, XIII, № 6, с. 819—828.

113а. Коновалов С. А., Максимов В. И. Ферменты, катализирующие первичное окисление насыщенных углеводов. — Журн. Всесоюз. хим. об-ва им. Д. И. Менделеева, 1972, 17, № 5, с. 538—544.

114. Копылов А. М., Шалаева Е. С., Богданов А. А. Структурные превращения рибонуклеопротенов, образующихся в процессе самосборки малой субчастицы рибосомы *Escherichia coli*. — ДАН СССР, 1974, 216, № 5, с. 1178—1181.

114а. Корнберг А. Синтез ДНК. — М.: Мир, 1977. — 359 с.

114б. Корниш-Боуден Э. Основы ферментативной кинетики. — М.: Мир, 1979. — 280 с.

115. Коротяев А. И. и др. Необычный характер изменений массы ДНК у некоторых штаммов *Escherichia coli* в процессе роста / Коротяев А. И., Максимов В. Ф., Орлов В. Г., Ширяев И. Н., Астапов А. Л. — ДАН СССР, 1970, 194, с. 1433—1436.

116. Коротяев А. И. и др. Кинетика биосинтеза РНК и белка у бактерий рода *Mucosoccus* при периодическом культивировании на среде с углеводородами / Коротяев А. И., Наумов Г. Н., Коновалов С. А., Хохленко А. Ф. — Прикл. биохим. и микробиол., 1977, XII, № 3, с. 470—474.

117. Коротяев А. И. и др. Содержание рибосом в клетках *Mucosoccus D-5* при периодическом культивировании / Коротяев А. И., Наумов Г. Н., Коновалов С. А., Хохленко А. Ф. — Прикл. биохим. и микробиол., 1977, XIII, № 4, с. 581—585.

118. Косиков К. В. Отдаленная гибридизация дрожжей. I. Получение гибридов между *Saccharomyces cerevisiae* (раса XI) и *Schizosaccharomyces pombe*. — Микробиология, 1956, 25, № 3, с. 275—278.

119. Косиков К. В. Методы гибридизации и полиплоидии дрожжей. — Усп. микробиол., 1975, № 10, с. 101—119.

120. Косиков К. В. и др. Гибрид дрожжей, повышающий выход спирта при сбраживании патоки / Косиков К. В., Раевская О. Г., Коновалов С. А., Голубенкова Н. И., Василенко Т. В. — Микробиология, 1963, 32, № 6, с. 1052—1058.

121. Косиков К. В., Раевская О. Г. Гибридный штамм дрожжей Г-112. А. с. 384866 (СССР). — Б. И., 1973, № 5.

122. Косиков К. В. и др. Полиплоидные гибриды производственных рас дрожжей и перспективы применения их в производстве / Косиков К. В., Раевская О. Г., Хорошутин Э. Б., Перевертайло Г. А. — Микробиология, 1975, 44, № 4, с. 682—688.

123. Косиков К. В., Раевская О. Г. Биологическая продуктивность гибридов и штаммов. — Микробиология, 1976, 45, № 6, с. 1040—1044.
124. Котельникова А. В., Звягильская Р. А. Биохимия дрожжевых митохондрий. — М.: Наука, 1973. — 239 с.
125. Кочетов Г. А. Структура и функция транскетолазы. Автореф. докт. дисс. — М.: Ин-т орг. хим. АН СССР, 1975. — 28 с.
126. Кочетов Г. А. Тиаминовые ферменты. — М.: Наука, 1978. — 231 с.
127. Кощеенко К. В. Иммунизация клеток микроорганизмов и трансформация органических соединений. В кн.: Биохимия и физиология микроорганизмов. Пушино-на-Оке, 1975, с. 53—56.
128. Кретович В. Л. Основы биохимии растений. — М.: Высшая школа, 1971. — 464 с.
129. Кретович В. Л. Введение в энзимологию. — М.: Наука, 1974. — 351 с.
130. Кретович В. Л., Попов М. П., Щербаков С. С. Выделение сульфогидрильных соединений различными расами дрожжей в процессе брожения. — Микробиология, 1974, 43, № 4, с. 723—728.
131. Крупяно В. И. Исследование свойств неспецифических рибонуклеаз микроорганизмов. — Пушино-на-Оке: Ин-т биохим. и физиол. микроорг. АН СССР, 1978. — 24 с.
132. Кудрявцев В. И. Систематика дрожжей. — М.: Изд-во АН СССР, 1954. — 250 с.
133. Кудрявцева Г. В. Пентозофосфатный путь (ПФП) и его взаимосвязь с метаболизмом нуклеиновых кислот. — Усп. совр. биол., 1978, 85, № 1, с. 3—17.
134. Кулаев И. С., Вагабов В. М., Биоменко А. Б. О корреляции накопления полисахаридов клеточной стенки и некоторых фракций высокомолекулярных полифосфатов у дрожжей. — ДАН СССР, 1972, 204, № 3, с. 734—736.
135. Кулаев И. С., Григорьева С. П., Воробьева Г. И. Изучение полифосфатфосфогидролазной активности в клетках дрожжей *Candida guilliermondii*, ассимилирующих углеводороды нефти, при разных условиях культивирования. — Прикл. биохим. и микробиол., 1974, X, № 3, с. 396—401.
136. Курганов Б. И. Аллостерические ферменты. — М.: Наука, 1978. — 243 с.
- 136а. Ладик Я. Квантовая биохимия для химиков и биологов. — М.: Мир, 1975.
137. Латышева Н. Н. Активность изоцитратлиазы и ферментов цикла Кребса при росте дрожжей *Candida guilliermondii* № 2 на среде с углеводородами. — Прикл. биохим. и микробиол., 1971, VII, № 5, с. 515—520.
138. Латышева Н. Н., Гололобов А. Д., Коновалов С. А. Влияние источника углерода в среде на активность малатдегидрогеназы и фумаразы в дрожжах. — Прикл. биохим. и микробиол., 1971, VII, № 6, с. 632—636.
139. Левин С. В. Структурные изменения клеточных мембран. — Л.: Наука. Ленингр. отд., 1976. — 220 с.
140. Лейтин В. Л. Регуляция биосинтеза белка на уровне трансляции. II. Анализ путей регуляции с помощью определения кинетических параметров трансляции. — Усп. совр. биол., 1975, 80, № 1 (4), с. 22—38.
141. Ленингер А. Биохимия. — М.: Мир, 1974. — 957 с.
142. Лобырев Л. Б. Липолитическая активность дрожжей *Candida utilis* 295t. — Изв. АН СССР, серия биол., 1974, № 6, с. 885.
143. Логинова Л. Г. Получение ферментов в условиях непрерывного культивирования микроорганизмов. — Микробиология, т. 4. — ВИНТИ, 1975, с. 124—151.
144. Логинова Н. В., Трощенко Ю. А. Метаболизм метанола у *Pseudomonas oleovorans*. — Микробиология, 1977, 46, № 2, с. 210—216.
145. Логинова Н. В., Намсареева Б. Б., Трощенко Ю. А. Автотрофный метаболизм метанола *Miccoscyclus aquaticus*. — Микробиология, 1978, 47, № 1, с. 168—170.
146. Лозенко М. Ф. Разработка способов получения хлебопекарных дрожжей, пригодных для длительного хранения. Автореф. канд. дисс. — М.: МТИП, 1971 — 30 с.
147. Лозинов А. Б. Особенности окислительного обмена веществ дрожжевых организмов при их росте на *n*-алканах. — В кн.: Биохимия и физиология микроорганизмов, Пушино-на-Оке, 1975, с. 16—20.

148. Лозинов А. Б. и др. Окисление нормальных первичных спиртов клетками и митохондриями *Torulopsis candida*/Лозинов А. Б., Ильченко А. П., Сапожников Г. П., Судовцев В. Е. — Изв. АН СССР, серия биол., 1976, № 4, с. 546—554.
149. Лозинов А. Б., Финогенова Т. В. Микробиологический синтез органических кислот из углеводов нефти. — Журн. Всесоюз. хим. об-ва им. Д. И. Менделеева, 1972, 17, № 5, с. 526—532.
150. Лучник А. Н. Изучение механизма репарации двунитевых разрывов ДНК у дрожжей. — М.: МГУ, 1978.
151. Львов Т. Н., Артамонова О. И., Татарская Р. И. Метод получения препарата экзонуклеазы А5, свободного от примесей фосфомоноэстераз. — Биохимия, 1975, 40, № 4, с. 703—710.
152. Малащенко Ю. Р., Романовская В. А., Троценко Ю. А. Метанооксиляющие микроорганизмы. — М.: Наука, 1978. — 195 с.
- 152а. Маркович Д. С. Конформационные аспекты регуляции ферментативной активности. — В кн.: Молекулярная и клеточная биофизика. М., 1977, с. 7—12.
153. Мейсель М. Н., Медведева Г. А., Козлова Т. М. Цитологические механизмы ассимиляции дрожжевыми организмами *n*-алканов. — Микробиология, 1976, 45, № 5, с. 844—851.
154. Мейсель М. Н. и др. О возникновении и деградации пероксисом у дрожжевых организмов/Мейсель М. Н., Медведева Г. А., Козлова Т. М., Помощникова Н. А., Новичкова А. Т. — Микробиология, 1978, 47, № 6, с. 1030—1036.
155. Мешков Н. П. Физико-химические методы исследования в биологии. — М.: МГУ, 1975. — 179 с.
156. Михалева В. В. и др. Потребление дрожжами *Candida guilliermondii* *n*-парафинов с разным молекулярным весом/Михалева В. В., Гербалинский В. А., Ботникова Т. А., Карноз Г. В., Мельник Р. А. — Прикл. биохим. и микробиол., 1974, X, № 1, с. 35—42.
157. Мосолов В. В., Лушникова Е. В. Нерастворимые ферменты, их получение, свойства и применение. — Усп. биол. хим., 1973, XIV, с. 146—171.
158. Мосс Д. В., Баттерворт П. Дж. Энзимология и медицина. — М.: Медицина, 1978. — 286 с.
159. Мэзия Д. Жизненный цикл клетки. — В кн.: Молекулы и клетки. М., 1977, вып. 6, с. 216—233.
160. Наумов Г. Н. Соотношение рибосомальной и тотальной клеточной РНК у различных бактерий. Автореф. канд. дис. — Краснодар: мед. ин-т, 1975. — 28 с.
161. Несмеянова М. А. Изучение роли мембран в регуляции активности и синтеза бактериальных ферментов. — В кн.: Биохимия и физиология микроорганизмов. Пушино-на-Оке, 1975, с. 70—73.
162. Нестеров А. И., Назаренко А. В. Активность метанооксиляющих бактерий в адсорбированном состоянии. — Микробиология, 1975, 44, № 5, с. 851—854.
163. Образцова А. З. Исследование свойств *Saccharomyces cerevisiae* штамма К-69 и применение его в спирто-дрожжевом производстве. Автореф. канд. дис. — Воронеж: Воронежск. технол. ин-т, 1975. — 27 с.
164. Озернюк Н. Д. Регуляция деления митохондрий. — Усп. совр. биол. 1978, 86, № 2 (5), с. 227—239.
- 164а. Озернюк Н. Д. Рост и воспроизведение митохондрий. — М.: Наука, 1978. — 263 с.
165. О कोरोков Л. А. Возможные пути регуляции уровня катионов поливалентных металлов у микроорганизмов. — В кн.: Биохимия и физиология микроорганизмов. Пушино-на-Оке, 1975, с. 67—70.
166. О कोरोков Л. А., Кадомцева В. М., Кулаев И. С. Обнаружение полимерных ортофосфатов кальция, магния и марганца у *Penicillium chrysogenum*. — ДАН СССР, 1973, 209, № 3, с. 735—737.
167. О कोरोков Л. А., Перов Н., Кулаев И. С. О локализации полимерного ортофосфата железа у *Penicillium chrysogenum*. — Цитология, 1979, 15, № 4, с. 481—483.

168. **Окороков Л. А.** и др. Обмен и физико-химическое состояние ионов Mg^{2+} у грибов / Окороков Л. А., Личко Л. П., Кадомцева В. М., Холоденко В. П., Кулаев И. С. — Микробиология, 1974, 43, № 3, с. 410—416.
169. **Орешкия А. Е., Кудряшова Н. А.** Образование диацетила и ацетона при сбраживании виноградного сусла. — Прикл. биохим. и микробиол., 1971, 7, № 6, с. 703—708.
170. **Паскевич И. Ф.** Исследование нуклеаз, связанных с гистонами печени и селезенки. — Биохимия, 1972, 22, № 2, с. 479—481.
171. **Патент** Бельгии 70542, 1970; 846580, 1977.
172. **Патент** Великобритании 1046291, 1966.
173. **Патент** Великобритании 1159986, 1967.
174. **Патент** ФРГ 2311006, 1974.
175. **Патент** Франции 2330984, 1977.
176. **Патент** Чехословакии 136373, 1970.
177. **Патент** Японии 42033, 1976.
178. **Перт С. Дж.** Основы культивирования микроорганизмов и клеток. — М.: Мир, 1978. — 331 с.
179. **Печуркин Н. С., Позмогова И. Н., Терсков И. А.** Регулирование процесса непрерывного культивирования *Candida tropicalis* изменением pH среды. — Прикл. биохим. и микробиол., 1969, 4, № 2, с. 158—163.
180. **Позмогова И. Н., Мальян А. Н.** Содержание АТФ в клетках *Candida tropicalis*, развивающихся при разных температурах. — Микробиология, 1976, 45, № 3, с. 413—416.
181. **Поликар А.** Поверхность клетки и ее микросреда. — М.: Мир, 1975. — 108 с.
182. **Поляновский О. Л.** Четвертичная структура и аллостерические свойства ферментов. — Биол. хим., т. 8. — М.: ВИНТИ, 1975, с. 5—56.
- 182а. **Поляновский О. Л., Носиков В. В.** Рестрикционные эндонуклеазы в генетической инженерии. — Биол. хим., т. 14. — М.: ВИНТИ, 1978, с. 189.
183. **Попова Т. Е.** и др. Особенности роста микроорганизмов родов *Proactinopus*, *Mycobacterium* и *Micoglossus* на углеводородах / Попова Т. Е., Козлова Л. И., Нестеренко О. А., Квасников Е. И., Рыбакова В. А., Голубева В. Г., Поважная Т. Н. — Прикл. биохим. и микробиол., 1973, IX, № 4, с. 539—545.
184. **Постнова Т. И., Глазер В. М., Шестакова С. В.** Репарация полинуклеотидлигазой *in vitro* повреждений в ДНК, индуцированных рентгеновскими лучами. — ДАН СССР, 1970, 105, № 4, с. 976—978.
185. **Работнова И. Л.** Исследование физиологического состояния микроорганизмов при непрерывном хемостатном культивировании. — В кн.: Теория и практика непрерывного культивирования микроорганизмов. М., 1973, с. 3—4.
186. **Работнова И. Л.** Исследования физиологического состояния микроорганизмов при непрерывном хемостатном культивировании. — Микробиология, т. 4, ВИНТИ, 1975, с. 5—51.
187. **Раевская О. Г., Косиков К. В.** Гибридизация спиртовых и хлебопекарных рас дрожжей. — Микробиология, 1972, 41, № 3, с. 500—507.
188. **Разманова Н. В.** и др. Физиологическая характеристика чистой культуры в производстве хлебопекарных дрожжей / Разманова Н. В., Витринская А. М., Палачина Н. К., Бочаров Н. Н., Черный В. Г. — М.: ЦНИИТЭИпищепром, 1975. — 32 с.
189. **Рачинский В. В., Давидова Е. Г., Корчак О. Б.** Исследование кинетики белковых фракций дрожжей *Candida tropicalis* в онтогенез. — Прикл. биохим. и микробиол., 1971, VII, № 6, с. 621—625.
190. **Родопуло А. К.** Биохимия шампанского производства. — М.: Пищевая промышленность, 1975. — 323 с.
191. **Родопуло А. К., Кормакова Т. А., Егоров И. А.** Исследование ароматообразующих веществ шампанского. — Прикл. биохим. и микробиол., 1975, XI, № 1, с. 107—114.
192. **Родопуло А. К., Кавадзе А. В., Писарницкий А. Ф.** Биосинтез и метаболизм ацетона и диацетила (обзор). — Прикл. биохим. и микробиол., 1976, XIII, № 3, с. 309—316.
193. **Родопуло А. К., Чичашвили Н. Д., Кавадзе А. В.** Исследование накопления вторичных продуктов алкогольного брожения дрожжами *Saccharomyces*

vini и *Saccharomyces oviformis*. — Прикл. биохим. и микробиол., 1978, XIV, № 1, с. 85—92.

194. Розанова Е. П. Ферментативный аппарат углеводородокисляющих микроорганизмов и модели механизмов соокисления углеводов. — Усп. микробиол., 1975, № 10, с. 3—26.

195. Розенфельд С. М. Некоторые особенности азотного обмена тиамингетеротрофных дрожжей. Автореф. канд. дис. — М.: МГУ, 1971. — 21 с.

195а. Рейтел Ф. Белки микроорганизмов. — В кн.: Молекулярная микробиология, 1977, с. 113—144.

196. Рубан Б. А., Логинова Л. Н. Альтернативные пути биологического окисления. — Биол. хим., т. 6. — М.: ВИНТИ, 1973.

197. Рубан Б. А., Ладыгина М. Е. Физиология и биохимия дыхания растений. — М.: МГУ, 1974. — 507 с.

198. Рылкин С. С. и др. Влияние условий роста на химический состав и активность ферментов оболочки клеток дрожжей *Candida tropicalis* ИБФМ-303 / Рылкин С. С., Березов Т. Б., Фихте Б. А., Шульга А. В., Гурина Л. В., Белова Л. А., Орлова В. С., Грищенко В. М., Чигалейчик А. Г., Боев А. В. — Изв. АН СССР, серия биол., 1978, № 5, с. 739—753.

199. Сабо Б., Спирин А. С. Диссимиляция 70 S-монорибосом *Escherichia coli* в зависимости от ионной силы, pH и температуры. — Молек. биол., 1970, № 4, с. 628—631.

199а. Самойлов П. М. Энергетические процессы при окислении *n*-алканов у микроорганизмов. — Усп. биол. хим., 1978, XIX, с. 130—150.

200. Саубенова М. Г. Полисахариды дрожжевых организмов и их метаболизм в процессе пострadiационного восстановления. Автореф. канд. дис. — Алма-Ата: Ин-т микробиол. и вирусол., 1967. — 29 с.

201. Сафронова М. Ю. и др. Активность пируват- и α -кетоглутаратдегидрогеназы при росте дрожжевых организмов на глюкозе и на гексадекане / Сафронова М. Ю., Глазунова Л. М., Мунтян Л. Н., Финогонова Т. В., Лозинов А. Б. — Микробиология, 1976, 45, № 2, с. 266—268.

202. Сенджер Р. Цитоплазматические гены и органеллы. — М.: Мир, 1975. — 423 с.

203. Серебрянников В. М., Ауэрман Т. Л., Исследование активности глутаминсинтетазы из кормовых дрожжей *Candida tropicalis* в присутствии магния, марганца и некоторых других катионов. — Микробиология, 1974, 43, № 4, с. 613—617.

204. Скулачев В. П. Трансформация энергии в биомембранах. — М.: МГУ, 1972. — 203 с.

205. Сойфор В. Н., Дорохов Ю. Л. Single-burst-анализ размножения фагов Т. 4D и Т. 4Dv в клетках *E. coli* В и *E. coli* Bs. — ДАН СССР, 1970, 192, № 4, с. 899—900.

205а. Сокурова Е. Н. Митоз у дрожжей. — Усп. микробиол., 1976, № 11, с. 3—20.

206. Спирин А. С. О структурных основах функционирования рибосом. — Усп. совр. биол., 1974, 77, № 2, с. 155—166.

207. Спирин А. С., Гаврилова Л. П. Рибосома. — М.: Наука, 1971. — 254 с.

207а. Стейн Г., Стейн Дж., Клейсмит Л. Хромосомные белки и регуляция активности генов. — В кн.: Молекулы и клетки. М., 1977, № 6, с. 45—66.

208. Степаненко Б. Н., Боброва Л. Н. Современные представления о микро- и макромолекулярной структуре гликогена. — Усп. биол. хим., 1974, т. 15, с. 195—207.

209. Столяров И. В., Лиходед В. С., Паскевич И. Ф. ДНК-зависимая РНК-полимераза эукариотов. — Усп. совр. биол., 1976, 81, № 3, с. 323—340.

210. Томилин Н. В. Энзимология процесса репарации ДНК. — Цитология, 1977, 19, № 10, с. 1086—1109.

211. Томилин Н. В. Энзиматические механизмы репарации ДНК и генетическая стабильность клетки. — Л.: НИИ эксп. мед., 1978. — 44 с.

212. Троян О. С. и др. Окисление одноуглеродных соединений бактериями разных родов / Троян О. С., Нетрусов А. И., Скирдов И. В., Кондратьева Е. Н. — Прикл. биохим. и микробиол., 1978, XIV, № 2, с. 202—207.

212а. Угарова Т. Ю. Эукариотические бесклеточные белоксинтезирующие системы. — Молекулярная биология, т. 7, М.: ВИНТИ, 1976, с. 58—141.

213. Уралец Т. И. Исследование глутаминсинтетазы кормовых дрожжей *Candida tropicalis*. Автореф. канд. дис. — М.: МТИПП, 1977. — 25 с.

214. Уралец Т. И., Ауэрман Т. Л., Кретович В. Л. Влияние *n*-хлормеркурибензоата на глутаминсинтетазу кормовых дрожжей *Candida tropicalis*. — Микробиология, 1977, 46, № 4, с. 632—634.

215. Финогенова Т. В., Илларионова В. И., Лозинов А. Б. Образование лимонных кислот дрожжами *Candida lipolytica* при росте на *n*-алканах. — Микробиология, 1973, 42, № 5, с. 790—794.

216. Фрадкин Г. Е., Айзенберг О. А., Самойленко И. И. Нарушение равновесия между скоростями синтезов ДНК и белка у бактерий и их жизнедеятельность. — Микробиология, 1975, 44, № 4, с. 592—594.

217. Фрей-Висслинг А. Сравнительная органеллография цитоплазмы. — М.: Мир, 1976. — 142 с.

218. Харатьян С. Г. и др. Выращивание дрожжей *Mycoderma vini* на среде с этанолом и оценка питательной ценности выделенных из них белков/Харатьян С. Г., Калужный М. Я., Петрушенко Г. М., Беликов В. М., Вольнова А. И., Антонова Т. В. — Прикл. биохим. и микробиол., 1975, XI, № 1, с. 35—38.

219. Хотянович А. В., Веденеева Н. А., Кубарева З. И. Содержание и перерабатываемость белка в кормовых дрожжах при выращивании их на различных источниках углерода и азота. — Прикл. биохим. и микробиол., 1972, VIII, № 2, с. 186—191.

220. Хохленко А. Ф., Коновалов С. А. Активность некоторых дегидрогеназ накопительной и непрерывно-проточной культуры парафинокисляющих дрожжей рода *Candida*. — Прикл. биохим. и микробиол., 1975, XI, № 5, с. 637—639.

221. Циоменко А. Б. Исследование взаимосвязи обмена компонентов дрожжевой клеточной оболочки. — Пушкино-на-Оке: Ин-т биохим. и физиол. микроорг. АН СССР, 1978. — 27 с.

222. Циоменко А. Б. и др. О взаимосвязи обмена неорганических полифосфатов и маннана у дрожжей/Циоменко А. Б., Вагабов В. М., Августини И., Кулаев И. С. — ДАН СССР, 1974, 215, № 2, с. 478—480.

223. Чичкова Н. В. и др. РНК-белковые взаимодействия в бактериальных рибосомах. III Вторичная структура участков 16S РНК, взаимодействующих с белком S4/Чичкова Н. В., Резапкин Г. В., Тетерина Н. Л., Богданов А. А. — Молек. биол., 1974, 8, № 6, с. 894—901.

224. Чулкова А. П. Условия культивирования *Aerobacter cloacae*, благоприятные для образования валина. — Микробиология, 1970, 39, № 3, с. 440—446.

225. Шапот В. С. Нуклеазы. — М.: Медицина, 1968. — 212 с.

226. Шатский И. Н., Чичкова Н. В., Богданов А. А. Изучение РНК-белковых взаимодействий в рибосомах, I. Тепловая денатурация РНК в рибосомах. — Молек. биол., 1971, 5, № 1, с. 149—156.

227. Шлегель Г. Общая микробиология. — М.: Мир, 1972. — 472 с.

228. Шульговская Е. М. и др. Изменение содержания АТФ в клетках хемотратных культур дрожжей под воздействием субмаксимальных температур/Шульговская Е. М., Позмогова И. Н., Ховрычев М. П., Ибрагимова С. И. — Микробиология, 1977, 46, № 2, с. 223—226.

229. Щербаков С. С. Выделение дрожжами в процессе брожения глутатиона и его влияние на белок теста. Автореф. канд. дис. — М.: МТИПП, 1971. — 30 с.

230. Щербаков С. С., Попов М. П., Кретович В. Л. Идентификация тиолового соединения, выделяемого дрожжами *Saccharomyces cerevisiae* в процессе брожения. — Прикл. биохим. и микробиол., 1976, XII, № 5, с. 674—680.

230а. Яровенко В. Л. Основные закономерности непрерывного спиртового и ацетонобутилового брожения. — М.: Пищевая промышленность, 1975. — 101 с.

231. Agarwal K. L. et al. Total Synthesis of the Gene for an Alanine Transfer Ribonucleic Acid from Yeast (Agarwal K. L., Büchl H., Caruthers M. H., Gupta N., Khorana H. G., Kleppe K., Kumar A., Ohtsuka E., Rajbhandary U. L., Van de Sande J. H., Sgaramella V., Weber H., Yamada T.). — Nature, 1970, 227, № 5253, 27—34.

232. **Anderson R. G., Howard D.** The Synthesis of Acetate Esters by Brewing Yeasts. — *J. Appl. Chem. and Biotechnology*, 1976, 26, № 2, 107—108.
233. **Ando T., Kosawa T.** Isolation of a DNA ligase from phage—infected *Escherichia coli*. — *Biochim. et Biophys. acta Nucleic. Acids and Protein Synthesis*, 1970, 204, № 1, 257—259.
234. **Anthony C.** Cytochrome c and the Oxidation of C₁ Compounds in *Pseudomonas AM 1*. — *Biochem J.*, 1970, 119, № 5, 54—55.
235. **Anthony C.** The Microbial Metabolism of C₁ Compounds. The Cytochromes of *Pseudomonas AM 1*. — *Biochem. J.*, 1975, 146, № 2, 289—298.
236. **Aoki Y., Koshihara H.** Inhibitory effects of acid polysaccharides from sea urchin embryos in RNA synthesis in vitro. — *Experimental Cell research*, 1972, 70, № 2, 431—436.
237. **Arnold H. H., Schmidt W., Kersten H.** Occurrence and biosynthesis of ribothymidine in +RNAs of *B. subtilis*. — *PEBS Letters*, 1975, 52, № 1, 62—65.
238. **Askaa G., Christiansen C., Ern M.** Bovine Mycoplasmas: Genome Size and Base Composition of DNA. — *J. Gen. Microbiol.*, 1973, 75, № 2, 283—286.
239. **Ägräpää T.** Biosynthetic formation of higher Alcohols by Yeast. Dependence on the Nitrogenous nutrient level of the medium. — *J. Inst. Brew.*, 1971, 77, № 3, 266—276.
240. **Awasni Y. C., Beutler E., Srivastava S. K.** Purification and Properties of Human Erythrocyte Glutathione Peroxidase. — *J. Biol. Chem.*, 1975, 250, № 13, 5144—5149.
241. **Ball L. A., Johnson P. M., Walker I. O.** The Dissociation of *Escherichia coli* Ribosomes. — *Eur. J. Biochem.*, 1973, 37, № 1, 12—20.
242. **Barnett J. A., Pankhurst R.** A new key to the yeasts. A key for Identifying yeasts based on physiological tests only. Amsterdam—London, North—Holland publ. Co., New York, American Elsevier, 1974, 273.
243. **Bautz E. K. F., Bautz F. A., Beck E.** Specificity of ν -dependent Binding of RNA Polymerase to DNA. — *Molec. gen. Genet.* 1972, 118, № 3, 199—207.
244. **Bauer H., Horisberger M., Bush D. A., Sigarlakie E.** Mannan as a Major Component of the Bud Scars of *Saccharomyces cerevisiac*. — *Arch. Mikrobiol.*, 1972, 85, № 3, 202—208.
245. **Benemann J. R., Koopman B., Weissman J., Oswald W. J.** Biomass production and waste recycling with blue—green algal—Microbial energy conversion. Göttingen University. Pergamon Press, 1976, 399—412.
246. **Black S. H., Gorman C.** The Citology of *Hansenula*. III. Nuclear Segregation and Envelopment during ascosporeogenesis in *Hansenula Wingei*. — *Arch. Mikrobiol.*, 1972, 79, № 3, 231—248.
247. **Bostock C. I.** DNA synthesis in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. — *Experimental Cell Research*, 1970, 60, № 1, 16—26.
248. **Boyle S. M., Cohen P. S., Merse J. W., Selden M.** Relations between spermidine content and RNA stability in rifampicin treated *Escherichia coli* 451—458 *Bioch. a. Biophys. res. com.* 1972, 47, № 2.
249. **Brown C. M., Johnson B.** Influence of the Concentration of Glucose and Galactose on the Physiology of *Saccharomyces cerevisiac* in Continuous Culture. — *J. Gen. Microbiol.*, 1970, 64, № 3, 279—287.
250. **Brown C. M., Stanley S. O.** Environment—mediated Changes in the Cellular Content of the «Pool» Constituents and their Associated Changes in Cell Physiology. — *J. appl. Chem. Biotechnol.*, 1972, 22, № 3, 363—389.
251. **Brown J. P. and Edwards M. R.** Observations on budding cells of *Torulopsis glabrata*. — *Canadian Journal of Microbiology*, 1971, 17, № 5, 569—571.
252. **Brown D. G., Coffey D. S.** The release of chromatin template restrictions by Natural Polyribonucleotides *Biochemical and Biophysical research communications*. 1971, vol. 42, № 2, 326—333.
253. **Burgoyne L., Wagar M. A., Atkinson M. R.** Calcium—dependent priming of DNA synthesis. *Biochem. Biophys. res. com.* 1970, 39, № 2, 254—259.
254. **Cabib E., Farkas V.** The Control of Morphogenesis: An Enzymatic Mechanism for the Initiation of Septum Tormation in Yeast. — *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1971, 68, № 9, 2052—2056.
255. **Cabib E., Bowers B.** Chitin and Yeast Budding. Localization of chitin in Yeast bud scars. — *J. Biol. Chem.*, 1971, 246, № 1, 152—159.

256. **Cardini G., Jurtshuk P.** Enzymatic Hydroxylation of n—octane by *Corynebacterium* sp. Strain 7E1C. — *J. Biol. Chem.*, 1970, 245, № 11, 2789—2796.
257. **Cawley T. N., Harrington M. G.** Study of the Phosphate Linkages in Phosphomannan in Cell Walls of *Saccharomyces cerevisiae* — *Biochem. J.*, 1972, 129, № 3, 711—720.
258. **Cawley T. N., Ballou C. E.** Identification of Tivo *Saccharomyces cerevisiae* Cell Wall Mannan Chemotypes. *J. of Bacteriology*, 1972, v. 111, № 3, 690—695.
259. **Chavancy G., Garel J. P., Daillie J.** Functional adaptation of aminoacyl—tRNA synthetases to fibroin biosynthesis in the silkgland of *Bombyx mori* L. — *FEBS Letters*, 1975, 49, № 3, 380—384.
260. **Chen M., Shiau R. P., Hwang L. T., Yaughan J., Weiss S.** Methionine and Formylmethionine Specific rRNAs Coded by Bacteriophage T5. — *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1975, 72, № 2, 558—562.
261. **Chi H., Suyama Y.** Comparative Studies on Mitochondrial and Cytoplasmic Ribosomes of *Tetrahymena pyriformis*. — *J. Mol. Biol.*, 1970, 53, № 3, 531—556.
262. **Chuang L. F., Collins E. B.** Inhibition of Diacetyl Synthesis by Valine and the Roles of α -Ketoisovaleric Acid in the Synthesis of Diacetyl by *Saccharomyces cerevisiae*. — *J. General Microbiol.*, 1972, 72, № 1, 201—210.
263. **Colby J., Zatman L. J.** Enzymological aspects of the Pathways for Trimethylamine Oxidation and C₁ assimilation in obligate Methylotrophs and Restricted Facultative Methylotrophs. — *Biochem. J.*, 1975, 148, № 3, 513—520.
264. **Collins E. B., Speckman R. A.** Evidence for cellular control in the synthesis of acetoin or α -ketoisovaleric acid by microorganisms. — *Canadian J. Microbiol.*, 1974, 20, № 6, 805—811.
265. **Cortat M., Matile P. and Wiemken A.** Isolation of Glucanase—Containing Vesicles from Budding Yeast. — *Arch. Mikrobiol.*, 1972, 82, № 3, 189—205.
266. **Cox R. B., Quayle J. R.** The autotrophic Growth of *Micrococcus denitrificans* on Methanol. — *Biochem. J.*, 1975, 150, № 3, 569—571.
267. **Cox R. B., Quayle J. R.** The Autotrophic Growth of *Micrococcus denitrificans* on Methanol, *Biochem. J.*, 1975, v. 150, № 3, 569—571.
268. **Dawson P. S. S.** Continuously Synchronised Growth. — *J. appl. chem. Biotechnol.*, 1972, 22, № 1, 79—103.
269. **Demain A. L.** Theoretical and Applied Aspects of Enzyme Regulation and Biosynthesis in Microbial Cells. — *Enzyme engineering* (Interscience Publishers), 1978, 21—32.
270. **Duin J., Dieijen G., Knippenberg P. H., Bosch L.** Different species of 70S Ribosomes of *Escherichia coli* and their Dissociation into Subunits. — *Eur. J. Biochem.*, 1970, 17, № 3, 433—440.
271. **Edwards V. H., Ko R. C., Balogh S. A.** Dynamics and Control of Continuous Microbial Propagators to Subject Substrate Inhibition. — *Biotechn. and Bioeng.*, 1972, 14, № 6, 939—974.
272. **Eisenstadt E., Silver S.** Calcium Transport During Sporulation in *Bacillus subtilis*. — *Spores* 1972, 5, 180—186.
273. **Engan S.** Aroma Components of Beer. II. Esters. *J. Inst. Brewing*, 1973, 79, № 3, 250.
274. **Engan S.** Higher Alcohols in Beer. — *The/ Brewers Digest*, 1974, 49, № 8, 52—59.
275. **Epler J. L., Shugart L. R., Barnett W. E.** N—Formylmethionyl Transfer Ribonucleic Acid in Mitochondria from *Neurospora*. — *Biochemistry*, 1970, 9, № 18, 3575—3579.
276. **Fahnestock S., Erdmann V., Nomura M.** Reconstitution of 50S Ribosomal Subunits from Protein—Free Ribonucleic Acid. *Biochemistry*, 1973, v. 12, № 2, 220—223.
277. **Fium L., Wieland T.** Amanitins. Chemistry and Action. — *FEBS Letters*, 1970, 8, № 1, 1—5.
278. **Flint S. J. et al.** Template Specificity of Eucaryotic DNA—Dependent RNA Polymerases Effect of DNA Structure and Integrity (Flint S., Pomeroy D. I., Chesterton C. J., Butterworth P. H. W.) — *Eur. J. Biochem.*, 1974, 42, № 2, 567—579.

279. **Fukui S., Tanaka A., Kawamoto S., Yasuhara S., Teranishi J., Osumi M.** Ultrastructura of Methanol—Utilizing Yeast Cells: Appearance of microbodies in Relation to High Catalase Activity. *J. of Bacteriolog*, 1975, v. 123, № 3, 317—328.
280. **Gay J. L., Martin M.** An Electron Microscopic Study of Bud Development in *Saccharomyces ludwigii* and *Sacchoromyces cerevisial*. — *Arch. Mikrobiol.*, 1971, 78, № 1, 145—157.
281. **Gaziev A. I., Kuzin A. M.** The Localization of DNA Ligase in the Chromatin of Animal Cells. — *Eur. J. Biochem.*, 1973, 37, № 1, 7—11.
282. **Geilenkotten J., Nyns E. J.** The Biochemistry of Yeast Flocculence a Review. *Brewers Digest*, 1971, 46, № 4, 64—71.
283. **Gyertsen P., Schouboe A.** By—Products of Fermentation and Their Influence on Beer. — *Brewers Digest*, 1974, 49, № 1, 52—62.
284. **Goldring E. S. et al.** The Petite Mitation in Yeast Loss of Mitochondrial Deoxyribonucleic Acid during Induction of Petites with Ethidium Bromide /Goldring E. S., Grossman L. I., Kruphick D., Cryer D. R., Marmur J./ — *J. Mol. Biol.*, 1970, 52, № 2, 323—335.
285. **Goodman J. I., Tephly T. R.** A comparison of rat and human liver formaldehyde dehydrogenase. — *Biochimica et Biophysica Acta*, 1971, 252, № 3, 489—505.
286. **Gray W. J. H., Midglei J. E.** The Control of Ribonucleic Acid Synthesis in Bacteria. — *Biochem. J.*, 1970, 120, № 2, 279—288.
287. **Grove S. N., Bracker O. E., Morre D. J.** An Ultrastructural Basis for Hyphal Tip Growth in *Pythium Ultimum* Amer. *J. of Botany* 1970, 57, № 3, 245—266.
288. **Gumport R. I., Lehman I. R.** Structure of the DNA Ligase—Adenylate Intermediate: Lysine (—amino)—Linked Adenosine Monophosphoramidate. — *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1971, 68, № 10, 2559—2563.
289. **Haidle C.** Fragmentation of Deoxyribonucleic Acid by Bleomycin. — *Molec pharmacology*, 1971, 7, № 5, 645—652.
290. **Harvath R. S., Alexander M.** Cometabolism of m—chlorobenzoate by an *Arthrobacter*. — *Appl. Microbiol.*, 1970, 20, № 2, 254—258.
291. **Horvath R. S.** Microbial Co—Metabolism and the Degradation of Organic Compounds in Nature. — *Bact. Reviews*, 1972, 36, № 2, 146—155.
292. **Harvey C. L. et al.** Enzymatic Breakage and Joining of Deoxyribonucleic Acid. IX. Synthesis and Properties of the Deoxyribonucleic Acid. Adenylate in the Phage (Harvey C. L., Gabriel T. F., Wilt E. M., Richardson C. C.). — *J. Biol. Chem.*, 1971, 246, № 14, 4523—4530.
293. **Harwood J. H., Pirt S. J.** Quantitative Aspects of Growth of the Methane Oxidizing Bacterium *Methylococcus capsulatus* on Methane in Shake Flask and Continuous Chemostat Culture. — *J. appl. Bact.*, 1972, 35, № 4, 597—607.
294. **Hashimoto N., Kuroiwa Y.** Maturation of Beer Flavor During Lagering. — *The Brewers Digest*, 1972, 47, № 8, 64—71.
295. **Haukeli A. D., Lie S.** Production of Diacetyl, 2—Acetolactate and Acetoin by Yeasts during Fermentation. — *J. Inst. Brewing.*, 1972, 78, № 3, 229—232.
296. **Haukeli A. D., Lie S.** Formation and removal of acetoin during Yeast fermentation. — *J. Inst. Brew.*, 1975, 81, № 1—2, 58—64.
297. **Haut M. J., London J. W., Garfinkel D.** Simulation of the Pentose Cycle in Lactating Rat Mammary Gland. — *Biochem. J.*, 1974, 138, № 3, 511—524.
298. **Heimer E. H., Ahmad M., Roy S., Ramel A., Nussbaum A. L.** Nucleoside S—Alkyl Phosphorothioates. VI. Synthesis of Deoxyribonucleotide Oligomers. — *J. Amer. Chem. Soc.*, 1972, 94, № 5, 1707—1713.
299. **Heineken F. G., O'Connor R. J.** Continuous Culture Studies on the Biosynthesis of Alkaline Protease, Neutral Protease and α —Amylase by *Bacillus subtilis* NRRL—b 3411. — *J. Gen. Microbiol.*, 1972, 73, № 1, 35—44.
300. **Herman A. I.** Variability in the Yeast *Hansenula Holstii* — *Amer(ican) J(ournal) of Bot(any)*, 1970, 57, № 3—4, 304—308.
301. **Hinkle D. C., Ring J., Chamberlin M. J.** Studies of the Binding of *Escherichia coli* RNA Polymerase to DNA. III. Tight Binding of RNA Polymerase Holoenzyme to Single—strand Breaks in T 7 DNA, *J. Mol. Biol.*, 1972, 70, 197—207.
302. **Hirai M. et al.** Effects of Hydrocarbons on the Morphology of *Candida*

tropicalis pK 233 (Hirai M., Shimizu S., Teranishi J., Tanaka A.). *Agr Biol. Chem.* 1972, v. 36, № 13, 2335—2343.

303. **Horvath R. S.** Microbial Co—Metabolism and the Deoradation of Organic Compounds in Nature, *Bacteriol. Reviews*, 1972, v. 36, № 2, pp. 146—155.

304. **Horvath R. S., Alexander M.** Cometabolism of m—Chlorobenzoate by an *Arthrobacter* Appl. *Microbiol.*, 1970, v. 20, № 2, 254—258.

305. **Hyodo M., Koyama H., Ono T.** Intermediate fragments of newly replicated DNA in mammalian cells. II. Effect of cycloheximide on DNA chain elongation. — *Exp. Cell Res.*, 1971, 67, № 2, 461—463.

306. **Igarashi K., Takahashi K., Hirose S.** Necessity of polyamines for maximum isoleucyl—trna formation in a rat liver cell—free system. — *Biochem. and Biophys. Res. Comm.*, 1974, 60, № 1, 234—240.

307. **Isham K. R., Stulberg M. P.** Modified nucleosides in Undermethylated Pheylalanine transfer RNA from *Escherichia coli*. — *Biochem. et biophys. acta*, 1974, 340, № 2, 177—182.

308. **Itzhaki R. E.** Structure of Deoxyribonucleoprotein as revealed by its Binding to Polylysine. — *Biochem. and Biophys. Res. Communs.*, 1970, 41, № 1, 25—32.

309. **Jagow G., Klingenberg M.** Pathways of Hidrogen in Mitochondria of *Saccharomyces carlsbergensis*. — *Eur. J. Biochem.*, 1970, 12, № 3, 583—592.

310. **Jacob S. T.** Mammalian RNA Polymerases. — *Progress in Nucleic Acid Besearch and Molecular Biology*, 1973, v. 13, 93—126.

311. **Jacob S. A., Bopp A., Hagen U.** In vitro repair of singlestrand breaks in j—irradiated DNA by polynucleotide ligase. — *Int. J. Radiat. Biol.*, 1972, 22, № 5, 431—435.

312. **Kafiani C.** Cenome transcription in fish development. — *Advances Morphogen*, 1970, 8, 209—284.

313. **Kaltschmidt E. and Wittmann H. G.** Rifosomal Proteins. VII Tivo—Dimensional Polyacrylamide Qcl Electrophoresis for Pingerprinting of Rifosomal Protein *Anal. Biochemistry*, 1970, v. 36, № 2, 401—412.

314. **Karam J. D., Barker B.** Properties of Bacteriophage T 4 Mutants Defective in Gene 30 (Geoxyribonucleic Acid Ligase and the rII Gene). — *J. Virology*, 1971, 7, № 2, 260—266.

315. **Kaufmann R., Voigt H.—P.** Soluble RNA Polymerases from Human Placenta. — *Hoppe — Seyler's Z. Physiol. Chem.*, 1973, 354, № 10/11, 1432—1438.

316. **Kemp M. B.** The hexose phosphate synthetase of *Methylococcus capsulatus*. — *Biochem. J.*, 1972, 127, № 3, 64—65.

317. **Kessler B.** Interactions in vitro between hormones and DNA. III. Effects of Plant AND animal hormones on the action of DNA ligaste and its relationship to age. — *Biochim. et Biophys. acta Nucleic Acid and Protein synthesis*, 1971, 240, № 3, 330—342.

318. **Khawaja J. A., Raina A.** Effect of spermine and magnesium on the attachment of free ritosomes to endoplasmic reticulum membranes in vitro. *Biochem. and Biophys. Res. Comm.*, 1970, 41, № 2, 512—518.

319. **Kidby D. K., Davies R.** In vertase and Disulphide Bridges in the Yeast Wall. *J. of Gen. Microbiology*, 1970, v. 61, № 3, 327—333.

320. **Kinoshita S.** Synthesis of sulfate donor in developing sea urchin embryos. — *Exptl. Cell Res.*, 1974, 87, № 2, 382—385.

321. **Kinoshita S.** Heparin as a possible initiator of Genomic RNA synthesis in early development of sea urchin embryos. — *Exp. Cell Research*, 1971, 64, № 2, 403—411.

322. **Kirsop B. H., Brown M. L.** Some effects of wort composition on the rate and extent of fermentation by brewing yeasts. — *J. Inst. Brewing.*, 1972, 78, № 1, 51—57.

323. **Kleppe K., van de Sande J. H., Khorana H. G.** Polynucleotide Ligase — Catalyzed Joining of Deoxyribo—oligonucleotides on Ribopolynucleotide Templates and of Ribo—oligonuclitides on Deoxyribopolynucleotide Templates. — *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 67, № 1, 68—73.

324. **Kraemer R. J., Coffey D. S.** The interaction of natural and syanthetic polyanions with mammalian nuclei 1. DNA synthesis. — 1970, 224, à 2, 553—567.

325. **Kreder—van—Rij N. W., Veenhuis M.** Bipolar budding in yeasts — an

- electron microscope study. — A van Leeuwenhoek J. Microbiol. a. Seroli — 1971, 37, № 1, 125—136.
326. **Lempen J. O.** Mechanism of Enzyme Secretion by Microorganisms. — Enzyme engineering, 1972, 37—41.
327. **Lampert A., Feigelson P.** A short lived Polypeptide component of one of two Discrete functional pools of hepatic nuclear. — Biochem. a. Biophys. Res. Commun., 1974, 58, № 4, 1030—1038.
328. **Lazarus L. H., Kitron N.** Cytoplasmic DNA Polymerase: Polymeric Forms and their Conversion into an Active Monomer Resembling Nuclear DNA Polymerase. — J. Mol. Biol., 1973, 81, № 4, 529—534.
329. **Le John H. B., Stevenson R. M.** Cytokinins and Magnesium ions May control the flow of metabolites and calcium ions through fungal cell membranes. Biochem. and Biophys. Res Comm., 1973, 54, № 3, 1061—1066.
330. **Lezzi M.** Differential Gene Activation in Isolated Chromosomes. — Internat. Rev. Cytology, 1970, 29, 127—168.
331. **Lodder J. and Kreger-van Rij, N. I.** The yeasts. A taxonomic study. Amsterdam North—Holland. publ. co., 1952, XI, 713, p., 111.
332. **Lyons T. P., Hough J. S.** Flocculation of Bruver's Yeast, J. Inst. Brewing, 1970, v. 76, № 6, 564—571.
333. **Lyons T. P. Hough J. S.** The Role of Yeast Cell Walls in Brewing. The Brewers Digest, 1970, v. 45, № 8, 52—60.
334. **May S. W. Abbott B. J.** Enzymatic Epoxidation. II. Comparison between the Epoxidation and Hydroxylation Reactions Catalyzed by the 10—Hydroxylation System of *Pseudomonas oleovorans*. — J. Biol. Chem., 1973, 248, № 5, 1725—1730.
335. **Mandel J. L., Chambon P.** Purification of RNA Polymerase B activity from rat liver. — FEBS Letters, 1971, 15, № 3, 175—180.
336. **Meihlac M. et al.** Amanitin Binding to calf Thymus RNA Polymerase B (Meihlac M., Kedinger C., Chambon P., Fanlstich H., Govindan M. V., Wieland T.). — FEBS Letters, 1970, 9, № 5, 258—260.
337. **Menta R. J.** Pyridine Nucleotide—Linked Oxidation of Methanol in Methanol—assimilating Yeasts. — J. of Bacteriol., 1975, 124, № 3, 1165—1167.
338. **Menta R. J.** Demonstration of Methanol Dehydrogenase in Methanol assimilating Yeasts. — Experimentia, 1975, 31, № 4, 407.
339. **Miller R. V., Sypherd P. S.** Topography of the *Escherichia coli* 30S Ribosome Revealed by the Modification of Ribosomal Protein. J. Mol. Biol., 1973, v. 78, № 3, 539—550.
340. **Miskin R., Zamir A., Elson D.** Inactivation and Reactivation of Ribosomal Subunits: The Peptidyl Transferase Activity of the 50S Subunit of *Escherichia coli*. — J. Mol. Biol., 1970, 54, № 2, 355—378.
341. **Mizutani S. et al.** DNA Ligase and Exonuclease Activities in Virions of Rous Sarcoma Virus (Mizutani S., Temin H. M., Kodama M., Wells R.). — Nature New Biol., 1971, 230, № 16, 232—235.
342. **Morgan J., Brimacombe R.** A Preliminary Three—Dimensional Arrangement of the Proteins in the *Escherichia coli* 30S Ribosomal Sub—Particle. Eur. J. Biochem, 1973, v. 37, № 3, 472—480.
343. **Modrich P., Lehman I. R.** Enzymatic Characterization of a Mutant of *Escherichia coli* with an Altered DNALigase. — Proc. Nat. Acad. Sci., 1971, 68, № 5, 1002—1005.
344. **Mortimer R. K., Hawthorne D. C.** Genetic mapping in *Saccharomyces*. IV. Mapping of temperature sensitive genes and use of disomic strains in localizing genes. — Genetics, 1973, 74, № 1, 33—54.
345. **Mühlethaler K.** Electron Microscope Methods Applied to Membranes, 1972, 8, № 4, 259—264.
346. **Müller W. E. G., Yamazaki Z. — I., Zahn R. K.** Bleomycin, A Selective inhibitor of DNA—Dependent DNA Polymerase from oncogenic RNA Viruses. Biochem. and Biophys. Res. Commun., 1972, 46, № 4, 1667—1673.
347. **Nain N. H.** Synthesis of Soluble Protein During the Cell Cycle of the Fission Yeast *Schizosaccharomyces Pombe*, 1971, v. 69, № 1, 49—56.
348. **Nomura M., Erdmann V. A.** Reconstitution of 50S Ribosomal Subunits from Dissociated Molecular Components. Nature, 1970, v. 228, № 5273, 744—748.
349. **Novello F., Fiume L., Stirpe F.** Inhibition by α -Amanitin of Ribonucleic

Acid Polymerase Solubilized from Rat Liver Nuclei. *Biochem. J.*, 1970, 116, № 2, 177—180.

350. **Paca J., Gregr V.** Design and Performance characteristics of a Continuous Multistage Tower Fermentor. — *Biotech. and Bioeng.* 1976, 18, № 8, 1075—1090.

351. **Paca J., Gregr V.** Growth characteristics of *Candida utilis* on volatile substrate in a Multistage Tower Fermentor. — *Biotech. and Bioeng.*, 1977, 19, № 4, 539—554.

352. **Painter A. A., Hunter F. E.** Phosphorylation coupled to oxidation of thiol groups (GSH) by cytochrome c with glutathione (GSSG) as an essential catalyst. I Demonstration of ADP formation from AMP AND HPO_4^{2-} . — *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1970, 40, № 2, 360—368.

353. **Painter A. A., Hunter F. E.** Phosphorylation Coupled to the Transfer of Electrons from Glutathione to Cytochrome c. — *Science*, 1970, 170, № 3956, 552—553.

354. **Pedriani A. M. et al.** Induction of Polynucleotide Ligase in Human Lymphocytes stimulated by Phytohemagglutinin (Pedriani A. M., Nuzzo F., Ciarracchi G., Dalproi L., Falaschi A.). — *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1972, 47, № 5, 1221—1227.

355. **Perlman P. S., Mahler H. R.** Molecular Consequences of Ethidium Bromide Mutagenesis. — *Nature Newbiology*, 1971, 231, № 18, 12—16.

356. **Petermann M. L., Pavlovic A., Hamilton M. G.** Effects of Agents That Influence Hydrogen Bonding, on the Structure of Rat Liver Ribosomes. *Biochemistry*, 1972, v. 11, № 21, 3925—3933.

357. **Ponta H., Ponta U., Wintersberger E.** DNA—Dependent RNA Polymerases from Yeast. Partial characterization of three Nuclear Enzyme activities. — *FEBS Letters*, 1971, 18, № 2, 204—208.

358. **Robinson G. G., Preston R. D.** Plasmalemma Structure in Relation to Microfibril Biosynthesis in *Oocystis*. *Planta*, 1972, v. 104, № 3, pp. 234—246.

359. **Roeder R. G.** Multiple Forms of Deoxyribonucleic Acid—dependent Ribonucleic Acid. Polymerase in *Xenopus laevis*. — *J. Biol. Chem.*, 1974, 249, № 1, 241—248.

360. **Roy A. K.** Inhibition of the alanine tRNA aminoacylation by Ca^{2+} . — *Biochim et Biophys. Acta*, 1971, 246, № 2, 349—352.

361. **Royer G. R., Andrews J. P.** Immobilized Derivatives of Leucine Aminopeptidase and Aminopeptidase *J. Biol. Chem.*, 1973, 248, № 5, 1807—1812.

362. **Sahn H., Cox R. B., Quayle J. R.** Metabolism of Methanol by *Rhodospseudomonas acidophila*. — *J. Gen. Microbiol.*, 1976, 94, № 2, 313—322.

363. **Sajdel E., Jacob S.** Mechanism of Early Effect of Early Effect of Hydrocortisone of the transcriptional Process: Stimulation of the Activities of Purified rat Liver Nucleolar RNA Polymerases. — *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, 1971, 45, № 3, 707—715.

364. **Schmidt G. B., Rosano C. L., Hurwitz C.** Evidence for a Magnesium Pump in *Bacillus cereus* T. *J. of Bacteriol.*, 1971, 105, № 1, 150—155.

365. **Schwartz R. D.** Octene Epoxidation by a Cold—Stable alkane—Oxidizing Isolate of *Pseudomonas oleovorans*. — *Appl. Microbiol.*, 1973, 25, № 4, 574—577.

366. **Sebastian J., Carter B. L. A., Holvorson H. O.** Use of Yeast Populations Fractionated by Bacter. 1971, v. 108, № 3, 1045—1050.

367. **Sebastian J., Hildebrandt A., Halvorson H. O.** Immunological Cross reaction between the RNA Polymerase /AND/ from Yeast. — *Federat. Proc.*, 1973, 32, № 3, 646 Abs.

368. **Seifart K. H., Juhasz P. P., Benecke B. J.** A Protein Factor from Rat—Liver Tissue Enhancing the Transcription of Native Templates by Homologous RNA Polymerase B. — *Europ. J. Biochem.*, 1973, 33, № 1, 181—191.

369. **Seifart K., Sekeris C. E.** RNA Polymerase from Eucaryotic Cells. — *Hopp—Seyler's Z. physiol. Chem.*, 1970, 351, № 7, 776—777.

370. **Šestákava M., Strost F.** Medium pro kultivaci kvasinek na etanolu nevyžadující upravení pH. — *Kvasný průmysl*, 1977, 23, № 1, 8—10.

371. **Sgaramella V., van de Sande J. H., Khorana H. G.** Studies on Polynucleotides, C. A Novel Joining Reaction Catalyzed by the T4—Polynucleotide Ligase. — *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 1970, 67, № 3, 1468—1475.

372. **Shannon J. L., Rothman A. H.** Notes. Transverse Septum Formation in Budding Cells of the Yeastlike Pungus *Candida albicans*. *J. of Bacteriol.*, 1971, 106, № 3, 1026—1028.
373. **Shimizu S. et al.** Synthesis of Coenzyme A by Immobilized Microbial Cells, (Shimizu S., Morioka H., Tani J., Ogata K.). — *J. of Ferment. Technology*, 1975, 5, № 2, 77—83.
374. **Shugart L.** Selective methylation of newly synthesized transfer RNA from an rel- Mutant of *Escherichia coli* during Methionine starvation. — *Biochem. a. Biophys. Res. Communs.*, 1973, 53, № 4, 1200—1204.
375. **Silver S., Clark D.** Magnesium Transport in *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.*, 1971, v. 246, № 3, 569—576.
376. **Smith K. E., Arntein H. R. V.** RNA Synthesis in Isolated Rallit — Liser Nuclei. *Eur. J. Biochem.* 1972, 30, № 1, 195—204.
377. **Soumalainen N.** Yeast and its effecton the flavour of alcoholic beverages. — *I. Ynst. Brewing*, 1971, 77, № 1, 164—177.
378. **Soyfer V. N., Dorohov Y. L.** Effects of the Hostcell repair system of Bacteriophage reproduction. — *Biochem. and Biophys. Res. Communs.*, 1970, 41, № 6, 1396—1405.
379. **Stoffer G. et al. Hasenbank P., Lütgehaus M., Maschler R.** The Accessibility of Proteins of the *Escherichia coli* 30S Ribosomal Subunit to Antibody Binding (Stöffler G., Morrison C. A., Zeichhardt H., Garrett R. A.). *Mol. Gen. Genetica*, 1973, 127, № 2, 89—110.
380. **Strøm T., Ferenci T., Quayll J. B.** The Carbon assimilation Pathways of *Methylococcus capsulatus*, *Pseudomonas methanica* and *Methylosinus trichosporium* (OBSB) during Growth on Methane. — *Biochem. J.*, 1974, 144, № 3, 465—476.
381. **Vieth W. R., Wano S. S., Saini R.** Immobilization of Whole Cells in a Membraneous From. *Biotech and Bioeng.*, 1973, v. 15, № 3, 565—569.
382. **Vrana D., Fencel Z., Lieblova J., Beran K.** Relationship between Growth and Division of *Candida utilis* unter Continuous Cultivation Conditions. — *Tolia microbiol.*, 1971, 16, 501.
383. **Wainwright R.** Diacetyl — A review Part I — Analytical and biochemical considerations; Part II — Brewing experience. — *J. Inst. Brewing*, 1973, 79, № 6, 451—470.
384. **Wanger J. I., Rernofsky C.** Mitochondrial Alconol Dehydrogenase from *Saccharomyces Cerevisiae*. — *Biochim. et Biophys. Acta*, 1971, 227, № 3, 479—490.
385. **Weaver T. L., Dugan P. R.** Enhancement of Bacterial Methane Oxidation by Clay Minerals. — *Nature*, 1972, 237, № 5357, 518.
386. **Wellner V. P., Sekura R., Meister A., Larsson A. A.** Glutathione Synthetase Deficiency, an Inborn Error of Metabolism Involving the γ -Glutamyl Cycle in Patients with S-Oxoprolinuria (Pyroglutamic Aciduria). — *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1974, 71, № 6, 2505—2509.
387. **Wenger J. I., Rernofsky C.** Mitochondrial Alconol Dehydrogenase from *Saccharomyces Cerevisiac*. — *Biochim et Biophys Acta*, 1971, 227, № 3, 479—490.
388. **Wiemken A., Matile P., Moor H.** Vacuolar Dinamics in Synchronously Budding Yeast. — *Arch. Mikrobiol.*, 1970, 70, № 2, 89—103.
389. **Whittenbury R., Phillips K. C., Wilkinson I. F.** Enrichment, Isolation and Some Propeties of Methane-utilizino Bacteria. — *J. Gen. Microbiol.*, 1970, 61, № 2, 205—218.
390. **Wittmann H. G., Stöffler G., Hindennach C.** Correlation of 30S Ribosomal Proteins of *Escherichia coli* Isolated in Different laboratories. — *Mol. Gen. Genetics*, 1971, 111, № 4, 327—333.
391. **Zaborsky O.** Nine lives for trapped enzymes. — *New scientist*, 1973, 57, № 839, 719.
392. **Zehavi—Willner T. et al.** Glutathione. V. The Effects of the Thiol — oxidizing agent diamine on initiation and Translation in Rebbit Reticulocytes (Zehavi — Willner T., Kosower E. M., Hunt T., Kosower N. S.). — *Biochem. et Biophys. acta*, 1971, 228, № 1, 245—251.
393. **Zehavi — Willner T., Kosower N. S., Hunt T., Kosower E. M.** GSH Oxidation and Protein synthesis in rabbit reticulocytes. — *Biochem. a. Biophys. Res. Cemmuns.*, 1970, 40, № 1, 37—42.

Аденозинтрифосфат (АТФ) 74, 92, 93, 94, 110, 192
 Аденозин-3,5-цикломонофосфат (цАМФ) 233
 Актиномицин D 214
 Алканоксигеназа 110
 Алкогольдегидрогеназа 78, 89, 90, 116
 — митохондриальная 91
 — цитоплазматическая 91
 Аллостерические (регуляторные) ферменты 82, 99
 — ингибиторы 150
 Альдегиды 128, 129, 230, 233
 Альдолаза 82, 83, 84
 Аминокислоты 142
 — активация 173, 174
 — биосинтез 144—156
 — предшественники 143
 — прямая ассимиляция 165, 166, 167
 — регуляция биосинтеза 157
 — свободные внутриклеточные 157—164
 Анаболизм 74, 75
 Анаплеротический (вспомогательный) синтез 115
 Анаэробы 76, 78, 79
 — облигатные 76
 — факультативные 77
 Аппарат Гольджи 17, 39, 40
 — онтогенез 40
 — функция 41
 Аспартатдегидрогеназа 147
 Ацетальдегид 75, 79, 81, 88, 89, 119, 120, 128, 129
 — активный 128
 Ацетилкиназа 119
 Ацетил-КоА, 74, 75, 96, 97, 99, 114, 119, 120, 123, 124
 — конденсация 99
 Ацетоин 122, 123
 — биосинтез 123, 124, 125, 126, 127
 Ацетомолочная кислота 123, 124

Белки 56
 — аминокислотный состав 171, 172
 — ацилпереносящие 138
 — биосинтез 63, 64, 67, 142, 168, 173, 185
 — изоляты 239
 — митохондриальные 28, 29
 — рибосомальные 32, 34
 — стимуляторы синтеза РНК 214
 Биомолекулы 55
 2, 3-Бутиленгликоль 127, 129
 Вакуоли (тонопласт) 16, 17, 38, 39
 Вторичные продукты 141
 Высшие спирты 129, 132, 229
 — синтез 130, 131, 132, 133

 Гексокиназа 79, 80, 81, 82, 90
 Гены 57, 58, 59, 64
 ω-Гидроксилаза (цитохром р-450) 110
 Гистоны 17, 59
 Гликоген 91
 Глиоксилатный цикл 113, 114, 115
 Глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа 84, 86, 87
 Глутаматдегидрогеназы 144
 — НАД-зависимая 145
 — НАДФ-зависимая 145
 Глутаминсинтетаза 146
 Глутатион 116, 117, 167
 Глюканы 49, 240
 Глюкозамин 50
 Глюкокиназа 80, 81, 82
 Гомеостаз 66
 Гуанозиндифосфат (ГДФ) 102
 Гуанозинтрифосфат (ГТФ) 102

 Дегидрогеназы аминокислот 144
 Дегидрогеназы аспарагиновой кислоты (аспартатдегидрогеназы) 147
 Дезоксирибонуклеиновая кислота 17
 — количество в клетке 56, 222
 — комплементарная 202
 — локализация 199
 — метилирование 189, 208
 — митохондриальная 18, 209

— — репликация 54, 55, 56, 57, 62, 66, 201
— — роль 199, 215
— — синтез 59, 62, 63, 66, 201
— — состав и строение 199, 200
— — ядерная 52
ДНК-лигаза 56, 205, 206, 207
ДНК-полимераза 56, 62, 65, 67, 202, 203, 204, 214
Диацетил 122, 123, 125
— биосинтез 123, 124, 125, 126, 127
Дигидролипоилтрансукцинилаза 101
Динуклеотиды 195
— коферменты 195—198
— строение 195, 196
Дрожжи 4, 7, 10, 16, 103, 145
— биохимические особенности 103, 111
— гибриды 12
— жизненный цикл 53
— иммобилизация 237, 238
— лизаты 240
— метанольные 115
— многократное использование 235
— мутанты petite 72
— накопление биомассы 114, 119, 163
— несовершенные 15
— почечные рубцы 51
— размер 53, 113
— размножение 217, 218, 225, 226, 234
— репродуктивный возраст 70, 235
— спиртовые 77
— строение 17
— сумчатые 10
— этанольные 119
Енолаза 87
Жирные кислоты 110, 133, 137, 138
— — образование 134, 135, 136, 139
— — состав 134
Изоцитратдегидрогеназа 100, 112, 113, 114
— димерная 101
— мономерная 101
Изоцитратлиаза 112, 113, 114
Катаболизм 74, 75
 α -Кетоглутаратдегидрогеназа 101
Клетки 16, 95
— «глюкозные» 115
— прокариоты 16
— протисты 16, 95
— эукариоты 16, 17
Клеточная перегородка 63

Клеточная стенка 16, 17, 47, 48, 49, 50, 51
— пластинка 42
— размер и состав 48, 49, 50, 51, 113
Коферменты 102, 150, 193, 194, 195, 197

Лизосомы 7, 36
Липоевая кислота 97, 101

Макромолекулы 55
— функция 61
Малатдегидрогеназы 103, 113
— митохондриальная 103, 104
— цитоплазматическая 103, 104

Мальтаза 64
Маннан 49, 240
Метаболизм 66, 70, 76, 114, 122, 149, 228, 232, 333

Метаболиты, формирующие качество продукта 228, 229

Мембраны 17, 18
— внутренняя 27
— матрикс 26, 27
— наружная 27
— роль 22
— свойства 18
— строение 19
— функция 22, 23

Меркаптан 141

Метанолоксидаза 115, 116

Метилаза 65, 208

Митоз 60, 62, 63, 64

Митохондрии 16, 17, 25

— белки 29
— липиды 29
— РНК — полимераза 214
— роль 29
— строение 26, 29

Модулятор 101

Мононуклеотиды 187, 190

— биологическое значение 191—193, 233
— коферменты 193
— строение 187—191

Монотерминальное окисление 110

Мультиэнзимная система 14, 139

Негистоновые хромосомные белки 59, 60

— продолжительность жизни 60
— фосфорилирование 59

Нуклеаза 62

Нуклеозиды 190, 191

Нуклеотиды 190, 195, 196, 197

Оксигеназы 109

- соокисление 109
- Олигомицин 28
- Отрицательная обратная связь 9, 82, 124, 151, 152, 153, 154, 155, 156
- 2,3 — Пентадион 128
- Пероксисомы (макротельца) 46, 47
- Пиридоксальфосфат 150
- Пиримидины 188
 - минорные 189
- Пируватдегидрогеназный комплекс 96, 97, 98
 - — дигидролипоилдегидрогеназа (флавопротеид) 96, 98, 101
 - — дигидролипоилтрансацилаза 96, 97, 98
 - — пируватдегидрогеназа 96, 98
- Пируватдекарбоксилаза 88, 89, 96
- Пируваткиназа 88
- Побочные продукты 141'
- Полинуклеотиды 203
- Полирибосомы 35, 68
- Прокариоты 18, 30
- Промитохондрии 30
- Протисты 16
- Пурин 188
 - минорные 189
- Пурамицин 179
- Ректриктаза 56
- Репарация 60, 64, 65, 66, 234
- Рибонуклеиновая кислота (РНК) 199
 - — информационная, или матричная (иРНК) 175, 210
 - — количество в клетке 56, 222
 - — минорные основания 188
 - — молекулярная масса 210
 - — рибосомная (рРНК) 31, 32, 210, 211
 - — синтез 63, 67, 212
 - — транспортная (тРНК) 173, 174, 175, 184, 211
 - — РНКазы 203
 - РНК — полимераза 36, 67, 213, 214, 215
- Рибосомы 16, 17, 30, 234
 - бактерий 32
 - белки 32, 34
 - количественное содержание 35
 - коэффициент седиментации 32, 33
 - локализация 36
 - митохондриальные 29
 - стабильность 68
 - форма и состав 31, 32, 34
 - эукариотов 32
- Рифамицин 214
- Спиртовое брожение 78, 79, 89, 105, 114
 - — первая стадия 80, 81
 - — вторая стадия 84
 - — заключительная 89
- Сукцинатдегидрогеназа (флавопротеид) 102
- Терминация 181, 182
- Тиамин пирофосфат (ТПФ) 88, 89, 124, 197
- Тиокиназы 110
- Трансальдолаза 106, 107, 108
- Трансаминазы 146
 - аланинтрансаминазы 146
 - глутаматтрансаминазы 146
- Транскетолаза 106, 107, 108, 109
- Транскрипция 56, 58, 201
- Трансляция 56
- Уридинтрансфераза (УТФ) 82, 90, 198
- Ферменты 7, 8, 9, 103
 - аллотопическая активность 28
 - глиоксилатный цикл 114
 - индуцированный синтез 8, 9, 111
 - митохондрий 27,
 - синтез 8, 62
- Флавинадениннуклеотид (ФАД) 102, 194, 196
- Формальдегиддегидрогеназа 116, 117
- Формиатдегидрогеназа 117
- Фосфатаза щелочная 64
- Фосфатаза фосфорилазы 92, 93
- Фосфоглицераткиназа 87
- Фосфоглицеромутаза 87
- Фосфоглюкомутаза 93
- Фосфодиэстеразы 203
- Фосфорилазы «а» и «в» 92
- Фосфофруктокиназа 82
- β -Фруктофуранозидаза 232
- Фумараза 103
 - митохондриальная 103
 - цитоплазматическая 103
- Хитин 50, 63
- Хитинсинтаза 63,
- Хлорамфеникол 215
- Хромосомы 17, 57, 58, 66, 67
- Центриоли 16
- Цитозоль 47
- Цитокиназа 60
- Цитоплазма 17, 24, 25
- Цитоплазматическая мембрана 17, 18
 - роль 22
 - строение 19, 45
- Цитратсинтаза 99

Экзо- β -1,3-глюканаза 64
Экзоиуклеаза 65
Элонгация 176, 177
Эндонуклеазы 56, 208
Эндоплазматическая сеть 43, 44
— — онтогенез 44

— — функция 45
Эукариоты 16, 30, 32, 60
Эфиры 140, 230, 233

Ядро 16, 17, 45
— деление 54

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение	3
Характерные биохимические особенности дрожжей	4
Роль ферментов в жизнедеятельности живой клетки	7
Индукированное образование ферментов	8
Глава 1. Дрожжи и молекулярная организация их клеточной структуры.	10
Дрожжи и дрожжеподобные грибы	10
Сумчатые грибы, или истинные дрожжи	10
Гибриды дрожжей	12
Несовершенные грибы	15
Молекулярная организация клеточной структуры дрожжей	16
Ультраструктура эукариотических клеток	16
Молекулярная структура и основные свойства мембран	18
Цитоплазма	24
Митохондрии	25
Рибосомы	30
Лизосомы	36
Вакуоли (тонопласт)	38
Аппарат Гольджи	39
Эндоплазматическая сеть	43
Пероксисомы (макротельца)	46
Цитозоль	47
Клеточная стенка дрожжей	47
Глава 2. Биохимия роста, развития и размножения дрожжей	52
Биохимические процессы, предшествующие размножению дрожжевых клеток	54
Репликация, или самоудвоение, ДНК	56
Воспроизведение генов и хромосом	57
Функция макромолекул	61
Синтез ферментов в цикле митотического деления дрожжей	62
Условия биосинтеза белка	64
Сбалансированность синтеза ДНК и белка	64
Стимуляторы синтеза ДНК	66
Влияние ионов на синтез РНК	67
Влияние ионов на уровень хромосом	67
Влияние ионов и полиаминов на белковый синтез	67
Влияние катионов на стабильность рибосом и образование полирибосом	68
Возможные пути регуляции уровня катионов	69
Репродуктивный возраст дрожжевых клеток	70
Глава 3. Метаболизм и превращение энергии	73
Обмен веществ (метаболизм)	73
Биохимия брожения и дыхания	77
Анаэробный распад углеводов	78

Стадия спиртового брожения (гликолиза)	80
Первая стадия спиртового брожения	80
Вторая стадия спиртового брожения	84
Заключительная реакция спиртового брожения	89
Сбраживание маннозы, фруктозы, галактозы	90
Диссимиляция гликогена	91
Аэробный распад углеводов	94
Биохимические фазы энергетического обмена	94
Цикл трикарбоновых кислот	95
Отдельные реакции цикла трикарбоновых кислот	99
Пентозофосфатный путь окисления глюкозы	105
Биологическое окисление углеводов	109
Микробиологическое окисление метанола	115
Метилотрофные дрожжи	115
Окисление формальдегида	116
Окисление формиата	117
Микробиологическое окисление этанола	119
Глава 4. Вторичные и побочные продукты метаболизма дрожжей	122
Ацетон и диацетил	122
Образование диацетила на пути биосинтеза пантотеновой кислоты	125
Влияние некоторых факторов на образование диацетила	125
Соединения, родственные диацетилу	128
Высшие спирты	129
Летучие жирные кислоты	133
Образование летучих кислот при интенсивном режиме спиртового брожения	135
Влияние аэрации и перемешивания на образование летучих жирных кислот	136
Органические кислоты, образующиеся при непрерывном культивировании дрожжей на среде с <i>n</i> -парафинами	137
Жирные кислоты	138
Эфиры	140
Серосодержащие вещества	141
Глава 5. Аминокислотный и белковый обмен дрожжей	142
Биосинтез аминокислот	142
Глутаминовая кислота	144
Аспарагиновая кислота	146
Аланин	148
Пролин	150
Серин и глицин	150
Метионин и треонин	151
Лизин	152
Изолейцин, валин, лейцин	153
Гистидин	153
Фенилаланин, триптофан и тирозин	155
Регуляция биосинтеза аминокислот	157
Свободные внутриклеточные аминокислоты	157
Прямая ассимиляция аминокислот	165
Глутатион	167
Биосинтез белка	168
Биосинтез белка микроорганизмами различных таксономических групп	169
Аминокислотный состав белка	171
Основные этапы биосинтеза белка	173
Активация аминокислот	173
Инициация полипептидной цепи	175
Элонгация — удлинение пептидной цепи	177
Терминация — отделение свободной полипептидной цепи	181

Факторы, влияющие на скорость синтеза белка	182
Глава 6. Обмен нуклеиновых кислот	187
Мононуклеотиды и их биологическое значение	187
Состав и строение мононуклеотидов	187
Биологическое значение мононуклеотидов	191
Роль нуклеотидных коферментов в обмене нуклеиновых кислот	193
Роль нуклеиновых кислот в жизнедеятельности клетки	199
Состав и строение нуклеиновых кислот	199
Синтез ДНК и характеристика ферментов	201
Особенности митохондриальной ДНК и ее синтеза	209
Синтез РНК и характеристика ферментов	210
Глава 7. Отличительные особенности обмена веществ у дрожжей, культивируемых в проточных средах	216
Непрерывное брожение в спиртовом производстве	217
Сочетание размножения дрожжей с их бродильной функцией	217
Изменение химического состава клеток	219
Особенности потребления азота и фосфора дрожжами, культивируемыми в проточных средах	220
Максимальное содержание нуклеиновых кислот в клетках	222
Сбалансированность процессов при различных источниках углерода	223
Проточный способ брожения в виноделии	225
Непрерывное брожение в производстве пива	226
Главное спиртовое брожение	226
Дображивание	228
Метаболиты дрожжей, участвующие в формировании качества продукта	228
Глава 8. Основные итоги современных исследований биохимии дрожжей и практическое использование их для интенсификации производства	232
Интенсификация классической технологии	232
Повышение физиологической активности дрожжей в проточной среде	234
Повышение продуктивности дрожжей путем многократного их использования	235
Многократное использование дрожжей при брожении	235
Иммобилизация клеток	237
Ускорение созревания вин и пива и повышение их качества	238
Рациональное использование внутриклеточных белков	239
Получение белковых изолятов	239
Получение дрожжевых лизатов пищевого достоинства	240
Получение лизатов кормового достоинства	240
Заключение	241
Список использованной литературы	247
Предметный указатель	265

СЕРГЕЙ АЛЕКСАНДРОВИЧ КОНОВАЛОВ

Биохимия дрожжей

Редактор Г. И. Круглова Художник С. Н. Орлов
Художественный редактор В. А. Чуракова
Технический редактор Г. Б. Жарова
Корректор З. В. Коршунова

ИБ № 917

Сдано в набор 21.09.79. Подписано в печать 4.04.80.
Т-07633. Формат 60×90^{1/16}. Бумага типографская № 1.
Литературная гарнитура. Высокая печать.
Объем 17,0 печ. л. Усл. печ. л. 17,0. Уч.-изд. л. 20,88.
Тираж 3000 экз. Заказ 742. Цена 3 р. 50 к.
Издательство «Пищевая промышленность», 113035,
Москва, М-35, 1-й Кадашевский пер., д. 12. Московская
типография № 6 Союзполиграфпрома при Государствен-
ном комитете СССР по делам издательств, полиграфии
и книжной торговли.
109088, Москва, Ж-88, Южнопортовая ул., 24.

