

М.В.Антонычева, И.А.Кузьмиченко, А.К.Никифоров, О.А.Волох,
И.В.Шульгина, С.А.Нижегородцев

ЭФФЕКТИВНОСТЬ АВТОЛИЗА ПЕКАРСКИХ ДРОЖЖЕЙ, ИНДУЦИРОВАННОГО ФЕРМЕНТНЫМИ ПРЕПАРАТАМИ

ФГУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

Изучено влияние ферментных препаратов (трипсина, пепсина, проназы, протеовибрина – ферментного комплекса, выделенного из ультрафильтрата культуральной жидкости производственного штамма *Vibrio cholerae* М 41 серовара *Ogawa* и не инаktivированного автолизата дрожжей) на процесс автолиза хлебопекарных дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae*). Использование выбранных ферментных препаратов в сублитических дозах оказывает стимулирующее действие на автолитический процесс, сокращая его время и позволяя получить автолизат с более высоким содержанием аминного азота.

Ключевые слова: автолиз, *Saccharomyces cerevisiae*, гидролиз, ферменты, питательные среды.

В качестве питательных основ микробиологических сред обычно используют гидролизаты различного белкового сырья. Перспективным сырьем является биомасса дрожжевых клеток, удовлетворяющая требованиям стандартности, безопасности, экономичности и конкурентоспособности питательных сред. При их конструировании применяют дрожжевые экстракты, автолизаты и гидролизаты.

Автолиз является разновидностью ферментативного гидролиза, так как происходит под воздействием собственных ферментов. При создании определенных условий активизируется ферментная система дрожжевой клетки, что приводит к расщеплению белковых структур клетки до водорастворимых соединений [1, 7, 17]. Процесс является экономичным, поскольку гидролиз с образованием аминокислот, пептидов и витаминов происходит в основном под действием комплекса ферментов, находящихся на внутренней поверхности клеточной стенки и на лизосомах.

Способы получения автолизата пекарских дрожжей можно систематизировать по основным индуцирующим воздействиям: механическому (гомогенизация в мельницах вибро- и ударного типа, продавливание под высоким давлением через сопло); термическому (замораживание и продавливание через сопло замороженной массы или кратковременная высокотемпературная обработка с последующим быстрым охлаждением); электрическим или ультразвуковым полем; химическому (использование хлороформа, толуола, этанола, олеиновой кислоты и т.д.) и ферментативному (добавление ферментов – пепсина, трипсина, папаина, протосубтилина, лизоцима и др.) в дозах, стимулирующих процесс автолиза [2, 3, 4, 6, 7, 11, 12, 13, 15, 17, 18, 19, 20].

К эффективным, экономичным и, соответственно, перспективным относятся способы индукции автолиза с помощью химических веществ и ферментов, в том числе микробного происхождения [2, 3, 5, 6, 7, 11, 13, 17]. Известно, что введение ферментов даже в

небольших дозах, демаскирует белковые структуры эндогенных ферментов дрожжевой клетки, переводя их в активное состояние, обеспечивая синергический эффект интенсификации автолиза [1, 3, 14]. Также эффективность процесса гидролиза повышает дробное дозированное добавление одного и того же фермента [2, 13, 14].

В качестве полиферментных препаратов для гидролиза белкового сырья используют биомассу интактных дрожжей (рода *Saccharomyces*) и их автолизаты [12, 13]. Дрожжевые клетки (*Sac. cerevisiae*), иммобилизованные на керамических носителях, используют в качестве биокатализаторов гидролизного процесса [8]. Логично предположить возможность использования в качестве ферментного индуктора автолиза неинаktivированный автолизат той же культуры.

Целью настоящей работы явилось изучение влияния различных по происхождению и специфическому действию ферментных препаратов на эффективность автолиза пекарских дрожжей и выбор индуктора автолитического процесса в его оптимальной концентрации.

Материалы и методы

В качестве объектов исследования были выбраны дрожжи пекарские прессованные – *Sac. cerevisiae* (ГОСТ 171-81) в виде водной суспензии 1:4 (w/v). Для протеолитического воздействия на дрожжевые клетки использовали коммерческие препараты: трипсин (Serva), проназу (Serva), пепсин (Spofa) и экспериментальный ферментный комплекс – протеовибрин, полученный нами из ультрафильтрата культуральной жидкости производственного штамма *Vibrio cholerae* М 41 серовара *Ogawa*, с известным составом и активностью ферментного комплекса [9, 10].

Протеолитическую активность, в условных единицах, предварительно определяли на плотной тест-

среде с обезжиренным молоком при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$. Ферментный препарат в двукратном разведении вносили в лунки, единицу рассчитывали по разведению, дающему через 24 ч просветление вокруг лунки в 2 мм, при стандартных условиях постановки реакции [9, 17]. Дозы различных ферментных препаратов, вносимых в дрожжевую суспензию, выравнивали по активности (из расчета 120000, 100000, 80000 и 16000 усл.ед./л).

Шестичасовой автолизат пекарских дрожжей использовали как самостоятельный полиферментный препарат, внося его в дозе 1, 3 и 5 % к объему исходной дрожжевой взвеси. Дрожжевая биомасса после 4–6 ч автолиза проявляла протеолитическое действие на молочной тест-среде.

Автолиз проводили в объеме 100, 1000 мл в стеклянных бутылках 0,2 и 2,5 л при температуре $(49 \pm 1)^\circ\text{C}$ и периодическом перемешивании. В опытных (автолиз с добавлением ферментного препарата) и контрольных (собственно автолиз) сериях в качестве плазмолизирующего и стабилизирующего вещества использовали хлороформ (до 1,5 %). Длительность процесса составляла 24–30 ч. Пробы отбирали через каждые 2 ч.

Степень лизиса и эффективность гидролитического расщепления белка контролировали по снижению оптической плотности (в %) автолизата по отношению к оптической плотности исходной взвеси турбидиметрическим методом [7, 17] и по содержанию аминного азота методом формольного титрования [16, 17]. Динамику изменения дрожжевых клеток в процессе автолиза определяли в мазках с окраской спиртовым раствором метиленового синего на инвертированном микроскопе с фото/ви-

део съемкой [5, 17].

Ферментативный процесс останавливали прогреванием биомассы при режиме 110°C ($0,5 \text{ кгс/см}^2$) в течение 30 мин. После отстаивания взвеси надосадочную жидкость декантировали, фильтровали и лиофилизировали.

Оценку значимости различий полученных значений проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента; статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Для контроля динамики изменения дрожжевых клеток (рис. 1, А – интактные клетки) в процессе автолиза из дрожжевой взвеси через каждые 2 ч делали мазки – с целью учета количества живых клеток. Погибшие клетки имеют другую форму и восприимчивость к окраске. Ферменты в дозе, превышающей 100000 усл.ед./л, оказывали протеолитическое действие через 6–12 ч, вызывая гибель около 40–45 % дрожжевых клеток (рис. 1, Б). При автолизе (рис. 1, В) за этот период количество погибших клеток – 10–15 %.

Установлено, что выбранные ферментные препараты в дозе от 100000 усл.ед./л и выше оказывали протеолитическое действие на субстрат – взвесь клеток пекарских дрожжей. В дальнейших экспериментах ферментные препараты применяли в меньших дозах.

Эффективность автолиза пекарских дрожжей по изменению оптической плотности взвеси и содержанию аминного азота, в зависимости от добавленных ферментных препаратов (концентрация которых вы-

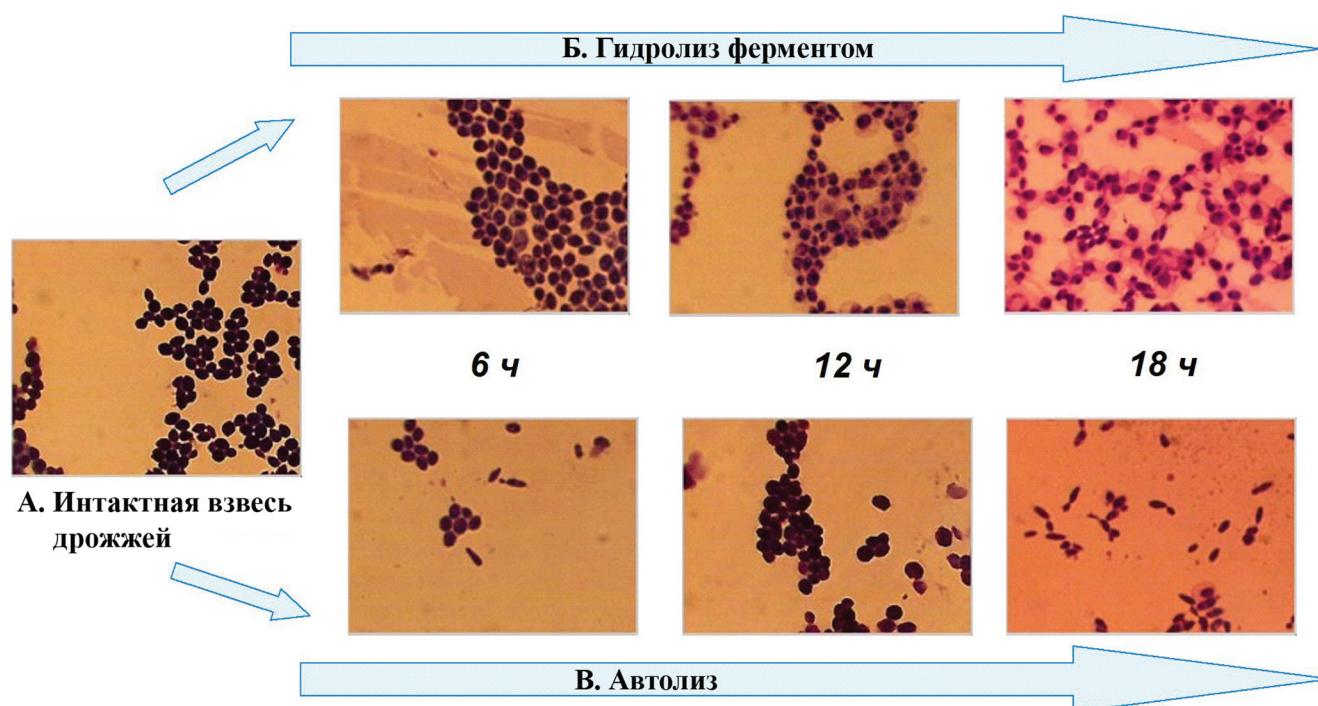


Рис. 1. Изменение морфологии дрожжевых клеток:

А – интактная взвесь; Б – гидролиз ферментом (трипсин 120000 усл.ед./л); В – собственно автолиз. Окраска метиленовым синим

Таблица 1

Влияние ферментов различного происхождения на автолиз пекарских дрожжей через 24 ч инкубации

Вариант автолиза	Аминный азот		Снижение оптической плотности, %	pH
	г/л	прирост, %		
Трипсин (Serva)	1,89	180	51,6	5,6
Пепсин (Spofa)	1,54	147	49,32	5,6
Проназа (Serva)	1,68	160	45,16	5,3
Протеовибрин	1,85	177	50	5,6
Контроль (собственно автолиз)	1,05	100	29,35	5,3

ровнена по активности – 80000 усл.ед./л), представлена в табл. 1.

Прирост аминного азота в контроле условно приняли за 100 %. Более активное действие оказали трипсин и комплексный ферментный препарат – протеовибрин, судя по накоплению аминного азота и степени лизиса дрожжевых клеток. Прирост аминного азота в автолизате через 24 ч достигал, соответственно, 180 и 177 % по сравнению с контролем. Этому соответствовала и степень лизиса, определенная турбидиметрическим методом по снижению оптической плотности.

В следующих опытах по изучению индуцирующего воздействия ферментов – трипсина и протеовибрина на автолиз клеток пекарских дрожжей была испытана доза, уменьшенная в пять раз (16000 усл.ед./л). Также изучено действие шестичасового свежеприготовленного автолизата, в качестве комплексного ферментного препарата, в концентрации от 1 до 5 % в автолизируемой взвеси дрожжей.

По уровню накопления аминного азота (см. рис. 2) было отмечено, что уже через 12 ч автолиза в присутствии ферментов трипсина, протеовибрина и шестичасового автолизата (концентрация в дрожжевой взвеси 3 и 5 %) автолитический процесс протекает эффективнее (различие с контролем статистически значимо: по результатам двенадцатичасовых проб – $p < 0,05$; по результатам двадцатичетырехчасовых проб – $p < 0,001$).

Добавление ферментов в качестве индукторов позволяет ускорить ферментативные реакции, характерные для автолиза дрожжевых клеток, и получить продукт – водорастворимую фракцию автолизата с высоким содержанием аминного азота.

Как и предполагали, максимальная степень конверсии исходного сырья произошла при добавлении трипсина и протеовибрина (80000 усл.ед./л). Применение ферментов в выбранных дозах обеспечивало достоверное по сравнению с контролем увеличение степени лизиса и прироста аминного азота. Отмечено положительное действие на процесс автолиза шестичасового автолизата той же культуры дрожжей, проявляющегося в концентрации от 3 % (см. таб. 2). Добавление 1 % свежего неинактивированного автолизата к исходной взвеси не позволило выявить статистически значимых различий в содер-

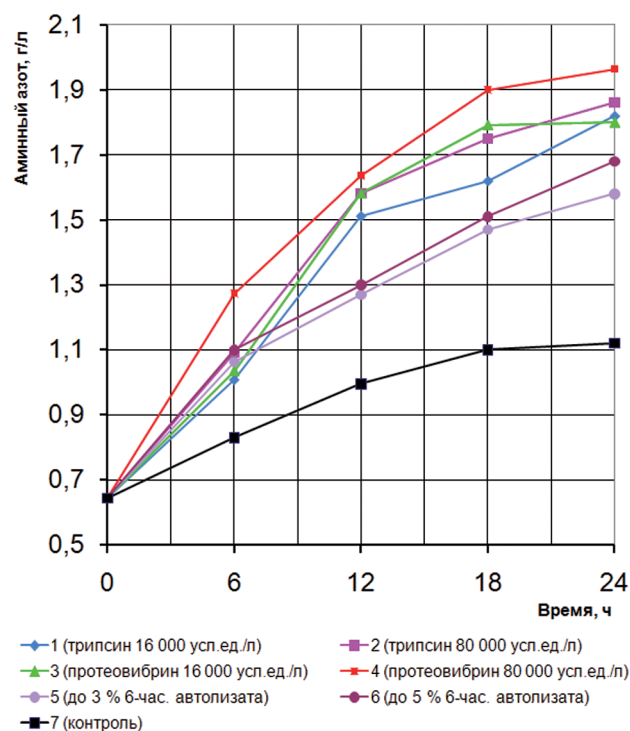


Рис. 2. Динамика накопления аминного азота в дрожжевом автолизате под действием ферментов

жания аминного азота в полученном препарате по сравнению с контролем ($p > 0,05$).

Результаты эффективности автолиза по снижению оптической плотности дрожжевой взвеси коррелировали с результатами накопления аминного азота в автолизате – максимальные показатели получены в опытах с применением протеовибрина и трипсина (таб. 2).

В работе были использованы прессованные пекарские дрожжи из разных производственных серий, при этом зарегистрированы значительные колебания уровня аминного азота (0,18–1,0 г/л) в исходной дрожжевой взвеси. Спонтанный автолиз дрожжевых клеток и расщепление эндопротеазами с образова-

Таблица 2

Зависимость эффективности автолиза от концентрации фермента в дрожжевой взвеси через 24 ч инкубации

Вариант автолиза	Аминный азот		Снижение оптической плотности, %
	г/л	%	
Трипсин 16000 усл.ед./л	1,82*	162,5	49*
Трипсин 80000 усл.ед./л	1,86*	166,2	50,99*
Протеовибрин 16000 усл.ед./л	1,80*	160,7	51*
Протеовибрин 80000 усл.ед./л	1,96*	175,4	52,63*
1 % 6-часового автолизата	1,39**	124,5	38,0**
3 % 6-часового автолизата	1,52*	136,1	45,0*
5 % 6-часового автолизата	1,68*	150,0	45,6*
Контроль (собственно автолиз)	1,12	100	32,7

*Различие с контролем статистически значимо ($p < 0,001$), $n = 17$.

**Различие с контролем статистически не значимо ($p > 0,05$).

нием инактивированных (денатурированных) форм фермента присущ всем дрожжевым культурам и происходит при положительной температуре. Уровень аминного азота во взвеси может косвенно свидетельствовать о состоянии дрожжевой популяции – ее старении [3, 15]. Поэтому при работе с прессованными пекарскими дрожжами необходимо учитывать срок их изготовления и условия хранения.

Таким образом, изучение влияния ферментных препаратов различного происхождения на процесс автолиза хлебопекарных дрожжей (*Sac. cerevisiae*) показало, что использование ферментов (трипсина, пепсина, проназы, протеовибрина и собственно автолизата пекарских дрожжей) оказывает стимулирующее действие на автолитический процесс. Применение трипсина и протеовибрина сокращает время автолиза на 6 ч и увеличивает в 1,5–1,7 раза выход водорастворимой части автолизата (по аминному азоту).

Впервые в качестве индуктора автолиза дрожжевых клеток был использован протеовибрин. Фермент микробного происхождения не уступает по гидролитической активности трипсину – ферменту поджелудочной железы, традиционно применяемому для ферментативного гидролиза при изготовлении питательных основ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Антонов В.К. Химия протеолиза. М.: Наука, 1991. 504 с.
2. Бабаян Т.Л., Латов В.К. Способ оценки протеиназной активности комплексного ферментного препарата по данным кинетики протеолиза модельного белкового субстрата. Биотехнология. 2003; 6:47–51.
3. Белоусова Н.И., Гордиенко С.В., Ерошин В.К. Влияние условий автолиза на характеристики аминокислотных смесей, полученных с использованием этанолассимилирующих дрожжей. Прикладная биохим. и микробиол. 1995; 31(4):458–62.
4. Белоусова Н.И., Гордиенко С.В., Ерошин В.К., Ильченко В.Я. Получение смеси аминокислот на основе автолизатов дрожжей *Saccharomyces*, выращенных на этаноле или сахарах. Биотехнология. 1990; 3:6–9.
5. Божков А.И., Леонова И.С., Облак В.И. Удаление клеточных стенок *Saccharomyces cerevisiae* ферментным комплексом *Chaetomium globosum* Kunze. Биотехнология. 2004; 6:46–53.
6. Божков А.И., Облак В.И. Экскреторная активность гидролитических ферментов *Pleurotus ostreatus* (Jacq.: Fr.) Kumm в глубоководной культуре. Биотехнология. 2007; 1:41–6.
7. Кислухина О.В., Калунянц К.А., Аленова Д.Ж. Ферментативный лизис микроорганизмов. Алма-Ата: Рауан; 1990. 200 с.
8. Коваленко Г.А., Перминова Л.В., Чуенко Т.В., Ивицина И.Б., Куюкина М.С., Рычкова М.И., Филл Дж.К. Углеродсодержащие макроструктурированные керамические носители для адсорбционной иммобилизации ферментов и микроорганизмов. Биотехнология. 2006; 1:76–83.
9. Кузьмиченко И.А., Громова О.В., Джапаридзе М.Н., Киреев М.Н., Белякова Н.И., Клокова О.Д. Тест-среды для определения активности триназы, протеазы и фосфолипазы в холерной химической вакцине и ее компонентах. Пробл. особо опасных инфекций. 2002; 1(83): 148–53.
10. Кузьмиченко И.А., Громова О.В., Нижегородцев С.А.,

Балашова Е.В., Дятлов И.А., Киреев М.Н. Экзоферменты ультрафильтрата культуральной жидкости вакцинного штамма М-41 холерного вибриона. В кн.: Сборник материалов VIII Рос. науч.-практ. конф. по проблеме «Холера». Ростов н/Д; 2003. Вып. 16. С. 229–30.

11. Латов В.К., Бабаян Т.Л., Гордиенко С.В., Коган А.С., Цырякин В.А., Беликов В.М. Комплексная переработка дрожжевой биомассы. Биотехнология. 1990; 3:14–8.
12. Неклюдов А.Д., Илюхина В.П., Мосина Г.И., Петракова А.Н., Федорова Н.В., Кузнецов В.Д. Гидролизующая способность дрожжевых протеаз по отношению к белковым субстратам. Прикладная биохимия и микробиология. 1996; 32(2):231–6.
13. Неклюдов Д.А., Иванкин А.Н., Мосина Г.И. [и др.] Оптимизация процесса гидролиза белковых субстратов дрожжевыми протеазами *Saccharomyces cerevisiae*. Прикладная биохим. и микробиол. 1998; 34(4):394–7.
14. Плакунов В.К. Основы энзимологии. М.: Логос; 2001. 126 с.
15. Тиммербаева Р.Х., Бобкова Е.В., Туягунов М.М., Баталова Т.А., Ибрагимов Н.Ю. Биотехнологические аспекты автолиза дрожжей хлебопекарных. III. Конструирование двустадийной модели гидролиза дрожжевого сырья. В кн.: Актуал. вопр. разработки производства и применения иммунобиол. и фармацевтических препаратов: Матер. конф. Уфа, 2000. Ч. 1. С. 194–6.
16. Физико-химические, химические, физические и иммунохимические методы контроля медицинских иммунобиологических препаратов. ФС 42-3874-99. Изд. официальное. М.: Минздрав РФ.
17. Шкляр Б.Х. Ферментативный лизис дрожжей. Минск: Наука и техника; 1977. 192 с.
18. Knorr D., Shetty K., Kinsella Y. Enzymic lysis of yeast cell walls. Biotechnol. Bioeng. 1979; 21(11):2011–21.
19. Pepler H.I. Uses of food yeasts. The yeasts, London. N.Y. Academic Press; 1970. Vol. 3. 442 p.
20. Sugimoto H. Synergistic effect of Ethanol and sodium chloride in autolysis of Baker's yeast for preparing food grade Yeast extracts. J. Food Sci. 1974; 39:939.

Об авторах:

Антонычева М.В., Кузьмиченко И.А., Никифоров А.К., Волох О.А., Шулгина И.В., Нижегородцев С.А. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: microbe@san.ru

M.V.Antonycheva, I.A.Kuzmichenko, A.K.Nikiforov, O.A.Volokh,
I.V.Shulgina, S.A.Nizhegorodtsev

The Efficiency of Baker's Yeast Autolysis Induced by Enzyme Preparations

Russian Anti-Plague Research Institute "Microbe",
Saratov

Has been analyzed the effect of enzyme preparations (trypsin, pepsin, pronase, proteovibrin – enzyme complex isolated from cultural ultrafiltrate of the industrial strain *Vibrio cholerae* M 41 Ogawa and from non-inactivated autolysate of yeasts) upon the process of autolysis of baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). The selected enzyme preparations being used in small doses render stimulatory effect to autolytic process thus reducing its duration and enabling to obtain autolysate with higher content of amine nitrogen.

Key words: autolysis, *Saccharomyces cerevisiae*, hydrolysis, enzymes, nutrient media.

Authors:

Antonycheva M.V., Kuzmichenko I.A., Nikiforov A.K., Volokh O.A., Shulgina I.V., Nizhegorodtsev S.A. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 410005, Saratov, Universitetskaya St., 46. E-mail: microbe@san.ru

Поступила 26.01.09.