

УДК 579.66

Биологическая роль глицерина в клетках дрожжей. Дрожжи как продуценты глицерина

© 2020 М.М. ВУСТИН^{1, 2*}¹ ФГБУ Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра «Курчатовский институт», Москва, 117545² Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва, 123182

*e-mail: vustinmm@genetika.ru, vustin.mm@gmail.com

Поступила в редакцию 03.09.2020 г.

После доработки 24.10.2020 г.

Принята к публикации 01.12.2020 г.

В представленном обзоре собрана информация о физиологической роли глицерина в жизнедеятельности дрожжевой клетки как осмопротекторного и криопротекторного фактора. Показано значение биосинтеза глицерина в дрожжах при культивировании их в анаэробных и микроаэрофильных условиях. Рассмотрена зависимость продукции глицерина дрожжами от условий культивирования и состава питательных сред. Проведен анализ литературы по продукции глицерина различными таксономическими группами дрожжей. На основании изученного литературного материала сделаны прогнозы относительно перспектив использования дрожжевых организмов в качестве продуцентов глицерина ферментационным путем.

Ключевые слова: глицерин, дрожжи, гиперосмотический стресс, ферментация

doi: 10.21519/0234-2758-2020-36-6-16

Еще в середине девятнадцатого века Пастером глицерин впервые был обнаружен как минорный продукт спиртового брожения сахаров у дрожжей. Он накапливался в культуральной жидкости в количествах, составляющих несколько процентов.

Как таковое, микробное производство глицерина путем ферментации было начато только во время Первой мировой войны, когда возникла острая необходимость в нем в качестве основного компонента при производстве взрывчатых веществ. В последующие годы производство глицерина с помощью микробного синтеза заметно снизилось, из-за трудностей, связанных с извлечением и очисткой глицерина из микробной культуральной жидкости, кроме того оно не могло конкурировать с более экономически выгодным химическим синтезом на основе продуктов переработки нефти. В настоящее время наблюдается новая волна повышенного интереса к глицерину, который производится с помощью дрожжей. Это

в первую очередь связано с переизбытком дешевого углеводного сырья, появившегося на мировом рынке в следствие выращивания высокоурожайных сортов зерновых культур, таких как пшеница и кукуруза. Глицерин является побочным продуктом при производстве биодизеля для двигателей внутреннего сгорания. Существенное снижение объемов этого производства в связи с появлением более экологичных электрических двигателей сыграло не малую роль в необходимости усовершенствования процессов получения глицерина с помощью микроорганизмов, в частности дрожжей. Роль глицерина в жизнедеятельности дрожжей давно и хорошо изучена. В клетках этих организмов он играет очень важную роль как фактор осморегуляции и криозащиты. Одновременно с этим глицерин может служить окислительно-восстановительным стоком для избытка НАДН, который образуется в анаэробных или микроаэрофильных условиях культивирования.

Список сокращений: АВ — активность воды; НАД — никотинамидадениндинуклеотид; Gph — глицерол-3-фосфат-дегидрогеназа; Pdc — пируватдекарбоксилаза; Pdh — пируватдегидрогеназа; Grd — цитозольная глицерол-3-фосфат-дегидрогеназа; Grp — глицерол-3-фосфатфосфатаза; *FPS1* — ген, кодирующий синтез белка-канала Fps1p, регулирующего диффузию глицерина; *GPP1* — ген, кодирующий синтез глицерол-1-фосфат-фосфогидролазы1; HOG — специальный сигнальный путь; Ndc — внешняя митохондриальная НАДН-дегидрогеназа; Ndi — внутренняя митохондриальная НАДН-дегидрогеназа.

ОСМОРЕГУЛЯЦИЯ

Поддержание клеточного водного баланса является основополагающим для всех живых организмов. Быстрые изменения во внеклеточной осмолярности и активности воды (АВ) могут быть вредными для клеток, например, повышенное осмотическое давление окружающей среды вызывает отток воды и, следовательно, изменение регидности клеток. Накопление определенных растворенных веществ, необходимых для компенсации потери воды, является универсальной стратегией выживания в этих условиях [1]. Такие вещества должны быть совместимы с внутриклеточными процессами и их растворы должны либо замещать воду, либо изменять градиент концентрации осмолита, возвращая воду обратно в клетку. В микроорганизмах наиболее распространенными являются растворы небольших незаряженных молекул — полиолов (глицерин, арабит) или углеводов (трегалоза и сахароза), а также аминокислот (пролин, глутамат или глутамин) и эктоинов (β - гидроксидектоин) [2]. В дрожжах и других грибах глицерин является наиболее заметным растворенным веществом, которое регулирует клеточный тургор в условиях высокой внеклеточной осмолярности [3, 4]. Например, на начальном этапе брожения вина *S. cerevisiae* производит повышенное количество глицерина в ответ на осмотический стресс из-за высокой концентрации сахара в сусле. Продукция глицерина в клетках дрожжей зависит не только от концентрации источников углерода в среде, но и от их разнообразия [5]. Показано, что дрожжи, выращенные на этаноле в качестве единственного источника углерода и энергии, в условиях повышенного осмостресса, фактически не синтезировали глицерин. В таких условиях наблюдалось образование повышенной внутриклеточной трегалозы, которая, вероятно, могла взять на себя функции осмопротектора.

Количество глицерина в культуральной жидкости у дрожжей также зависит и от содержания в последней легко растворимых солей и находится в прямо пропорциональной зависимости от их концентрации, например, для NaCl в интервале от 0,7 до 1,4 М [6]. Более того, в этих условиях наблюдалось заметное повышение уровня активности цитоплазматической глицерол-3-фосфатдегидрогеназы (Gpd) (рис.1), являющейся ключевым ферментом в синтезе глицерина [6, 7].

У дрожжей *S. cerevisiae* адаптация к гиперосмотическому стрессу достигается за счет увеличения накопления глицерина и его удержания внутри клеток. Мутанты, у которых блокирован синтез глицерина (например, *gpd1Δgpd2Δ*) или происходит его утечка (например, с гиперактивным геном

FPS1) проявляют осмо-чувствительный фенотип Fps [8]. Индукция гена, кодирующего синтез белка Gpd1p в результате осмотического стресса, происходит на уровне транскрипции, которая контролируется специфическим путем передачи сигнала HOG (путь высокоосмолярного ответа глицерина), регулирующим ген *GPD1*, что в итоге приводит к повышенному образованию глицерина [9–11]. Внутриклеточное накопление глицерина у *S. cerevisiae* контролируется Fps1p-каналом [12]. В условиях гиперосмотического стресса канал закрывается, тем самым сохраняя глицерин внутри клетки, чтобы поддерживать осмотическое равновесие с внешней средой. В отсутствие гиперосмотического стресса канал остается открытым, и глицерин свободно выходит из клетки [13, 14].

Дрожжи несхаромицеты могут использовать и некоторые другие механизмы для увеличения концентрации внутриклеточного глицерина. Например, ксеротолерантные дрожжи *Z. rouxii*, хорошо растущие в экстремальных условиях с низкой влажностью и высокими концентрациями солей, удерживают и накапливают глицерин в норме даже против градиента концентрации солей [15, 16]. У дрожжей накопление глицерина во время осмоадаптации происходит с целью восстановления объема и тургора клетки. В дальнейшем, после снижения или полного исчезновения гипоосмотического шока, накопившийся внутри клетки глицерин может свободно выходить в межклеточное пространство за счет диффузии. Путь реакции с высокой осмолярностью (HOG) контролирует накопление глицерина на различных уровнях, где каждый механизм вносит свой вклад во временную и количественную картину восстановления объема клетки. Это ингибирование оттока глицерина из клетки, прямая активация первого фермента в его биосинтезе (рис. 1), стимуляция гликолитического потока, регуляция экспрессии генов, кодирующих ферменты в биосинтезе глицерина, а также активная система поглощения глицерина [17]. Осморегуляция включает в себя активные гомеостатические процессы, обеспечивающие надлежащий объем, форму и тургор клеток, а также межклеточную среду, оптимальную для различных биохимических процессов [18]. Недавние исследования показывали, что узкий количественный интервал содержания воды в дрожжевых клетках, способствует быстрой диффузии биомолекул, в то время как уже умеренное сжатие клеток после гиперосмотического стресса приводит к макромолекулярному скоплению и замедлению клеточных процессов [19].

Внутриклеточное накопление глицерина является одной из основных адаптаций грибов к осмотическому и холодному стрессу.

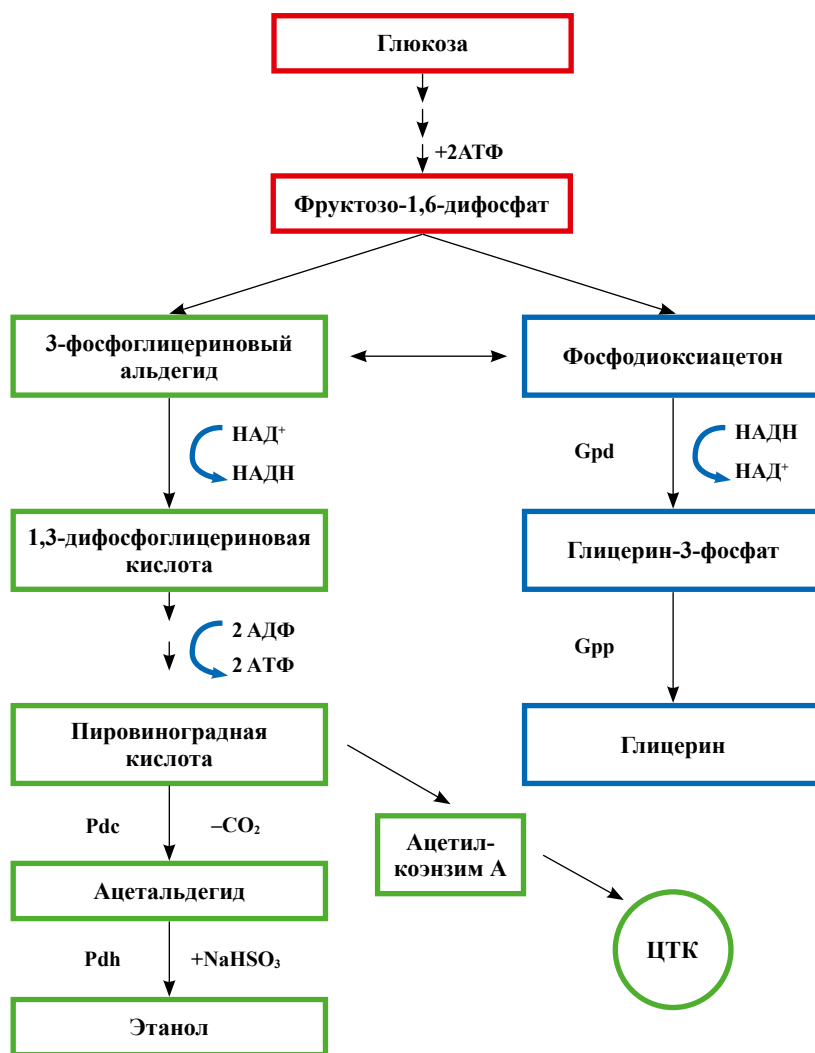


Рис. 1. Схема биосинтеза глицерина у дрожжей (глицериновое брожение)

Pdc — пируватдекарбоксилаза, Pdh — пируватдегидрогеназа, Gpd — цитозольная глицерол-3-фосфат-дегидрогеназа, Gpp — глицерол-3-фосфатфосфатаза

Fig. 1. Scheme of glycerol biosynthesis in yeast (glycerol fermentation)

Pdc-pyruvate decarboxylase, Pdh-pyruvate dehydrogenase, Gpd-cytosolic glycerol-3-phosphate dehydrogenase, Gpp-glycerol-3-phosphate phosphatase

Исследования управления метаболизмом глицерина в полиэкстремотолерантных черных дрожжах *Aureobasidium pullulans* и *Aureobasidium subglaciale* показали, что повышенная соленость от 5% до 10%, вызывает внутриклеточное накопление глицерина [20]. Показано, что его накопление, как и транскрипционный ответ на гиперсалиновый стресс был больше и более последовательным у *A. pullulans* по сравнению с *A. subglaciale*, отражая различие в стрессоустойчивости и экологической стратегии каждого вида.

Анализ экспрессии всего генома дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* показал, что более половины генома участвует в различных реакциях, являющихся ответом на изменение окружающей среды (включая изменение температуры,

процесса окисления, состава и концентрации питательных веществ, pH и осмолярности) и выявляет глобальный набор генов, индуцируемых и подавляемых каждым ее фактором. Вместе с этим, эксперименты позволили выявить новые нехарактерные для этих процессов гены (10% генома), участвующие в ранее изученных процессах, связанных с индукцией общей реакции на изменения окружающей среды [21].

Биосинтез глицерина во время роста дрожжей в анаэробных и микроаэрофильных условиях

Коэнзим никотинамидадениндинуклеотид (НАД⁺) является важным переносчиком электронов и протонов. В норме, в дрожжах присутствуют только каталитические количества (1–2 мМ) этого

пиридинового нуклеотида. Общее соотношение НАД⁺/НАДН в дрожжах составляет приблизительно 3:1 [22], включая свободные и связанные формы кофермента. Стабильное внутриклеточное окислительно-восстановительное состояние достигается за счет точного уравнивания восстановления НАД⁺ и окисления НАДН.

В среде с глюкозой цитозольное восстановление НАД⁺ главным образом катализируется ферментом глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназой (рис.1). Митохондриальный НАДН в клетке появляется в результате протекания реакций цикла трикарбоновых кислот при активном росте дрожжей в процессе окисления субстратов. Полученный НАДН окисляется в пяти основных реакциях: синтез этанола алкогольдегидрогеназой (Adh); синтез глицерина цитозольной глицерол-3-фосфат-дегидрогеназой (Gpd1/2); окисление цитозольного НАДН внешней митохондриальной НАДН-дегидрогеназой (Nde1/2); окисление цитозольного НАДН при переносе через глицерол-3-фосфатный челнок и окисление внутримитохондриального НАДН митохондриальной «внутренней» НАДН-дегидрогеназой (Ndi1) [23].

Усвоение глюкозы в клетке часто приводит к образованию «избытка» НАДН. Большая его часть генерируется в биосинтетических реакциях при образовании аминокислот в цитозоле и в митохондриальном матриксе [24]. Поскольку окислительно-восстановительное производство этанола, происходящее в анаэробных условиях, не может служить окислительно-восстановительным стоком для избытка НАДН, его необходимо снова окислить какими-либо другими способами. Во время роста в присутствии кислорода это может быть достигнуто в дыхательной цепи. Внешняя НАДН-дегидрогеназа (Nde) и внутренняя НАДН-дегидрогеназа (Ndi), локализованные во внутренней мембране, непосредственно переносят восстанавливающие эквиваленты своего компартмента в дыхательную цепь. Но в анаэробных условиях дыхание невозможно и *S. cerevisiae*, например, окисляет НАДН в реакции глицерол-3-фосфатдегидрогеназы (рис. 1). Гены *GPD2* (глицерол-3-фосфат-дегидрогеназы 2) и *GPP1* (глицерол-1-фосфат-фосфогидролазы 1) активируются после перехода в анаэробные условия, что приводит к увеличению выработки глицерина. При удалении этих генов клетки не способны расти в отсутствие кислорода [25–28]. Чтобы обеспечить постоянную активность этого пути для непрерывного окисления НАДН, синтезированный глицерин экспортируется из клеток через специальный канал Fps1. Поскольку единственным путем окисления НАДН в анаэробных условиях, является образование цитозольного глицерина,

то продуцируемый в митохондриальном матриксе во время синтеза аминокислот НАДН необходимо транспортировать в цитозоль. Однако митохондриальная внутренняя мембрана практически непроницаема для пиридиновых нуклеотидных коферментов [29], поэтому анаэробное окисление внутримитохондриального НАДН требует челночного механизма, который экспортирует окислительно-восстановительные эквиваленты в цитозоль.

Баккер и соавторы [30] предложили возможное участие этанол-ацетальдегидного челнока в экспорте внутримитохондриального НАДН. Этот челнок состоит из двух компонентов: цитозольной НАД⁺-связанной глицерол-3-фосфат-дегидрогеназы (Gpd1 и Gpd2) и митохондриальной глицерол-3-фосфат-убихинон-оксидоредуктазы, часто называемой, митохондриальной глицерол-3-фосфат-дегидрогеназой (Gut2) [31]. Другие существующие глицерол-3-фосфатные челноки служат для переноса окислительно-восстановительных эквивалентов из цитозольного НАДН в дыхательную цепь в аэробных условиях. Следует отметить, что попытка увеличить выработку глицерина у *S.cerevisiae*, например, путем избыточной экспрессии гена *GPD1* нарушает окислительно-восстановительный баланс в клетке и вызывает образование дополнительных окисленных побочных продуктов, таких как пируват, ацетат, ацетоин, 2,3-бутандиол и сукцинат [32–34]. Поскольку синтез глицерина включает дефосфорилирование, оно может также участвовать в пополнении цитозольного пула неорганического фосфата во время перехода от глюконеогенного к гликолитическому метаболизму [35, 36]. Таким образом можно заключить, что у дрожжей образование глицерина в ощутимых количествах, как одной из восстановленных форм метаболизма глюкозы, возможно только в анаэробных или микроаэрофильных условиях. В аэробных условиях синтез глицерина идет лишь в незначительных количествах и то в присутствии высоких концентраций глюкозы.

Глицерин как криопротектор

Холодовой шок вызывает ряд изменений физических и биохимических свойств клетки, таких как состояние мембран, функционирование рибосом, формирование белковых молекул, а также влияет на вторичную структуру нуклеиновых кислот, нарушая тем самым процессы транскрипции и трансляции [37]. На примере дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* показано, что понижение температуры активирует путь биосинтеза глицерина высокой осмолярности (НОГ), который определяет устойчивость клеток к заморзанию [38]. При пониженных температурах значительно замедляются

внутриклеточные процессы (примерно в 2 раза на каждые 10 °С), происходит снижение активности ферментов, повышение вязкости мембран [39], нарушение трансмембранного транспорта и синтеза белков. Чтобы обеспечить выживание и рост клеток при низкой температуре, происходит активация синтеза белков холодового шока, а также некоторых белков теплового шока [40], повышение степени ненасыщенности и уменьшение длины ацильных цепей жирных кислот мембранных фосфолипидов. Одновременно с этим в клетках идет синтез трегалозы и других криопротекторных соединений, к которым можно отнести арабитол, эритритол, маннитол и глицерин [37].

Для нормального функционирования мембрана должна находиться в жидкокристаллическом состоянии и, следовательно, организмы под воздействием внешних условий, должны изменять липидный состав мембраны, синтезируя липиды с нужными полярными группами и ацильными цепями, таким образом, чтобы поддерживать мембрану в жидкокристаллическом состоянии и избегать перехода к гелевой фазе [41–43]. При увеличении доли ненасыщенных жирных кислот в составе мембранных цепей фосфолипидов текучесть мембран повышается. Холодовой шок вызывает активацию десатураз и дегидрогеназ, что в свою очередь, повышает соотношение полиненасыщенных жирных кислот к насыщенным и/или укорачивает длину ацильных цепей [44]. Было выдвинуто предположение, что главной целью ответа на холодовой шок служит защита клеток от повреждений при замерзании путем синтеза больших количеств трегалозы и глицерина [45, 46]. В последнее время универсальность трегалозы, как защитной молекулы, подвергаются сомнению, однако её криопротекторная роль не опровергается [47, 48]. Накопление глицерина также защищает клетку от разрушительного действия низких температур. Так, *GPD1* — ген глицерол-3-фосфат-дегидрогеназы, кодирующий главный фермент, участвующий в синтезе глицерина (рис. 1), активируется у дрожжей при снижении температуры с 12 до 4 °С [49].

Дрожжи — продуценты глицерина.

Глицерин, как продукт метаболизма образуются многими микроорганизмами такими как дрожжи, мицелиальные грибы, водоросли и даже простейшие. Дрожжи в этом списке занимают особое место. Главным образом это связано с их физиолого-биохимическими особенностями: способностью к анаэробному брожению углеводов с высоким выходом спиртов и высокой осмоотолерантностью. Пожалуй, оба эти фактора сыграли

решающую роль в выборе дрожжей, в качестве потенциального продуцента глицерина ферментативным путем. В предыдущих разделах подробно рассматривались причины, вызывающие биосинтез глицерина внутри клетки дрожжей. Как правило, они связаны с воздействием на дрожжи различных видов внеклеточных стрессов: осмотического, сульфитного или холодового, а также значительным снижением растворимого кислорода в питательной среде. Внеклеточная же продукция глицерина дрожжами происходит, как правило, по мере снижения этих стрессовых воздействий, например, при потреблении глюкозы в процессе культивирования.

Первыми дрожжами, которые начали использовать для получения глицерина, были сильно бродящие дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*. Добавление в ферментационную питательную среду смеси сульфита и бисульфита натрия блокировало спиртовое брожение, и вместо этанола начинал образовываться глицерин (рис. 1). В послевоенные годы были разработаны технологии получения глицерина с помощью дрожжей не только с использованием бисульфита, но и методы проведения ферментаций при высоких значениях pH. Акцент с традиционных сахаромисцетов сместился в сторону других осмоотолерантных дрожжей. Производство глицерина осмоотолерантными дрожжами было впервые описано для *Zygosaccharomyces acidifaciens* [50]. Это исследование вместе с сообщениями о производстве глицерина наряду с другими необходимыми химической промышленности полиолами (эритритом, d-арабитом и маннитом) [51, 52] стимулировало всестороннее изучение других осмоотолерантных дрожжей с целью обнаружения организма, продуцирующего глицерин без использования регулирующего агента, подобного бисульфиту. Однако эти исследования не привели к коммерциализации процессов из-за трудностей в извлечении глицерина из культуральной среды и легкой доступности менее дорогих синтетических источников нефтяного происхождения. Позже, разработка методов разделения компонентов культуральной жидкости, таких как обратный осмос, ультрафильтрация, ионный обмен и ионное исключение, позволила перейти к производству глицерина с использованием осмоотолерантных дрожжей путем ферментации в больших биореакторах.

Большинство осмоотолерантных видов дрожжей, рассматриваемых для получения глицерина, относятся к родам *Candida*, *Hansenula*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Torulaspora*, *Zygosaccharomyces*, *Kluyveromyces* и *Wickerhamomyces* [53–58]. Все они нуждаются

в кислороде для роста, что значительно увеличивает производственные капиталовложения из-за дополнительных затрат, необходимых для аэрации и охлаждения ферментеров [59]. Выход глицерина с конверсией в 40% был достигнут при использовании штамма дрожжей *C. magnoliae* [60]. Выделенный из пчелиных сот вид *C. magnoliae* способен расти в присутствии высоких концентраций сахаров (50%) и продуцировать спирты: эритрит, маннит и глицерин в ответ на высокий внеклеточный осмос [61, 62]. Когда дрожжи *C. magnoliae* выращивали при высоких концентрациях фруктозы, они продуцировали значительное количество глицерина, сопоставимое с количеством эритрита. Авторы заключили, что внутриклеточное накопление глицерина является жизненно необходимым для *C. magnoliae* с целью поддержания осмолярности, как и для хорошо изученных ранее дрожжей *S. cerevisiae*, *Z. rouxii* и *Hansenula anomala* [63, 64].

С 70-х годов двадцатого века в Китае предпринимаются интенсивные усилия по разработке процесса производства глицерина на основе осмолотерантных дрожжей. Так, проведя скрининг более чем пяти тысяч природных изолятов таких дрожжей, авторам удалось выделить штамм со значительным потенциалом производства глицерина [65]. Этот штамм, выделенный из глазированных фруктов в Южном Китае, позднее был назван *C. glycerinogenes* [66] и коммерциализирован для использования в производстве глицерина [67]. По сравнению с другими дрожжами *C. glycerinogenes* наряду с толерантностью к высоким концентрациям глюкозы, обладали быстрым ростом и способностью создавать высокую концентрацию внеклеточного глицерина за короткий временной период.

В экспериментах с культурой во встряхиваемой колбе было обнаружено, что этот штамм способен продуцировать до 85 г/л глицерина за 48 ч при начальной концентрации общего сахара в 45%. Опыты на экспериментальной установке показали, что глицерин может быть получен также из ряда недорогих сырьевых материалов, например, глюкозы, полученной ферментативным гидролизом сладкого картофеля батата, который дрожжи *C. glycerinogenes* превращали в 85 г/л глицерина с конверсией 41% в биореакторе объемом 3 м³ [68]. Ферментация кислотно-гидролизованного кукурузного крахмала в биореакторах объемом от 0,5 до 2,5 м³ позволяла получать среднюю концентрацию глицерина около 100 г/л с эффективностью 40% [68]. С помощью генетически улучшенного штамма *C. glycerinogenes* в лабораторном ферментере удалось поднять выход глицерина до 130 г/л с конверсией в 63% и объемной скоростью производства в 32 г/л за 24 ч.

Процесс отличался еще и относительно низкими концентрациями примесей, таких как лактат, ацетальдегид и этанол, что значительно снижало себестоимость производства за счет экономии по выделению чистого глицерина из культуральной жидкости. Отмечено, что при крупно тоннажном производстве в процессе ферментации другие полиолы не накапливались, конверсия составляла 58%, а производительность до 30 г/л в сут. Это позволило в промышленных масштабах в условиях оптимизированной аэробной ферментации получать за несколько сут до 120 г чистого глицерина с литра культуральной жидкости.

Физиологические аспекты продукции глицерина

Обнаружено, что факторы окружающей среды, такие как температура, аэрация, pH среды, содержание фосфатов и азота, а также концентрация сахара и осмотический стресс, влияют на скорость процесса и выход глицерина, вырабатываемого дрожжами. На разных продуцентах глицерина показано, что оптимальная температура для его производства дрожжами, совпадает с оптимальной температурой роста организма. Например, самые высокие уровни глицерина были получены несколькими штаммами *S. cerevisiae*, *C. magnoliae* и *Z. rouxii nru* температуре от 30 до 35 °C [69] и *C. glycerinogenes* от 29 °C до 33 °C. При повышении температуры до 40 °C для *C. magnoliae* и 35 °C для *C. glycerinogenes* отмечено значительное снижение выхода глицерина. У некоторых штаммов винных дрожжей *S. cerevisiae* наблюдаются различия между температурами оптимальными для роста и для синтеза глицерина. Так для этих дрожжей оптимальной для роста является температура от 28 до 30 °C, а для продукции глицерина — от 20 до 25 °C [70]. Образование глицерина внутри клеток дрожжей *S. cerevisiae* может играть важную роль в низкотемпературном производстве многих сортов вина. Наличие глицерина в вине, конечно, в определенных пределах, указывает на его высокое качество и зрелость [71]. При изучении десяти различных винных штаммов *S. cerevisiae* было показано, что на выработку глицерина большое влияние оказывала температура, что позволило авторам в результате селекции выбрать штаммы, способные продуцировать глицерин при более низких температурах.

На уровень продукции глицерина у осмолотерантных дрожжей большое влияние оказывает степень аэрации [69, 72, 73]. При низких уровнях аэрации у *C. glycerinogenes* больше глюкозы превращалось в этанол и этилацетат, а выработка глицерина при этом значительно снижалась. В условиях высокой аэрации наблюдалось

существенное потребление глюкозы для роста биомассы клеток, но при этом выход этанола и глицерина заметно снижался [74]. При оптимальной концентрации растворенного кислорода (DO) для *C. glycerinogenes* уровень внутриклеточного глицерина составлял 1,34 мг/г сухого веса, при скорости потребления кислорода культурой около 16 мг/(г/ч) в 5-литровом ферментере [74]. На оптимальное значение DO для производства глицерина влияют и другие параметры процесса, такие как температура культивирования и компоненты среды, особенно концентрация фосфата, поэтому для каждого конкретного процесса необходим подбор условий. Так, продукция глицерина с помощью *S. cerevisiae* требует специальных условий с ограниченным содержанием кислорода. Барботирование диоксидом углерода или создание вакуума в ферментере заметно улучшило концентрацию глицерина и производительность ферментации [75–77].

Слабощелочные условия культивирования (pH 8,0) осмоотолерантных дрожжей *Zygosaccharomyces acidifaciens* заметно увеличивали выход глицерина и снижали содержание этанола в условиях микроаэрофильного культивирования [50]. Информации о влиянии различных компонентов питательных сред на продукцию глицерина дрожжами в открытой печати представлено мало. Так, в одном исследовании для *C. glycerinogenes*, было показано, что оптимальная концентрация общего фосфата для максимальной продукции глицерина в среде, содержащей 230 г/л глюкозы, составляет 65 мг/л [65, 68]. По данным авторов [78] синтез глицерина *S. cerevisiae* может усиливать круговорот фосфатов в клетке и, следовательно, увеличивать поток глюкозы через гликолиз.

Концентрация азота в форме мочевины мало влияет на выработку глицерина [72, 79, 68]. Источник азота в среде анаэробно выращенного *S. cerevisiae* оказывает значительное влияние на выход глицерина [79, 80]. В культурах, выращенных на солях аммония, выход глицерина более чем в два раза выше, чем в культурах, выращенных с использованием в качестве источника азота смеси аминокислот. Использование для роста культур солей аммония требует синтеза аминокислот «*de novo*», поэтому образовавшийся избыток НАДН окисляется путем синтеза глицерина. Увеличение концентрации сахара обычно приводит к большему синтезу глицерина дрожжами, что в первую очередь связано с большим осмотическим стрессом, налагаемым на организм [81, 82].

Изучено влияние АВ на образование глицерина при ферментации этанола дрожжами *Saccharomyces cerevisiae* в непрерывной культуре с использованием сорбита. Уменьшение

АВ среды с 0,994 до 0,971 привело к увеличению выхода глицерина в 3–4 раза. С целью поддержания АВ при ее снижении удельная скорость потребления глюкозы дрожжами увеличивалась. Полученные результаты свидетельствуют о том, что влияние АВ на продукцию глицерина может быть уменьшено путем контролируемой подачи субстрата во время ферментации в биореакторах [83]. У дрожжей *C. glycerinogenes* оптимальной концентрацией глюкозы следует считать ее содержание от 220 до 260 г в л питательной среды, однако скорость потребления глюкозы в периодической культуре снижалась в процессе культивирования. Это приводило к увеличению АВ в среде и, как следствие, к снижению биосинтеза глицерина, что ухудшало общую эффективность процесса [84].

Процесс получения глицерина путем микробной ферментации имеет долгую историю. Если рассматривать экономику этого процесса, то по своей рентабельности он всегда уступал получению глицерина из растительных и животных материалов в силу их низкой стоимости, как отходов различных производств. Наибольшего прогресса работы по созданию продуцента глицерина были достигнуты в Китае, где технология ферментации глицерина была доведена до стадии коммерческого производства. Примерно 10 000 т глицерина в год в настоящее время производится в этой стране путем микробного синтеза, который обеспечивает более 12% потребности в этом продукте. Успех этого коммерческого процесса был в значительной степени достигнут благодаря выделению новых дрожжей вида *Candida glycerinogenes*, способных ферментировать глюкозу в глицерин с высокой скоростью и конверсией [85, 86]. Для этих штаммов в кратчайшие сроки были разработаны эффективные технологии извлечения и очистки конечного продукта, что позволило микробному процессу успешно конкурировать с уже существующими химическими технологиями. Дальнейшие генно-инженерные манипуляции с диким штаммом *Candida glycerinogenes* [87] еще больше повысили экономическую эффективность использования дрожжей в биотехнологических процессах получения глицерина. В настоящее время не ясно, будет ли ферментативный процесс экономически жизнеспособным в других странах, где преобладают традиционные технологии, основанные на извлечении глицерина из жиров различных сельскохозяйственных продуктов. В Российской Федерации, например, по данным аналитического центра TEBIZ GROUP [88], в настоящее время производится около 110 000 т глицерина, что фактически позволяет полностью закрыть потребность российского рынка в этом продукте. Производство

основано на очистке до 99,5% импортируемого из Бразилии и Германии глицерина растительного происхождения. Последние годы характеризуются большой нестабильностью в потребности глицерина на мировом рынке. Остается надеяться, что быстро развивающаяся генетическая инженерия дрожжевых организмов наряду с фундаментальными знаниями вопросов метаболизма глицерина позволит в скором времени разработать конкурентно способные биотехнологические процессы, основанные на использовании высокопродуктивных и стабильных штаммов дрожжей и борьба за производство глицерина между химиками и биотехнологами продолжится.

ЛИТЕРАТУРА

1. Yancey P.H., Clark M.E., Hand S.C et al.. Living with water stress: of osmolyte systems. *Science*, 1982, 217, 1214–1222.
2. Grant W.D. Life at low water activity. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci.*, 2004, 359, 1249–1266. doi: 10.1098/rstb.2004.1502
3. Brown A.D. Compatible solutes and extreme water stress in eukaryotic microorganisms. *Adv. Microb. Physiol.*, 1978, 17, 181–242. doi: 10.1016/j. fm. 2017. 06. 014
4. Blomberg A., Adler L. Physiology of osmotolerance in fungi. *Adv Microb Physiol.*, 1992, 33, 145–212. doi: 10.1016/s0065-2911 (08) 60217-9
5. Babazadeh R., Lahtvee P.J., Adiels C.B., et al. The yeast osmotic stress response is carbon source dependent. *Sci. Rep.*, 2017, 7, 990–1001. doi.org/10.1038/s41598-017-01141-4
6. Blomberg A., Adler L. Roles of glycerol and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺) in acquired osmotolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, 1989, 171, 1087–1092. doi: 10.1128 / jb.171.2.1087-1092.1989
7. Andre L., Hemming A., Adler L. Osmoregulation in *Saccharomyces cerevisiae*: studies on the osmotic induction of glycerol production and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺). *FEBS Lett.*, 1991, 286, 13–17. doi.org/10.1016/0014-5793(91)80930-2
8. Hohmann S. Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2002, 66, 300–372. doi: 10.1128/MMBR.66.2.300-372.2002
9. Varela J.C.S., van Beekvelt C., Planta R.J., Mager W.H. Osmotic stress-induced changes in yeast gene expression. *Mol. Microbiol.* 1992, 6, 2183–2190. doi.org/10.1111/j.1365-2958.1992.tb01392.x
10. Brewster J.L., de Valoir T., Dwyer N.D., et al. An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science*, 1993, 259, 1760–1763. doi: 10.1126 / science.7681220
11. Albertyn J., Hohmann S., Thevelein J.M., Prior B.A. *GPD1*, which encodes glycerol-3-phosphate dehydrogenase is essential for growth under osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae* and its expression is regulated by the high-osmolarity glycerol response pathway. *Mol. Cell Biol.* 1994, 14, 4135–4144. doi: 10.1128 / mcb.14.6.4135
12. Luyten K., Albertyn J., Skibbe W.F., et al., Fps1, a yeast member of the MIP family of channel proteins, is a facilitator for glycerol uptake and efflux and is inactive under osmotic stress. *EMBO J.* 1995, 14, 1360–1371. doi: 10.1002 / j. 1460-2075. 1995.tb07122.x
13. Tamas M.J., Luyten K., Sutherland F.C., et al., Fps1p controls the accumulation and release of the compatible solute glycerol in yeast osmoregulation. *Mol. Microbiol.*, 1999, 31, 1087–1104. doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01248.x
14. Hohmann S. Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2002, 66, 300–372. doi: 10.1128/mmbr.66.2.300-372.2002
15. Edgley M., Brown A.D. Yeast water relations: physiological changes induced by solute stress in *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces rouxii*. *J. Gen. Microbiol.*, 1983, 129, 3453–3463. doi.org/10.1099/00221287-129-11-3453
16. Lages F., Silva-Graca M., Lucas C. (1999) Active glycerol uptake is a mechanism underlying halotolerance in yeasts: a study of 42 species. *Microbiology*, 1999, 145, 2577–2585. doi.org/10.1099/00221287-145-9-2577
17. Hohmann S. An integrated view on a eukaryotic osmoregulation system. *Curr. Genet.*, 2015, 61(3), 373–382. doi:10.1007/s00294-015-0475-0
18. de Lima Alves, F., Stevenson, A., Baxter, E., et al. Concomitant osmotic and chaotropicity-induced stresses in *Aspergillus wentii*: compatible solutes determine the biotic window. *Curr. Genet.*, 2015, 61, 457–477. doi:10.1007/s00294-015-0496-8
19. Siderius M., van Wuytswinkel O., Reijenga K. A., et al. The control of intracellular glycerol in *Saccharomyces cerevisiae* influences osmotic stress response and resistance to increased temperature *Mol. Microbiol.*, 2000, 36(6), 1381–1390. doi: 10.1046 / j. 1365-2958. 2000. 01955.x
20. Turk M., Cene Gostinčar G. Glycerol metabolism genes in *Aureobasidium pullulans* and *Aureobasidium subglaciale*. *Fungal. Biology*, 2018, 122(1), 63–73. doi.org/10.1016/j.funbio.2017.10.005
21. Causton H.C., Ren B., Koh S.S., et al. Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. *Mol. Biol. Cell*, 2001, 12, 323–337. doi: 10.1091 / mbc.12.2.323
22. Anderson R.M., Bitterman K.J., Wood J.G., et al, Manipulation of a nuclear NAD⁺ salvage pathway delays aging without altering steady-state NAD⁺ levels. *J. Biol. Chem.*, 2002, 277, 18881–18890. doi: 10.1074 / jbc.M111773200
23. Bakker B.M., Overkamp K.M., van Maris A.J., et al. Stoichiometry and compartmentation of NADH metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2001, 25, 15–37. doi: 10.1016/S0168-6445(00)00039-5

24. Ansell R., Granath K., Hohmann S., et al. The two isoenzymes for yeast NAD⁺-dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase encoded by *GPD1* and *GPD2* have distinct roles in osmoadaptation and redox regulation. *EMBO J.*, 1997, 16, 2179–2187. doi: 10.1093 / emboj / 16.9.2179
25. Bjorkqvist S., Ansell R., Adler L., Liden G. Physiological response to anaerobicity of glycerol 3-phosphate dehydrogenase mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, 63, 128–132. doi:10.1128/aem.63.1.128-132.1997
26. Norbeck J., Blomberg A. Metabolic and regulatory changes associated with growth of *Saccharomyces cerevisiae* in 1.4 M NaCl. Evidence for osmotic induction of glycerol dissimilation via the dihydroxyacetone pathway. *J. Biol. Chem.*, 1997, 272, 5544–5554. doi:10.1074/jbc.272.9.5544
27. Nissen T.L., Hamann C.W., Kielland-Brant M.C., et al. Anaerobic and aerobic batch cultivations of *Saccharomyces cerevisiae* mutants unpaired in glycerol synthesis. *Yeast* 2000, 16, 463–474. doi:10.1074/jbc.272.9.5544
28. Von Jagow G., Klingenberg M. Pathways of hydrogen in mitochondria of *Saccharomyces carlsbergensis*. *Eur. J. Biochem.*, 1970, 12, 583–592. doi: 10.1111 / j. 1432-1033. 1970.tb00890.x
29. van Heerden J.H., Wortel M.T., Bruggeman F.J., et al. Lost in transition: start-up of glycolysis yields subpopulations of nongrowing cells. *Science*, 2014, 343, 1245114. doi: 10.1126 / science.1245114
30. Dawson A.G. Oxidation of cytosolic NADH formed during aerobic metabolism in mammalian cells. *Trends Biochem Sci.*, 1979, 4, 171–176. doi.org/10.1016/0968-0004(79)90417-1
31. Michnick S., Roustan J.L., Remize F., et al. Modulation of glycerol and ethanol yields during alcoholic fermentation in *Saccharomyces cerevisiae* strains overexpressed or disrupted for *GPD1* encoding glycerol 3-phosphate dehydrogenase. *Yeast*, 1997, 13, 783–793. doi: 10.1002/(SICI)1097-0061(199707)13:9<783
32. Roustan J.L., Salblayrolles J.M., Barre P., Dequin S. Glycerol overproduction by engineered *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains leads to substantial changes in by-product formation and to a stimulation of fermentation rate in stationary phase. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, 65, 143–149. doi:10.1128/aem.65.1.143-149.1999
33. Bakker B.M., Overkamp K.M., van Maris A.J., et al. Stoichiometry and compartmentation of NADH metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2001, 25, 15–37. doi.org/10.1111/j.1574-6976.2001.tb00570.x
34. Thevelein JM, Hohmann S. Trehalose synthase: guard to the gate of glycolysis in yeast? *Trends Biochem. Sci.*, 1995, 20, 3–10. doi: 10.1016/s0968-0004(00)88938-0
35. van Heerden J.H., Wortel M.T., Bruggeman F.J., et al. Lost in transition: start-up of glycolysis yields subpopulations of nongrowing cells. *Science*, 2014, 343(6174), 1245114. doi.org/10.1126/science.1245114
36. Inouye M., Phadtare S. Cold shock response and adaptation at near-freezing temperature in cold-adapted yeasts: Cold-Adapted yeast. Bussinii P. and Margesin (eds.) Springer-Verlage Berlin Heidelberg, 2014, 243–257. doi.org/10.1007/978-3-642-39681-6_11
37. Panadero J., Pallotti C., Rodríguez-Vargas S., et al. A Downshift in temperature activates the high osmolarity glycerol (HOG) pathway, which determines freeze tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 2006, 281(8), 4638–4645. doi.org/10.1074/jbc.M512736200
38. Ernst R., Fishing C.S., Antonny B. Homeoviscous adaptation and the regulation of membrane lipids. *J. Mol. Biol.*, 2016, 428, 4776–4791. doi:10.1016/j.jmb.2016.08.013
39. Inouye M., Phadtare S. Cold shock response and adaptation at near-freezing temperature in microorganisms. *Sci. STKE*, 2004, 237, 26–34. doi:10.1126/stke.2372004pe26
40. Gunde-Cimerman N., Plemenitas A., Oren A. Strategies of adaptation of microorganisms of the three domains of life to high salt concentrations. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2018, 42(3), 353–375. doi:10.1093/femsre/fuy009
41. Nicol, R.W., Marchand, K., Lubitz, W.D. Bioconversion of crude glycerol by fungi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2012, 93(5), 1865–1875. doi:10.1007/s00253-012-3921-7
42. Hochachka, P.W. and Somero, G.N. Isolation of the oleaginous yeasts from the soil and studies of their lipid-producing. *Biochemical Adaptation: Mechanism and Process in Physiological Evolution*. Oxford University Press, 2002, Oxford, UK, 466.
43. Al-Fageeh M.B. and Smales C.M. Control and regulation of the cellular responses to cold shock: the responses in yeast and mammalian systems. *Biochem. J.*, 2006, 397(2), 247–259. doi: 10.1042/BJ20060166
44. Martin C.E., Oh C.S., Kandasamy P. Yeast desaturases. *Biochem. Soc. Trans.*, 2002, 30(6), 1080–1082. doi: 10.1042/BST0301080
45. Kandror O., Bretschneider N., Kreydin E., et al. Yeast adapt to near-freezing temperatures by *STRE/Msn2,4*-dependent induction of trehalose synthesis and certain molecular chaperones. *Molecular. Cell.*, 2004, 13(6), 771–781. doi: 10.1016/s1097-2765(04)00148-0
46. Gibney P.A., Schieler A., Chen J.C., et al. Characterizing the in vivo role of trehalose in *Saccharomyces cerevisiae* using the AGT1 transporter. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2015, 112(19), 6116–6121. doi.org/10.1073/pnas.1506289112
47. Petitjean M. Yeast Tolerance to Various Stresses Relies on the Trehalose-6P Synthase (Tps1) Protein, Not on Trehalose. *J. Biol. Chem.*, 2015, 290(26), 16177–16190. doi:10.1074/jbc.M115.653899
48. Panadero J., et al. A downshift in temperature activates the high osmolarity glycerol (HOG) pathway, which determines freeze tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 2006, 281(8), 4638–4645. doi.org/10.1074/jbc.M512736200
49. Nickerson W.J., Carroll W.R. On the metabolism of *Zygosaccharomyces*. *Arch. Biochem.*, 1945, 7, 257–271.

50. Spencer J.F.T., Shu P. Polyhydric alcohol production by osmophilic yeasts: effect of oxygen tension and inorganic phosphate concentration. *Can. J. Microbiol.*, 1957, 3, 559–567. doi: 10.1139/m57-061
51. Onishi H., Saito N., Koshiyama I. Studies on osmophilic yeasts. Part XI. Various factors affecting on polyalcohol production by *Pichia miso*. *Agric. Biol. Chem.*, 1961, 25, 124–130. doi.org/10.1080/00021369.1961.10857784
52. Onishi H. Osmophilic yeasts. *Adv. Food Res.*, 1963, 12, 53–94. doi:10.1016/s0065-2628(08)60006-3
53. Zhang S.Z., Yang X.W., Wang H.L. A study on production of glycerol and arabitol by osmophilic yeasts: II. The condition for production of arabitol by *Hansenula arabitolgenes*. *Fang. Acta Microbiol. Sin.*, 1963, 9, 134–139.
54. Zhuge J. A study on glycerol production by fermentation with a new strain of osmophilic yeast. *Kexue Tongbao (Sci Bull Sin)*, 1973, 18, 188–189.
55. Kumar J., Agarwal S.C., Basu S.K., Spivastava O.P. Isolation, evaluation and taxonomic characterization of some glycerol producing osmotolerant yeasts. *Biol. Membr.*, 1989, 15, 129–135.
56. Petrovska B., Winkelhausen E., Kuzmanova S. Glycerol production by yeasts under osmotic and sulfite stress. *Can. J. Microbiol.*, 1999, 45, 695–699. doi: 10.1139/w99-054
57. Hawary, H.; Rasmey, A.M.; Aboseidah, A.A., et al. Enhancement of glycerol production by UV-mutagenesis of the marine yeast *Wickerhamomyces anomalus* HH16: kinetics and optimization of the fermentation process. *Biotech.*, 2019, 9(12), 446. doi: 10.1007/s13205-019-1981-4
58. Cueto-Rojas H.F., van Maris A.J., Wahl S.A., Heijnen J.J. Thermodynamics-based design of microbial cell factories for anaerobic product formation. *Trends Biotechnol.*, 2015, 33(9), 534–546. doi:10.1016/j.tibtech.2015.06.010
59. Hajny G.J., Hendershot W.F., Peterson W.H. Factors affecting glycerol production by a newly isolated osmophilic yeast. *Appl. Microbiol.*, 1960, 8, 5–11. doi:10.1128/aem.8.1.5-11.1960
60. Kim SY, Park SS, Jeon YJ, Seo JH Analysis of fermentation characteristics for production of erythritol by *Candida sp.* *Korean J. Food Sci. Technol.*, 1996, 28, 935–939.
61. Yu J.H., Lee D.H., Oh Y.J., et al. Selective utilization of fructose to glucose by *Candida magnoliae*, an erythritol producer. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2006, 132, 870–879.
62. Groleau, D., Chevalier, P., and Yuen, T.H. Production of polyols and ethanol by the osmophilic yeast *Zygosaccharomyces rouxii*. *Biotechnol. Lett.*, 1995, 17, 315–320. doi:10.1007/BF01190645
63. Parekh S.R., Pandey N.K. Production of glycerol by *Hansenula anomala*. *Biotechnol. Bioeng.*, 1985, 27, 1081–1091. doi.org/10.1002/bit.260270727
64. Zhuge J. A study on glycerol production by fermentation with a new strain of osmophilic yeast. *Kexue Tongbao (Sci Bull Sin)*, 1973, 18, 188–189.
65. Nevoigt E., Stahl U. Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, 1997, 21(3), 1997, 231–241 doi.org/10.1111/j.1574-6976.1997.tb00352.x
66. Zhuge J., Fang H.Y., Wang Z.X., et al. Glycerol production by a novel osmotolerant yeast *Candida glycerinogenes*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2001, 55, 686–692. doi:10.1007/s002530100596
67. Zhuge J. Glycerol produced by osmotolerant yeast from sweet potato starch. *Gongye Weishengwu (Ind. Microbiol.)*. 1974, 2, 1–9.
68. Spencer J.F.T., Shu P. Polyhydric alcohol production by osmophilic yeasts: effect of oxygen tension and inorganic phosphate concentration. *Can. J. Microbiol.*, 1957, 3, 559–567. doi: 10.1139/m57-061
69. Gardner N., Rodrigue N., Champagne C.P. Combined effects of sulfites, temperature and agitation time on production of glycerol in grape juice by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1993, 59, 2022–2028. doi:10.1128/aem.59.7.2022-2028.1993
70. Yu-Ting Gao, Zhang Yu-Shu, Xiang Wen, et al. The glycerol and ethanol production kinetics in low-temperature wine fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains. *Food Scien. Technol.*, 2019, 54(1), 102–110.
71. Peterson W.H., Hendershot W.F., Hainy G.J. Factors affecting production of glycerol and D-arabitol by representative yeasts of the genus *Zygosaccharomyces*. *Appl. Microbiol.*, 1958, 6, 349–356.
72. Hajny G.J., Hendershot W.F., Peterson W.H. Factors affecting glycerol production by a newly isolated osmophilic yeast. *Appl. Microbiol.*, 1960, 8, 5–11. doi:10.1128/aem.8.1.5-11.1960
73. Jin H.R., Fang H.Y., Zhuge J. Effect of oxygen supply on the production of glycerol by osmotolerant *Candida glycerolgenesis*. *Chin. J. Biotechnol.*, 2000, 16, 203–206.
74. Kalle G.P., Naik S.C., Lashkari B.Z. Improved glycerol production from cane molasses by the sulfite process with vacuum or continuous carbon dioxide sparging during fermentation. *J. Ferment Technol.*, 1985, 63, 231–237. Corpus ID: 88747616
75. Bisping B., Hecker R., Rehm H.J. Glycerol production by semicontinuous fed-batch fermentation with immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1989, 32, 119–123. doi:10.1007/BF00165873
76. Hecker D., Bisping B., Rehm H.J. Continuous glycerol production by the sulphite process with immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1990, 32, 627–632. doi: 10.1007/BF00164730
77. Thevelein J.M., Hohmann S. Trehalose synthase: guard to the gate of glycolysis in yeast? *Trends Biochem. Sci.*, 1995, 20, 3–10. doi:10.1016/S0968-0004(00)88938-0
78. Omori T., Takashita H., Omori N., Shimoda M. High glycerol producing amino acid analogue-resistant

- Saccharomyces cerevisiae* mutant. *J. Ferment. Bioeng.*, 1995, 80, 218–222. doi:10.1016/0922-338X(95)90819-L
79. Albers E., Larsson C., Liden G., et al. Influence of the nitrogen source of *Saccharomyces cerevisiae* anaerobic growth and product formation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996, 62, 3187–3195. doi:10.1128/aem.62.9.3187-3195.1996
80. Vijaikishore P., Karanth N.G. Glycerol production by fermentation — a review. *Proc. Biochem.*, 1986, 21, 54–57. doi:10.1007/BF02798490
81. Andre L., Hemming A., Adler L. Osmoregulation in *Saccharomyces cerevisiae*: studies on the osmotic induction of glycerol production and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺). *FEBS Lett.*, 1991, 286, 13–17. doi:10.1016/0014-5793(91)80930-2
82. Albertyn J., Hohmann S., Thevelein J.M., Prior B.A. GPD1 encoding glycerol-3-phosphate dehydrogenase is essential for growth under osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae* and its expression is regulated by the highosmolarity glycerol response pathway. *Mol. Cell. Biol.*, 1994, 14, 4135–4144. doi:10.1128/MCB.14.6.4135
83. Kenyon C.P., Prior B.A., Van Vuuren H.J.J. Water relations of ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*: glycerol production under solute stress. *Enzyme Microb. Technol.*, 1986, 8, 461–464. doi:10.1016/0141-0229(86)90047-5
84. Wang Z.X., Zhuge J., Fang H.Y. A new osmotolerant glycerol- highly-producing species of *Candida sp.*— *Candida glycerolgenesis* Zhuge sp. nov. *Acta Microbiol. Sin.*, 1999, 39, 68–74.
85. Wang Z.X., Zhuge J., Cao Y., Chen J., Fang H.Y. The key enzymes of metabolism of glycerol in *Candida glycerolgenesis*. *Acta Microbiol. Sin.*, 2000, 40, 180–187 Corpus ID: 23199287
86. Zhuge J., Fang H.Y. Glycerol production by aerobic fermentation. Chinese Patent, 1994, CN 1110321A.
87. Chen X.Z., Fang H.Y., Rao Z. M. (2008). Cloning and characterization of a NAD⁺-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase gene from *Candida glycerinogenes*, an industrial glycerol producer. *FEMS Yeast Res.*, 2008, 8(5), 725–734. doi:10.1111/j.1567-1364.2008.00382.x
88. <https://tebiz.ru/assets/pdf/mi/rynok-glitsierina-v-rossii.pdf>

The Biological Role of Glycerol in Yeast Cells. Yeast as Glycerol Producers

M.M. VUSTIN^{1,2*}

¹ State Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms of National Research Center “Kurchatov Institute”, Moscow, 117545, Russia

² National Research Center «Kurchatov Institute», Moscow, 123182, Russia

*e-mail: vustinmm@genetika.ru, vustin.mm@gmail.com

Received September 3, 2020

Revised October 24, 2020

Accepted December 1, 2020

Abstract—This review contains information about the physiological role of glycerol as an osmoprotective and cryoprotective factor in the vital activity of yeast cells. The significance of the glycerol biosynthesis in yeast when cultured under anaerobic and microaerophilic conditions is shown. The dependence of the glycerol production by yeast on the cultivation conditions and the composition of nutrient media is discussed. The publications on glycerol production by various taxonomic yeast groups have been analyzed. Based on the studied literature material, prospects of using yeast organisms as producers of glycerol by fermentation are predicted.

Key words: glycerol, yeast, hyperosmotic stress, fermentation

doi: 10.21519/0234-2758-2020-36-6-6-16