

УДК 663.252.41;663.2

ВЛИЯНИЕ СВЕРХОПТИМАЛЬНЫХ ТЕМПЕРАТУР НА СВОЙСТВА ПРИРОДНЫХ ДРОЖЖЕЙ *S.CEREVISIAE*

Е. С. Магомедова, Д. А. Абдуллабекова

Прикаспийский институт биологических ресурсов ДНЦ РАН

Показаны максимальные температурные границы роста природных дрожжей *S.cerevisiae*. Выявлена способность культур, инкубированных при повышенной температуре, к обратимой морфологической перестройке. Биотехнологические свойства штаммов, выращенных в условиях оптимальных и сверхоптимальных температур, не имели отличий.

Maximal growth temperatures for *S. cerevisiae* yeast are shown. Ability of, incubated at high temperature, culture to reversible morphological displacement is defined. Biological properties of strains, cultivated under optimal and super-optimal temperatures have not exposed any differences.

Ключевые слова: дрожжи; виноград; температура; адаптация; метаболизм; биотехнология.

Keywords: yeast; grapes; temperature; adaptation; metabolism; biotechnology.

Дрожжевые организмы в природе обитают преимущественно на богатых сахарами субстратах: плодах, листьях, цветах, где они питаются прижизненными выделениями и раневыми соками растений, нектаром, мертвой фитомассой и т.д. Многочисленные факторы среды обитания – температура, влажность, солнечная радиация, вид растения, его физиологическая активность, химический состав экссудатов – влияют на развитие дрожжей [1]. Одним из важнейших факторов, определяющих ареал и оказывающих селекционирующее влияние на популяции, является температура. Известно, что большинство дрожжей, эволюционно сложившихся как мезофилы, способно развиваться при 0...5°C, с наибольшей скоростью растет при 20...30°C и имеет максимальную температуру, при которой наступает необратимая инактивация клеточных компонентов, в пределах 30...40°C. Температурный диапазон развития дрожжей зависит от таксономической принадлежности и для каждого рода, вида и даже штамма может быть индивидуален.

При повышении температуры выше оптимальной рост дрожжей замедляется или прекращается совсем. В большинстве случаев параллельно с увеличением температуры снижается скорость роста и происходит гибель клеток. Стрессовые воздействия, включая тепловой шок, приводят к глобальным изменениям метаболизма клетки, вызывая повреждение мембран, денатурацию и агрегацию клеточных белков. В ответ на изменение окружающей среды микроорганизмы способны включать специальные механизмы адаптации, что обеспечивает их выживание и конкурентоспособность.

Обычно природные формы, обладающие широкой нормой реакции, имеют низкий уровень метаболизма. После выделения культур, имеющих практическое применение, из естественных источников обитания до их использования в производстве они сталкиваются с новыми условиями существования, поэтому важно, чтобы они обладали достаточной гибкостью, определенной степенью фенотипической и генотипической изменчивости. При изучении индивидуальных особенностей каждой отдельной культуры, позволяющем выявить необходимые полезные свойства, возникает проблема обеспечения их постоянства, а по возможности и улучшения в последующих генерациях.

Таким образом, интересы производства, определяющие выбор дрожжей, обуславливают необходимость изучения их потенциальных возможностей, в том числе в зависимости от влияния различных факторов среды.

В большой мере это касается культур *S. cerevisiae*, применяемых во многих отраслях промышленности и являющихся целевым продуктом при производстве их в виде прессованных и сушеных дрожжей [2]. Ряд производств заинтересован в штаммах, способных нормально размножаться при супраоптимальных и даже максимальных температурах, их использование позволит значительно интенсифицировать технологические процессы. Известно, что развитие одних штаммов, принадлежащих к данному виду, может происходить в интервале от 1 до 40°C, других – от 0 до 42°C [3, 4].

В связи с изложенным представляет интерес исследование дрожжей *S. cerevisiae*, изолированных из естественных местообитаний, на устойчивость к температуре, способной при определенных значениях стать основным фактором, влияющим на их развитие и формирование функциональных свойств.

Цель данной работы – исследование влияния сверхоптимальной температуры на морфологические и физиолого-биохимические свойства дрожжей *S. cerevisiae*, выделенных из природного дрожжевого комплекса винограда.

Объект и методы исследований

Объект изучения – природные штаммы, изолированные с поверхности ягод винограда, который адаптирован к условиям микрорайона, расположенного вблизи бархана Сарыкум, где под его воздействием создается микроклимат, характеризующийся повышенной теплообеспеченностью [4].

Штаммы тестировали на способность к росту при температуре, находящейся в пределах оптимальной – 27°C (контроль), и сверхоптимальной – 37, 39, 40, 41, 42, 43, 44°C (опыт). В работе использовали двух-трехсуточные культуры, которые рассеивали на агаризованное виноградное сусло в чашках Петри и инкубировали при указанных температурных режимах.

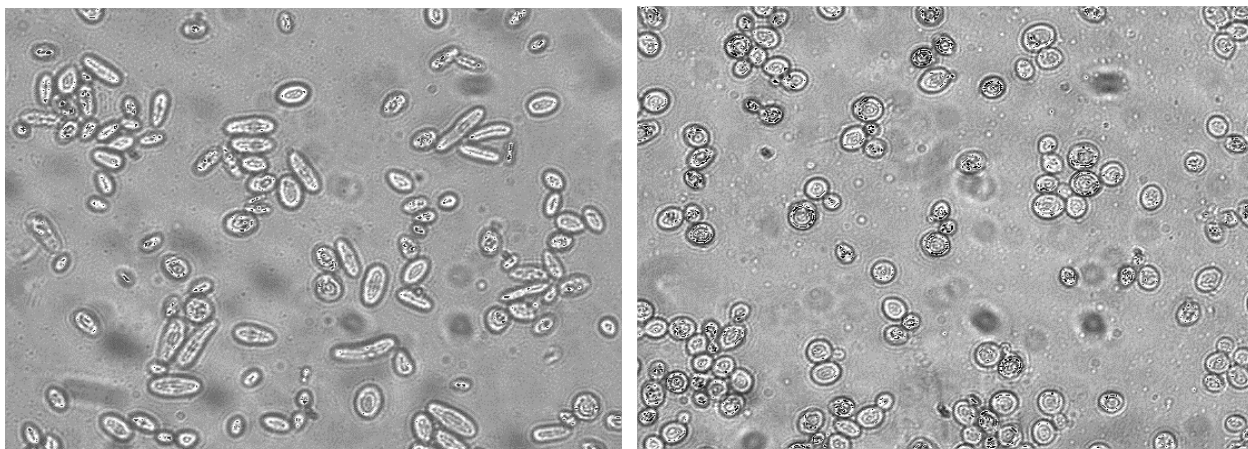
При исследовании биотехнологических свойств дрожжей использовали методы, принятые в винодельческом производстве и изложенные в соответствующих стандартах [5, 6].

Результаты и их обсуждение

Размножение клеток во всех вариантах наблюдали уже на вторые сутки, однако с повышением температуры выше 39°C количество изолятов, способных к размножению, уменьшалось, а штрих культуры становился менее обильным по сравнению с контролем. При 43°C отмечали слабый рост биомассы только у единичных штаммов, что, по нашему мнению, может быть обусловлено акклиматизацией первых поколений этих дрожжей к повышенной теплообеспеченности, присущей естественной среде обитания. Следует отметить, что у отдельных клеток, выращенных при 42–43°C, наблюдали разрыв стенки.

По данным, полученным при выявлении температурного диапазона роста клеток дрожжей *S. cerevisiae*, изолированных с винограда этого биотопа, проведенном ранее, минимальное значение составляло 3°C [7], а максимальное у разных штаммов находилось в пределах 40...43°C. Возможно, наблюдаемый сдвиг температурных границ роста *S. cerevisiae* в более высокую область, по сравнению со значениями, характерными для большинства представителей этого вида, обусловлен биотопической приуроченностью изучаемых штаммов.

Во всех опытных вариантах, выращенных при значениях температур выше 36°C, считающейся для них критической, отмечали морфологическую перестройку – эллипсоидная форма, характерная для сахаромецетов, сменялась на округлую, почти шаровидную (см. рисунок). Цвет штрих-культур по сравнению с контролем, приобретал более темный оттенок и характеризовался как темно-бежевый.



а

б

Клетки дрожжей, выращенные при: а – оптимальной (27°C) и
б – повышенной температуре (39°C)

По результатам эксперимента провели скрининг штаммов, устойчивых к температуре 43°C, потенциал которых может представлять интерес для селекции термотолерантных форм и их использования в биотехнологии.

По множеству признаков, применяемых для учета изменчивости микроорганизмов – морфология, структурно-химические особенности клеток, культуральные свойства, антигенность, различают наследуемые мутации, ненаследуемые модификации и наследуемые длительные фенотипические модификации [8].

Наблюдаемая нами изменчивость формы клеток и цвета биомассы опытных культур, по-видимому, возникает как приспособительный признак при тепловой адаптации. Для выявления стабильности приобретаемых признаков скрининговые культуры, наиболее устойчивые к росту при максимальной температуре, инкубировали на полноценной питательной среде – агаризованном виноградном соке, в течение 48 ч при 37°C и 39°C. Полученную биомассу пересевали на такую же среду и выращивали при 27°C. При возврате дрожжей в наиболее благоприятные условия клетки восстанавливали свою первоначальную форму и цвет штрих-культуры, что свидетельствует о нестабильности данных признаков. Можно предположить, что это связано с непродолжительным периодом воздействия супраоптимальной температуры, однако, известно, что при получении термотолерантных форм дрожжей, даже после их продолжительной адаптации (месяцы, годы), при переходе к оптимальному тепловому режиму возможно восстановление исходных свойств [9]. Этот факт может объясняться тем, что не у всех штаммов, инкубируемых при высоких температурах, включение стабильных метаболических циклов, обеспечивающих длительность модификационных изменений, зависит от времени ее воздействия. Очевидно, что характер поведения исследуемых нами природных штаммов, устойчивых к росту при температуре 43°C, лежащей за пределами максимального значения, которое отмечается для этого вида дрожжей, также обусловлен фенотипической пластичностью в пределах генотипа.

При изучении физиолого-биохимических свойств морфологически перестроенных клеток основное внимание было уделено функциональным, характеризующим их метаболизм и одновременно отражающим практическую ценность штаммов. Совокупность этих признаков должна обеспечить эффективное использование дрожжей как производственной культуры, в том числе при использовании в виноделии, где они являются главным звеном технологической цепи.

Исследование биотехнологического потенциала пяти штаммов проводилось по определению скорости сбраживания углеводов, способности к образованию этанола, продуцированию диоксида серы, летучих кислот, изменению комплекса органических кислот, фенольных соединений.

О скорости утилизации сахаров судили по весу выделившегося диоксида углерода, образованного при брожении 80 мл виноградного сусла с концентрацией сахаров 18.8 г/100 см³, не препятствующей нормальному брожению. Опыты ставили в склянках емкостью 100 см³, снабженных специальным устройством [5]. Количество этанола, сахаров, титруемых и летучих кислот определяли в соответствии с действующими ГОСТами, фенольных – перманганометрическим методом [6].

Культуры, выращенные на твердой среде в течение двух суток при температуре 27°C и 39°C, контроль и опыт соответственно, инокулировали в стерильное виноградное сусло, которое сбраживалось при температуре 22–23°C.

Состав субстратов, сброженных на штамме, выращенном при различных температурах

Показатели	Температура выращивания культуры, °C	
	27 (контроль)	39 (опыт)
Количество выделившегося CO ₂ , г	6.6	6.7
Спирт, % об.	11.6	11.6
Массовая концентрация:		
остаточных сахаров, г/100 см ³	0.2	0.2
титруемых кислот, г/дм ³	7.7	7.5
летучих кислот, г/дм ³	0.5	0.5
фенольных соединений, мг/дм ³	180.5	175.5
диоксида серы (общий), г/дм ³	14.3	14.3

Результаты изучения энергии брожения показали, что клетки, выращенные при оптимальной и сверхоптимальной температуре, завершили процесс одновременно, утилизируя при

этом одинаковое количество углеводов, о чем свидетельствует объем выделившегося диоксида углерода. При анализе состава сброженных субстратов обнаружено, что концентрации компонентов во всех опытных вариантах практически не отличались от контрольных, что видно из таблицы, где представлены данные по одному из исследованных штаммов. На основании полученных сведений можно сделать вывод, что выращивание дрожжей при сверхоптимальной температуре в течение 48 ч, впоследствии практически не повлияло на их биохимическую функцию, определяющую технологические свойства дрожжей при брожении виноградного сусла.

Результаты изучения влияния температуры на свойства дрожжей *S. cerevisiae*, выделенных из природных местообитаний, показали, что у отдельных изолятов, прошедших акклиматизацию в условиях повышенной теплообеспеченности, границы роста смещены в более высокую область. При ассимиляции углеводов в течение 48 ч в условиях сверхоптимального для мезофилов температурного режима (37°C и 39°C) отмечена способность этих культур к активному росту и изменению фенотипа, который носит характер ненаследуемых модификаций. Показано, что по функциональным свойствам, играющим ключевую роль при брожении, опытные дрожжи не отличались от контрольных, выращенных при оптимальной температуре. Отмеченная устойчивость штаммов к тепловому воздействию, обусловленная экологическим потенциалом местности, свидетельствует о целесообразности поиска природных форм, метаболический статус которых представляет интерес для бродильных производств и получения дрожжей как целевого продукта.

ЛИТЕРАТУРА

1. Глушакова А.М., Чернов И.Ю. Сезонная динамика структуры сообществ эпифитных дрожжей // Микробиология. 2010. Т. 79, № 6. С. 1–11.
2. Мартыненко Н.Н. Биотехнологические основы высокоэффективных препаративных форм дрожжей рода *Saccharomyces*: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Щелково, 2009. 48 с.
3. Шигаева М.Х. Селекция дрожжей. Алма-Ата: Наука, 1975. 148 с.
4. Абрамов Ш.А., Абдуллабекова Д.А., Магомедова Е.С. Дрожжевая флора винограда экосистемы бархана Сарыкум // Виноград и вино России. 2006. № 4. С. 20–22.
5. Теория и практика виноделия / Ж. Риборо-Гайон, Э. Пейно, П. Риборо-Гайон, П. Сюдро. М.: Пищ. пром-ть, 1980. Т. 2. 352 с.
6. Государственный контроль качества винодельческой продукции. М.: Изд-во стандартов, 2003. 872 с.
7. Абдуллабекова Д.А., Магомедова Е.С. Температурный диапазон развития дрожжей растительных субстратов, культивируемых в природных условиях Дагестана // Материалы Междунар. науч.-техн. конф. «Наука и образование-2009», г. Мурманск, Россия. 1–9 апреля 2009 г. Мурманск: МГТУ, 2009. С. 64–644.
8. Елинов Н.П. Химическая микробиология. М.: Высш. шк., 1989. 448 с.
9. Логинова Л.Г., Головачева Р.С., Егорова Л.Г. Жизнь микроорганизмов при высоких температурах. М.: Наука, 1966. 112 с.

Поступила в редакцию 05.10.2011 г.
Принята к печати 30.09.2013 г.