

DOI 10.31029/vestdnc96/5

УДК 663.125/663.252.4

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* В ПРОЦЕССЕ АДАПТАЦИИ К ЭКСТРЕМАЛЬНЫМ УСЛОВИЯМ

Э. А. Исламмагомедова, ORCID: 0000-0002-9897-1256

Э. А. Халилова, ORCID: 0000-0003-1974-2840

А. А. Абакарова, ORCID: 0000-0003-0888-9580

Прикаспийский институт биологических ресурсов Дагестанского
федерального исследовательского центра РАН, Махачкала, Россия

MORPHOLOGICAL PROPERTIES OF THE YEAST *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* IN THE PROCESS OF ADAPTATION TO EXTREME CONDITIONS

E. A. Islammagomedova, ORCID: 0000-0002-9897-1256

E. A. Khalilova, ORCID: 0000-0003-1974-2840

A. A. Abakarova, ORCID: 0000-0003-0888-9580

Precaspian Institute of Biological Resources of the
Daghestan Federal Research Centre of RAS, Makhachkala, Russia

Аннотация. Изучены морфологические свойства дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* Y-503 и DAW-3a в процессе адаптации к экстремальным значениям температуры, NaCl и pH в составе твердой среды культивирования дрожжей. При 30°C форма клеток штамма *S. cerevisiae* Y-503 в основном была овальной, с увеличением температуры до 37°C – более округлой; обнаружено наибольшее количество удлинённых форм в кислых средах и отсутствие их в щелочной среде. Характерной особенностью штамма DAW-3a при всех режимах культивирования являлась округлая форма клеток. Отмечено, что при оптимальных условиях размеры клеток, особенно Y-503, увеличивались. Минимальные размеры клеток во всех вариантах выявлены в кислых средах при pH 3,0; повышение концентрации NaCl в среде также приводило к уменьшению их размера. При 30°C и pH 3,0; 4,5; 7,0; 9,0; 11,0 размеры гигантских колоний *S. cerevisiae* Y-503 значительно превосходили показатели DAW-3a; pH 4,5 являлся оптимальным для роста дрожжей. В условиях повышенной температуры 37°C и 5, 10, 15, 20% NaCl в среде штаммы идентично реагировали на стресс, при этом более комфортными для роста дрожжей являлись варианты с нейтральным и щелочным pH. Исследование толерантности дрожжей *S. cerevisiae* Y-503 и DAW-3a к экстремальным условиям представляет интерес для возможного использования стрессоустойчивых штаммов в различных биотехнологиях.

Abstract. The morphological properties of the *Saccharomyces cerevisiae* Y-503 and DAW-3a yeasts have been studied in the process of adaptation to extreme values of temperature, NaCl and pH in the composition of a solid yeast culture medium. At 30°C, the cell shape of the *S. cerevisiae* Y-503 strain is mostly oval, with an increase in temperature to 37°C – more rounded; the largest number of elongated forms are found in acidic media and their absence in an alkaline medium. The characteristic feature of the DAW-3a strain in all cultivation modes is the rounded shape of the cells. It is noted that under optimal conditions, cell size, especially Y-503, increases. The minimum cell sizes in all variants are found in acidic media at pH 3.0; an increase in the concentration of NaCl in the medium also leads to a decrease in size. At 30°C and pH 3.0; 4.5; 7.0; 9.0; 11.0, the sizes of giant colonies of *S. cerevisiae* Y-503 significantly exceed those of DAW-3a; pH 4.5 is optimal for yeast growth. At elevated temperatures of 37°C and 5, 10, 15, 20% NaCl in the medium, the strains react identically to stress, while variants with neutral and alkaline pH are more comfortable for yeast growth. The study of the tolerance of *S. cerevisiae* yeast Y-503 and DAW-3a to extreme conditions is of interest for possible use of stress-resistant strains in various biotechnologies.

Ключевые слова: стрессоустойчивые штаммы дрожжей, морфологические свойства, биотехнологии.

Keywords: stress-resistant yeast strains, morphological properties, biotechnology.

Исследование толерантности дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* к экстремальным условиям представляет как научный, так и практический интерес [1, 2]. Существенными факторами, влияющими на физиологическую активность дрожжей, являются температурный и осмотический стресс, pH среды [2–5]. В адаптации к данным видам стресса важную роль играют митохондрии, ферменты антиоксидантной защиты, перегруппировка и изменение концентрации липидов – основных компонентов клеточной мембраны и углеводов клеточной стенки [6, 7]. Однако как в экстремальных природных условиях, так и в биотехнологических процессах дрожжи могут подвергаться одновременному влиянию нескольких стресс-факторов, при этом последствия их воздействия на метаболизм клетки существенно отличаются

[8]. Известно, что полиплоидия, влияющая на жизнеспособность дрожжей, также является одним из механизмов адаптации в экстремальных условиях [9]. Изучение морфологических свойств, отражающих биохимические изменения в метаболизме дрожжей в условиях стресса [10], важно для получения результатов анализа адаптивных способностей *S. cerevisiae* и разработки биотехнологий с использованием стрессоустойчивых штаммов [11].

Цель исследования – изучение морфологических особенностей дрожжей различной плоидности – *S. cerevisiae* Y-503 и DAW-3a в процессе адаптации к экстремальным значениям pH, температуры и NaCl.

Материалы и методы исследований

В данной работе использовались штаммы *S. cerevisiae* Y-503 (гетерозиготный тетраплоид), полученный в результате лазерного воздействия в Прикаспийском институте биологических ресурсов ДФИЦ РАН [12], и DAW-3a (гетероталличный гаплоид), являющийся потомком линии Y-503 [13].

Гигантские колонии выращивались на чашках Петри в течение двадцати суток при температуре 30°C и 37°C. В состав среды YPD входили 2,0% D-глюкозы (Merk, Германия); 0,5% дрожжевого экстракта (BD, США); 0,5% пептона (BD, США); 2,5% агар-агара (Difco, Нидерланды). Различные варианты сред содержали NaCl в концентрации 5, 10, 15, 20%. Значения pH составляли 3,0; 4,5; 7,0; 9,0; 11,0 – кислотность среды корректировалась 4М КОН или 1N HCL (Россия). Приборы, используемые в эксперименте: микроскоп CX21 (Olympus, Япония), микробиологический инкубатор BINDERBF 115 (Германия), ламинарный бокс ВЛ-12 1000 (Россия), весы аналитические DV215CD (Ohaus Discovery, Швейцария), pH-метр Анион 4100 (Анион, Россия), сушильный шкаф SNOL 67/350 (Utenos, Литва).

Эксперимент включал три повторных опыта. Статистическую обработку результатов, полученных в процессе работы, проводили методом малой выборки.

Результаты исследований

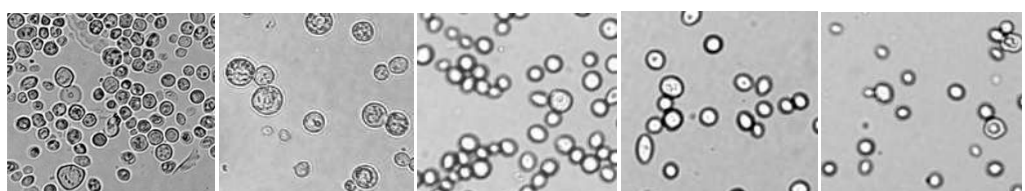
В результате морфометрического анализа обнаружена зависимость формы клеток дрожжей *S. cerevisiae* Y-503 и DAW-3a от pH при температуре 30°C. Для клеток штамма Y-503 в основном характерна овальная и овально-округлая форма (40–60%), в зависимости от pH среды появлялись удлиненные – до 40% (при pH 3,0) и яйцеобразные (при pH 7,0; 9,0) клетки. Форма клеток DAW-3a была округлой (до 90%) при всех значениях pH. Таким образом, в широком диапазоне значений pH для тетраплоидных клеток Y-503 отмечено разнообразие форм, для гаплоидных клеток DAW-3a – округлая форма.

Таблица 1. Зависимость размеров клеток (мкм) дрожжей *S. cerevisiae* Y-503 и DAW-3a от pH и температуры

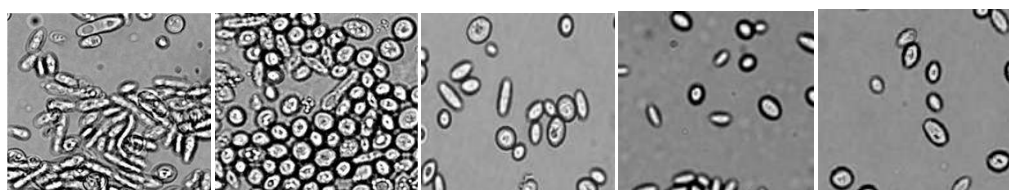
t°C pH штаммы	pH 3,0	pH 4,5	pH 7,0	pH 9,0	pH 11,0
30°C <i>S. cerevisiae</i> DAW-3a	5×5±0,4; 4×4±0,3; 3×3±0,3	7×7±0,4; 6×6±0,4; 5×5±0,3	5×5±0,4; 4×4±0,4	6×6±0,4; 4×4±0,4	5×5±0,4; 4×4±0,4
37°C <i>S. cerevisiae</i> DAW-3a	6×6±0,4; 5×5±0,3	6×6±0,4; 5×5±0,4; 4×4±0,3	6×6±0,4; 5×5±0,3	5×5±0,4; 4×4±0,4	6×6±0,4; 6×5±0,4; 5×5±0,3
30°C <i>S. cerevisiae</i> Y-503	6×10±0,4; 5×10±0,4; 4×4±0,3	8×12±0,5; 6×10±0,4; 5×6±0,4	6×10±0,4; 5×10±0,4; 6×7±0,3	6×9±0,4; 6×8±0,4; 4×6±0,3	6×8±0,4; 6×7±0,4; 4×5±0,3
37°C <i>S. cerevisiae</i> Y-503	8×8±0,5; 5×5±0,4	7×11±0,5; 7×9±0,5; 5×6±0,4	5×10±0,4; 6×6±0,4; 5×5±0,4	7×11±0,5; 7×9±0,5; 5×6±0,4	7×7±0,5; 5×5±0,4

Известно, что размеры клеток влияют на репродуктивный потенциал и общую продолжительность жизни дрожжей *S. cerevisiae*, регулируются различными факторами и изменяются в зависимости от плоидности штамма [9]. Обнаружено варьирование размеров клеток Y-503 и DAW-3a в зависимости от pH среды и температуры (табл. 1).

Максимальные размеры клеток выявлены при pH 4,5; минимальные – при pH 3,0; в щелочных условиях отмечается разнообразие размеров Y-503 и однородность DAW-3a. Во всех вариантах средний размер клеток Y-503 был значительно больше показателей DAW-3a. Различия в морфологических характеристиках клеток Y-503 и DAW-3a в условиях 30°C и критических значений pH в среде культивирования могут быть обусловлены их плоидностью. Во всех вариантах исследуемые штаммы демонстрировали почкующиеся клетки в небольшом количестве (до 5%); наличие зернистой цитоплазмы, при этом на средах с pH 3,0 и 11,0 выявлено наибольшее накопление запасных питательных веществ (рис. 1, а, б).



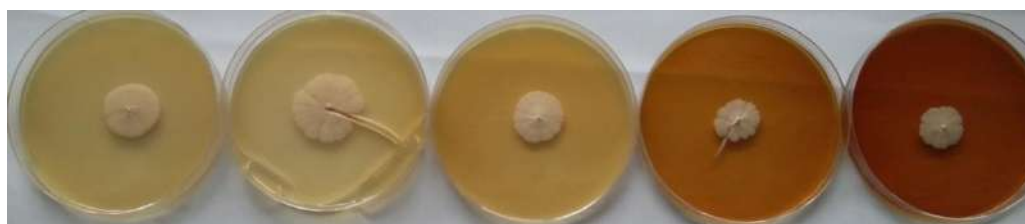
а)



б)



в)



г)

pH 3,0 pH 4,5 pH 7,0 pH 9,0 pH 11,0

Рис. 1. Клетки (световая микроскопия, увеличение $\times 600$) и гигантские колонии *S. cerevisiae* DAW-3a (а, в) и Y-503 (б, г). Температура 30°C, pH 3,0; 4,5; 7,0; 9,0; 11,0

Одновременно с морфологическими особенностями клеток в условиях стресса обнаружены изменения параметров гигантских колоний исследуемых штаммов (рис. 1, в, г). Наблюдались различные

оттенки бежевого цвета; уплотнение структуры при pH 11,0 и значительное изменение размеров колоний (табл. 2). При этом pH 4,5 отмечен как оптимальный для роста колоний. В щелочных условиях размер колоний уменьшался в 2,5, при pH 3,0 – почти в 2 раза по сравнению с оптимальным pH. Различия в плоидности штаммов DAW-3a и Y-503, возможно, обусловили их адаптацию к экстремальным значениям pH. Обнаружено, что размеры гигантских колоний штамма Y-503 превышают размеры колоний DAW-3a в 1,9 раза при pH 7,0, в 1,5 раза при pH 3,0, в 1,3 раза при pH 4,5 и pH 11,0 и незначительно при pH 9,0. Форма, поверхность и профиль колоний сохранялись при всех значениях pH.

Таблица 2. Зависимость средних размеров гигантских колоний дрожжей (см²) *S. cerevisiae* Y-503 и DAW-3a от pH и температуры

t°C \ pH штаммы	pH 3,0	pH 4,5	pH 7,0	pH 9,0	pH 11,0
30°C <i>S. cerevisiae</i> DAW-3a	2,40±0,3	5,41±0,7	2,14±0,3	2,34±0,3	2,01±0,2
37°C <i>S. cerevisiae</i> DAW-3a	3,22±0,4	2,34±0,3	2,74±0,4	1,89±0,2	2,34±0,3
30°C <i>S. cerevisiae</i> Y-503	3,80±0,4	7,06±0,8	4,15±0,5	2,67±0,3	2,68±0,3
37°C <i>S. cerevisiae</i> Y-503	3,79±0,4	2,26±0,2	2,67±0,3	2,0±0,2	2,4±0,3

В условиях повышенной температуры 37°C форма клеток Y-503 на средах с pH 3,0 и 11,0 была округлой; для pH 4,5–9,0 характерно наличие удлинённых клеток. При различных pH клетки DAW-3a обладали в основном округлой формой (рис. 2, а, б). Обнаружено, что размеры клеток исследуемых штаммов практически не изменились (табл. 1); отмечено лишь небольшое увеличение данного параметра DAW-3a в кислой среде, что, возможно, демонстрирует уровень устойчивости дрожжей к гипертермии. С увеличением температуры происходит накопление в клетках запасных питательных веществ во всех вариантах, при этом выявлено, что Y-503 образует споры.

При 37°C и всех значениях pH сохранялись форма, профиль, поверхность и структура колоний. Интересно, что, в отличие от Y-503, цвет колоний DAW-3a менялся и приобретал розоватый оттенок (рис. 2, в, г). Изменились и размеры колоний, которые были максимальными на средах с низким значением pH 3,0 (табл. 2). Способность штаммов Y-503 и DAW-3a к росту в данных экстремальных условиях представляет практический интерес [14]. Преимущества тетраплоидного штамма Y-503 не наблюдалось; размеры колоний были идентичны, за исключением варианта с pH 3,0 (размер Y-503 больше в 1,17 раза).

Известно, что в условиях стресса дрожжи способны корректировать поверхность, морфогенез, рост и изменение объема клеток [15]. В условиях высокой концентрации NaCl и критических значений pH в среде культивирования при 30°C клетки Y-503 приобретали более округлую форму. Размер клеток уменьшался, особенно с увеличением кислотности, при этом обнаружена толерантность к солевому стрессу при нейтральном и щелочном значении pH. В клетках исследуемых штаммов обнаружено достаточно большое число почкующихся (до 5%) при 5 % NaCl и различных значениях pH. Добавление 10–20% NaCl в среду культивирования приводило фактически к ингибированию метаболизма дрожжей Y-503 и DAW-3a и гибели клеток.

Для гигантских колоний в условиях солевого стресса при всех значениях pH характерны неправильная форма, бугристая поверхность, изменение цвета от бежевого до светло-коричневого и уплотнение структуры. Наличие NaCl в концентрации 5% не оказывало значительного влияния на рост дрожжей, однако повышение NaCl в среде до 20% приводило к уменьшению размера колоний до минимума.

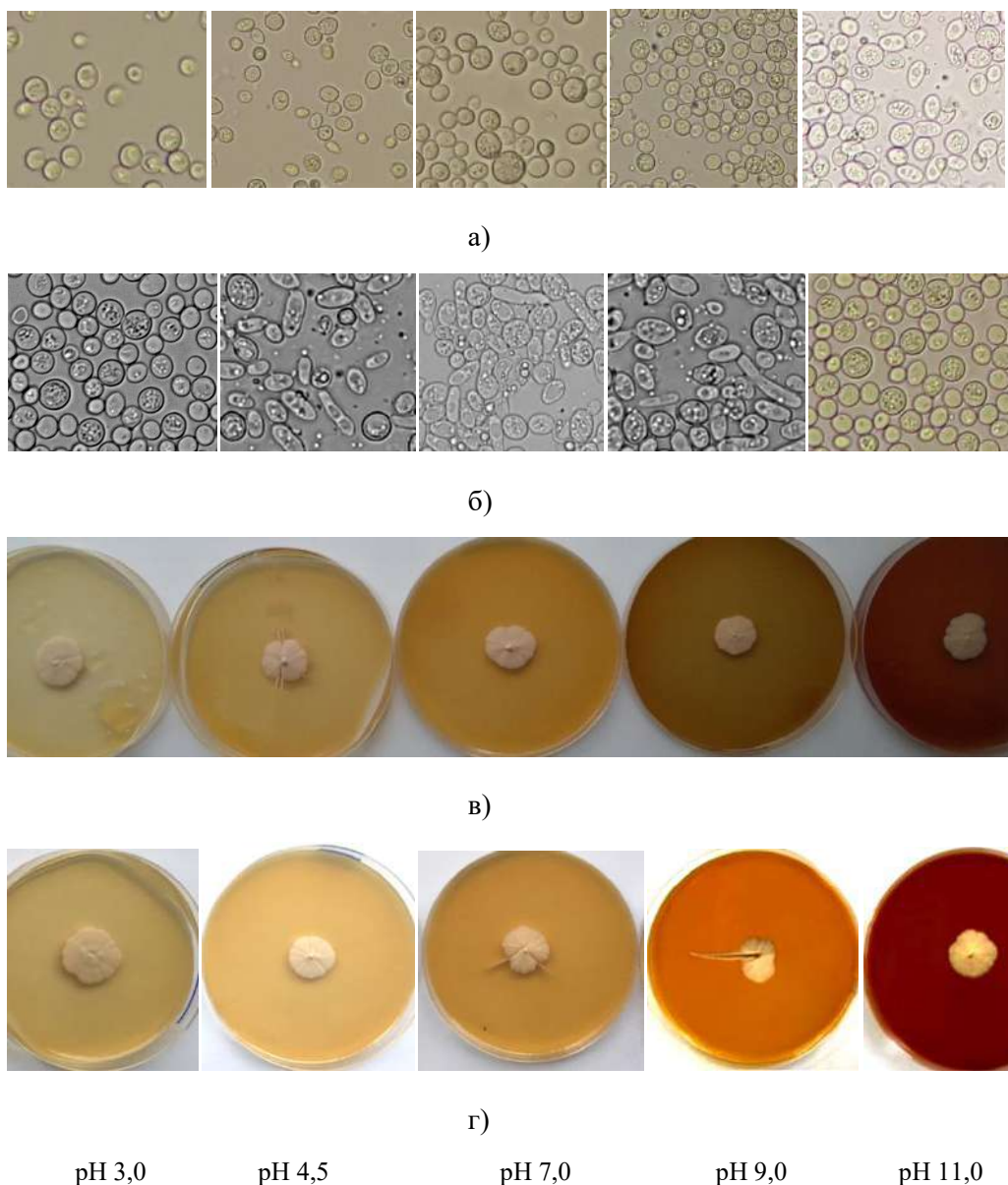


Рис. 2. Клетки (световая микроскопия, увеличение $\times 600$) и гигантские колонии *S. cerevisiae* DAW-3a (а, в) и Y-503 (б, г). Температура 37°C, pH 3,0; 4,5; 7,0; 9,0; 11,0

При 37°C, различных значениях pH и 5% NaCl в среде обнаружено, что для клеток штамма DAW-3a характерна округлая форма, в отличие от Y-503. В данных условиях наблюдается тенденция преобразования эллипсовидных форм Y-503 в более округлые, однако доминирующей являлась овально-округлая форма; выявлено наибольшее количество клеток с удлинённой формой в кислых средах и их отсутствие при pH 11,0. Размеры клеток уменьшались незначительно, отмечено наличие липидных включений в цитоплазме. В результате исследований показано отсутствие вакуолей в клетках обоих штаммов и наличие спор в клетках *S. cerevisiae* Y-503. Отмечается, что образование спор, характерное для штамма Y-503, происходило только при повышенной температуре.

Для гигантских колоний DAW-3a и Y-503 в данных условиях характерно сохранение формы, поверхности, профиля и структуры. Установлено изменение цвета от светлого до темно-бежевого и уменьшение размеров колоний (максимальный – при pH 11,0; минимальный – при pH 3,0). Подтверждается обнаруженная нами ранее способность исследуемых штаммов легче переносить солевой стресс при щелочных значениях pH [16]. Сравнительный анализ размеров колоний DAW-3a и Y-503 в условиях 5% NaCl, повышенной температуры и широкого спектра pH продемонстрировал их идентичность (рис. 3).

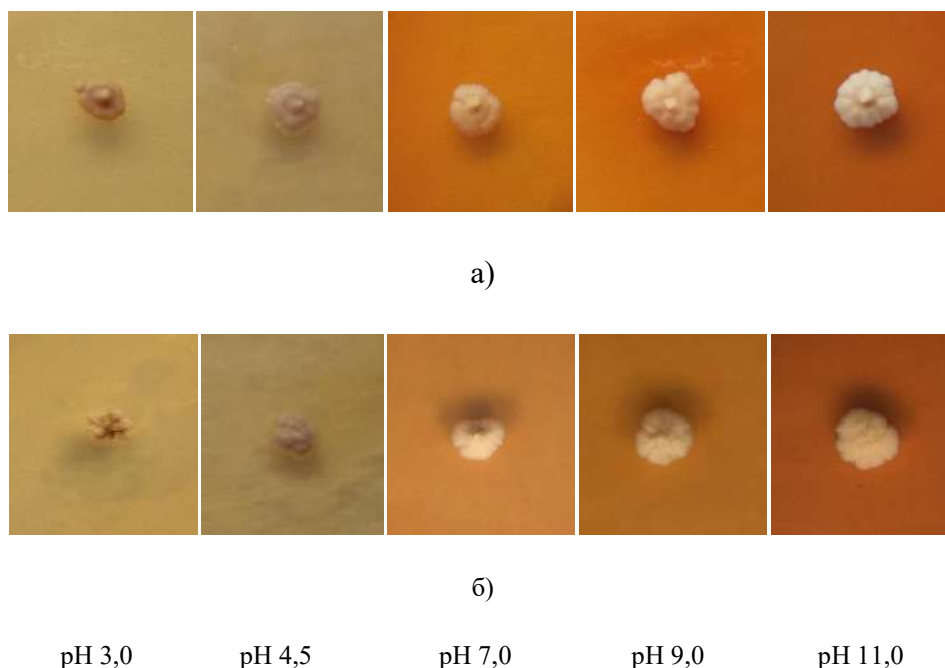


Рис. 3. Гигантские колонии DAW-3a (а) и Y-503 (б). Температура 37°C; pH 3,0; 4,5; 7,0; 9,0; 11,0; NaCl 5 % в составе среды культивирования [16]

Заключение

В экстремальных условиях DAW-3a и Y-503 обладали различными размерами и формой клеток, размерами колоний, что, вероятно, связано с их плоидностью. Установлено, что при всех режимах культивирования характерной особенностью штамма DAW-3a являлась округлая форма клеток. Для штамма *S. cerevisiae* Y-503 доминирующей была овально-округлая форма; с увеличением температуры проявлялась тенденция преобразования эллипсовидных форм клеток в более округлые; обнаружено наибольшее количество удлинённых форм в кислых средах и отсутствие их в щелочной среде. Отмечено, что при оптимальных условиях (30°C, pH 4,5) размеры клеток, особенно Y-503, увеличивались. Минимальные размеры выявлены при pH 3,0; солевой стресс также способствовал уменьшению размера клеток во всех вариантах. С повышением температуры до 37°C происходило накопление в клетках DAW-3a и Y-503 запасных питательных веществ, образование спор штаммом Y-503. В оптимальных условиях культивирования размеры колоний Y-503 значительно превосходили показатели DAW-3a; в экстремальных (37°C; 5, 10, 15, 20% NaCl в среде) штаммы идентично реагировали на стресс. Установлена способность исследуемых штаммов легче переносить солевой стресс при щелочных значениях pH. Изучение толерантности дрожжей *S. cerevisiae* Y-503 и DAW-3a к экстремальным условиям представляет интерес для возможного использования стрессоустойчивых штаммов в различных биотехнологиях.

ЛИТЕРАТУРА

1. Borrull A., Lopez-Martínez G., Miro-Abella E., Salvado Z., Poblet M., Cordero-Otero R., Rozes N. New insights into the physiological state of *Saccharomyces cerevisiae* during ethanol acclimation for producing sparkling wines // Food Microbiology. 2016. Vol. 54. P. 20–29.
2. Caspeta L., Nielsen J. Thermotolerant yeast strains adapted by Laboratory evolution show trade-off at ancestral temperatures and preadaptation to other stresses // MBio. 2015. Vol. 6(4). P. 431–446.
3. Serra-Cardona A., Canadell D., Ariño J. Coordinate responses to alkaline pH stress in budding yeast // Microbial Cell. 2015. Vol. 2(6). P. 182–196.
4. Liu X., Jia B., Sun X., Ai J., Wang L., Wang C., Zhao F., Zhan J., Huang W. Effect of initial pH on growth characteristics and fermentation properties of *Saccharomyces cerevisiae* // Food science. 2015. Vol. 80(4). P. 800–808.

5. Bubnová M., Zemančíkova J., Sychrova H. Osmotolerant yeast species differ in basic physiological parameters and in tolerance of non-osmotic stresses // *Yeast*. 2014. Vol. 31(8). P. 309–21.
6. Brown A.J.P., Cowen L.E., Pietro A. Di., Quinn J. Stress adaptation // *Microbiology spectrum*. 2017. Vol. 5(4). P. 1–10.
7. Аринбасарова А.Ю., Бирюкова Е.Н., Меденцев А.Г. Антистрессовые системы дрожжей *Yarrowia lipolytica* (Обзор) // *Прикладная биохимия и микробиология*. 2015. N 51(2). С. 122–131.
8. Balakumar S., Arasaratnam V. Osmo-, thermo- and ethanol- tolerances of *Saccharomyces cerevisiae* S1 // *Brazilian Journal of Microbiology*. 2012. Vol. 43(1). P. 157–166.
9. Zdrag-Tecza R., Kwolek-Mirek M., Alabrudzińska M., Skoneczna A. Cell size influences the reproductive potential and total lifespan of the *Saccharomyces cerevisiae* yeast as revealed by the analysis of polyploid strains // *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2018. Vol. 2018. N 1. P. 1–17. DOI: 10.1155/2018/1898421
10. Viana N.C., Portugal C. and Cruz S.H. Morphophysiological and molecular characterization of wild yeast isolates from industrial ethanol process // *African Journal of Microbiology Research*. 2017. Vol. 11(37). P. 1422–1430.
11. Vorálovská I., Hulková M., Janderová B., Palkova Z. The morphology of *Saccharomyces cerevisiae* colonies is affected by cell adhesion and the budding pattern // *Research in Microbiology*. 2005. Vol. 156(9). P. 921–31.
12. Авт. свид. СССР № 1284998. Штамм дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* Y-503, используемый в производстве хлебобулочных изделий / Ш.А. Абрамов, С.Ц. Котенко, Б.И. Далгатова, А.Т. Маммаев, Д.С. Пейсахова // Б.И. 1987. № 3. С. 104.
13. Справка о депонировании штамма *Saccharomyces cerevisiae* DAW-3a в БРЦ ВКПМ НИЦ «Курчатовский институт» от 28.06.2022. Регистрационный номер ВКПМ: Y-5030.
14. Swinnen S., Henriques S., Shrestha R., Ho P.-W., Sá-Correia I., Nevoigt E. Improvement of yeast tolerance to acetic acid through Haa1 transcription factor engineering: towards the underlying mechanisms // *Microbial Cell Factories*. 2017. Vol. 16. P. 1–7.
15. Zemančíkova J., Kodedova M., Papoušková K., Sychrova H. Four *Saccharomyces* species differ in their tolerance to various stresses though they have similar basic physiological parameters // *Folia Microbiologica*. 2018. Vol. 63. P. 217–227.
16. Исламмагомедова Э.А., Халилова Э.А., Гасанов Р.З., Абакарова А.А., Аливердиева Д.А. Устойчивость дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* к экстремальным условиям // *Известия вузов. Северо-Кавказский регион. Естественные науки*. 2021. № 2. С. 113–118.

Поступила в редакцию 02.10.2024 г.
Принята к печати 26.03.2025 г.

Исламмагомедова Эльвира Ахмедовна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, Прикаспийский институт биологических ресурсов Дагестанского федерального исследовательского центра РАН; e-mail: islammagomedova@mail.ru

Elvira A. Islammagomedova, Candidate of Biology, senior researcher, Precaspian Institute of Biological Resources of the Daghestan Federal Research Centre of RAS; e-mail: islammagomedova@mail.ru

Халилова Эсланда Абдурахмановна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, Прикаспийский институт биологических ресурсов Дагестанского федерального исследовательского центра РАН; e-mail: eslanda61@mail.ru

Eslanda A. Khalilova, Candidate of Biology, senior researcher, Precaspian Institute of Biological Resources of the Daghestan Federal Research Centre of RAS; e-mail: eslanda61@mail.ru

Абакарова Аида Алевдиновна, старший лаборант, Прикаспийский институт биологических ресурсов Дагестанского федерального исследовательского центра РАН; e-mail: aida.abacarva@rambler.ru

Aida A. Abakarova, senior laboratory assistant, Precaspian Institute of Biological Resources of the Daghestan Federal Research Centre of RAS; e-mail: aida.abacarva@rambler.ru