



УДК 663.14:556.315 (479)

ФЕРМЕНТАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ И МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* Y-503 ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ В АЭРОБНЫХ И АНАЭРОБНЫХ УСЛОВИЯХ

© 2010 Котенко С. Ц., Исламмагомедова Э.А., Халилова Э.А.

Дагестанский Прикаспийский институт биологических ресурсов Дагестанского научного центра РАН,

Исследовано влияние аэробных и анаэробных условий культивирования на морфологию клеток и активность ферментов дрожжей *S.cerevisiae* Y-503. Результаты эксперимента показали, что питательная среда, содержащая геотермальную воду, в аэробных условиях культивирования улучшает биотехнологические свойства дрожжей, важные для хлебопечения, а в анаэробных активирует ферменты, участвующие в синтезе этанола. Штамм *S.cerevisiae* Y-503 может успешно использоваться как в хлебопекарной, так и спиртовой промышленности.

The influence of aerobic and anaerobic conditions of cultivation on structure of cells and enzymes' activity of yeast *S. cerevisiae* Y-503 is researched. The results of experiment have shown that nutrient medium containing geothermal water in aerobic conditions of cultivation improves biotechnological properties of yeast important for manufacturing bread, and anaerobic activates the enzymes participating in synthesis of ethanol. Strain *S. cerevisiae* Y-503 can successfully be used both in baking, and in the spirit industries.

Ключевые слова: условия выращивания дрожжей, морфология, ферменты

Key words: conditions of cultivation of yeast, morphology, enzymes

Kotenko S.Ts., Islammagomedova E.A., Halilova E.A. The fermentative activity and morphological speciality of yeast *Saccharomyces cerevisiae* Y-503 at cultivation in aerobic and anaerobic conditions

Ранее нами было установлено благоприятное влияние биологически активных веществ геотермальной воды на метаболизм хлебопекарных дрожжей. Разработаны высокоэффективные технологии получения хлебопекарных и сушеных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, позволяющие применять геотермальные воды как важный компонент, обладающий большим химическим потенциалом в биотехнологических процессах [1, 8, 9]. Данные технологии хлебопекарных дрожжей основаны на аэробном процессе культивирования микроорганизмов. Также впервые разработана биотехнология активного синтеза этанола, которая позволила увеличить выход спирта в сбраживаемой среде на 25% [3, 10]. Сущность новой технологии заключается в том, что для интенсификации синтеза этанола в анаэробных условиях используется питательная среда, где источником дополнительного минерального и органического питания служит геотермальная вода нефенольного класса [2].

В дальнейшем, актуальным стало изучение ряда факторов, обуславливающих активацию этих процессов. Известно, что уникальным свойством дрожжевой клетки является получение энергии, необходимой для нормального функционирования всех ее органелл, которое осуществляется посредством окислительно-восстановительных реакций, протекающих как в аэробных, так и анаэробных условиях. Все сложные биохимические реакции, определяющие жизнедеятельность клетки, направляются и координируются ферментами. Поэтому их каталитическое действие в совокупности с факторами внешней среды обеспечивает условия для жизни и роста дрожжей.

Цель настоящей работы - изучение влияния аэробных и анаэробных условий на ферментативную активность и морфологические свойства дрожжей *S.cerevisiae* Y-503, культивируемых на питательной среде с использованием геотермальной воды нефенольного класса.

Материал и методы исследований

Объектом исследования был штамм дрожжей *S.cerevisiae* Y-503, полученный Ш.А. Абрамовым, С.Ц. Котенко, А.Т. Маммаевым и др. в Прикаспийском институте биологических ресурсов Дагестанского научного центра РАН в результате воздействия азотного лазера на штамм *S.cerevisiae* №73 [6]. Штамм находится в коллекциях указанного института и Государственного унитарного предприятия «ГНИИ Генетика» г. Москва. Для культивирования дрожжей применяли мелассные среды с использованием геотермальной воды нефенольного класса из скважины №26 Махачкалинского месторождения. Технологический процесс проводили в аэробных и



анаэробных условиях по ранее разработанным схемам [1, 2]. Для электронно-микроскопических исследований клеточные суспензии дважды промывали дистиллированной водой, осаждавая клетки центрифугированием (5000 g, 15 мин.); количество клеточной массы определяли весовым методом. Далее клеточные осадки последовательно фиксировали при 4°C 1.5 %-ным водным раствором КМпО₄ в течение 6-18 ч. Дофиксацию проводили 1%-ным раствором OsO₄ в 0.1 М растворе фосфатного буфера (pH 6.8) в течение 2 ч. Для увеличения контрастности объектов в раствор OsO₄ добавляли хромовый ангидрид; материал заливали в Эпон-812. Ультратонкие срезы, изготовленные на ультратоме «LKB-4800», просматривали и фотографировали в электронном микроскопе «JEM 100 C» (при рабочем напряжении 3.5 МВ). Ферментативную активность в суспензиях клеток штамма *S.cerevisiae* Y-503 изучали следующим образом: активность инвертазы - β-фруктофуранозидазы (3.2.1.26) и α - глюкозидазы (3.2.1.20) определяли поляриметрическим методом; альдозазы (4.1.2.13) и алкогольдегидрогеназы (1.1.1.1.) — спектрофотометрически при 340 нм; пируватдекарбоксилазы (4.1.1.1.) — манометрически, глюкоамилазы (3.2.1.31) — модифицированным глюкозооксидазным методом, активность протеолитических ферментов (суммарное количество) (3.4) — модифицированным методом Ансона. Контролем служила исходная биомасса штамма *S.cerevisiae* Y-503, выросшая на сусло-агаре.

Результаты и обсуждение

Известно, что существует корреляция между морфологическим строением и функциональными особенностями дрожжей. Процессы дыхания и брожения тесным образом связаны с состоянием клеточных структур и вся клетка в целом ответственна за характер и уровень их действия. Аэробно развивающиеся дрожжи, так же как и бродящие, состоят из клеток дышащего и бродящего типа, только в первом случае преобладают аэробные, а во втором — анаэробные клетки. Не все клетки культуры функционируют одновременно в определенном направлении и с одинаковой интенсивностью. При проведении эксперимента мы наблюдали, что дрожжевые клетки *S. cerevisiae* Y-503, вызывающие брожение, становились гораздо меньше, чем функционирующие в условиях аэрации (8-10 × 11-13 мкм — аэробные, 6-7 × 7-9 и 9 × 9 мкм — анаэробные), принимали более округлую форму, в то время как форма аэробных клеток — овальная. Электронно-микроскопические исследования клеток штамма Y-503, культивируемых на мелассных средах с использованием геотермальной воды нефенольного класса в аэробных и анаэробных условиях, позволили обнаружить достаточно отчетливые ультраструктурные изменения (рисунок).

Так в аэробных условиях культивирования цитоплазматическая мембрана выявляется по всей длине клетки и имеет четкую трехслойную контурность. Клеточная стенка состоит из двух слоев, внутренний слой электронно-светлый, внешний - более плотный. Содержимое вакуолей разжижено, видны тонкие тяжи, в цитоплазме. Хорошо просматриваются эндоплазматические нити, аппарат Гольджи представлен рядом мембран. Обращает внимание сильно развитый энергетический аппарат. На электронном снимке митохондрии легко различимы и занимают значительную часть среза клетки, овальной и сферической формы, окруженные двойной мембраной, складки внутренней мембраны образуют кресты.

Бродящие организмы имели более плотную прозрачную цитоплазму, так как повысилась поглощающая способность протопласта по сравнению с протопластом дышащих клеток. Отличаются многочисленные инвагинации цитоплазматической мембраны, отсутствие аппарата Гольджи, вакуолей. Значительную часть клеток занимает ядро неправильной формы, в ядре видно ядрышко, образование которого характерно для клеток, способных к бурному росту и синтезу большого количества белка. В стационарной фазе ферменты в избытке скапливаются в цитоплазме и отчетливо выявляются в виде микротелец (пероксисом), без дополнительного мощного участия которых не могут быть метаболизированы высшие жирные кислоты, углеводы и метанол. В процессе ферментации дрожжей в условиях анаэробно-анаэробно происходит резкая перестройка энергетического обмена. Митохондрии превращаются в недифференцированные структуры, редуцируются их основные энергетические функции. Отсутствие дыхания компенсируется усилением гликолиза, который становится основным источником энергии клетки при значительном накоплении гликогена, характерном для определенных этапов брожения. Часть этого резервного вещества перемещается из цитоплазмы в вакуоли.

Для получения данных, расширяющих биохимическую характеристику штамма *S. cerevisiae* Y-503, были проведены исследования по определению активности ферментов, участвующих в углеводном и азотистом обмене в биомассе аэробных и анаэробных клеток.

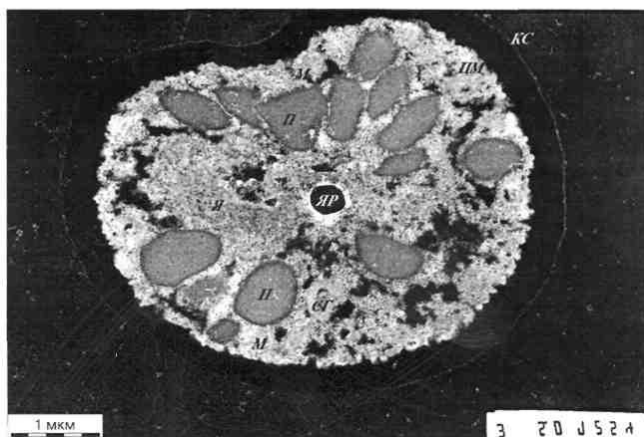
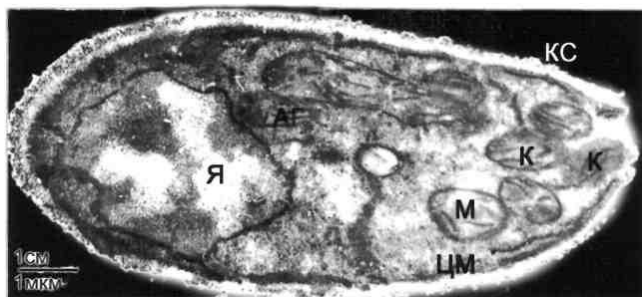


Рис. Электронные микрофотографии клеток штамма *Saccharomyces cerevisiae* Y-503, выращенных на мелассной питательной среде с геотермальной водой в аэробных (а) и анаэробных условиях (б). Обозначения к рисунку: клеточная стенка (КС), цитоплазматическая мембрана (ЦМ), ядро (Я), ядрышко (Яр), митохондрии (М), эндоплазматический ретикулум (ЭР), вакуоль (В), аппарат Гольджи (АГ), пероксисомы (П), гликоген (Г).

В аэробных клетках была изучена активность ферментов: β - фруктофуранозидазы, α -глюкозидазы, алкогольдегидрогеназы, глюкоамилазы и суммарной протеазы, играющих решающую роль в определении биотехнологических показателей хлебопекарных дрожжей. Известно, что фермент β - фруктофуранозидаза, или иначе инвертаза, катализирует реакцию гидролиза сахарозы, входящей в состав мелассной питательной среды. Активность данного фермента проявляется с самого начала процесса. Показано, что уровень активности β - фруктофуранозидазы опытного варианта дрожжей, полученных в аэробных условиях, превосходит контроль в 1,27 раза в суспензиях клеток (табл. 1). Образование мальтозы в процессе замеса хлеба способствует синтезу фермента α - глюкозидазы. В наших экспериментах дрожжи, выращенные на питательной среде с геотермальной водой, имеют более высокий уровень активности α - глюкозидазы: в 1,22 раза по сравнению с исходными дрожжами. Реакция восстановления ацетальдегида до этанола катализируется ферментом алкогольдегидрогеназой, что имеет важное значение для процесса созревания теста. Установлено, что активность алкогольдегидрогеназы опытного варианта превосходит контроль в 1,58 раза. Условия культивирования и состав питательной среды повлияли на способность клеток синтезировать фермент глюкоамилазу (амилоглюкозидазу), который также принимает участие в углеводном обмене дрожжей. Глюкоамилаза является единственной из всех амилаз, способная быстро расщеплять крахмал муки до легко сбраживаемого субстрата - глюкозы. Установлено, что уровень активности глюкоамилазы в суспензиях клеток опытного варианта несколько выше (в 1,25 раза), чем у исходного. По-видимому, синтез данного индуцибельного фермента происходит в результате воздействия биологически активных веществ геотермальной воды, которые повлияли на изученный ранее аминокислотный состав опытного штамма [11]. Так большее содержание аргинина, глутаминовой кислоты и пролина в клетке, как известно, стимулирует накопление глюкоамилазы в дрожжах. Особое место среди гидролаз дрожжей по своей роли во внутриклеточных процессах занимают протеолитические ферменты. Как показали исследования, штамм *S.cerevisiae* Y-503, выращенный на питательной среде с геотермальной водой, по уровню суммарной протеолитической активности превышает такие же показатели исходного штамма в 1,2 раза в суспензиях клеток. Возможно, это связано с большей интенсивностью азотистого обмена. Известно, что определенные металлы оказывают влияние на специфичность действия и величину удельной активности протеолитических ферментов. В нашем эксперименте повышению активности протеолитических ферментов способствовали изученные ранее, находящиеся в геотермальной воде



и востребованные дрожжевыми клетками макро- и микроэлементы: магний, марганец, кобальт, цинк [6]. Кроме того, на повышение активности протеолитических ферментов могло повлиять появление метаболитов, индуцирующих синтез или активность изучаемых ферментов в стационарной фазе при периодических условиях культивирования

Таблица 1

**Активность ферментов штамма *Saccharomyces cerevisiae* Y-503
в аэробных условиях культивирования, Е/мг клеток**

Варианты	Ферменты				
	β -фруктофуранозидаса	алкогольдегидрогеназа	α -глюкозидаза	глюкоамилаза	суммарная протеаза
<i>S.cerevisiae</i> Y-503 (опыт)	$36,2 \pm 1,18$	$0,68 \pm 0,03$	$32,1 \pm 1,19$	$1,75 \pm 0,07$	$0,18 \pm 0,01$
<i>S.cerevisiae</i> Y-503 (исходная культура)	$28,5 \pm 1,78$	$0,43 \pm 0,04$	$26,3 \pm 0,71$	$1,4 \pm 0,05$	$0,15 \pm 0,03$

В анаэробных клетках была исследована активность ферментов, представляющих большой интерес для спиртового брожения: β -фруктофуранозидазы, альдолазы, пируватдекарбоксилазы и алкогольдегидрогеназы (табл. 2). При эффективном процессе брожения активируются присутствующие в дрожжах β -фруктофуранозидаса (в 1.14 раза), катализирующая гидролиз сахаров, и альдолаза (в 1.25 раза), способствующая образованию пировиноградной кислоты - ключевого вещества анаэробного расщепления глюкозы и преобразования сахаров. Разложение пировиноградной кислоты на ацетальдегид и CO_2 катализируется пируватдекарбоксилазой. Именно благодаря ее действию образуется значительная часть углекислого газа, выделяющегося при брожении. Полученные нами данные позволяют говорить о более высокой активности фермента (в 1.37 раз) в дрожжевой биомассе, выращенной на питательной среде с использованием геотермальной воды по сравнению с исходной культурой. Заключительный этап брожения катализирует алкогольдегидрогеназа, восстанавливающая ацетальдегид до этанола. Она имеет особое значение, поскольку связана с окислительно-восстановительными реакциями; активной группой фермента, которой является НАД. В ходе данной реакции трансформации дрожжевая клетка вырабатывает спирт и необходимую для жизнедеятельности энергию. Как видно из таблицы, активность этого фермента в клетках опытного варианта штамма *S. cerevisiae* Y-503 в 1.6 раз превышает данный показатель исходной культуры.

Таблица 2

**Активность ферментов штамма *Saccharomyces cerevisiae* Y-503
в анаэробных условиях, Е/мг клеток**

Варианты	Ферменты			
	β -фруктофуранозидаса	альдолаза	пируватдекарбоксилаза	алкогольдегидрогеназа
<i>S.cerevisiae</i> Y-503 (опыт)	$32,6 \pm 2,0,2$	$0,35 \pm 0,03$	$19,4 0, \pm 1,32$	$0,69 \pm 0,06$
<i>S.cerevisiae</i> Y-503 (исходная культура)	$28,5 \pm 1,78$	$0,28 \pm 0,02$	$14,1 \pm 1,12$	$0,43 \pm 0,4$

Очевидно, на активность исследуемых нами ферментов оказывают влияние органические и минеральные компоненты подземных вод в составе питательной среды. Содержащиеся в геотермальной воде минеральные вещества в сочетании с макро- и микроэлементами мелассы создают наиболее оптимальные концентрации ионов Na, K, Ca, Mg, Mn, Fe, Zn, Cu в питательной среде. Известно, что дрожжевая альдолаза содержит цинк, который, по-видимому, входит в активный центр и влияет на ферментативную активность. Активность альдолазы также специфически усиливают ионы калия. Поэтому оптимальное содержание данного элемента в опытной питательной среде способствует накоплению триозофосфатов и, что в конечном итоге, ускоряет процесс спиртового брожения. В свою очередь, индукция пируватдекарбоксилазы в



дрожжах коррелирует с концентрацией триозофосфатов [7]. Кроме того, активность пируватдекарбоксилазы зависит от ее важнейшей составной части — кофермента витамина В₁, вернее, его пирофосфорного эфира — тиаминпирофосфата. Ранее установлена повышенная концентрация данного витамина как в исходной опытной питательной среде с использованием геотермальной воды, так и в биомассе дрожжей рода *Saccharomyces*, выращенных на данной среде [4]. По-видимому, входящие в состав геотермальной воды органические соединения участвовали в синтезе тиамина в качестве предшественников, увеличивая его содержание в клетках. Соответственно, накопление витамина способствовало усилению пируватдекарбоксилазной активности. Повышение активности алкогольдегидрогеназы также связано с присутствием в опытной питательной среде оптимального количества ионов цинка, входящего в ее состав.

Таким образом, изучено влияние аэробных и анаэробных условий на морфологию клеток и активность ферментов в биомассе штамма *S. cerevisiae* Y-503, выращенном на среде с использованием геотермальной воды нефенольного класса. Обнаружена зависимость функциональной морфологии дрожжевых организмов от условий культивирования. Установлена активация ферментов, координирующих основные биохимические реакции в исследуемых процессах, что позволяет глубже понять химические превращения, лежащие в основе жизнедеятельности дрожжей, и дает возможность интенсифицировать технологические процессы. Высокая ферментативная активность биомассы, полученной в результате аэробного культивирования, влияет на биотехнологические показатели штамма, важные для его успешного применения в хлебопекарном производстве. Анаэробный способ выращивания дрожжей *S. cerevisiae* Y-503 способствовал активации ферментов углеводного синтеза этанола, что в свою очередь представляет интерес для спиртовой промышленности.

Библиографический список

1. Абрамов Ш.А., Котенко С.Ц., Эфендиева Д.А., Халилова Э.А., Исламмагомедова Э.А., Даунова С.М. Новая питательная среда для выращивания дрожжей // Прикл. биохимия и микробиология. 1995.— Т.31. — № 2 — С.232-233.
2. Абрамов Ш.А. Новые технологии пищевых продуктов на основе использования геотермальных вод юга России // Юг России: экология, развитие. 2008— №2. — С.6-10.
3. Абрамов Ш.А., Халилова Э.А., Магадова С.А. Новое в биотехнологии синтеза этанола в сбраживаемой среде // Хранение и переработка сельхозсырья. 2006. — №12. —С.51-54.
4. Абрамов Ш.А., Котенко С.Ц., Рамазанов А.Ш., Исламова Ф.И. Содержание витаминов в дрожжах рода *Saccharomyces* в зависимости от состава питательной среды // Прикл. биохимия и микробиология. 2003. —Т. 39.— №4. — С.438-440.
5. Абрамов Ш.А., Халилова Э.А. Геотермальные воды в биотехнологическом процессе получения хлебопекарных дрожжей // Вестник ДНЦ РАН. 2002. — №13.— С.46-53.
6. А.с. СССР №1284998. Штамм дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* Y-503, используемый в производстве хлебобулочных изделий / Ш.А. Абрамов, С.Ц. Котенко, Б.И. Далгатова, А.Т. Мамаев, Д.С. Пейсахова // Б.И. 1987. — №3. — С.104.
7. Волкова Л.Д., Егоров Н.С., Яровенко В.Л. Влияние источника азотистого питания на рост дрожжей *Endomycopsis Fibuligera* штамма 21 и синтез ими глюкоамилазы // Прикл. биохимия и микробиология. 1978. — Т.14.— №2.— С.200.
8. Патент РФ № 2084519. Способ получения питательной среды для выращивания хлебопекарных дрожжей / Ш.Абрамов, С.Ц. Котенко, Б.И. Далгатова, Д.А. Эфендиева, Э.А. Халилова // Б.И. 1997. — №20.— С.270.
9. Патент РФ №2151795. Получение сушеных дрожжей / Ш.А. Абрамов, С.Ц. Котенко, Э.А. Халилова, Ф.И. Исламова, М.М. Омаров Б.И. // 2000.— №18.— С.138.
10. Патент РФ №2329302. Способ сбраживания мелассного сусла // Ш.А. Абрамов, Э.А., Халилова Б.И. // 2008.— №20.— С.167.
11. Халилова Э.А., Абрамов Ш.А. Свободные аминокислоты в биомассе и сушеных дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* в зависимости от состава питательной среды // Прикл. биохимия и микробиология. 2001. —Т.37. — № 5.— С. 578-581.