

УДК 663.12/14:551.1

# Сравнительный анализ морфофизиологических особенностей дрожжей *Saccharomyces* в процессе спиртового брожения

Э. А. Исламгагомедова,  
канд. биол. наук;  
Э. А. Халилова,  
канд. биол. наук  
Прикаспийский институт  
биологических ресурсов ДНЦ  
РАН, г. Махачкала

Различные штаммы дрожжей обладают отличительной способностью к регулированию биохимических процессов в зависимости от условий культивирования [1, 2]. Важную роль в энергетическом обмене дрожжей, метаболизме углерода, синтетических и диссимиляционных процессах играют органические кислоты [3, 4], использование которых в качестве источника углерода зависит от ряда причин [5], в том числе от вида и расы дрожжей [6]. Известно, что в основе получения этанола из мелассы лежит процесс брожения с применением традиционных спиртовых дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* [7, 8]. Ранее нами установлено, что минеральные и органические компоненты геотермальных вод в составе мелассной среды культивирования дрожжей *S. cerevisiae Y-503*, используемые в качестве дополнительного источника питания [А. с. СССР № 1730140, Патенты РФ №№ 2084519, 2151795], способствуют интенсификации биосинтеза этанола [Патент РФ № 2329302]. Исследованы некоторые морфологические и биохимические особенности штамма *S. oviformis M-12X* в процессе спиртового брожения [9]. Известно, что в определенной концентрации свободные органические кислоты оказывают ингибирующее действие на клетки дрожжей и биосинтез этанола [10], поэтому представляет интерес дальнейшее изучение механизма влияния геотермальной воды в составе мелассной среды культивирования

на метаболизм дрожжей различных видов *Saccharomyces* в процессе спиртового брожения.

Цель данной работы — сравнительное исследование влияния геотермальной воды фенольного класса на морфологические особенности дрожжей *S. cerevisiae Y-503* и *S. oviformis M-12X*, динамику содержания некоторых свободных органических кислот в мелассных питательных средах и сброженных субстратах в процессе синтеза этанола.

Объектами исследований служили штаммы *S. cerevisiae Y-503* (А. с. СССР № 1284998) и *S. oviformis M-12X* (А. с. СССР № 1104149) из коллекции дрожжевых культур Прикаспийского института биологических ресурсов ДНЦ РАН. Дрожжи выращивали на лабораторной установке глубинным методом в периодическом режиме по известной технологической схеме на мелассных питательных средах с геотермальной водой фенольного класса из скважины № 7-Т Кизлярского месторождения (опыт) и по традиционной технологии (контроль) при рН 4,5 и температуре 30...32 °С в анаэробных условиях. Состав опытной питательной среды: меласса (содержание углеводов 20,0 г/100 см<sup>3</sup>), гидроортофосфат аммония (2,58 г/л) и геотермальная вода фенольного класса. Контролем служила традиционная мелассная питательная среда, используемая в настоящее время на предприятиях России, производящих этанол: меласса (содержание углеводов

20,0 г/100 см<sup>3</sup>), гидроортофосфат аммония (1,53 г/л), сернистый аммоний (4,6 г/л) и водопроводная вода.

Морфологические исследования проводили на световом микроскопе CX-21 (OLYMPUS, Япония). Исследование содержания свободных органических кислот в питательных средах и сброженных субстратах осуществлялось методом капиллярного электрофореза на приборе «Капель-105» (Россия) [11, 12].

В отличие от дрожжей *S. cerevisiae*, применяемых в процессе получения этанола из мелассы, селективной питательной средой для используемого в винодельческой промышленности штамма *S. oviformis* M-12X служит виноградное сусло при оптимальных значениях pH 2,9–3,6 и температуры 20 °С. Адаптационный процесс данной культуры способствовал выявлению и отбору наиболее приспособленных форм дрожжей M-12X к неблагоприятным примесям мелассной питательной среды, pH 4,5, температуре 30...32 °С. Отмечена отличительная способность адаптированных клеток *S. oviformis*, как и традиционных спиртовых дрожжей *S. cerevisiae*, наиболее полно сбраживать углеводы мелассной среды культивирования. В опытных сброженных субстратах, независимо от вида используемых дрожжей, обнаружено повышенное образование этанола: *S. cerevisiae* — 11,4:9,7 об. % и *S. oviformis* — 10,4:9,4 об. %.

Аналогично, морфологические исследования, проводимые на всех этапах культивирования дрожжей, показали изменение формы клеток, более энергичное почкование и накопление резервных веществ в опытных вариантах исследуемых штаммов. Так, в инокуляте *S. cerevisiae* в 1 мл содержалось  $79,4 \cdot 10^6$ : $67,2 \cdot 10^6$  клеток (опыт: контроль); размер 8–9×12–13:6–7×11–12 мкм (опыт: контроль); количество почкующихся 31:27% (опыт: контроль). В 1 мл инокулята *S. oviformis* содержалось  $77,2 \cdot 10^6$ : $65,3 \cdot 10^6$  клеток (опыт: контроль); размер 7–8×12–13:6–7×10–11 мкм (опыт: контроль); количество почкующихся 32:27% (опыт: контроль). Количество нежизнеспособных клеток — 0,4–0,5% в опыте и 0,8–0,9% в контроле — в исследуемых штаммах идентично. По-видимому, благоприятные условия для развития дрожжевых организмов создает наличие в геотермальной воде микро- и макроэлементов, борной, кремниевой кислот, органических веществ, в частности, гуминовых кислот, которые способны действовать как мембранотропные соединения [13]. Морфология гигантских колоний — один из параметров, по которому можно оценивать действие таких соединений. Нами исследованы двадцатисуточные культуры, выращенные на плотной питательной среде (контрольной и опытной) в чашках Петри при 30 °С. Коло-

нии опытного варианта Y-503 имели форму цветка светло-палевого цвета, M-12X — округлую палевого цвета. В отличие от колоний, выращенных на среде с геотермальной водой, контрольные варианты характеризовались меньшими размерами, изменением формы, поверхности и профиля. Обнаруженные отличия типичны для исследуемых дрожжей и определяются в конечном итоге набором ферментов, обеспечивающих обмен и жизнеспособность клеток данного штамма.

Определенный интерес представляет исследование динамики содержания некоторых свободных органических кислот в мелассных питательных средах и сброженных субстратах. В результате изучения состава низкомолекулярных органических кислот в средах культивирования дрожжей *S. oviformis* и *S. cerevisiae* нами идентифицированы муравьиная, уксусная, молочная, щавелевая, янтарная, яблочная и лимонная кислоты (рис. 1).

Как известно, в мелассе содержатся нелетучие и летучие органические кислоты; нелетучие попадают в мелассу из свеклы и образуются из моносахаров, в состав летучих входят муравьиная, уксусная, пропионовая, масляная, изомасляная, валериановая и капроновая кислоты. Органические кислоты в мелассе находятся в свободном состоянии и в виде солей. Многие штаммы дрожжей *S. cerevisiae*, в том числе и спиртовые, эффективно используют аммиачные соли уксусной, молочной, яблочной и янтарной кислот. Однако в присутствии достаточного количества сбраживаемых сахаров, как в нашем эксперименте, аммиачные соли органических кислот служат для дрожжей лишь источником азота и как питательный материал не имеют значения. Известно, что освобождающиеся при расщеплении солей свободные органические кислоты оказывают большее ингибирующее действие на дрожжи, чем их соли. Присутствуя в сбраживаемой среде, они задерживают размножение дрожжевых клеток и тормозят скорость биохимических процессов. При сбраживании концентрированных мелассных растворов органические кислоты подавляют действие ферментов, участвующих в гликолитическом процессе. Муравьиная кислота действует на многие ферменты, обеспечивающие превращение глюкозы в пивоваренную

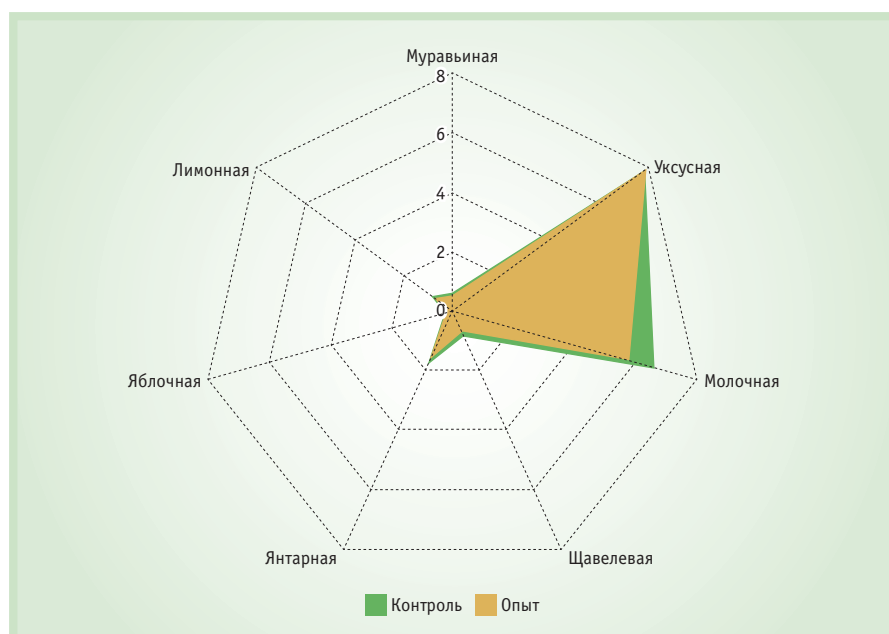


Рис. 1. Содержание органических кислот (г/л) в мелассных питательных средах с использованием геотермальной воды фенольного класса (опыт) и традиционной (контроль)



Рис. 2. Содержание органических кислот (мг/л) в мелассных субстратах, сброженных дрожжами *S. cerevisiae* Y-503 (а) и *S. oviformis* M-12X (б)

кислоту; янтарная и яблочная кислоты при сбраживании концентрированных мелассных растворов действуют на ферменты гексокиназу, фосфофруктокиназу, ответственные за образование из глюкозы фруктозодифосфата. Особенно чувствительны дрожжи к органическим кислотам при определенных значениях pH. Кроме того, степень токсичности органических кислот находится в прямой зависимости от количества атомов углерода в молекуле кислоты. Так, муравьиная кислота снижает коэффициент размножения дрожжей, но практически не вызывает отмирания клеток. Сравнительно слабым ингибитором является и уксусная кислота [10].

Суммарное содержание низкомолекулярных органических кислот в опытной и контрольной средах составляло соответственно 17,86 : 19,22 г/л. В количественном отношении преобладали уксусная и молочная кислоты; для обоих вариантов сред отмечена закономерность: муравьиная, щавелевая, яблочная, лимонная и янтарная кислоты представлены в незначительном количестве. Как видно из рис. 1, содержание указанных органических кислот в средах культивирования почти идентично, за исключением незначительно преобладающей в контроле молочной кислоты.

В процессе брожения органические кислоты активно метаболизируются дрожжевыми клетками [14, 15]. После брожения наблюдается снижение содержания всех органических кислот и за счет их этерификации [10].

Исследование динамики содержания свободных органических кислот в сброженных субстратах выявило их значительное снижение во всех вариантах (рис. 2). Так, уксусная, щавелевая и яблочная кислоты полностью отсутствовали, а муравьиная была обнаружена лишь в контрольном варианте *S. cerevisiae* Y-503 (7,5% от первоначального количества в среде). Лимонная кислота отсутствовала во всех вариантах, кроме опытного варианта субстрата, сброженного *S. oviformis* M-12X, где обнаружено 8,9% от первоначального количества в среде. Молочная кислота не выявлена лишь в опытном варианте субстрата M-12X, при этом в контроле ее содержание от исходного количества составляло 4,9%; в опытном варианте субстрата, сброженном Y-503, — 5,9%, в контроле — 4,6%. Янтарная кислота отсутствовала в опытном варианте M-12X, в контроле обнаружено 34,6%; в опытном варианте Y-503 — 59,6%, в контроле — 52,4% от первоначального количества в среде.

При сбраживании мелассы, кроме основных продуктов спиртового брожения (этанол и углекислого газа), в результате сбраживания сахаров образуются вторичные продукты (в том числе лимонная, уксусная, янтарная, молочная кислоты), которые в дальнейшем могут быть использованы дрожжами в процессах метаболизма. Так, уксусная кислота, полностью отсутствующая в сброженных субстратах (см. рис. 2), при спиртовом брожении, возможно, используется дрожжами для построения аминокис-

лот, белков и жиров [10]. Органические кислоты участвуют и в образовании побочных метаболитов. Ранее в результате исследований летучих примесей во всех вариантах сброженных субстратов выявлен этиловый эфир уксусной кислоты [16, 17]. Однако контрольные варианты обоих штаммов существенно отличались количеством данного синтезируемого побочного продукта: при использовании *S. cerevisiae* — 737,44 : 747,54 мг/дм<sup>3</sup> (опыт : контроль) и *S. oviformis* M-12X — 788,21 : 806,32 мг/дм<sup>3</sup> (опыт : контроль). Очевидно, присутствие в среде культивирования дрожжей биологически активных веществ геотермальной воды, ускоряющих течение процесса спиртового брожения [18, 19], повлияло на обмен исследуемых органических кислот. Более низкое содержание этилового эфира уксусной кислоты в отгонах сброженных опытных субстратов, вероятно, связано с изменением регуляторных функций клетки, а также со специфической обмен органических кислот и отличительными свойствами различных штаммов дрожжей. Так, суммарное содержание низкомолекулярных органических кислот в субстратах, сброженных *S. cerevisiae*, в контроле составляло 7,1% от первоначального количества в среде, в опыте — 7,8%; в контрольном варианте *S. oviformis* — 5,2%, опытном — 0,56%.

Таким образом, обнаружено, что содержание исследуемых свободных органических кислот в сброженных субстратах зависит не только от условий культивирования, но

и от свойств различных штаммов. По-видимому, это явление можно объяснить различной сбалансированностью метаболических процессов в клетках исследуемых дрожжей. Как показали наши исследования, наличие геотермальной воды фенольного класса в составе среды культивирования *S. cerevisiae* Y-503 и *S. oviformis* M-12X оказывает влияние на морфологические и физиологические особенности клеток, в том числе и на обмен исследуемых органических кислот, что в конечном итоге способствует активации процесса спиртового брожения.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Изменение ультраструктуры клеток Yarrowia lipolytica* в стрессовых условиях/Е. Н. Бирюкова [и др.] // Микробиология. — 2011. — Т. 80. — № 3. — С. 344–348.
2. *Особенности изменения содержания субстратов эндогенного дыхания в клетках Saccharomyces cerevisiae* при низкой температуре/Д. А. Аливердиева [и др.] // Биохимия. — 2006. — Т. 71. — № 1. — С. 50–58.
3. *Перспективы производства органических кислот дрожжами Yarrowia lipolytica*/Т. В. Финогенова [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. — 2005. — Т. 41. — № 5. — С. 478–486.
4. *Роль органических кислот в производстве игристых вин*/Л. А. Оганесянц [и др.] // Виноделие и виноградарство. — 2008. — № 2. — С. 15–17.
5. *Aliverdieva, D. A. Plasmalemma dicarboxylate transporter of Saccharomyces cerevisiae is involved in citrate and succinate influx and is modulated by pH and cations*/D. A. Aliverdieva,

- D. V. Mamaev, D. I. Bondarenko // Biochemistry (Moscow) Supplement. Series A: Membrane and Cell Biology. — 2008. — Т. 2. — № 4. — С. 354–364.
6. *Patent WO № 2013061941 A1. Method for producing ethanol that uses recombinant yeast.* Onishi Toru. 2013.
7. *Биотехнология* активного синтеза этанола в сбраживаемой среде на основе использования геотермальной воды нефенольного класса/Ш. А. Абрамов [и др.] // Вестник Дагестанского научного центра. — 2009. — № 34. — С. 21–28.
8. *Молекулярно-генетическая характеристика спиртовых дрожжей Saccharomyces cerevisiae*/Е. С. Наумова [и др.] // Микробиология. — 2013. — Т. 82. — № 2. — С. 176–186.
9. *Исламмагомедова, Э. А. Потребление минеральных веществ и аминокислот дрожжами Saccharomyces oviformis* в процессе спиртового брожения/Э. А. Исламмагомедова, С. Ц. Котенко, Э. А. Халилова // Производство спирта и ликероводочных изделий. — 2011. — № 3. — С. 17–19.
10. *Маринченко, В. А. Технология спирта из мелассы*/В. А. Маринченко, Б. Д. Метюшев, В. Н. Швец. — М., 1975. — 284 с.
11. *Голубенко, А. М. Определение гидроксикарбоновых кислот в продуктах питания методом капиллярного электрофореза*/А. М. Голубенко, В. В. Никоноров, Т. Г. Никитина // Журнал аналитической химии. — 2012. — Т. 67. — № 9. — С. 866–870.
12. *Новая методика определения органических кислот в винах методом капиллярного электрофореза*/В. В. Сурякова [и др.] // Журнал Сибирского федерального университета. Серия: Химия. — 2011. — Т. 4. — № 4. — С. 393–400.

13. *О мембранной активности гидрогумата* — гуминового препарата из торфа/Т. Ф. Овчинникова [и др.] // Биологические науки. — 1991. — № 10. — С. 103–108.
14. *Авакянц, С. П. Биохимические основы технологии шампанского*/С. А. Авакянц. — М., 1980. — 350 с.
15. *Байрактар, В. М. Концентрация органических кислот в виноматериалах после ферментации дрожжей Saccharomyces cerevisiae*/В. М. Байрактар // Биотехнология. — 2013. — Т. 6. — № 2. — С. 97–106.
16. *Изменение морфологических и технологических свойств дрожжей Saccharomyces cerevisiae Y-503* в условиях спиртового брожения/С. Ц. Котенко [и др.] // Вестник Дагестанского научного центра. — 2010. — № 39. — С. 32–37.
17. *Исламмагомедова, Э. А. Некоторые физиолого-биохимические свойства штамма Saccharomyces oviformis M-12X* в зависимости от условий культивирования/Э. А. Исламмагомедова, Э. А. Халилова, С. Ц. Котенко // Производство спирта и ликероводочных изделий. — 2011. — № 1. — С. 13–15.
18. *Влияние гуматов окисленных бурых углей на процесс спиртового брожения*/А. Д. Дашищыренова [и др.] // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Экология и безопасность жизнедеятельности. — 2005. — № 1. — С. 167–172.
19. *Халилова, Э. А. Геотермальная вода фенольного класса и некоторые особенности метаболизма дрожжей S. cerevisiae Y-503* в процессе синтеза биоэтанола/Э. А. Халилова, С. Ц. Котенко, Э. А. Исламмагомедова // Вестник Дагестанского научного центра. — 2013. — № 49. — С. 49–54.

**Сравнительный анализ морфологических особенностей дрожжей Saccharomyces в процессе спиртового брожения**

**Ключевые слова**

геотермальная вода; дрожжи; меласса; морфология; органические кислоты; этанол.

**Реферат**

Установлено, что геотермальная вода фенольного класса в составе мелассной среды культивирования дрожжей *S. cerevisiae* Y-503 и *S. oviformis* M-12X способствует изменению морфологических свойств дрожжей и интенсификации процесса биосинтеза этанола. Обнаружена зависимость содержания органических кислот в сброженных субстратах от условий культивирования и свойств исследуемых штаммов дрожжей.

**Авторы**

Исламмагомедова Эльвира Ахмедовна, канд. биол. наук;  
Халилова Эсланда Абдурахмановна, канд. биол. наук  
Прикаспийский институт биологических ресурсов ДНЦ РАН,  
367025, г. Махачкала, ул. М. Гаджиева, д. 45, islammagomedova@mail.ru

**Comparative analysis of the morphophysiological particularities of yeast Saccharomyces in process of ethanol fermentation**

**Key words**

geothermal water; yeast; melass; morphology; organic acids; ethanol.

**Abstract**

It is established that geothermal water of phenol class in the composition of melass medium of cultivating of yeast *S. cerevisiae* Y-503 and *S. oviformis* M-12X promoted to a change of morphophysiological properties of yeast and intensification of the process biosynthesis of ethanol. Is discovered the dependence of content of organic acids in substrats of fermentation on the conditions of cultivating and properties of studing strains of yeast.

**Authors**

Islammagomedova Elvira Ahmedovna, Candidate of Biological Science;  
Halilova Eslanda Abdurahmanovna, Candidate of Biological Science  
Caspian Institute of Biological Resources of DSC RAS,  
45 M. Gadzhieva st., Makhachkala, 367025, Russia, islammagomedova@mail.ru