

Елена Бадьева

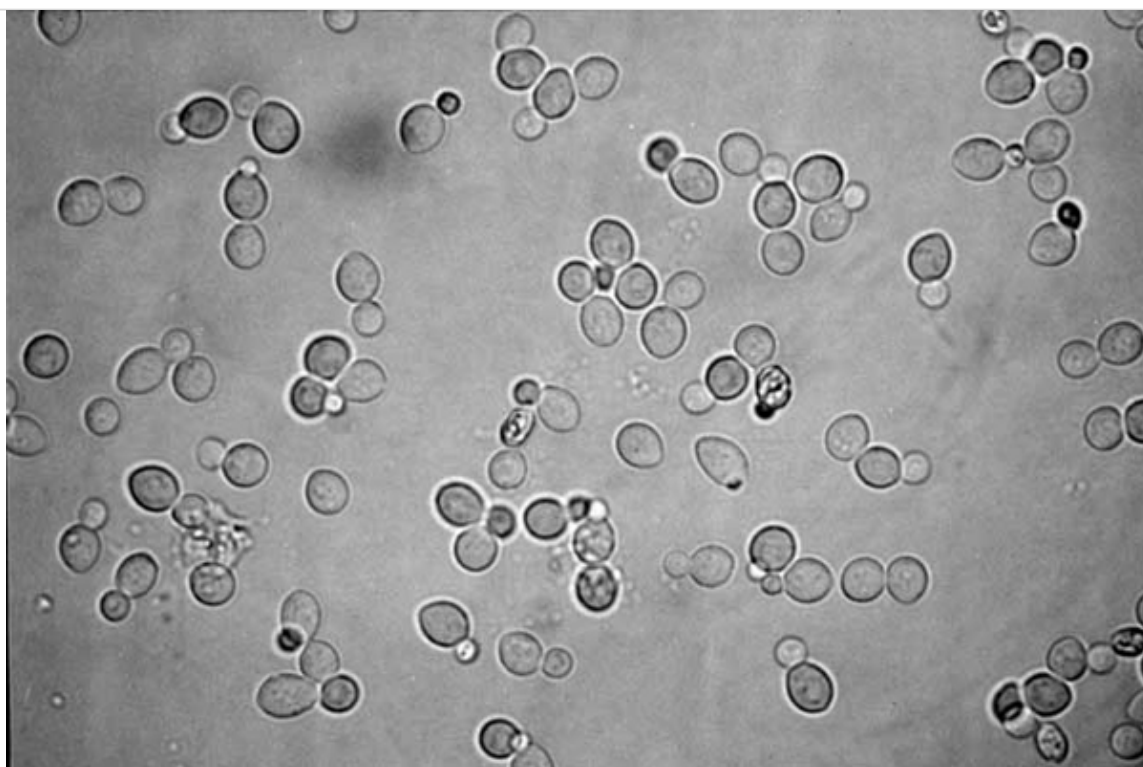
Дрожжи размножаются быстрее, если их попеременно то охлаждать, то нагревать

ПО СТАТЬЕ:

В. А. Калюжин

Терморезистентность у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

Том 72, 2011. № 2, Март - апрель • Стр. 140–149



Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*.

Температура 30–33°C оптимальна для размножения дрожжей, но только в том случае, если ее поддерживать постоянно. Экспериментально показано, что повышение температуры до сверхоптимальной (37,5–40°C) стимулирует ускоренное размножение дрожжей, если до этого они жили при более низкой температуре (14–30°C). При длительном воздействии повышенной температуры дрожжи теряют терморезистентность, однако способны восстановить ее за всего за одно поколение

при 20°C. По-видимому, это свойство является адаптацией к суточным колебаниям температуры в природе. Предполагается, что механизм, позволяющий дрожжам проявлять терморезистентность, локализован в клеточной мембране и его функционирование зависит от энергетической и хемиосмотической систем клеток.

Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* применяются в производстве алкогольной и хлебопекарной продукции, также они широко используются в научных исследованиях. Так, *S. Cerevisiae* стали первыми эукариотами, чей геном был полностью секвенирован. Этот же вид послужил одним из модельных объектов при изучении способности микроорганизмов к опережающему реагированию, т.е. к предвидению изменения условий окружающей среды (см.: У микробов обнаружена способность к предвидению. «Элементы», 23.06.09). На культуре *S. Cerevisiae* ведутся исследования механизмов экспрессии генов, роли белков теплового шока и многие другие.

Дрожжи *S. Cerevisiae* в природе обитают на поверхности поврежденных сладких и сочных плодов, в нектаре цветов или в местах истечения растительных соков. В течение суток температура естественной среды обитания дрожжей подвергается резким колебаниям. Естественно предположить, что в процессе эволюции дрожжи должны были хорошо приспособиться к таким перепадам.

Работа сотрудника НИИ Биологии и биофизики при Томском государственном университете В.А. Калюжина посвящена поиску этих адаптаций. Автор исследовал развитие устойчивости *S. cerevisiae* к повышению температуры. Показателем устойчивости принимается скорость размножения (почкования) дрожжевых клеток.

В первой серии опытов 12 поколений дрожжей выращивали в насыщенной питательными веществами среде при оптимальной кислотности (pH=4) и постоянной температуре. Разные подопытные популяции содержались при температурах от 14 до 40°C, что примерно соответствует диапазону температурных колебаний в естественных условиях обитания в летний период. Быстрее всего дрожжи размножались при 30-33°C (табл. 1).

Температура культивирования, °C	Время генерации клеток (время удвоения числа клеток), ч	Удельная скорость роста, $\mu, \text{ч}^{-1}$
14	8.7 ± 0.27	0.08 ± 0.01
20	5 ± 0.1	0.14 ± 0.03
25	3 ± 0.1	0.23 ± 0.005
30	2.3 ± 0.04	0.3 ± 0.0075
33	2.2 ± 0.04	0.32 ± 0.005
36	3 ± 0.1	0.14 ± 0.005
37.5	5 ± 0.1	0.14 ± 0.005

39	9.9 ± 0.7	0.07 ± 0.005
----	---------------	------------------

Таблица 1. Скорость размножения дрожжей при постоянной температуре (из обсуждаемой статьи В.А.Калюжина)

Следующая серия экспериментов – выращивание культур сначала при низкой температуре t_1 , а затем при более высокой t_2 (остальные условия не менялись) – показала, что при переходах $t_1 \rightarrow t_2$ в диапазоне t_2 от 20 до 36°C скорость размножения дрожжей достигает значения, отмеченного при культивировании в стационарном режиме при температуре t_2 , в первом же поколении (табл. 2). Однако при повышении температуры до сверхоптимальной (37,5-40°C) скорость размножения дрожжей значительно возрастала по сравнению с культурами стационарных температур начального и конечного режимов (при 40-45°C клетки все же быстро погибали). Клетки были способны поддерживать высокий темп деления при сверхоптимальной температуре t_2 на протяжении 4-6 часов (2-4 поколений). После этого скорость размножения снижалась до того уровня, который характерен для дрожжей, выращиваемых при постоянной температуре t_2 .

Температурный переход $t_1 \rightarrow t_2$, °C	Время генерации клеток (время удвоения числа клеток) при t_2 , ч			
	I	II	III	IV
14→20	4.75 ± 0.5	5 ± 0.2	5 ± 0.1	5 ± 0.1
20→25	3.2 ± 0.35	3.1 ± 0.12	3 ± 0.1	3 ± 0.1
25→30	2.3 ± 0.08	2.3 ± 0.06	2.3 ± 0.04	2.3 ± 0.04
30→36	3 ± 0.1	2.5 ± 0.2	2.8 ± 0.2	3 ± 0.1
30→37.5	2.5 ± 0.2	2.6 ± 0.2	2.6 ± 0.2	2.7 ± 0.3
30→39	2.7 ± 0.2	3.2 ± 0.3	3.6 ± 0.4	3.8 ± 0.5
30→40	4.2 ± 0.8	Остановка размножения дрожжей		
14→30	2.4 ± 0.1	2.3 ± 0.15	2.3 ± 0.1	2.3 ± 0.08
20→30	2.4 ± 0.2	2.3 ± 0.15	2.3 ± 0.1	2.3 ± 0.06
14→39	3.3 ± 0.3	2.7 ± 0.3	2.8 ± 0.4	3.5 ± 0.8
20→37.5	2.6 ± 0.12	2.7 ± 0.14	2.8 ± 0.2	3.5 ± 0.6

Таблица 2. Скорость размножения дрожжей при переходе от низких к высоким температурам. Римскими цифрами показан порядковый номер поколения, начиная с момента увеличения температуры (из обсуждаемой статьи В.А.Калюжина)

Таким образом, переход к повышенным температурам стимулировал ускоренное размножение дрожжей, ранее живших в более прохладных условиях. В.А. Калюжин называет данное свойство терморезистентностью и полагает, что это адаптация,

позволяющая дрожжам в природе благополучно пережить период послеполуденного максимума температур.

Автор исследовал факторы, необходимые для формирования внутриклеточных условий, обеспечивающих терморезистентность.

Дрожжи в течение 12 поколений выращивали при 37,5°C (время одной генерации – 5 часов, см. табл. 1). Затем температуру снижали до 20°C (время одной генерации также 5 часов), выдерживали в течение различных интервалов времени и вновь подогревали до 37,5°C. Оказалось, что достаточно 4-6 часового пребывания культуры в прохладе, чтобы время первой генерации при повышении температуры составило 2,6 часа – как при переходе 20→37,5°C (табл. 2). Следовательно, для приведения системы терморезистентности в полную «боевую готовность» дрожжам необходимо 4-6 часов пребывания при пониженной температуре. Это сопоставимо с длительностью и величиной ночного понижения температуры в природе, т.е. ночью дрожжи успевают сформировать терморезистентность, которая реализуется днем.

Возможный биохимический механизм системы терморезистентности изучался путем создания дефицита в питательной среде различных веществ (глюкозы, солей азота, фосфора, калия, магния, а также бета-аланина и дестиобиотина – факторов роста растительного происхождения, которые нужны дрожжам для нормального развития).

Выяснилось, что культуры дрожжей, лимитированные глюкозой, фосфором или калием, прекращали рост при 37,5°C уже в первом поколении. Остальные вещества никак не влияли на устойчивость к высоким температурам. Исходя из этого, В.А. Калюжин предположил, что термоустойчивость зависит в основном от биоэнергетических функций клетки. Согласно хемиосмотической теории П.Д. Митчела (см.: В.П. Скулачев. Митчел и его догадка), запасание энергии клеткой (синтез АТФ) возможно благодаря созданию разности концентраций ионов H^+ в двух отсеках системы, разделенных мембраной. Ионы K^+ обеспечивают возможность транспорта ионов водорода через мембрану (служат антипортом для ионов H^+ : выход K^+ в обмен на H^+ . См.: Антонов В.Ф. Мембранный транспорт). Глюкоза является основным и наиболее универсальным источником энергии для обеспечения метаболических процессов (см.: Лемеза Н.А. и др. Энергетический обмен). Фосфор также необходим для синтеза АТФ. Таким образом, полученные результаты неплохо согласуются с предположением о том, что термоустойчивость дрожжей связана с активностью хемиосмотической биоэнергетической системы. В дополнительных опытах было установлено, что при добавлении глюкозы и фосфора к лимитированным по этим параметрам культурам дрожжи восстанавливали утраченное свойство терморезистентности.

Для подтверждения роли биоэнергетической системы в обеспечении терморезистентности были проведены опыты с 2,4-динитрофенолом (ДНФ), который ингибирует фосфорилирование, т.е. синтез АТФ из АДФ и фосфата. В присутствии ДНФ рост дрожжей прекращался в первый час после повышения температуры до 37,5°C, однако после удаления ДНФ терморезистентность восстанавливалась.

При закислении среды (до pH 2,35) дрожжи также прекращали размножаться в первый час после повышения температуры до 37,5°C и снова начинали при повышении pH до 4.

В.А. Калюжин считает, что поскольку «рН фактор оказывает влияние в основном на хемиосмотическую систему плазмолеммы клетки,... ДНФ ингибирует не только систему, расположенную в плазмалемме, но и митохондриальный комплекс хемиосмотической системы», то «проявление терморезистентности осуществляется за счет активности хемиосмотической энергетической системы, локализованной в плазмалемме дрожжевой клетки».

Автор обращает внимание на то, что дрожжи, лимитированные источником азота, необходимым для синтеза белков, не теряют свойства терморезистентности. Поэтому, скорее всего, в формировании терморезистентности синтез белков, в том числе белков теплового шока, ключевой роли не играет.

Таким образом, терморезистентность дрожжей, являющаяся адаптацией к суточным колебаниям температуры в природных условиях, формируется в период понижения температуры и зависит в основном от активности хемиосмотической энергетической системы.

Описанное свойство терморезистентности может быть использовано в прикладной биотехнологии для управления скоростью роста дрожжей и, вероятно, других культур при помощи температурного фактора.