

Адаптация дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* к экстремальным условиям этанола

Научный руководитель – Полякова Анна Владимировна

Тарасов Денис Романович

Студент (бакалавр)

Южный федеральный университет, Академия биологии и биотехнологии им. Дмитрия Иосифовича Ивановского, Кафедра биохимии и микробиологии, Ростов-на-Дону, Россия

E-mail: d.tara03@mail.ru

Научный руководитель: Полякова Анна Владимировна

Адаптация дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* к экстремальным условиям этанола имеет большое значение в различных областях, включая биотехнологию и промышленное производство. Этанол является токсичным для клеток при высоких концентрациях. Он нарушает клеточные мембраны, изменяет уровень pH, осмолярность и может вмешиваться в нормальные метаболические процессы. В процессе ферментации для получения спирта в том числе в алкогольной промышленности в условиях высокой концентрации этанола дрожжи испытывают стресс, который может замедлить или остановить их рост и активность. Адаптация позволяет поддерживать высокую скорость ферментации при высоких уровнях этанола. Адаптированные к высокому уровню этанола дрожжи могут способствовать увеличению выходов этанола, что особенно важно для биотехнологических процессов, направленных на производство продуктов на основе спирта.

В настоящее время штамм дрожжей *S. cerevisiae* используется на промышленном производстве для создания продуктов на основе спирта, но для улучшения его конечного выхода изучают стрессовые воздействия и механизмы регуляции метаболизма клетки в процессе ее адаптации. Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* обладают способностью адаптации к экстремальным условиям, это делает их перспективными для дальнейшего использования в биотехнологических процессах.

Так в работе Э. А. Исламмагомедова с соавторами (2020) приводит данные об адаптации дрожжевых клеток в экстремальных значениях глюкозы и этанола. Сахаромицеты культивировались на субстратах с 2%, 10% 20% значениях глюкозы и 6%, 12%, 18% этанола. При наличии разных концентраций сахара в субстрате клетки лишь изменились в размерах и приобрели округло-овальную форму, когда как с повышением процента этанола клетки приобретали неправильную форму, установлено наличие зернистости цитоплазмы, что предполагает запас питательных веществ. Таким образом дрожжевые клетки обладают способностью адаптироваться к стрессовым условиям при высоких концентрациях этанола и глюкозы в субстрате.

Цель работы - адаптация дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* US-05 к экстремальным условиям этанола. Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- 1) Культивирование дрожжей в условиях этанольного стресса.
- 2) Изучение культуральных и морфологических особенностей сахаромицетов, выращенных в экстремальных условиях.
- 3) Отбор штаммов *Saccharomyces cerevisiae* US-05, устойчивых к повышенным концентрациям этанола.

Методы исследования

Посев инокулят *Saccharomyces cerevisiae* US-05 проводился на жидкой среде Сабуро в колбах и пробирках. Следующим этапом был отбор клеток дрожжей, устойчивых к повышенным концентрациям этанола. С этой целью дрожжи, культивируемые на 15% этанола, пересекали в среду Сабуро с 20% этанола. По истечению 3–5 суток культивирования дрожжи из пробирок и колб с жидкой средой Сабуро (0,1 мл) высевались на плотную среду Сабуро. Температура культивирования 30 °С. Количественный учёт клеток дрожжей осуществляли подсчетом колоний в чашках Петри с последующим пересчетом на 1 мл. Определение размеров клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* US-05 проводилось под микроскопом серии «Биолам» с помощью винтового окулярного микрометра. Препарат «раздавленная капля» (увел. 600). Предварительно определялась цена деления с использованием объект-микрометра. Измеряли клетки дрожжей, выращенных на среде Сабуро (контроль) и на среде Сабуро с этанолом 15% и 20%.

Результаты исследования

После 3–5 суток культивирования на чашках Петри, а также пробирках и колбах наблюдался рост сахаромикетов в контроле, с содержанием 15 % этанола в среде. На плотной питательной среде во всех вариантах опыта регистрировался обильный рост с той разницей, что в среде с добавлением 15% размер колоний был значительно меньше, чем в контроле. Колонии сахаромикетов кремового цвета, непрозрачные, с выпуклым профилем, гладким краем, с однородной структурой клеток.

Учет численности дрожжей на жидкой среде Сабуро в колбах и пробирках осуществляли чашечным методом, результаты представлены на рисунке 1.

Следующим этапом работы была попытка получения популяции дрожжей, способных к росту при более высокой концентрации этанола. С этой целью дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* US -05, адаптированные к концентрации 15% этанола, пересекали на плотную среду Сабуро с содержанием 20% этилового спирта. Посевы культивировали при температуре 30 °С. По истечении срока культивирования обильный рост дрожжей регистрировался при температуре 30 °С

Последний этап работы заключался в изучении морфологических особенностей дрожжей. Для этого проводили измерение размеров клеток *Saccharomyces cerevisiae* US -05 (данные представлены на рисунке 2).

Анализ таблицы, содержащей информацию о размерах дрожжевых клеток, показывает, что в оптимальных условиях среднее значение составляет 5,97 мкм. Практически не отличаются по размерам клетки в присутствии 15% этанола, выращенные на жидкой среде Сабуро – 5,25 мкм. На той же концентрации этанола, но на плотной среде средний размер увеличивается до 7,02 мкм. Такие различия можно объяснить разными условиями аэрации и сменой типа метаболизма с бродильного на дыхательный. Кроме того, возможно контакт клеток со спиртом ограничивает консистенция среды. При увеличении концентрации этанола до 20% средний размер клеток ожидаемо уменьшается. Во всех вариантах эксперимента размеры клеток значительно различаются, так как почки, отделившиеся от материнских клеток всегда меньше по размеру.

В рамках исследования проводилось культивирование дрожжевых клеток при оптимальной температуре 30 °С, а также в условиях этанольного стресса с концентрацией 15% и 20% в среде. Было обнаружено, что сахаромикеты способны расти как в оптимальных условиях, так и в условиях стресса.

В ходе исследования было выявлено, что в условиях стресса клетки дрожжей изменяют свою форму и размеры. В частности, в условиях этанольного стресса размеры клеток варьировались от 4,98 мкм при культивировании в среде с содержанием 20% этанола и до 7,02 мкм при 15% этанола, тогда как при оптимальных условиях средние размеры не превышали 5,97 мкм.

Источники и литература

- 1) Исламмагомедова Э. А. и др. Изменение морфологических свойств дрожжей *S. cerevisiae* в условиях стресса //Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2019. – Т. 21. – №. 2. – С. 101-107.
- 2) Исламмагомедова Э. А. и др. Морфологические особенности дрожжей рода *Saccharomyces* в процессе адаптации к экстремальным значениям глюкозы и этанола //Известия высших учебных заведений. Северо-Кавказский регион. Естественные науки. – 2020. – №. 1 (205). – С. 95-101.
- 3) Исламмагомедова Э. А., Халилова Э. А., Абакарова А. А. Некоторые биохимические и морфологические свойства дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* в условиях стресса (обзор) //Известия высших учебных заведений. Северо-Кавказский регион. Естественные науки. – 2022. – №. 3 (215). – С. 129-138
- 4) Кузнецова Т. А., Иванченко О. Б. Морфометрическое исследование клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* как метод оценки их физиологического состояния //Научный журнал НИУ ИТМО. Серия «Процессы и аппараты пищевых производств». – 2020. – №. 1 (43). – С. 39-46.
- 5) Калужин В. А. Терморезистентность у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* //Журнал общей биологии. – 2011. – Т. 72. – №. 2. – С. 140-150.

Иллюстрации

Условия культивирования	30°C 0% Этанола	15% Этанола
Колбы	⁴ 53,0×10	⁴ 23,0×10
Пробирки	⁴ 22,0×10	⁴ 8,5×10

Рис. : Учет численности дрожжей на жидкой среде Сабуро.

вариант	число делений окулярного микрометра	размер, мкм	среднее значение, мкм
Контроль (0% Этанол)	46	6,90	5,97
	38	5,70	
	50	7,50	
	28	4,20	
	37	5,55	
15 % этанола (пробирка – жидкая среда)	19	2,85	5,25
	40	6,00	
	47	7,05	
	34	5,10	
	35	5,25	
15 % этанол (плотная среда)	55	8,25	7,02
	42	6,30	
	36	5,40	
	41	6,15	
	60	9,00	
20 % этанола (плотная среда)	30	4,50	4,98
	37	5,55	
	33	4,95	
	44	6,60	
	22	3,30	

Рис. : Морфологических особенностей дрожжей