

УДК 663.13

Исследование ксерорезистентности и репродуктивной активности обезвоженных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

Д-р техн. наук, проф. Т.В. МЕЛЕДИНА, С.А. ЧЕРЕПАНОВ

Санкт-Петербургский государственный университет низкотемпературных и пищевых технологий

The effect of relationship of nitrogen and carbohydrate – containing components in the yeast cells on their reproductive activity after dehydration was determined. It was found that by changing this relationship it is possible to control the synthesis of trehalose, glycogen and protein. With the relationship of the protein/structural carbohydrate equal to 1 ± 0.1, high viability and preservation of reproductive activity of cells is reached.

Проблема получения ксерорезистентных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* интересует как теоретиков, так и практиков. В результате их работы накоплено большое количество сведений, относящихся главным образом к получению активных сухих хлебопекарных дрожжей длительного срока хранения. При этом оцениваются их хлебопекарные свойства, то есть бродильная активность при сбраживании сахарозы (зимазная активность) и мальтозы (мальтазная активность), а не репродуктивная активность, которая имеет большое значение при использовании дегидратированных дрожжей в качестве посевного материала в промышленном масштабе.

Известно, что физиологическая активность клеток и их репродуктивная способность определяются содержанием в них белка и РНК, от уровня которых в посевном материале зависит интенсивность размножения клеток при последующем их культивировании, а также экономический коэффициент потребления субстрата. В противовес этому ксерорезистентность дрожжей коррелирует с низким содержанием в них азотсодержащих фракций, и прежде всего свободных аминокислот. Особая роль в защите клеток во время дегидратации отводится трегалозе, которая предохраняет клеточные структуры в стрессовых ситуациях, например при обезвоживании дрожжей, осмотическом или температурном шоке. Определенная роль в сохранении жизнеспособности клеток в экстремальных условиях отводится также другому резервному веществу клеток – гликогену, и в частности его метаболически активным фракциям [2,3,4,5].

Для выяснения влияния соотношения азотсодержащих и углеводсодержащих компонентов клеток на их репродуктивную активность после обезвоживания были исследованы два образца чистой культуры дрожжей

Saccharomyces cerevisiae, выращенных из пробирочной культуры штамма ЛВ-7 из коллекции ГЦ «Хлеб» (Санкт-Петербург).

В первом случае для накопления биомассы чистой культуры (ЧК) использовали режим культивирования, в котором приток углеводного питания позволяет получить клетки бродильного типа (табл. 1). В этом варианте подача азотного питания была рассчитана на получение клеток с содержанием сырого протеина около 50 %, что в пересчете на СВ составляет 9 % азота. Этот образец, как видно из табл. 2, имел высокое содержание белка, свободных аминокислот и РНК.

Второй образец дрожжей также был получен по принципам периодической культуры с притоком питательных компонентов, но при этом в целях увеличения количества мобильных резервных углеводов расход ассимилируемого азота был рассчитан, исходя из содержания сырого протеина в дрожжах 37 – 38 %, что в пересчете на азот составляет 6 % от СВ. Эти дрожжи были дыхательного типа и содержали меньше азотсодержащих компонентов, чем первый образец (см. табл. 1 и 2).

Полученные образцы высушивали на лабораторной установке в виброкипящем слое при температуре

Таблица 1
Энергетический обмен в клетках чистой культуры

Образец ЧК	Дыхательная активность Q_{O_2} , мкл/мг СВ/ч	Аэробная бродильная активность Q_{CO_2} воздух, мкл/мг СВ/ч	Анаэробная бродильная активность Q_{CO_2} азот, мкл/мг СВ/ч
1	147	132	403
2	150	78	399

Таблица 2

Химический состав интактных и дегидратированных клеток *Saccharomyces cerevisiae*, штамм ЛВ-7

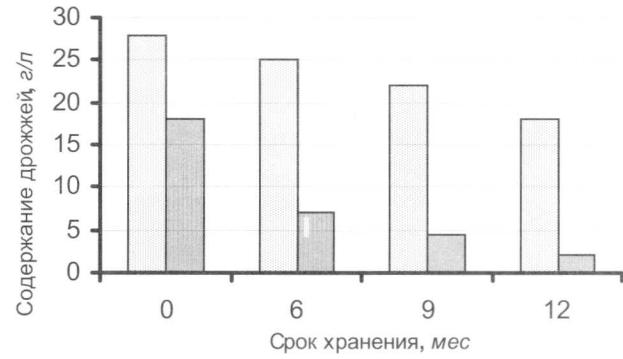
Компонент	1-й образец ЧК		2-й образец ЧК	
	Интактные клетки, % от СВ	Дегидратированные клетки, % от СВ	Интактные клетки, % от СВ	Дегидратированные клетки, % от СВ
Белок	41,2	32,6	32,0	29,1
Аминокислотный пул	9,1	10,3	5,1	6,1
РНК	8,6	9,9	6,3	7,9
Трегалоза	1,2	0,3	14,8	7,9
Гликоген, растворимый в уксусной кислоте	1,7	0,4	3,6	2,9
Гликоген, растворимый в хлорной кислоте	3,2	6,9	6,0	5,7
Отношение белок/углеводы				
	1,55	1,13	0,68	0,71

35 °C до остаточного содержания влаги $8,0 \pm 0,5$ %.

Обнаружено, что клетки бродильного типа теряют до 21 % белка. Одновременно в них происходят значительные изменения количества запасных фракций гликогена (табл.2). В результате после сушки количество жизнеспособных клеток составляет только 70 – 75 %.

Во втором образце дегидратация привела к значительному падению уровня трегалозы в дрожжах, в то время как потери белка при обезвоживании не превышали 9 %. В результате жизнеспособность полученных дрожжей составила 90 – 92 %.

Далее исследовали репродуктивную активность обезвоженных дрожжей чистой культуры при длительном хранении в среде без доступа воздуха. Способность к размножению оценивали по накоплению биомассы после культивирования в течение 6 ч в среде, содержащей 5 % сбраживаемых сахаров, источником которых являлась меласса, и после аэрации 2 л/ч/л. Показано, что через 6 мес хранения активность 1-го образца ЧК упала по сравнению с исходными, необезвоженными дрожжами в 3,5 раза, в то время как у 2-го образца она составила 83,3 % от исходной (см. рисунок). Через 12 мес хранения эта величина для первого образца составляла 7 %, а для второго – 64 % от накопления биомассы не подвергшихся обезвоживанию дрожжей ЧК. Таким образом,



□ – трегалоза 14,8% от СВ; ■ – трегалоза 1,2 % от СВ

Концентрация биомассы через 6 ч культивирования дрожжей с разным содержанием трегалозы в клетках в зависимости от длительности их хранения

клетки с высоким содержанием трегалозы имели не только более высокую выживаемость после обезвоживания, но и быстро восстанавливали свои репродуктивные свойства. Следовательно, для выращивания дрожжей чистой культуры, подвергаемой обезвоживанию и последующему длительному хранению (не менее 6 мес), подходит только режим углеводного питания, при использовании которого получают клетки дыхательного типа с большим содержанием резервных углеводов.

Ввиду того что репродуктивная активность клеток связана с содержанием в них белка, изучали влияние азотного питания на получение дрожжей с высоким содержанием как белка, так и резервных углеводов.

Не вызывает сомнения тот факт, что азотное питание влияет на регулирование биохимического состава дрожжей, их бродильную активность и экономический коэффициент потребления субстрата.

Так, рядом исследователей установлено, что при лимитации азота [1] в клетках дрожжей сахаромицетов (штаммов как верхового, так и низового брожения) увеличивается содержание резервных углеводов, и особенно гликогена, но при этом снижается ферментативная активность, в частности мальтазная. Это – нежелательный фактор, так как такие дрожжи будут плохо размножаться в солодовом сусле, что отразится на интенсивности главного брожения пива. В то же время с повышением количества азота в дрожжах падает ксерорезистентность дрожжей.

В свете этих работ изучали влияние дозировки азота из расчета содержания его в дрожжах 6,0; 6,5; 7,5 и 8,0 % от СВ при постоянном во всех опытах отношении N : P₂O₅ = 3 : 1. В этих экспериментах приток углеводного питания был рассчитан таким образом, чтобы предотвратить катаболитную репрессию, отсутствие которой является необходимым условием для синтеза

Таблица 3
Биохимический состав дрожжей (% от СВ) при разной дозировке азота

Клеточный компонент	Состав дрожжей (%) при содержании азота, % от СВ			
	6 (1-й вариант)	6,5 (2-й вариант)	7,5 (3-й вариант)	8 (4-й вариант)
Белок	32,0	35,1	36,7	38,2
Аминокислотный пул	5,1	7,8	8,5	—
Сумма углеводов	46,4	37,1	36,0	33,2
Тргалоза	14,8	9,7	8,3	7,5
Выход биомассы, % на АСБ				
	180,8	176,3	172,9	156,2
Отношение белок/углеводы				
	0,7	0,9	1,0	1,2

трегалозы. Как видно из табл. 3, только в 1, 2 и 3-м вариантах опытов дрожжи метаболизировали сахарозу в основном дыхательным путем, в то время как в 4-м варианте имело место аэробное брожение, о чем свидетельствует низкий выход биомассы.

Наибольший интерес с точки зрения получения физиологически активных клеток представляют варианты, в которых соотношение белок/углеводы приближается к 1.

Эти образцы обезвоживали и изучали их химический состав и жизнеспособность (табл. 4). Для того чтобы выявить роль трегалозы в процессе обезвоживания, оп-

Таблица 5
Ферментативная активность дрожжей, полученных при разной дозировке азотного питания

Содержание азота в интактных дрожжах, %	Ферментативная активность дрожжей, мг CO ₂ /мг СВ/ч			
	Сахароза		Мальтоза	
	до сушки	после сушки	до сушки	после сушки
6,5	476±17	454±14	224±10	232±3
7,5	489±8	395±23	190±15	228±8

ределяли ее содержание в биомассе и супернатанте. По выходу трегалозы, по всей видимости, можно судить о степени повреждения дрожжей, так как она участвует в регуляции осмотического давления в клетке [6].

Как следует из приведенных результатов (см. табл. 4), количество трегалозы в обезвоженных дрожжах практически не изменилось по сравнению с прессованными, в то время как потери белка и суммарной фракции углеводов более ощутимы у образца с высоким содержанием азота в клетках. Это отразилось на их жизнеспособности, которая в первом варианте составила 92 %, а во втором – 85 %, несмотря на то, что выход трегалозы из клеток в обоих вариантах был практически одинаковым (40 – 42 %).

Эти изменения повлияли на ферментативную активность дрожжей: у обезвоженных дрожжей с пониженным содержанием азота газообразующая способность упала на 4,6 %, в то время как у богатых азотом – на 19,2 %. При этом активность ферментов мальтазного комплекса (табл. 5) практически не изменилась.

Так как изменений в количественном содержании трегалозы во время обезвоживания не было выявлено,

Таблица 4
Биохимический состав дрожжей после дегидратации

Клеточные компоненты	Состав дрожжей (%) при содержании азота в дрожжах до обезвоживания, % от СВ	
	6,5	7,5
Белок	31,9	30,1
Аминокислоты	8,1	8,9
Трегалоза	4,5 в дрожжах после дегидратации	4,5
	4,1 в супернатанте	3,3
	8,6 в обезвоженных дрожжах	7,8
Углеводы	36,6	34,6
	Соотношение белок/углеводы	
	0,87	0,87

Таблица 6
Влияние скорости сушки на фракционный состав углеводов дрожжей

Фракции углеводов	Фракционный состав углеводов (%) при скорости удаления влаги, %/мин			
	1,0		0,07	
до сушки	после	до сушки	после	
Трегалоза	Дрожжи	12,1	5,4	9,7
	Супернатант	—	7,0	—
Гликоген, растворимый в кислотах	Уксусной	6,8	3,8	5,1
	Хлорной	7,4	5,6	11,1
Структурные		19,9	12,5	18,8
		16,0		

а сумма углеводных фракций падала, дальнейшие исследования были направлены на выяснение роли других углеводных фракций – гликогена и структурных углеводов (табл. 6). При этом биомассу обезвоживали в жестком режиме (скорость удаления влаги 1 %/мин) и в мягком режиме (скорость удаления влаги 0,07 %/мин).

Из табл. 6 видно, что при мягком режиме обезвоживания потери всех фракций незначительны. При жестком режиме сушки, когда скорость удаления влаги высока, отчетливо видна роль каждой из фракций. В этом случае задействованы все углеводные фракции, кроме трегалозы. Особенno следует отметить падение количества структурных углеводов (вероятно, поэтому количество мертвых клеток возросло с 8 до 45 %). Показатель жизнеспособности в данном случае также коррелировал с количеством трегалозы, которая выходит из клеток при оводнении. В первом случае в водную среду вышло 57,9 % от количества трегалозы в сухих дрожжах, во втором – 44,4 %.

Полученные данные подтверждают точку зрения тех исследователей, которые отводят роль осмотически активного вещества трегалозе, а не энергетическому субстрату, который используется для эндогенного дыхания во время дегидратации [1,2,3].

Таким образом, путем изменения углеводного и азотного обмена при культивировании дрожжей в простой

периодической культуре с аэрацией можно регулировать синтез трегалозы, гликогена и белка. Установлено, что при отношении белок/структурные углеводы в биомассе, равном $1,0 \pm 0,1$, достигается высокая жизнеспособность клеток и длительная сохранность их репродуктивной активности. Выявлена также роль гликогена, особенно фракции, растворимой в уксусной кислоте, как источника углеводного питания при эндогенном дыхании дрожжей и роль трегалозы как осмочувствительного компонента клетки.

Список литературы

1. Бекер М.Е., Дамберг Б.Э., Рапопорт А.И. Анабиоз микроорганизмов. – Рига: Зинатне, 1981.
2. Кулаев И.С. Роль мембран в компартментализации биохимических процессов у микроорганизмов // Биомембранны. – Рига: Зинатне, 1977.
3. Grba S., Oura E., Suomalainen H. On the formation of glycogen and trehalose in baker's yeast. // -Eur.J. Appl. Microbiol., 1976, 2.
4. Hottinga T., De Vergilio C., Hall M.N. et al. The role of trehalose synthesis for the acquisition of thermotolerance in yeast. // Eur.J. Biochem., 1994, 219.
5. O Connor-Cox ESC., Majara M.M., Locholo G.J. et al. The use of yeast glycogen and Trehalose contents as indications for process optimisation// Ferment, 1997, 9.
6. Keller F., Schelenberg M., Wimken A. Localisation of trehalase in vacuoles and trehalose in cytosol of yeast (*S.cerevisiae*) // – Arch: Microbiol., 1982, 131.