

ВЛИЯНИЕ ЭТИЛОВОГО СПИРТА НА СТРУКТУРНУЮ ЛАБИЛЬНОСТЬ МЕМБРАН ДРОЖЖЕЙ

Г.А. САМВЕЛЯН

Научный центр виноградоплодовиноделия, 378312, Армавирская область,
с. Мерцаван

Используя метод триптофановой фосфоресценции, проведены исследования лабильности мембран винных дрожжей. Выявлены критические концентрации этилового спирта, влияющие на структурную лабильность мембран для дрожжей *Saccharomyces vini* раса Агавнатун 123 - 9, *Schizosaccharomyces pombe* раса 554 - 12 и *Sacch. oviformis* var. *cheresiensis* раса Бюракан 1 - 15 об.%. Рекомендуется использование дрожжей *Schiz. pombe* в производстве хереса на стадии брожения.

Օգտագործելով տրիպտոֆանային ֆոսֆորեսցենցիայի մեթոդը, կատարվել են հետազոտություններ շաքարասնկերի բջիջների մեմբրանների անկայունության վերաբերյալ: Բացահայտվել են մեմբրանների կառուցվածքի անկայունության վրա ազդող էթիլ սպիրտի կրիտիկական կոնցենտրացիաները հետևյալ շաքարասնկերի համար - *Saccharomyces vini* Աղավնատուն 123 ռասա - 9, *Schizosaccharomyces pombe* 554 ռասա - 12 և *Sacch. oviformis* var. *cheresiensis* Բյուրական 1 ռասա - 15 ծավ. %: Արդյունքում խորհուրդ է տրվում *Schiz. pombe* շաքարասնկերի օգտագործումը խերեսային գինիների արտադրության մեջ խմորման ստադիայում:

Based on the use of triptophane phosphorescence method the lability of membrane of some industrial strains of wine yeasts has been studied. The critical value of ethanol on the membrane structural lability varies in different strains tested: *Saccharomyces vini*, strain Aghavnatun 123 - 9, *Schizosaccharomyces pombe* - 12 and *Sacch. oviformis* var. *cheresiensis* strain Byurakan - 15 vol. per cent. The application of *Schiz. pombe* during the fermentation process in production of shern wines is recommended.

Винные дрожжи - мембраны - этиловый спирт - виноделие

Структурное состояние биологических мембран в достаточной мере характеризует функциональную активность дрожжевых микроорганизмов. Этиловый спирт в зависимости от концентрации в среде способен тормозить рост многих микроорганизмов в культуре и влиять на структурную лабильность мембранных клеток. Однако критическая концентрация спирта, ингибирующая скорость размножения клеток и влияющая на структурную реорганизацию мембран, для разных видов микроорганизмов различна. Для установления структурных перестроек мембран и изменения подвижности мембранных белков эффективным методом является триптофановая фосфоресценция при комнатной температуре (ТФКТ) [5]. Этот метод основан на измерении спектральных и кинетических параметров фосфоресценции макромолекул белков триптофанилов и позволяет изучать состояние мембраны непосредственно в клетке без предварительного выделения.

По данным литературы [7], критическая концентрация этилового спирта 8% вызывает структурную перестройку клеточных мембран винных дрожжей (здесь и далее об.%). Практическое значение этого эффекта заключается в том, что по достижении в броющем сусле концентрации

этилового спирта 8%, необходимо отделение дрожжей от виноматериала для получения биологически стабильных столовых вин, поскольку этим предотвращается выход аминокислот из автолизированных клеток в среду.

Нами ставилась цель выявить различия в структурной лабильности биологических мембран дрожжей - шизосахаромикетов в отношении к разным концентрациям этилового спирта, образующегося при брожении виноградного сусла в концентрации 3-20%.

Материал и методика. Материалом для исследований служили чистые культуры дрожжей рода *Sacch. vini* раса Агавнатун 123, *Sacch. oviformis* var. *cheresiensis* раса Бюракан-1 и *Schiz. pombe* раса 554, взятые из музея отдела микробиологии ВНИИВ и ПИ "Магарач".

Для регистрации структурного состояния мембран дрожжевых клеток использовали метод ТФКТ [3, 9]. Исследования проводили на установке, созданной в Институте фотобиологии АН Республики Беларусь [4, 6].

Измерения дыхательной активности дрожжевых клеток регистрировали полярографическим методом с помощью полярографа *Radecis* ОН 101/1 [8]. Об изменении проницаемости клеточных мембран судили по выходу свободных нуклеотидов в инкубационную среду [10]. В качестве инкубационной среды использовали среду Ридер и виноградное сусло [2].

Результаты и обсуждение. Результаты наших опытов показали, что этиловый спирт в критической концентрации 9,0% для *Sacch. vini*, раса Агавнатун - 123, 12% - *Schiz. pombe* раса 554 и выше 15% - для хересной культуры *Sacch. oviformis* var. *cheresiensis* раса Бюракан-1 приводит к изменениям критических параметров ТФКТ - увеличению τ_m , τ_0 и $\bar{\tau}$ (рис. 1, 2, 3).

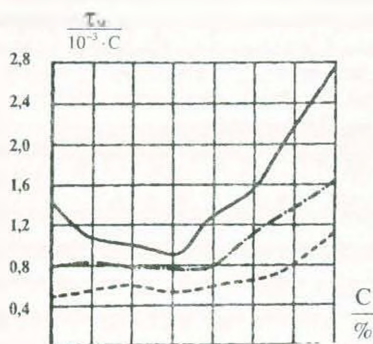


Рис. 1. Влияние концентрации этилового спирта на время жизни медленнозатухающей компоненты ТФКТ

— *Sacch. vini* раса Агавнатун 123
 - - - *Schiz. pombe* раса 554
 - · - *Sacch. oviformis* var. *cheresiensis* раса Бюракан 1

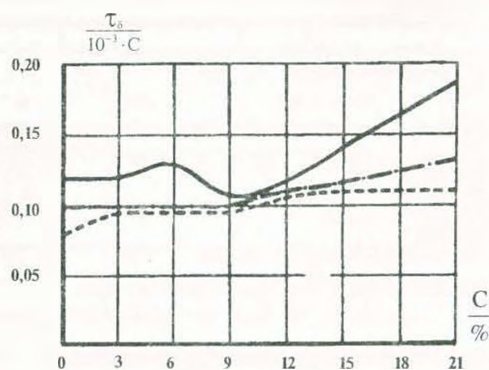


Рис. 2. Влияние концентрации этилового спирта на время жизни быстро затухающей компоненты ТФКТ

— *Sacch. vini* раса Агавнатун 123
 - - - *Schiz. pombe* раса 554
 - · - *Sacch. oviformis* var. *cheresiensis* раса Бюракан 1

Зарегистрированные изменения кинетических параметров ТФКТ свидетельствуют о том, что этиловый спирт способен инициировать структурную перестройку мембран дрожжевых клеток, затрагивает их белковую компоненту, сопряженную с изменением уровня равновесной внутримолекулярной динамики структуры мембранных белков.

Наиболее выраженная структурная реорганизация мембран дрожжевых клеток наблюдается у культуры *Sacch. vini*, менее у *Schiz. pombe*.

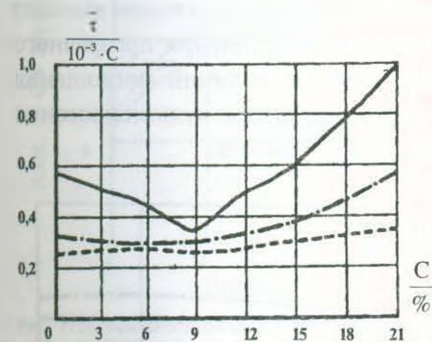


Рис. 3. Влияние концентрации этилового спирта на среднее время жизни ТФКТ

— *Sacch. vini* раса Агавнатун 123
 *Schiz. pombe* раса 554
 - - - *Sacch. oviformis* var. *cheresiensis* раса Бюракан 1

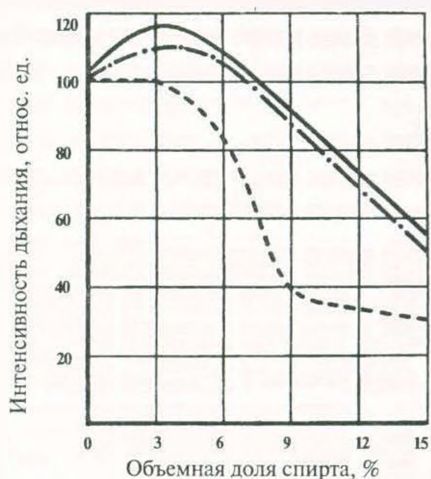


Рис. 4. Влияние концентрации этилового спирта на интенсивность дыхания дрожжей

— *Sacch. vini* раса Агавнатун 123
 *Schiz. pombe* раса 554
 - - - *Sacch. oviformis* var. *cheresiensis* раса Бюракан 1

Совершенно не чувствительна к этиловому спирту в интервале концентраций 3-15% культура *Sacch. oviformis* Бюракан-1.

Полученные данные показывают, что испытанные нами культуры дрожжевых микроорганизмов различны по структурному состоянию мембран и их химическому составу.

Измерения дыхательной активности клеток различных культур дрожжей показали, что снижение этих показателей происходит при различных концентрациях этилового спирта в среде (рис. 4).

Заметное снижение дыхательной активности клеток дрожжей *Sacch. vini* происходит при концентрации этилового спирта 6-9%, что подтверждается литературными данными [1].

Довольно толерантным к этиловому спирту по дыхательной активности являются клетки дрожжей *Sacch. oviformis* var. *cheresiensis* и *Schiz. pombe*, снижение дыхательной активности у которых наступает при концентрациях спирта в среде свыше 15%.

Немаловажной функцией активности дрожжевых клеток является трансмембранная проницаемость для внутриклеточных свободных нуклеотидов, не исключен также при этом выход из клеток и других соединений, в том числе азотистых.

На рис. 5 и 6 приведены кривые поглощения дрожжевых суспензий при $\lambda = 260$ нм, инкубированных в среде Ридер и в виноградном сусле.

Выявлено, что трансмембранная проницаемость клеток дрожжей сахаромисетов расы Агавнатун-123 и Бюракан-1 в процессе культивирования в среде Ридер и виноградном сусле возрастает, при этом проницаемость мембран клеток Бюракан-1 (хересные дрожжи) сравнительно выше, чем у расы Агавнатун-123. Следует также отметить, что при культивировании дрожжей вила *Sacch. vini* в среде Ридер наблюдалась отчетливая S-образность

кривой зависимости выхода из клеток свободных нуклеотидов. Мембранная проницаемость клеток *Schiz. pombe* в процессе культивирования различна: в среде Ридер кривая зависимости выхода свободных нуклеотидов выходит на константу, а в виноградном сусле величины поглощения прозрачного супернатанта дрожжей шизосахаромицетов выше величин поглощения сахаромицетов. Примечательно, что в конце процесса культивирования мембранная проницаемость клеток *Schiz. pombe* убывает.

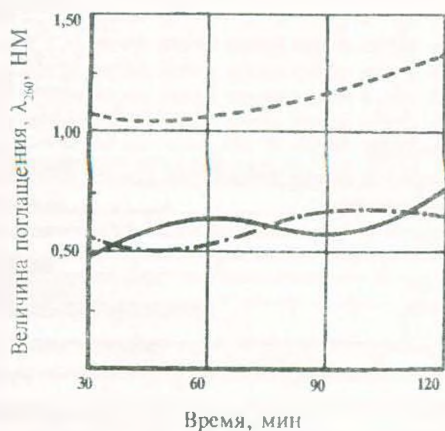


Рис. 5. Изменение величины поглощения дрожжевых суспензий, инкубированных в среде Ридер

— *Sacch. vini* паса Аравнатун 123
 — *Schiz. pombe* паса 554
 - - - *Sacch. oviformis* var. *cheresiensis* паса Бюракан 1

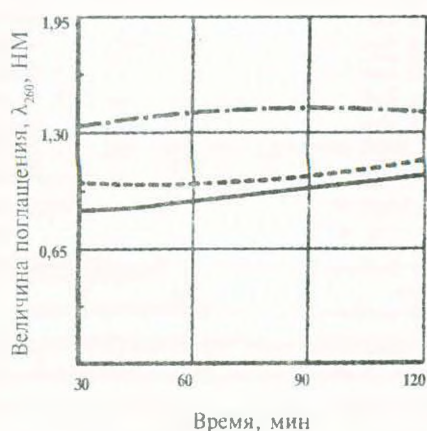


Рис. 6. Изменение величины поглощения дрожжевых суспензий, инкубированных в виноградном сусле

— *Sacch. vini* паса Аравнатун 123
 — *Schiz. pombe* паса 554
 - - - *Sacch. oviformis* var. *cheresiensis* паса Бюракан 1

Учитывая, что в процессах брожения виноградного сусла и дальнейшего хересования виноматериала важное значение имеют азотистые вещества, нами определялось содержание общего азота и азота белка в сухом веществе дрожжей в зависимости от фазы роста. По результатам анализов, наибольшим содержанием общего азота в клетках отличаются дрожжи - шизосахаромицеты, к тому же их содержание в клетках в процессе роста культуры увеличивается, в конечном итоге приближаясь к постоянной величине (рис. 7).

Накопление азота в клетках хересных дрожжей протекает аналогично накоплению в клетках дрожжей шизосахаромицетов, хотя его содержание в хересных дрожжах на всех стадиях роста несколько ниже, чем в дрожжах шизосахаромицетах. Дрожжи вида *Sacch. vini* отличались более высоким содержанием общего азота в начальной фазе роста. В процессе роста количество азота в клетках несколько увеличивалось, но в ходе всего опыта было сравнительно ниже, чем в клетках хересных дрожжей и дрожжей шизосахаромицетов.

Сравнительно высоким содержанием белкового азота в начальной фазе роста и сравнительно низким в конечной фазе отличаются клетки хересных дрожжей (рис. 8). Наибольший прирост белкового азота в клетках и максимальное его количество в конечной фазе роста наблюдалось в дрожжах-шизосахаромицетах.

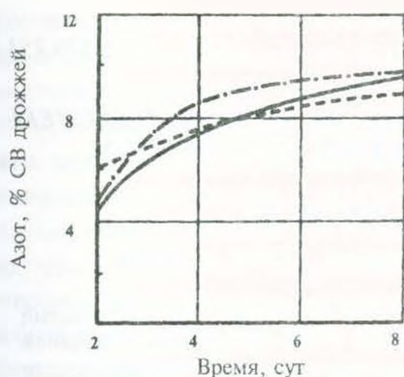


Рис. 7. Динамика содержания общего азота в сухом веществе (%) дрожжей в процессе роста культур
 — *Sacch. vini* паса Агавнатун 123
 - - - *Schiz. pombe* паса 554
 - - - *Sacch. oviformis* var. *cheresiensis* паса Бюракан 1

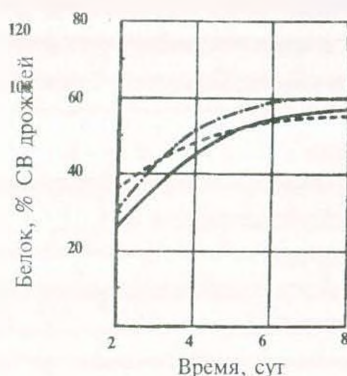


Рис. 8. Динамика содержания белка в сухом веществе (%) дрожжей в процессе роста культур
 — *Sacch. vini* паса Агавнатун 123
 - - - *Schiz. pombe* паса 554
 - - - *Sacch. oviformis* var. *cheresiensis* паса Бюракан 1

Таким образом, полученные данные позволяют заключить, что структурная перестройка мембран, затрагивающая белковую компоненту, осуществляется этиловым спиртом, образующимся в результате сбраживания сахаров виноградного сусла. Наиболее влиятельная концентрация этилового спирта находится в разных интервалах для различных видов дрожжевых микроорганизмов.

Установлены критические концентрации этилового спирта для дрожжей *Sacch. vini* (Агавнатун-123) - 9.0%, *Schiz. pombe* (паса 554) - 12% и более 15% для *Sacch. oviformis* var. *cheresiensis* (Бюракан 1).

Можно считать целесообразным использование дрожжей - *Shiz. pombe* в хересном производстве на стадии брожения виноградного сусла без риска получения недобродов и для обогащения виноматериалов веществами азотистой природы, необходимых для интенсификации процессов хересования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бажаев З.Ю. Автореф. канд. дисс., 26с., Ялта, 1988.
2. Бурьян Н.И., Тюрина Л.В. Микобиология виноделия, Пищевая промышленность, 271с., М., 1979.
3. Ермолаев Ю.С. Автореф. канд. дисс., 20с., Минск, 1985.
4. Ермолаев В.М., Бодунов Е.Н., Свешникова Е.Б. Безизлучательный перенос энергии электронного возбуждения, Наука, 311с., Л., 1977.
5. Мажуль В.М., Ермолаев Ю.С., Конев С.В. Журн. прикл. спектроскопии, 32, 5, 903-907, М., 1980.
6. Мажуль В.М., Конев С.В., Ермолаев Ю.С. и др. Автоматизация цитологических исследований, 88-93, Киев, 1985.
7. Разуваев В.С., Бурьян Н.И., Саркисян А.С., Бажаев З.Ю. В сб. научн. тр. Научные основы переработки винограда. ВНИИ ВиПП "Магарач", 28, Ялта, 1987.
8. Шюльц К.Ф., Островский Д.Н. Методы современной биологии, Наука, 52-58, М., 1975.
9. Horie T., Vanderkooi J.M. Biochim. Biophys. Acta., 670, 2, 294-297, 1981.
10. Strombini G.B. Biophys. J., 43, 1, 127-130, 1983.

Поступила 19.XII.2000