

УДК 582.282.23. 579.26. 663.252

**ДРОЖЖИ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*, ВЫДЕЛЕННЫЕ
ИЗ ПЛОДОВ АБРИКОСА (*PRUNUS ARMENIACA*)**© 2012 Д.А. Абдуллабекова¹, А.В. Качалкин²¹ Прикаспийский институт биологических ресурсов ДНЦ РАН, г. Махачкала² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

Поступила в редакцию 12.05.2012

Показано, что природным источником дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, выделение которых ограничено в основном бродильными производствами, могут быть плоды абрикоса. Идентификация вида, проведенная на основании морфо-физиологических признаков, подтверждена анализом нуклеотидных последовательностей D1/D2 доменов 26S рДНК. Биотехнологические характеристики выделенных культур позволяют рекомендовать этот локус для направленного поиска производственно-ценных штаммов.

Ключевые слова: *Prunus armeniaca*, *Saccharomyces cerevisiae*, плодово-ягодные вина, дрожжи, 26S рДНК

Одним из основных компонентов естественных микробиоценозов, локализованных на винограде и других сочных плодах, являются аскомицетовые дрожжевые организмы, у которых в различной степени выражена способность к сбраживанию сахаров. Встречаемость среди них представителей синантропного вида *Saccharomyces cerevisiae*, выделение которого в основном ограничено бродильными производствами, отмечается редко. Наличие в дрожжевом сообществе плодов дрожжево-сахаромицетов позволяет вести скрининг производственно-ценных штаммов и несёт определённую информацию об их экологии. Более изученным природным источником дрожжей, где исследователи отмечают присутствие вида *S. cerevisiae*, является виноград, традиционно используемый для получения вин. В последние годы, наряду с интересом к натуральным виноградным винам, отмечается возрастание популярности плодово-ягодных вин, которые по своему лечебному действию зачастую не уступают лучшим красным виноградным винам благодаря высокому содержанию биологически активных веществ [1, 2]. В связи с этим не ослабевают интерес микробиологов к выделению и исследованию дрожжей-бройдильщиков, обитающих на плодах и ягодах в регионах, где они произрастают в достаточных для промышленной переработки объёмах [3-5].

Плоды разных растений как естественная среда обитания эпифитных дрожжей неравноценны, так как различаются анатомическим строением, количеством и химическим составом выделяемых поверхностных экссудатов, адгезивными свойствами. Наряду с этим степень колонизации субстрата тем

или иным видом определяется такими факторами, как температура, влажность, солнечная радиация, взаимодействием между растительным субстратом и микробным сообществом, уровнем миграции клеток и скоростью их роста. В качестве вероятного природного локуса дрожжей *S. cerevisiae* нами были исследованы плоды абрикосового дерева (*Prunus armeniaca*), которое, являясь теплолюбивой культурой, имеет ограниченный ареал произрастания. Абрикосовое растение издавна известно на Северном Кавказе, где плодоносит менее регулярно, чем другие косточковые культуры, что связано с его биологическими особенностями, обуславливающими нестабильную зимостойкость. Абрикос характеризуется короткой фазой глубокого зимнего покоя и уже в январе цветковые почки выходят из этого состояния, из всех плодовых культур он наиболее подвержен подмерзанию в условиях юга.

Объекты и методы. Исследование проводили на плодах абрикоса сорта «Краснощёкий», культивируемых в Дагестане на равнинном и предгорном биотопах, расположенных на высотных отметках 34 и 475 метров над уровнем моря, соответственно. Образцы отбирали один раз в год в июле (2006, 2007 гг.), когда абрикосы накапливали максимальную для конкретных экологических условий концентрацию сахаров. Плоды снимали в разных точках участка в равных количествах и, соблюдая необходимые меры стерильности, смешивали для получения средней пробы. Из абрикосов, составивших среднюю пробу, удаляли косточки, мякоть разрезали на кусочки и помещали в стерильные 3-х литровые банки, в количестве 60-70% от объёма. В тот же день образцы доставляли в лабораторию и с момента спонтанного забраживания мезги (смесь стекшего сока и кусочков плодов) до остановки брожения каждые 2-3 дня проводили высевы на твёрдую питательную среду виноградное сусло – агар в чашки Петри. Начало забраживания отмечали

Абдуллабекова Динаханум Абиляевна, кандидат технических наук, ведущий научный сотрудник. E-mail: dina2407@mail.ru

Качалкин Алексей Владимирович, кандидат биологических наук, младший научный сотрудник. E-mail: Kachalkin_a@mail.ru

через 46-48 часов после измельчения плодов. Образец высевали в пяти повторностях, посевы инкубировали при комнатной температуре в течение 5-7 суток. Выросшие колонии дрожжей с помощью бинокулярной лупы разделяли на морфологические типы, две-три колонии каждого типа выделяли в чистую культуру.

При снятии результатов посева производили выделение только колоний, вероятно относящихся к роду *Saccharomyces*, в работе не рассматривались изоляты характер роста которых на плотных средах (цвет, консистенция, форма колоний и штриха, а также размер колоний) явно не соответствовал описаниям представителей этого рода в специальной литературе и определителях [6, 7]. Бластический тип вегетативного размножения с многосторонним почкованием, форма клеток – круглые и овальные, иногда удлинённые, образование на среде Городковой круглых и слабоовальных, бесцветных, гладких аскоспор в количестве 1-4 в аске явились основными микроморфологическими диагностическими признаками по которым дрожжи отнесли к роду *Saccharomyces* и дальнейшую видовую идентификацию проводили по физиологическим и культуральным признакам. Культуры тестировали на способность к ферментации глюкозы, галактозы, сахарозы, мальтозы, раффинозы, лактозы, мелибиозы, трегалозы; к росту на агаризованной среде при температуре 37°C и 40°C и дополнительно к сбраживанию стерильного виноградного сока с низким значением pH 2,5-3,0. В результате как вид *S. cerevisiae* были идентифицированы штаммы, утилизирующие только первые четыре сахара, имеющие максимальную температуру роста 37°C (при 40°C рост биомассы отсутствовал) и проявившие себя как хорошие бродильщики на виноградной среде

Для проверки фенотипической идентификации была проведена генетическая идентификация одного из выделенных штаммов (штамм А3) с использованием анализа нуклеотидных последовательностей D1/D2 доменов региона 26S (LSU) рДНК. Выделение ДНК и проведение ПЦР производили по методике, описанной ранее [8]. Для амплификации использовали праймеры ITS1f (5'-CTTGGTCATTTAGAGGAAGTA) и NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG). Секвенирование амплифицированного региона производили в Научно-производственной компании «Синтол» (г. Москва). Полученные результаты были использованы

для проведения филогенетического анализа с помощью программ MAFFT 6 и MEGA4. Сиквенсы типовых штаммов для построения филогенетического дерева были использованы из генбанка NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Изучение выделенных в ходе работы штаммов *S. cerevisiae* по способности к продуцированию и трансформации компонентов, имеющих важное значение при технологической характеристике, производилось в сравнении с контрольным штаммом (К) – «Дагестанский абрикосовый-4», обладающим ценными производственными признаками [9]. Абрикосовый сок заводского изготовления сахаристостью 13,7 г/100 см³ и титруемой кислотностью 3,6 г/дм³ сбраживали на этих культурах и в полученных виноматериалах определяли количество этанола, остаточных сахаров, титруемых и летучих кислот, средних эфиров в соответствии с действующими ГОСТами [10] и комплекс летучих компонентов на газовом хроматографе «Кристалл-200М» с пламенно-ионизационным детектором на капиллярной колонке HP-FFAP (50 м x 0,32 мм) с 10% диэтилглицольсукцинатом, газ носитель – азот (1,8-2,7 дм³/ч³).

Результаты и обсуждение. В результате проведенных исследований показано, что дрожжи, идентифицированные как *S. Cerevisiae*, были изолированы с плодов абрикоса независимо от места произрастания, при этом отмечали нерегулярность их выделения. Так, в 2006 г. этот вид был обнаружен на плодах, культивируемых в равнинном биотопе – два штамма (А1, А2), а на следующий год в предгорном – один штамм (А3). Согласно полученным данным, все опытные штаммы, как и контрольный проявили способность к полному сбраживанию сахаров и повышению титруемых кислот. Дрожжи варьировали по количеству синтезируемых летучих кислот, ацетальдегида, эфиров и высших спиртов, при этом в образцах, полученных на культурах А1, А2, А3 отмечена тенденция к меньшему накоплению летучих кислот и большему ацетальдегида (табл.). Таким образом, штаммы, выделенные с плодов абрикоса, обладали высокой бродильной активностью, обеспечивающей полное выбраживание сахаров и хороший выход спирта, и характеризуются способностью к образованию побочных продуктов брожения в пределах, допустимых для натуральных качественных спиртосодержащих напитков.

Таблица. Состав абрикосовых виноматериалов после сбраживания на различных штаммах

Показатели	Штаммы			
	А1	А2	А3	К
спирт, % об.	8,1	7,89	8,2	8,1
остаточный сахар, г/100 см ³	0,2	0,2	0,2	0,2
титруемые кислоты, г/дм ³	4,3	4,1	4,6	4,2
летучие кислоты, г/дм ³	0,2	0,2	0,1	0,3
ацетальдегид, мг/дм ³	62,2	63,6	104,1	37,2
сумма средних эфиров, мг/дм ³	99,9	54,2	102,5	82,5
сумма высших спиртов, мг/дм ³	232,4	182,1	217,7	242,0

Органолептическая характеристика виноматериалов показала, что по цвету, вкусу и аромату они близки, имели чётко выраженный аромат абрикосов и абрикосовой косточки, более высоко оценивался образец, полученный с использованием штамма АЗ. Качество и химический состав виноматериалов, сброженных на дрожжах, выделенных из природных местообитаний, свидетельствует о возможности их использования для производства натуральных плодовых вин и этилового спирта, на основе которого готовят крепкие алкогольные абрикосовые напитки, как например известный «Арцах Абрикосовый». Технология получения ароматного спирта и спиртового морса из абрикосов предложена в Дагестане – единственном в России регионе, где их выращивают в количестве, достаточном для промышленной переработки [11].

На сегодняшний день интенсивное развитие молекулярно-биологических и генетических методов, начатое с конца XX века привело к возникновению новых молекулярных подходов к выделению

видов у дрожжей и переходу от фенотипической систематики дрожжей, когда в качестве критериев видовой дифференциации рассматриваются морфофизиологические признаки, к филогенетической, построенной на изучении нуклеотидных последовательностей ДНК. В этой связи становится нормой использование этих методов для уточнения таксономического статуса штаммов, которые по своим свойствам могут быть рекомендованы в качестве агентов биотехнологии. Молекулярно-генетическое изучение дрожжей *Saccharomyces*, выделенных с поверхности ягод плодово-ягодных растений и из различных ферментационных процессов впервые позволило обнаружить наряду с *S.cerevisiae* гибридные штаммы *S. cerevisiae* x *S.bayanus* var. *uvarum* среди пекарских дрожжей и изолятов с ягод чёрной смородины [12]. Проведенный анализ нуклеотидных последовательностей D1/D2 доменов 26S рДНК подтвердил фенотипическую идентификацию штаммов *S. cerevisiae*, изолированных с плодов абрикоса (рис. 1).

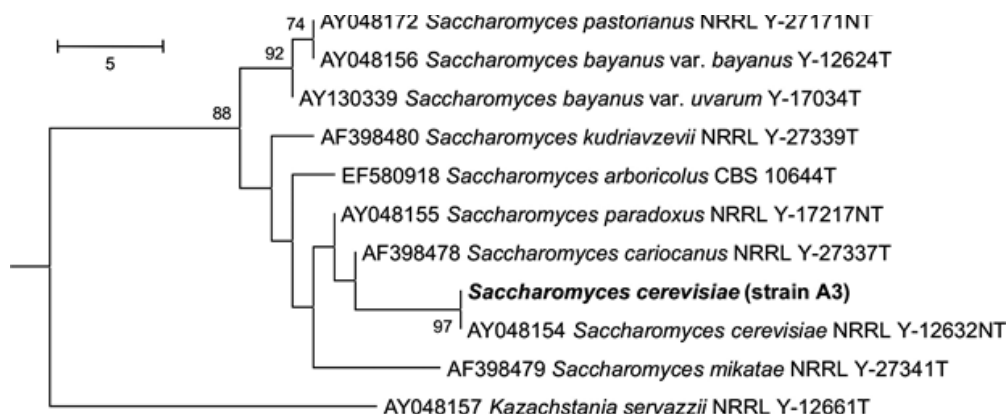


Рис. 1. Филогенетическое положение штамма *S. cerevisiae* (А3) полученное методом максимальной экономии (Maximum Parsimony analysis) на основании выровненных нуклеотидных последовательностей D1/D2 доменов 26S рДНК. Номера, данные над разветвлениями, соответствуют частоте (>55%) соединения таксонов при 1000 построений. Шкала показывает число замен на длину используемых для анализа нуклеотидных последовательностей (551 п.н.). U72163 *Zygosaccharomyces rouxii* NRRL Y-229T – скрытая внешняя группа

В результате проведенной работы показано, что дрожжи вида *S.cerevisiae* спорадически встречающиеся на поверхности сочных плодов и ягод могут входить в состав дрожжевых группировок, формирующихся на плодах абрикоса, что позволяет вести направленный поиск штаммов для нужд биотехнологии. Расширение сведений об освоении растительных локусов дрожжами *S. cerevisiae* должно способствовать более полному пониманию биологии вида, однако использованная нами методика разового отбора проб, позволяя сделать определённые выводы, не даёт ответа на многие вопросы в этом аспекте.

Интересные результаты, касающиеся распространения в природе дрожжевых грибов рода *Saccharomyces*, были получены за последнее время при исследовании численности и таксономического состава дрожжей филлосферы и почвы [13-15]. Было показано, что достаточно часто в определенных природных локусах наблюдается

обильное присутствие и даже доминирование вида *S. paradoxus*, при этом периоды такого обильного выделения очень кратковременны, выявление которых возможно только при изучении дрожжевых сообществ динамике.

Выводы: особенности экологии и распространения в природе дрожжей рода *Saccharomyces* изучены недостаточно. Изучение дрожжевых сообществ природных локусов в Дагестане продолжается с учётом годовой динамики на основе вертикально-ярусного подхода, включающего одновременный анализ образцов из различных биогеоценотических ярусов – живое растение, опад, почва, разработанного на факультете почвоведения МГУ, позволяющего с большей достоверностью проводить их исследование в синэкологическом и биогеографическом аспектах [16].

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 12-04-01222.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. *Heinonen, I.M.* Antioxidant activity of berry and fruit wines and liquors / *I.M. Heinonen, P.J. Lehtonen, A.I. Horia* // Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1988. V.46. №1. P. 25-31.
2. *Bradstock, N.* Cider, Perry and Fruin Wines // Fruit Processing. 2000. № 3. P. 176-182.
3. *Колесник, И.М.* Исследование дрожжевой микрофлоры ягод в Западной Беларуси и поиск новых штаммов для плодово-ягодного виноделия / *И.М. Колесник, Н.Н. Мартыненко, И.М. Грачева* // Хранение и переработка сельхозсырья. 2004. №1. С. 27-28.
4. *Руденко, Е.Ю.* Перспективные штаммы дрожжей для плодово-ягодного виноделия в Самарской области // Виноделие и виноградарство. 2007. №3. С. 24-25.
5. *Абдуллабекова, Д.А.* Биотехнологические свойства дрожжей-сахаромицетов, выделенных на винограде и плодах / *Д.А. Абдуллабекова, Е.С. Магомедова* // Виноделие и виноградарство. 2009. №5. С. 16-17
6. *Бабьева, И.П.* Методы выделения и идентификации дрожжей / *И.П. Бабьева, В.И. Голубев*. – М.: Пищевая промышленность, 1979. 120 с.
7. *Kurtzman, C.P.* The Yeasts, a taxonomic study. Fourth revised and enlarged edition / *C.P. Kurtzman, J.W. Fell* (eds.). – Amsterdam: Elsevier Science B.V, 1998. 1055 p.
8. *Качалкин, А.В.* Новые данные о распространении некоторых психрофильных дрожжевых грибов в Московской области // Микробиология. 2010. Т. 79. №6. С. 843-847.
9. Патент РФ №2113469, 20.06.1998
10. Государственный контроль качества винодельческой продукции. – М.: Издательство стандартов, 2003. 872 с.
11. *Ибрагимова, Н.У.* Влияние различных факторов на процесс сбраживания абрикосового сула / *Н.У. Ибрагимова, М-З.В. Вагабов, З.М. Вагабова* и др. // Известия вузов. Пищевая технология. 2000. №2. С.28-31.
12. *Наумова, Е.С.* Молекулярно-генетическая дифференциация культурных дрожжей *Saccharomyces* / *Е.С. Наумова, М.В. Жолудева, Н.Н. Мартыненко, Г.И. Наумов* // Микробиология. 2005. Т.74, №2. С. 215-223.
13. *Юрков, А.М.* Первое выделение дрожжей *Saccharomyces paradoxus* в Западной Сибири // Микробиология. 2005. Т. 74, № 4. С. 533-536.
14. *Глушакова, А.М.* Массовое выделение и идентификация дрожжей *Saccharomyces paradoxus* из филлосферы растений / *А.М. Глушакова, Ю.В. Иванникова, Е.С. Наумова, И.Ю. Чернов* // Микробиология. 2007. Т. 76. №2. С. 236-242.
15. *Глушакова, А.М.* Особенности динамики эпифитных и почвенных дрожжевых сообществ в зарослях Недотроги железистой на перегнойно-глеевой почве / *А.М. Глушакова, А.В. Качалкин, И.Ю. Чернов* // Почвоведение. 2011. № 8. С. 966-972.
16. *Макимова, И.А.* Структура сообществ дрожжевых грибов в лесных биогеоценозах / *И.А. Максимова, И.Ю. Чернов* // Микробиология. 2004. Т. 73. №4. С. 558-566.

SACCHAROMYCES CEREVISIAE YEAST ALLOCATED FROM APRICOT (*PRUNUS ARMENIACA*) FRUITS

© 2012 D.A. Abdullabekova¹, A.V. Kachalkin²

¹ Near-Caspian Institute of Biological Resources DSC RAS, Makhachkala

² Moscow State University named after M.V. Lomonosov

It is shown that apricot fruits can be a natural source of *Saccharomyces cerevisiae* yeast which selection is limited generally to fermentation industry. Type identification which has been carried out on the basis of morphophysiological indicators is confirmed with the analysis of nucleotide sequences of rDNA D1/D2 domains 26S. Biotechnological characteristics of the allocated cultures allow to recommend this locus for directional searching of production and valuable strains.

Key words: *Prunus armeniaca*, *Saccharomyces cerevisiae*, fruit and berry wines, yeast, 26S rDNA