

МОРФОЛОГО-ЦИТОЛОГІЧНІ ЗМІНИ КЛІТИН ДРІЖДЖІВ ЗА НИЗЬКИХ ТЕМПЕРАТУР

Л.Я. Паляниця

Кандидат хімічних наук, доцент*

Контактний тел.: (032) 258-26-81

E-mail: liubapal@ukr.net

Р.Б. Косів

Кандидат технічних наук, доцент*

Контактний тел.: (032) 258-26-81

E-mail: r.kosiv@online.ua

Н.І. Березовська

Кандидат хімічних наук, доцент*

Контактний тел.: (032) 258-26-81

E-mail: NBeresovska@gmail.com

Н.О. Паньків

Аспірант*

Контактний тел.: (032) 258-26-81

E-mail: n.pankiv@i.ua

*Кафедра технології органічних продуктів
Національний університет «Львівська політехніка»
вул. С.Бандери, 12, м. Львів, Україна, 79013

*Вивчено особливості цитологічних змін дріжджових клітин *Saccharomyces cerevisiae*, зумовлених дією низьких температур. Результати показали, що заморожування при -17°C і -50°C веде до часткової зміни форми клітин, ушкодження клітинних оболонок, виходу клітинного матеріалу назовні, змін кариосом і зовнішніх оболонок аскоспор дріжджів; деякі клітини залишаються неушкодженими і не зазнають суттєвих змін*

*Ключові слова: дріжджі *Saccharomyces cerevisiae*, низькі температури, морфологія, цитологія*

*Изучены особенности цитологических изменений дрожжевых клеток *Saccharomyces cerevisiae* в условиях низких температур. Результаты исследований показали, что замораживание при -17°C и -50°C ведет к частичному изменению форм клеток, повреждению клеточных оболочек, выходу клеточного материала, изменению кариосом и внешних оболочек аскоспор; некоторые клетки остаются неповрежденными без существенных изменений*

*Ключевые слова: дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, низкие температуры, морфология, цитология*

Вступ

Дріжджі роду *Saccharomyces* знайшли широке використання у харчовій промисловості, зокрема у виробництвах продуктів бродіння. Збереження морфолого-цитологічних, культуральних і фізіологічних властивостей промислових штамів дріжджів можна забезпечувати шляхом заморожування протягом певного періоду часу. Кріоконсервування є перспективним серед інших способів зберігання мікроорганізмів. Ефективність цього способу залежить від вибору режимів заморожування [1].

Аналіз літературних даних і постановка проблеми

При охолодженні в клітині відбуваються такі дискретні явища: видалення води у вигляді льоду; концентрування розчинів; зменшення об'єму клітини; осадження розчинених речовин [2].

Запропоновано декілька механізмів пошкодження клітин мікроорганізмів в умовах низьких температур. За одним з них висока концентрація електроліту, яка виникає в результаті заморожування, впливає на ліпиди мембрани, порушуючи цілісність дріжджової клітини. У результаті клітини перенасичуються катіонами і піддаються осмотичному удару через надходження води під час заморожування [3].

За іншим механізмом пошкодження дріжджів відбувається не від концентрації електроліту, а через нездатність клітин стискатися більше, ніж на 50 % від їхнього початкового об'єму. Це створює змінний градієнт тиску на мембрану і збільшує її проникність [4].

Дослідники [5] вважають, що висока внутрішньоклітинна концентрація солей веде до пошкодження білків у результаті зміни показника рН всередині клітини.

Більшість досліджень підтверджують, що основні об'єкти пошкодження клітин внаслідок заморожування – мембрани. Це зумовлює мембранно-опосередковані процеси окислювального фосфорилування, а не втрату активності розчинних ферментів [3].

Мета і завдання дослідження

Метою роботи було дослідження морфолого-цитологічні зміни клітин дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* в умовах низьких температур.

Експериментальні дані та їх обробка

Об'єктами досліджень були: дводобова культура дріжджів виду *Saccharomyces cerevisiae*, вирощена у солодовому суслі з товарних хлібопекарських дріжджів (ВАТ «Ензим»); культура у вигляді спор цих же дріжджів після 14-добового вирощування на середовищі Гордкової.

Біомасу дріжджів заморожували у камері НС-280/75 (Feigasa, Чехія) при $-2 \pm 0,5$ °С, -17 ± 1 °С, -50 ± 2 °С протягом 3 год. Відтанення здійснювали при кімнатній температурі.

Морфологію клітин дріжджів досліджували у препаратах з прижиттєвим забарвленням метиленовим синім за допомогою світлового мікроскопа XS-5510 (Optics&Electronics).

Дослідження цитології клітин сахароміцетів здійснювали за допомогою електронного трансмісійного мікроскопа ПЕМ-100. Для цього клітини дріжджів фіксували в 1,5 %-му водному розчині KMnO_4 при кімнатній температурі протягом 20 хв, промивали кілька разів водою та обезводнювали в розчинах етилового спирту при поступовому збільшенні його концентрації: 30, 50, 70, 90 % об. та абсолютному. Після зневоднення зразок поміщали в епоксидну смолу Епоп-812 та полімеризували протягом 48 год при температурі 60 °С. Зрізи готували на ультрамікротомі УМТП-6М та контрастували солями свинцю за Рейнольдсом.

Результати мікроскопування препаратів дріжджових клітин з прижиттєвим забарвленням метиленовим синім показали, що кількість забарвлених клітин після заморожування зростає у порівнянні з контрольним зразком (рис. 1). Це підтверджує збільшення проникності клітинних мембран дріжджів під впливом низьких температур.

Дослідження морфологічних змін клітин дріжджів після заморожування показали, що форма клітин майже не змінювалася при -2 °С і ставала більш видовженою при -17 °С (рис. 1, 2). При таких температурах не спостерігали руйнування клітинних стінок і виходу клітинного матеріалу назовні.

Морфолого-цитологічні спостереження виявили, що в деяких клітинах відбувалися зміни окремих органел у порівнянні з контрольним зразком (рис. 3), зокрема форми та цілісності вакуолей (рис. 4 б), форми ядра (рис. 4 в), цілісності ядерних оболонок (рис. 4 г).

Дослідження цитологічних особливостей клітин дріжджів після заморожування при -50 °С показали, що заморожування за таких умов призводить в окремих клітинах до розриву клітинної стінки (рис. 4 а) та виходу у середовище клітинного матеріалу, який локалізується на поверхні зовнішньої оболонки клітин (рис. 4 б).

Також зазнавала змін зовнішня оболонка аскоспор дріжджів у порівнянні з контрольним зразком (рис. 5).

Проте, варто зазначити, що вищевказані зміни у морфології та цитології клітин спостерігали лише в

окремих клітинах. Деякі клітини залишалися навіть після заморожування при -50 °С майже незмінними (рис. 4 д, 5 в). Результати досліджень морфолого-цитологічних особливостей аскоспор дріжджів показали їх більшу стійкість до низьких температур, оскільки значно менше клітин зі спорами зазнавали змін після заморожування.

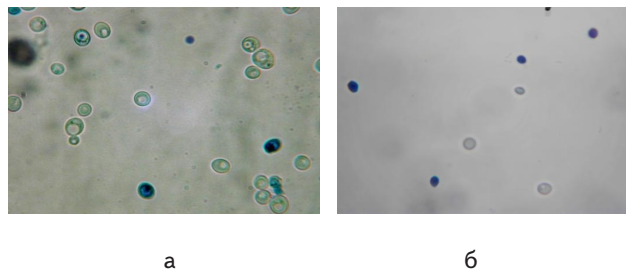


Рис. 1. Мікроскопування препаратів з прижиттєвим забарвленням метиленовим синім дріжджових клітин: а - вихідної культури (контрольний зразок); б - після заморожування при -17 °С (x 624)

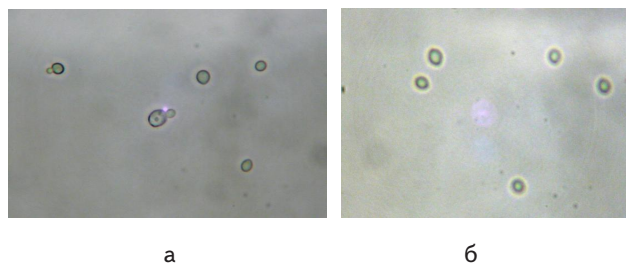


Рис. 2. Мікроскопування препаратів живих клітин після заморожування: а) при -2 °С, б) при -17 °С (x 624)

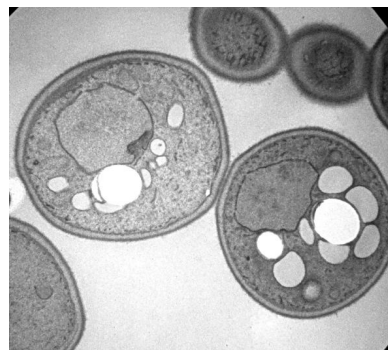


Рис. 3. Мікроскопування клітин дріжджів контрольного зразка (x 10 000)

Висновки

Отримані результати дають можливість зробити такі висновки:

- у досліджуваному діапазоні низьких температур -2 , -17 і -50 °С є можливим заморожування дріжджів зі збереженням морфолого-цитологічних властивостей клітин,

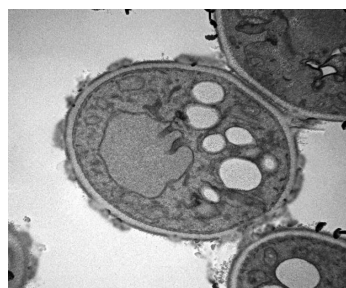
- виявлено, що кращою криостійкістю у процесі заморожування володіють спори дріжджів у порівнянні з вегетативними клітинами.



а



б



в

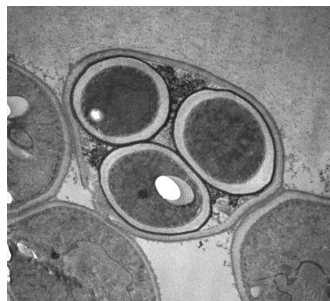


г



д

Рис. 4. Мікроскопування клітин дріжджів після заморожування при $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\times 10\ 000$)



а



б



в

Рис. 5. Мікроскопування аскоспор дріжджів: а – до заморожування (контрольний зразок), б і в – після заморожування при $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\times 10\ 000$)

Література

1. Сакун, О.В. Механізми кріопшкодження дріжджових грибів *Saccharomyces cerevisiae* при заморожуванні у водному розчині диметилсульфоксиду з постійною швидкістю у контейнерах циліндричної форми // Проблеми криобіології. - 2010. – Т.20, № 1. – С. 59-65.
2. Кульп, К. Производство изделий из замороженного теста: пер. с англ. / К.Кульп, К. Лоренц, Ю. Брюммер; под общ. ред. И.В. Матвеевой. – СПб.: Профессия, 2005. – 288 с.
3. Цуцаева, А.А. Криобиология и биотехнология / А.А. Цуцаева, В.Г. Попов, К.М. Сытник. - Киев: Наук. думка, 1987. – 216 с.
4. Кашнер, Д. Жизнь микробов в экстремальных условиях / Д. Кашнер. - М.: Мир, 1981. – 521 с.
5. Borst-Pauwels G.W.H. Ion transport in yeast // Biochim. Et biophys. Acta. – 1981. – 650, № 2. – P. 88-127.

Abstract

Yeast Saccharomyces is widely used in food industry, in particular at fermentation products production. The preservation of yeast taxonomical and technological characteristics is important and may be carried out by different methods, among which cryopreservation is the most prospective. Thus, the target of the research was to study the morphological and cytological changes of yeast cells at low temperatures applying light and electron microscopes according to the standard procedure. The results show that freezing at -17 oC and -50oC results in partial modification of the cell's form, damage of the cell membrane, outlet of cell material, modification of karyosomes and external membranes of yeast ascospores. Some cells remain undamaged and do not undergo essential changes. Yeast spores are more resistant to the cryopreservation in comparison with vegetative cells. The results obtained may be used in food industry and biotechnology when choosing the optimal modes of cryopreservation of industrial cultures of yeast

Key words: *yeast Saccharomyces cerevisiae, low temperatures, morphology, cytology*