

УДК 663.12/.14:665.127+547.262.

ВЗАЄМОЗВ'ЯЗОК ЖИРНОКИСЛОТНОГО СКЛАДУ КЛІТИННОЇ СТІНКИ ШТАМУ ДРІЖДЖІВ *KLUUYVEROMYCES MARXIANUS* УКМ Y-305 З ПРОДУКУВАННЯМ 2-ФЕНІЛЕТАНОЛУ ТА ЕТАНОЛУ

О.Г. МАМЕЄВА

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України
Україна, Д03680, Київ, вул. Академіка Заболотного 154
e-mail: mameeva.olga@gmail.com

Мета. Метою роботи було дослідження жирнокислотного (ЖК) складу клітинної стінки дріжджів *Kluuyveromyces marxianus* УКМ Y-305 за різних параметрів культивування і встановлення взаємозв'язку між її ЖК складом і продукуванням 2-фенілетанолу та етанолу. **Методи.** Ріст дріжджів та їхні параметри культивування вивчали із застосуванням загальноприйнятих мікробіологічних методів. Концентрації 2-фенілетанолу та етанолу та ЖК склад клітинних ліпідів вивчали методом хромато-мас-спектрометрії. **Результати.** Встановлено ЖК склад клітинної стінки дріжджів *K. marxianus* УКМ Y-305. Показано, що високі концентрації олеїнової кислоти у складі клітинної стінки дріжджів *K. marxianus* УКМ Y-305 забезпечують їхню адаптацію до токсичної дії етанолу і 2-фенілетанолу. **Висновки.** Штам дріжджів *K. marxianus* УКМ Y-305 характеризується високою стійкістю до етанольного і 2-фенілетанольного стресу.

Ключові слова: *Kluuyveromyces marxianus*, жирні кислоти, 2-фенілетанол, етанол, токсичність.

Вступ. При спиртовому бродінні дріжджів утворюється велика кількість вторинних метаболітів, які, в першу чергу, відповідають за смак та аромат вихідного продукту. Вищі ароматичні та неароматичні спирти, а саме: 2-фенілетанол (2-ФЕ) та етанол, є метаболітами мікробного походження, що утворюються внаслідок бродіння дріжджів [1 – 3]. У світі постійно проводиться селекція дріжджових культур, здатних синтезувати 2-фенілетанол та етанол. Продукентами переважно є штами дріжджів родів *Kluuyveromyces* та *Saccharomyces*, відповідно [4, 5]. Значною мірою увага дослідників приділяється вивченню фізіологічних основ синтезу та отриманню стійких мутантних штамів дріжджів, створенню нових біотехнологічних розробок на основі цих штамів із покращеним виходом кінцевого продукту [6 – 8]. ЖК склад клітинної стінки дріжджів залежить від багатьох факторів, а саме: умов ферментації – наявності кисню, температури культивування, складу поживного середовища тощо.

Такі метаболіти, як етанол і 2-фенілетанол, можуть бути токсичними щодо дріжджів. Хоча точний механізм впливу даних метаболітів на дріжджі залишається невідомим, склад мембрани є однією з найімовірніших мішеней, як це було з'ясовано у випадку етанолу [9, 10]. Отже, склад плазматичної мембрани дріжджів може відігравати важливу роль у транспортуванні та стійкості до цих сполук, і тому незначні зміни плазмалеми можуть змінювати метаболізм кліти-

© О.Г. МАМЕЄВА, 2013

ни. Жирні кислоти та їхні ефіри впливають на процеси спиртового бродіння [7]. Встановлено, що коротколанцюгові (КЛЖК) і середньоланцюгові (СЛЖК) жирні кислоти разом з етанолом можуть пригнічувати ріст дріжджів [8, 9]. З іншого боку, довголанцюгові жирні кислоти (ДЛЖК) сприяють їхньому росту [10]. Продукування цих кислот значно відрізняється у видів і штамів дріжджів і може впливати на послідовний ріст дріжджів під час ферментації.

Метою роботи було дослідження взаємозв'язків між жирнокислотним складом клітинної стінки дріжджів *K. marxianus* УКМ Y-305 та продукуванням вторинних метаболітів 2-фенілетанолу та етанолу.

Матеріали і методи

У роботі використовували штамп дріжджів *K. marxianus* УКМ Y-305, отриманий з Української колекції мікроорганізмів (УКМ) Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України.

Дріжджі (10^7 – 10^8 кл./мл, стаціонарна фаза росту) вирощували у рідкому середовищі YPD (глюкоза 20 г/л, бактеріологічний пептон 20 г/л, дріжджовий екстракт 10 г/л), рН 5,0. Для проведення експериментів використовували різні середовища [11–13], оптимальний склад яких був нами встановлений у попередніх експериментах: просте однокомпонентне (S) (0,75 % дріжджового екстракту) і багате трикомпонентне (R) (9 % сахарози, 1,5 % дріжджового екстракту, 0,2 г/л L-фенілаланіну) при активній, пасивній аерації та в мікроаерофільних умовах із додатковим внесенням твіну 80 (70 % олеїнової кислоти, Sigma). Ці умови були використані в різних комбінаціях. Культури вирощували при 14 °С і 28 °С на ротаційному шейкері 240 об./хв. Кількість біомаси визначали за оптичною густиною на фотоелектроколориметрі ЛМФ-69 ($\lambda=540$ нм) та перерахунком на абсолютно суху вагу (АСВ).

Визначення токсичного впливу 2-фенілетанолу, етанолу та впливу твіну 80 проводили за допомогою багатофакторного експерименту. Умовами оптимізації рівня продукування біомаси дріжджами *K. marxianus* УКМ Y-305 були концентрації етанолу (X_1), 2-фенілетанолу (X_2) та твіну 80 (X_3) з використанням моделі Бокса-Бенкена. Загалом було використано 15 комбінацій факторів. Рівні трьох факторів та їх рівновіддаленість були відібрані на основі даних попередніх експериментів та результатів інших авторів [6, 11 – 13]. Дисперсійний аналіз використаний для визначення достовірної різниці отриманих результатів і для визначення середніх значень при 95 % ймовірності ($p \leq 0,05$). Вплив кожного з факторів та їхні взаємозв'язки з отриманим результатом оцінені за допомогою ANOVA. Дані з оптимізації проаналізовані для отримання коефіцієнтів регресії і побудови регресійних рівнянь. Функція ймовірності вирахована методом найменших квадратів, графіки площин побудовані як функція від значень заданих початкових концентрацій речовин в середовищі з використанням програмного забезпечення STATISTICA 6.0 (StatSoft Inc., 2001).

Концентрації 2-фенілетанолу та етанолу в середовищі культивування вимірювали після фільтрації (фільтр 0,2 μm) методом хромато-мас-спектрометрії (Agilent Technologies, USA). Газохроматографічний-мас-спектрометричний ГХ/МС аналіз проводили на інерційному хромато-мас-спектрометрі Agilent 6890N/5973 з використанням капілярних колонок DB-FFAP (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm , J&W Scientific, USA). Аналіз здійснювали в режимі програмування температури 60 °С впродовж 1 хв з наступним градієнтом 20 °С/хв до 220 °С, яка трималася впродовж 5 хв. Температура інжектора складала 250 °С, інтерфейсу – 280 °С. Детекцію проводили в режимі SCAN. Речовини ідентифікували з використанням бази мас-

спектрів NIST02 та стандартного розчину 2-ФЕ (Merck, Germany) та етанолу.

ЖК склад клітинних ліпідів вивчали методом хромато-мас-спектрометрії. Проби для аналізу готували згідно з методикою приготування метилових ефірів жирних кислот дріжджів [14, 15]. Дослідження проводили на хроматографі Agilent 6890N з мас-спектрометричним детектором Agilent 5973 inert (капілярна колонка HP-5MS: 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm (J&W Scientific, USA). Об'єм проби – 1,0 мкл; режим – split; газ-носії – гелій; швидкість потоку – 1,0 мл/хв; початкова температура колонки – 150 °С; кінцева – 250 °С; температурний градієнт – 4 °С /хв; температура інтерфейсу – 280 °С; тип іонізації – електронний удар; енергія іонізації – 70 еВ. Обробку даних хромато-мас-спектрометричного аналізу проводили за допомогою комп'ютерної програми ChemStation та інтегрованої бази даних мас-спектрів NIST02.

Всі досліди стандартизовані, проведені у трьох повторностях та є статистично достовірними.

Результати та обговорення

У процесі спиртового бродіння дріжджова клітина продукує велику кількість вторинних метаболітів, у тому числі етанол і 2-ФЕ. Повідомляється переважно про токсичну дію на дріжджові клітини саме етанолу [9, 10]. Стійкість дріжджів до високих концентрацій етанолу в середовищі корелює зі здатністю клітин модифікувати ліпідний склад клітинної стінки у відповідь на де-

структивну дію етанолу [16–18, 19]. На відміну від етанолу, токсичний ефект 2-ФЕ в літературі майже не висвітлюється, основна увага дослідників приділяється вивченню синергічної дії етанолу і 2-ФЕ [5, 6, 13]. Проведені нами попередні дослідження штаму *K. marxianus* УКМ Y-305 показали, що він здатен синтезувати як 2-фенілетанол, так і етанол у високих концентраціях – 1,2 г/л та 21,3 г/л, відповідно. Досліджений штам є Кребтри-позитивним і здатний продукувати етанол в аеробних умовах [11, 20]. Відповідно виникає питання щодо стійкості *K. marxianus* УКМ Y-305 до високих концентрацій 2-ФЕ та етанолу в середовищі культивування, оскільки ці вторинні метаболіти є широковідомими токсичними сполуками.

В експериментальних хроматограмах ідентифікували основні ЖК компоненти ліпідів. Довжина вуглецевого ланцюга дріжджів *K. marxianus* УКМ Y-305 варіювала незначною мірою – від 16 до 18 атомів вуглецю. У ЖК профілі клітинної стінки дріжджів домінувала олеїнова кислота $cis_9C_{18:1}$. Крім того, дріжджі додатково містять у незначних кількостях насичені ЖК $C_{16:0}$ пальмітинову, $C_{18:0}$ стеаринову та ненасичені ЖК $(9)C_{16:1}$ пальмітоолеїнову і $9:2C_{18:1}$ лінолеву. Результати вивчення ЖК складу *K. marxianus* УКМ Y-305 при вирощуванні на агаризованому середовищі представлені у табл. 1.

Температура культивування і ростовий субстрат є одними із найважливіших параметрів для проходження процесу спиртового бродіння, оскільки вони впливають на кінетику процесу (тривалість та швидкість

Таблиця 1. Жирнокислотний склад клітинної стінки дріжджів *K. marxianus* УКМ Y-305

Дріжджі	$(9)C_{16:1}$	$C_{16:0}$	$9:2C_{18:2}$	$cis_9 C_{18:1}$	$C_{18:0}$	$C_{16:0}/C_{18:0}$	$C_{16:1}/C_{18:1}$	UFA/SFA*
<i>K. marxianus</i> УКМ Y-305	5,44	17,8	12,88	60,20	3,68	4,84	0,09	3,65

Примітки: * – насичені жирні кислоти (SFA) – $C_{16:0}$, $C_{18:0}$; ненасичені жирні кислоти (UFA) – $(9)C_{16:1}$, $9:2C_{18:2}$, $cis_9 C_{18:1}$. Дані представлені як відсоток від загального вмісту ЖК.

ферментації) та продукування вторинних метаболітів [6, 17, 18]. Зміни в складі плазматичної мембрани є адаптативною відповіддю на низькотемпературне спиртове бродіння [9, 10]. Зміни в складі мембранних ЖК були визначені за допомогою газової хроматографії для оцінки рівня адаптації клітин і представлені при 14 °С і 28 °С на прикладі штаму *K. marxianus* УКМ Y-305 за умови росту на двох різних живильних середовищах (табл. 2). Аналіз мембранних ЖК показав, що протягом ферментації найчастіше визначали ненасичені ДЛЖК. Зі збільшенням температури змінювався ліпідний склад мембран. Для штаму *K. marxianus* УКМ Y-305 за температури 14 °С в ЖК профілі домінували пальмітинова (31 – 37 %), олеїнова (32 – 34 %) і стеаринова (20 – 26 %) ЖК, у залишкових кількостях визначені пальмітоолеїнова і лінолева ЖК. За температури 28 °С переважала олеїнова (74 – 75 %) ЖК, рівень пальмітинової ЖК складав 14 – 16 %, в невеликих кількостях ідентифікували пальмітоолеїнову і стеаринову ЖК, лінолева – взагалі була відсутня.

Співвідношення насичених ЖК С16:0/С18:0 та ненасичених ЖК С16:1/С18:1 представлені в табл. 2. Текучість мембран при низьких температурах корегується змінами рівня ненасиченості ЖК. Чим вищим є показник ненасиченості ЖК (UFA/SFA), тим краще клітини дріжджів адаптуються до високих концентрацій етанолу і 2-ФЕ при культивуванні. Отже, дріжджі *K.*

marxianus УКМ Y-305 легко адаптуються до токсичної дії етанолу і 2-ФЕ при 28 °С, при цьому склад середовища впливає на рівень адаптації незначною мірою.

Відомо, що синтез 2-ФЕ збільшується зі збільшенням швидкості перемішування і, відповідно, рівня аерації (але не більше 250 rpm) [6, 16]. Кисень сприяє утворенню НЖК, що може призводити до інгібування алкогольацетилтрансферази. Таке інгібування каталізує перетворення 2-ФЕ в 2-фенілацетат. Для деяких сахароміцетів показано, що присутність кисню або внесення деяких компонентів у середовище культивування може збільшувати стійкість дріжджів до етанолу [6 – 8]. Саме тому необхідно було вивчення впливу рівня аерації і внесення твіну 80 (використовували як джерело олеїнової кислоти) на ЖК склад клітинної стінки дріжджів. Досліджені режими культивування і результати відповідних експериментів наведені в табл. 3. За заданих режимів культивування *K. marxianus* УКМ Y-305 у ліпідному складі клітинної стінки домінує олеїнова кислота 55 – 62 % (без внесення твіну 80), на рівні 14 – 18 % визначали пальмітинову і лінолеву кислоти і додатково слідові кількості пальмітоолеїнової та стеаринової кислот. Внесення твіну 80 в середовище культивування призводить до значного підвищення вмісту (89–94 %) олеїнової кислоти у складі клітинної стінки, пальмітинова і лінолева кислоти визначаються в слідових кількостях, а пальмітоолеїнова і стеаринова кислоти не детек-

Таблиця 2. Зміни в жирнокислотному складі клітинної стінки дріжджів *K. marxianus* УКМ Y-305 залеж-но від середовища і температури культивування

T, °C/ С*	(9)C _{16:1}	C _{16:0}	9:2C _{18:2}	cis 9 C _{18:1}	C _{18:0}	C _{16:0} / C _{18:0}	C _{16:1} / C _{18:1}	UFA/ SFA
14 / S	5.26	37.96	3.89	32.33	20.56	2.36	0.16	0.70
14 / R	2.23	31.19	5.81	34.60	26.17	1.19	0.06	0.74
28 / S	5.35	16.30	–	74.64	3.71	4.39	0.07	3.99
28 / R	4.23	14.99	–	75.44	5.34	2.81	0.05	3.92

Примітки: * – С – середовище культивування, S – просте, R – багате. Насичені жирні кислоти (SFA) – C_{16:0}, C_{18:0}; ненасичені жирні кислоти (UFA) – (9)C_{16:1}, 9:2C_{18:2}, cis 9 C_{18:1}. Дані представлені як відсоток від загального вмісту ЖК.

туються взагалі (табл. 3). Показник рівня ненасиченості ЖК (UFA/SFA) для *K. marxianus* УКМ Y-305 в 4–5 разів вищий за умови додаткового внесення твіну 80 в середовище культивування, що свідчить про високий рівень адаптації досліджених штамів дріжджів до етанолу і 2-ФЕ при культивуванні (табл. 3).

Показано, що збільшення рівня ненасиченості ЖК у дріжджів призводить до збільшення синтезу етанолу і, відповідно, підвищення стійкості до нього за рахунок регулювання ліпідного складу клітинної мембрани і що потреба у кисні може бути усунена при додаванні олеїнової кислоти в середовище культивування [6, 9, 16]. Досліджували вплив високих концентрацій етанолу та 2-ФЕ на ріст дріжджів і ріст клітин при внесенні в середовище твіну 80 [12, 14, 17, 18]. Досліджений токсичний вплив високих концентрацій етанолу (до 6 %), 2-ФЕ (до 0,5 %), твіну 80 (до 0,4 %), тому дані концентрації були відібрані нами для проведення експериментів [5 – 10, 18]. Слід зауважити, що середовище культивування R було більш сприятливим для росту дослі-

джуваних штамів дріжджів за таких високих концентрацій етанолу і 2-ФЕ, як 6 % і 0,5 % відповідно, додавання твіну 80 у такому випадку не стимулювало ріст дріжджів. Стимулювальна на ріст дріжджів дія твіну 80 проявлялася меншою мірою за невисоких концентрацій спиртів у середовищі.

Досліджували вплив етанолу і 2-ФЕ, а також роль і вплив твіну 80 як джерела олеїнової кислоти на ріст *K. marxianus* УКМ Y-305. Загалом було використано 15 комбінацій факторів (табл. 4.). Нами відібрані значущі фактори, які впливають на приріст біомаси дріжджів концентрації етанолу (X_1), 2-ФЕ (X_2) та твіну 80 (X_3). Комбінування незалежних факторів даного експерименту і отримані результати щодо продукування біомаси *K. marxianus* УКМ Y-305 на поживних середовищах R і S представлені в табл. 4.

Результати описані такими рівняннями регресії:

для дріжджів *K. marxianus* УКМ Y-305, середовище R

$$Y(1) = 1,8 - 8,02X_2 + 10,66X_3^2 \quad R^2: 0,84393 (1),$$

для дріжджів *K. marxianus* УКМ Y-305, середовище S

Таблиця 3. Жирнокислотний склад клітинної стінки дріжджів *K. marxianus* УКМ Y-305 за різних режимів культивування

N	Режими культивування	${}^{(9)}C_{16:1}$	$C_{16:0}$	${}_{9:2}C_{18:2}$	${}_{cis\ 9}C_{18:1}$	$C_{18:0}$	$\frac{C_{16:0}}{C_{18:0}}$	$\frac{C_{16:1}}{C_{18:1}}$	UFA/SFA
1	Активна аерація	3,64	14,36	18,62	60,06	3,33	4,31	0,06	4,65
2	Активна аерація з внесенням твіну 80	ND*	4,58	4,02	91,40	ND	–	–	20,80
3	Пасивна аерація	1,41	18,13	14,05	62,73	3,68	4,93	0,02	3,58
4	Пасивна аерація з внесенням твіну 80	ND	4,28	1,31	94,41	ND	–	–	22,36
5	Мікроаерофільні умови	8,69	15,98	16,58	55,25	3,5	4,56	0,16	4,13
6	Мікроаерофільні умови з внесенням твіну 80	0,76	4,72	3,64	89,90	0,98	4,82	0,008	16,54

Примітки: * – ND – вміст жирних кислот не визначався. Насичені жирні кислоти (SFA) – $C_{16:0}$, $C_{18:0}$; ненасичені жирні кислоти (UFA) – ${}^{(9)}C_{16:1}$, ${}_{9:2}C_{18:2}$, ${}_{cis\ 9}C_{18:1}$. Дані представлені як відсоток від загального вмісту ЖК.

Таблиця 4. Вплив комбінування незалежних на продукування біомаси дріжджами *K. marxianus* УКМ Y-305

Концентрація, %			Біомаса, г/л АСВ	
Етанол (X_1)	2-ФЕ (X_2)	Твін 80 (X_3)	Середовище	
			S	R
0	0	0,2	1,68	2,95
6	0	0,2	0,34	0,43
0	0,5	0,2	0,24	0,28
6	0,5	0,2	0,19	0,27
0	0,25	0	0,30	0,45
6	0,25	0	0,20	0,28
0	0,25	0,4	0,41	0,91
6	0,25	0,4	0,21	0,28
3	0	0	2,16	2,13
3	0,5	0	0,24	0,26
3	0	0,4	2,18	1,96
3	0,5	0,4	0,30	0,28
3	0,25	0,2	0,24	0,34
3	0,25	0,2	0,21	0,36
3	0,25	0,2	0,21	0,34

$Y(2) = 2,31 - 0,12X_1 - 8,44X_2 + 10,5X_3^2$ $R^2: 0,79320(2)$, де $Y(1)$, $Y(2)$ – рівні продукування біомаси, г/л, АСВ; 1,8; 2,31 тощо – коефіцієнти регресії.

Регресійна модель включає від 3 (1) до 4 (2) коефіцієнтів регресії з квадратичною залежністю впливу та лінійний вплив взаємодій факторів і описує взаємозв'язки між відповіддю Y та експериментальними факторами X_1 і X_2 . Слід зауважити, що основним значущим фактором, що впливає на приріст біомаси і, відповідно, показує його токсичний вплив, є концентрація 2-ФЕ. У випадку використання як субстрату середовища культивування R для штаму *K. marxianus* УКМ Y-305 досліджені концентрації етанолу негативно впливають на приріст біомаси. Позитивний квадратичний вплив дії такого фактора, як 2-ФЕ, показаний незалежно від типу середовища. Так, невисокі концентрації 2-ФЕ можуть стимулювати приріст біомаси дріжджів. Додаткове внесення різних концентрацій твіну 80 не впливає на їхній приріст біома-

си. Кореляція між отриманими (вісь X) та передбачуваними (вісь Y) даними є досить високою. Це свідчить про те, що отримані регресійні рівняння можуть бути використані для визначення рівня приросту біомаси досліджених штамів дріжджів. Отримані графічні площини синтезу біомаси дріжджами *K. marxianus* УКМ Y-305 на живильних середовищах R і S як функція від комбінацій значень концентрацій етанолу і 2-ФЕ, твіну 80 і етанолу, твіну 80 і 2-ФЕ. При рості *K. marxianus* УКМ Y-305 на середовищі R найбільший приріст біомаси може бути отриманий за умов концентрації етанолу від 4 до 6 %, 2-ФЕ менше 0,15 %, твіну 80 більше 0,45 %, при рості на середовищі R – за концентрації етанолу більше 6 %, 2-ФЕ менше 0,15 %, твіну 80 більше 0,45 %. Профілі прогнозованих значень свідчать, що наявність в середовищі культивування етанолу 3,0 %, 2-ФЕ – 0,25 % та твіну 80 – 0,2 % є оптимальними і не чинять токсичного впливу на синтез біомаси штамами дріжджів, що експериментально було під-

тверджено в наших подальших дослідженнях. Для штаму *K. marxianus* УКМУ-305 характерним був приріст біомаси 1,2 г/л АСВ на середовищі R і 1,6 г/л АСВ на середовищі S. Прогнозований діапазон приросту для даного штаму складає 2,2 г/л АСВ і 2,95 г/л АСВ на середовищах R і S відповідно.

Висновки

Високі концентрації олеїнової кислоти клітинної стінки дріжджів *K. marxianus* УКМ Y-305 забезпечують адаптацію до токсичної дії етанолу і 2-ФЕ тільки за температури 28 °С, при цьому склад середовища незначною мірою впливає на рівень адаптації. Додаткове внесення олеїнової кислоти приводить до наступного включення її в клітинні мембрани і, відповідно, сприяє підвищенню стійкості до високих концентрацій етанолу і 2-фенілетанолу. Штам *K. marxianus* УКМ Y-305 характеризується значною стійкістю до етанольного і 2-фенілетанольного стресу. Така властивість сприяє його домінуванню на пізніших стадіях ферментації при спиртовому бродінні і забезпечує утворення великих кількостей вищих ароматичних і неароматичних спиртів.

Подяка

Автор виражає щире подяку канд.б.н. А.М. Остапчуку і канд.б.н. В.В. Ключко за допомогу в проведенні ГХ / МС аналізів в лабораторії біологічних полімерних сполук Інституту мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного Національної академії наук України, Київ, Україна.

Перелік літератури

1. Romano P. Metabolic characteristics of wine strains during spontaneous and inoculated fermentations // Food Technol. Biotechnol. – 1997. – Vol. 35. – P. 27–314.
2. Lambrechts M.G., Pretorius I.S. Yeast and its importance to wine aroma – a review // S. Afr. J. Enol. Vitic. – 2000. – Vol. 21. – P. 97–129.

3. Fleet G.H. Yeast interactions and wine flavour // Int. J. Food Microbiol. – 2003. – Vol. 86. – P. 11–22.
4. Clemente-Jimenez J.M., Mingorance-Cazorla L., Martinez-Rodriguez S. Influence of sequential yeast mixtures on wine fermentation // Int. J. Food Microbiol. – 2005. – Vol. 98. – P. 301–308.
5. Etschmann M.M.N., Shell D., Schrader J. Screening of yeasts for the production of the aroma compound 2-phenylethanol in a molasses-based medium // Biotechnol. Lett. – 2003. – Vol. 25. – P. 531–536.
6. Torija M.J., Beltran G., Novo M. et al. Effects of fermentation temperature and *Saccharomyces* species on the cell fatty acid composition and presence of volatile compounds in wine // Int. J. Food Microbiol. – 2003. – Vol. 85. – P. 127–136.
7. Rosi I., Bertuccioli M. Influences of lipid addition on fatty acid composition of *Saccharomyces cerevisiae* and aroma characteristic of experimental wines // Journal of the Institute of Brewing. – 1992. – Vol. 98. – P. 305–314.
8. Oosthuizen A., Kock J.F., Botes P.J., Lategan P.M. The long-chain fatty acid composition of yeasts used in the brewing industry // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 1987. – Vol. 26. – P. 55–60.
9. Alexandre H., Rousseaux I., Charpentier C. Relationship between ethanol tolerance, lipid composition and plasma membrane fluidity in *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata* // FEMS Microbiol. Let. – 1994. – Vol. 124. – P. 17–22.
10. Swan T.M., Watson K. Membrane fatty acid composition and membrane fluidity as parameters of stress tolerance in yeast // Can. J. of Microbiol. – 1997. – Vol. 43. – P. 70–77.
11. Мамєєва О.Г., Нагорная С.С., Подгорский В.С. Скрининг продуцентів 2-фенілетанола среди дрожжей родов *Saccharomyces* и *Kluveromyces* // Микология и фитопатология. – 2008. – Т. 42, Вып. 2. – С. 185–191.
12. Mameeva O.G., Ostapchuk A.M., Podgorsky V.S. The 2-phenylethanol and ethanol production by yeasts *Saccharomyces cerevisiae* // Microbiol. and Biotechnol. – 2010. – № 1. – P. 14–22.
13. Mameeva O.G., Podgorsky V.S. Relationship between ethanol and 2-phenylethanol stress tolerance and fatty acid compositions of *Saccharomyces cerevisiae* // J. of Food Sci. and Eng. – 2013. – Vol. 3, № 2. – P. 71–78.
14. Brian B.L., Gardner E.W. Preparation of bacterial fatty acid methyl esters for rapid characterization by gas-liquid chromatography // Appl. Microbiol. – 1967. – Vol. 15, № 6. – P. 1499–1500.
15. Gunasekaran M., Hughes W.T. Gas-liquid chromatography: a rapid method for identification

- of different species of *Candida* // *Mycol.* – 1980. – Vol. 72. – P. 505 – 511.
16. *Steels E.L., Learmonth R.P., Watson K.* Stress tolerance and membrane lipid unsaturation in *Saccharomyces cerevisiae* // *Microbiol.* – 1994. – Vol. 140. – P. 569 – 576.
17. *Beltran G., Novo M., Guillamon J.M., Mass A., Rozes N.* Effect of fermentation temperature and culture media on the yeast lipid composition and wine volatile compounds // *Int. J. of Food Microbiol.* – 2008. – Vol. 121. – P. 169 – 177.
18. *Redon M., Guillamon J.M., Mass A., Rozes N.* Effect of fermentation temperature on the yeast lipid composition and alcoholic fermentation at low temperature // *Eur. Food Res. Technol.* – 2011. – Vol. 232. – P. 517 – 527.
19. *Mameeva O.G., Podgorsky V.S.* Fatty acid compositions of wine yeast under different cultivation regimes and stress factors // 1st International Symposium «Non-conventional Yeasts in the Postgenomic Era», September, 11–14, 2011, Lviv, Ukraine. Book of Abstracts. – P. 59.
20. *Mameeva O.G., Podgorsky V.S.* Relationship between stress tolerance and fatty acid compositions of *S. cerevisiae* // 13th International Congress on Yeasts «Yeasts for a sustainable future». – 26 – 30 August 2012, Madison, Wisconsin, USA. Book of Abstracts. – P. 334.

Представлено Т.П. Перервою
Надійшла 11.09.2013

ВЗАИМОСВЯЗЬ МЕЖДУ СОСТАВОМ ЖИРНЫХ КИСЛОТ КЛЕТОЧНЫХ СТЕНОК ШТАММА ДРОЖЖЕЙ *KLUYVEROMYCES MARXIANUS* УКМ Y-305 И ПРОДУЦИРОВАНИЕМ 2-ФЕНИЛЭТАНОЛА И ЭТАНОЛА

О.Г. Мамеева

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины Украина, Д03680, Киев, ул. Академика Заболотного, 154
e-mail: mameeva.olga@gmail.com

Цель. Целью работы было изучение жирнокислотного (ЖК) состава клеточной стенки дрожжей *K. marxianus* УКМ Y-305 при различных параметрах культивирования и установления взаимосвязи между их ЖК составом и возможностью продуцирования 2-фенилэтанола и этанола. **Методы.** Рост дрожжей и их параметры культивирования изучали с применением общепринятых микробиологических ме-

тодов. Концентрации 2-фенилэтанола и этанола и ЖК состав клеточных липидов изучали методом хромато-масс-спектрометрии. **Результаты.** Установлен ЖК состав клеточной стенки дрожжей *K. marxianus* УКМ Y-305. Определено, что высокие концентрации олеиновой кислоты в составе клеточной стенки дрожжей *K. marxianus* УКМ Y-305 обеспечивают адаптацию к токсическому действию этанола и 2-фенилэтанола. **Выводы.** Штамм дрожжей *K. marxianus* УКМ Y-305 отличается значительной устойчивостью к этанольному и 2-фенилэтанольному стрессу.

Ключевые слова: *Kluyveromyces marxianus*, жирные кислоты, 2-фенилэтанол, этанол, токсичность.

RELATIONSHIP BETWEEN CELL WALL FATTY ACID COMPOSITION OF THE YEAST STRAIN *KLUYVEROMYCES MARXIANUS* UCM Y-305 AND 2-PHENYLETHANOL AND ETHANOL PRODUCTION

O.G. Mameeva

Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, NAS of Ukraine
Ukraine, D03680, Kyiv, Akademika Zabolotnoho str., 154
e-mail: mameeva.olga@gmail.com

Aim. Aim of this work was to study the fatty acid (FA) composition of the cell wall in the yeast *K. marxianus* UCM Y-305 under different cultivation parameters and determine the relationship between its FA composition and producing of 2-phenylethanol and ethanol. **Methods.** Yeast growth and cultivation parameters were studied using conventional microbiological methods. Concentrations of 2-phenylethanol, ethanol and fatty acid composition of cellular lipids were explored by chromatography-mass spectrometry. **Results.** The fatty acid composition of the cell wall in *K. marxianus* UCM Y-305 yeast was determined. High concentrations of oleic acid in the cell wall of *K. marxianus* UCM Y-305 yeast was shown to ensure their adaptation to the toxic effects of ethanol and 2-phenylethanol. **Conclusions.** *K. marxianus* UCM Y-305 yeast strain is significantly resistant to ethanol and 2-phenylethanol stress.

Key words: *Kluyveromyces*, fatty acid, 2-phenylethanol, ethanol, toxicity.