**МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

**САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИНФОРМАЦИОННЫХ ТЕХНОЛОГИЙ, МЕХАНИКИ И ОПТИКИ**

**ИНСТИТУТ ХОЛОДА И БИОТЕХНОЛОГИЙ**

Т.В. Меледина, С.Г. Давыденко, Л.М. Васильева

# ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ ДРОЖЖЕЙ

Учебное пособие

**Санкт-Петербург
2013**

УДК 663.4
ББК 36.87
М 47

**Меледина Т.В., Давыденко С.Г., Васильева Л.М.** Физиологическое состояние дрожжей: Учеб. пособие. ─ СПб.: НИУ ИТМО; ИХиБТ, 2013. – 48 с.

Рассматриваются факторы, определяющие биосинтетическую активность клеток. Даны методические указания к проведению лабораторных работ по оценке жизнеспособности дрожжей и их физиологической активности.

Учебное пособие предназначено для подготовки магистров по направлению 260100 Продукты питания из растительного сырья.

**Рецензенты:** кафедра пищевой биотехнологии Санкт-Петербургского института управления и пищевых технологий (зав. кафедрой канд. техн. наук В.Г. Черныш); менеджер по обучению и развитию Н.Е. Худошина (Корпоративный университет ОАО «Пивоваренная компания “Балтика”»)

**Рекомендовано к печати редакционно-издательским советом Института холода и биотехнологий**

В 2009 году Университет стал победителем многоэтапного конкурса, в результате которого определены 12 ведущих университетов России, которым присвоена категория «Национальный исследовательский университет». Министерством образования и науки Российской Федерации была утверждена программа его развития на 2009–2018 годы. В 2011 году Университет получил наименование «Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики».

© Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, 2013

© Меледина Т.В., Давыденко С.Г., Васильева Л.М., 2013

# ВВЕДЕНИЕ

Важными факторами, определяющими бродильную способность дрожжей, биосинтез вкусоароматических компонентов пива и его коллоидную стойкость, являются биосинтетическая активность клеток и способность адаптироваться к постоянно изменяющимся условиям внешней среды в процессе брожения.

Биосинтетическая активность клеток зависит от питания дрожжей, их возраста, который определяется по числу дочерних рубцов на поверхности клеток, физико-химических условий внешней среды. Активность клеток изменяется в связи с осмотическими, гидростатическими, алкогольными, температурными, механическими стрессами, устойчивость к которым зависит как от штаммовых особенностей дрожжей, так и от их физиологического состояния.

Для оценки биосинтетической активности дрожжей используются показатели:

– жизнеспособность (viability) или количество живых клеток;

– мертвые клетки (vitality);

– физиологическая активность («жизненная сила»), которая тесным образом связана с жизнеспособностью.

Жизнеспособность можно определять методами, основанными на размножении клеток, или способами окрашивания различными красителями.

При определении жизнеспособности дрожжей методом окрашивания используют различные красители: метиленовую синь, раствор Люголя, сафранин, магниевую соль 1-анилино-8-нафтален сульфоновой кислоты (Mg-ANS), дигидродамин и др.

Физиологическую активность определяют по содержанию в клетках резервных углеводов (гликогена и трегалозы), которые являются источником эндогенной глюкозы, используемой в период лаг-фазы роста (адаптационный период) для биосинтеза стеринов, ненасыщенных жирных кислот, являющихся важнейшими компонентами клеточных мембран. Кроме того, эндогенная глюкоза участвует в метаболизме глицерина – антистрессового компонента клеток, который синтезируется при внесении дрожжей в плотные среды.

Биосинтетическую активность клеток можно определить по скорости выделения диоксида углерода или скорости потребления кислорода в аппарате Варбурга. Снижение скорости потребления $O_2$

свидетельствует о замедлении метаболических процессов, связанных с размножением дрожжей.

Среди новых методов оценки физиологического состояния дрожжей следует упомянуть тест «силы подкисления» и измерения внутриклеточного значения pH (метод JCP), модифицированный Давыденко С.Г.

Выбор того или иного метода оценки физиологического состояния клеток определяется поставленными перед производителями пива задачами. В любом случае своевременная оценка их биосинтетической активности является основой эффективного и успешного проведения процесса брожения и получения качественного продукта.

# 1. ФАКТОРЫ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ БИОСИНТЕТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ДРОЖЖЕЙ

## 1.1. Питание дрожжей

Физиологически активные дрожжи могут быть получены только при отсутствии дефицита питательных компонентов. Дефицит питательных веществ возрастает при использовании недорастворенного солода, зерновых несоложеных материалов, мальтозного сиропа и сахара. В результате снижается интенсивность размножения дрожжей, падает скорость брожения, увеличивается его длительность, снижается конечная степень сбраживания сусла. Это, в свою очередь, ведет к изменению вкусового профиля пива и уменьшению съема семенных дрожжей и снижению их физиологической активности.

Для предотвращения снижения интенсивности размножения и бродильной активности дрожжей в сусло необходимо вносить недостающие питательные вещества (аминокислоты или соли аммония, минеральные соли) и витамины. При выборе препаратов, в состав которых входят питательные вещества для дрожжей, а также для определения их дозировки, учитывают потребность дрожжей в факторах роста и минеральных компонентах и их влияние на процесс брожения.

### 1.1.1. Факторы роста

Дрожжи отличаются по отношению к факторам роста, т.е. к тем веществам, которые входят в состав клеток, но не могут при этом ими синтезироваться. Факторами роста для всех штаммов дрожжей являются биотин (витамин $B_7$), пантотеновая кислота (витамин $B_3$) и мезоинозит (витамин $B_8$). Некоторые штаммы дрожжей низового брожения испытывают потребность также и в пиридоксине (витамине $B_6$). Кроме этих витаминов следует обратить внимание на тиамин (витамин $B_1$), который является активатором брожения. Содержание этих витаминов в клетках и их роль в обмене (метаболизме) веществ у дрожжей приведены в табл. 1.1.

Таблица 1.1

**Содержание факторов роста (витаминов) в пивных дрожжах**

| Витамин | Содержание витамина, мг/100 г СВ | Роль в регулировании физиологического состояния дрожжей |
|---|---|---|
| Тиамин | 8–15 | Стимулирует спиртовое брожение, участвует в синтезе биомассы |
| Пантотеновая кислота | 2–20 | Участвует в синтезе непредельных жирных кислот, стероидов |
| Биотин | 0,1–1,0 | Регулирует углеводный, азотный и жировой обмен дрожжей |
| Инозит | 200–500 | В синтезе липидов мембран, росте и размножении клеток |

## 1.1.2. Минеральное питание дрожжей

К основным минеральным компонентам, необходимым для роста и размножения дрожжей, относятся азот, фосфор, калий, сера и магний, которые составляют основную массу золы (табл.1.2). Клетки в большей степени содержат азотистые вещества (60 % от СВ), в основном это белки, свободные аминокислоты, нуклеиновые кислоты. Для их синтеза дрожжами чаще используются аминокислоты, которые находятся в сусле. Они также могут ассимилировать (потреблять) неорганический азот ($NH_4^+$), который превращается клетками в аминокислоты. Для нормального обмена в 1л сусла должно содержаться не менее 140 мг аминного азота. При этом надо помнить, что дрожжи не утилизируют нитраты, нитриты и аминокислоты белков.

Таблица 1.2

**Содержание компонентов в дрожжах (% от СВ)**

| Компонент | Количество |
|---|---|
| Азот | 4,8–10,0 |
| Фосфор (в пересчете на $P_2O_5$) | 1,9–5,5 |
| Калий (в пересчете на $K_2O$) | 1,4–4,3 |
| Магний (в пересчете на MgO) | 0,1–0,7 |
| Сера (в пересчете на $SO_3$) | 0,0–0,05 |

С азотным обменом тесно связан обмен фосфора, калия и магния. Фосфор входит в состав нуклеиновых кислот, АТФ, фосфолипидов, полимеров клеточной стенки, он может накапливаться в клетке в виде полифосфатов. Для физиологических потребностей дрожжей расходуется от 10 до 13 мг фосфора на прирост 10 млрд. клеток.

Калий содержится в дрожжах в значительных количествах – до 4,3 % от СВ. Это сопоставимо лишь с содержанием азота (до 10 % от СВ) и фосфора (до 5,5 % от СВ), что свидетельствует о его важной роли в обмене дрожжей. В отличие от многих ионов калий выполняет роль не только кофермента, но также входит в некоторые структуры клетки. Он также участвует в регуляции транспорта ионов через клеточную стенку и через митохондриальную мембрану. Калий активирует около 40 различных ферментов, стимулирует сбраживание мальтозы и мальтотриозы. Он тесно связан с размножением дрожжей и скоростью сбраживания.

Магний имеет большое значение в энергетическом обмене дрожжей, связанном с ростом и размножением клеток. Экономический коэффициент потребленного магния в расчете на ионы варьирует в пределах от 300 до 900 г сухой биомассы на 1 г магния, для дрожжей эта величина обычно составляет 540 г/г магния.

Для нормального размножения дрожжей необходима сера, которая участвует в синтезе таких аминокислот, как цистеин и метионин. Небольшое количество серы требуется для образования сульфогрупп в некоторых коферментах, таких как биотин, кофермент А, липоевая кислота, тиамин и перидоксин. Было установлено, что в дрожжах при лимитации серы в среде наблюдается снижение дыхательной активности клеток, как и при лимитации роста дрожжей железом.

Экономический коэффициент в расчете на ионы $SO_4^{-2}$ для дрожжей составляет 100 г сухой биомассы на 1 г серы.

**Микроэлементы.** К микроэлементам, которые необходимы для роста дрожжей, относятся: Ca, Mn, Fe, Co, Cu, Zn (табл. 1.3). Элементы, редко требуемые для роста: B, Na, Al, Si, Cl, V, Cr, Ni, As, Se, Mo, Sn, I (табл. 1.3).

Таблица1.3

**Роль некоторых микроэлементов в жизнедеятельности дрожжей**

| Микроэлемент | Роль |
|---|---|
| Cu | Необходим для синтеза ряда ферментов дыхания. Повышает бродильную активность дрожжей. В небольших количествах стимулирует почкование клеток |
| Fe | Необходим для синтеза ряда ферментов дыхания. В небольшом количестве (до 0,2 мг/л) стимулирует почкование клеток, в большом количестве токсичен для дрожжей |
| Mn | Активирует многочисленные ферменты – декарбоксилазы, дегидрогеназы, киназы, оксидазы, пероксидазы, пептидазы и т.д., повышает бродильную активность |
| Zn | Активирует многочисленные ферменты дрожжевой клетки<br>Стимулирует размножение клеток, бродильную активность<br>Способствует оседанию дрожжей |

Средние значения экономического коэффициента, т. е. количество выросшей биомассы (кг) в расчете на 1 г потребленного микроэлемента, даны в табл. 1.4.

Таблица 1.4

**Экономический коэффициент выхода биомассы (кг) в расчете на 1 г элемента**

| Элемент | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Ca | Fe | Mn | Zn | Cu | Co | Mo |
| 0,54 | 10,8 | 54,0 | 5,4 | 135,0 | 100 | 100 |

Потребность в микроэлементах может увеличиваться в несколько раз, когда культура испытывает стресс, например, при увеличении температуры выше оптимальной.

Размножение дрожжей в пивном сусле ограничивается в связи с недостатком в нем ассимилируемого азота, солей цинка, железа и пантотеновой кислоты (табл.1.5). Недостаток железа может компенсироваться ионами магния, концентрация которых в несколько

раз превышает потребности дрожжей, в то время как лимит ионов цинка, пантотеновой кислоты и аминного азота может быть восполнен внесением этих компонентов в пивное сусло. В этом случае с целью обогащения среды факторами роста и микроэлементами при получении пива применяются различные препараты и «подкормки» для дрожжей (табл. 1.6).

Таблица 1.5

**Потребность дрожжей в минеральных, питательных и ростовых веществах (в расчете на 100 кг сбраживаемых углеводов)**

| Питательные и ростовые вещества | Количество компонентов для получения выхода 8,1г абсолютно сухих дрожжей | Содержание в 1280 л сусла 12 % СВ | Избыток или дефицит компонентов в сусле |
|---|---|---|---|
| Сбраживаемые углеводы | 100 кг | 100 кг | |
| Ассимилируемый азот | 750 г | 256 г | – |
| Фосфат $P_2O_5$ | 300 г | 1100 г | + |
| *Ионы* | | | |
| Калий | 150 г | 704 г | + |
| Сера | 82 г | 115 г | + |
| Магний | 15 г | 128 г | + |
| Кальций | 15 г | 44,8 г | + |
| Натрий | 7,5 г | 38,4 г | + |
| Цинк | 1,5 г | 0,192 г | – |
| Железо | 0,75 г | 0,128 г | – |
| Марганец | 0,15 г | 0,166 г | + |
| Медь | 0,06 г | 0,128 г | + |
| *Ростовые вещества* | | | |
| Биотин | 3 мг | 8,32 мг | + |
| Пантотеновая кислота | 1215 мг | 320/640 мг | – |
| Инозит | 16,2 г | 51,2 г | + |

Таблица 1.6

**Препараты для интенсификации роста и размножения дрожжей и увеличения их бродильной активности**

| Название препаратов | Фирма | Состав |
|---|---|---|
| Питание для дрожжей «Yeast Food GF» | Quest International | Неорганические вещества (соли аммония, калия, цинка, марганца). Органические вещества (соевая мука)<br>Факторы роста |
| Alcoten | Murphy and Son Ltd | Смесь витаминов группы В и аминокислот |
| Дрожжевая подкормка «Rhodia Zumesite» | Rhodia LTD | Смесь неорганических веществ (солей аммония, марганца, цинка) |
| HY-Vit | Hydralco Hydracolloide GmbH | Неорганические вещества (соли кальция, цинка, аммония)<br>Аминокислоты<br>Витамины группы В<br>Пептон |
| Yeastex | I.E. Siebel Sons Company | Смесь неорганических веществ (солей аммония, марганца, цинка) |

Применение препаратов направлено на улучшение физиологического состояния чистой культуры и семенных дрожжей, увеличение коэффициента их прироста, интенсификацию процесса главного брожения и улучшение органолептических свойств пива за счет увеличения стойкости дрожжей к автолизу и высокой степени сбраживания.

Эффект от внесения «подкормки» зависит от длительности и условий хранения семенных дрожжей (их физиологического состояния), состава сусла (особенно содержания в нем аминного азота), номера генерации семенных дрожжей, способа главного брожения, сорта пива (светлое, плотное, темное).

С увеличением номера генерации ухудшается физиологическое состояние дрожжей вследствие адсорбции на их поверхности белково-дубильных комплексов, хмелевых горьких веществ и инфицирующих пиво бактерий. В этом случае расход препаратов увеличи-

вается до максимально рекомендуемой нормы. Положительный эффект перед внесением подкормки дает промывка дрожжей ортофосфорной кислотой (pH 3 – 3,5).

При значительной контаминации дрожжей посторонними микроорганизмами не рекомендуется использовать препараты, стимулирующие размножение дрожжей, так как одновременно с интенсификацией процессов размножения дрожжей и сбраживанием сусла наблюдается размножение посторонних микроорганизмов.

## 1.2. Роль аэрации

Аэрация питательной среды при производстве пива используется при получении чистой культуры дрожжей и в начале брожения. Кислород воздуха необходим дрожжам для энергетического обмена и синтеза ненасыщенных жирных кислот и эргостерола.

При концентрации кислорода 8 мг/л прирост биомассы составляет около 40 млн клеток в 1 мл. Однако эта величина может меняться из-за несбалансированности питательной среды по макро- и микроэлементам, которые при производстве пива не определяются.

При разведении чистой культуры дрожжей с целью получения гарантированного результата рекомендуется использовать около 120 мг $O_2$/г АСД, так как пивное сусло обладает лишь ограниченным потенциалом этих снижающих удельное потребление кислорода питательных веществ.

Дрожжевой клетке в условиях производства пива для синтеза жизненно необходимого уровня жирных кислот требуется не менее 30–35 мг $O_2$/г АСД. На удельную скорость потребления кислорода решающее влияние оказывает концентрация сбраживаемых углеводов. В пивном сусле, в зависимости от температуры ферментации и физиологического состояния, а также жизнеспособности вводимых дрожжей (у дрожжей, хранившихся под водой, ниже, чем у дрожжей после ферментации в течение 24 ч), удельная скорость потребления кислорода колеблется от 2 до 33 мг $O_2$/(г АСД · ч).

В качестве средней величины для проведения модельных расчетов можно использовать равное 13 мг $O_2$/(г АСД · ч) значение максимальной удельной скорости потребления кислорода при температуре ферментации 15 °С.

При концентрации глюкозы, превышающей 0,1 г/л, кислород важен не как акцептор водорода в цикле трикарбоновых кислот, но как необходимый элемент для синтеза ненасыщенных жирных кислот и стеролов, чрезвычайно важных для размножения дрожжей.

Стерины синтезируются из сквалена. Сначала он превращается в сквален-2,3-эпоксид, а затем циклизируется в эргостерин. То, что сквален является предшественником стеринов, становится ясным еще и потому, что видно значительное количественное и качественное отличие между аэробно и анаэробно разброженными дрожжами. Так, анаэробные дрожжи обнаруживают значительное содержание сквалена и пониженное содержание стеринов, в то время как аэробные – наоборот.

Стерины в большинстве случаев представлены в виде эфира. В наибольшем количестве встречается цимостерин у аэробно выросших дрожжевых клеток, а именно 5 мг на 1 г сухого вещества. Синтез стерина, который начинается уже через полчаса после внесения дрожжей, тесно взаимосвязан с их ростом. Если аэрируются сами дрожжи, то одновременно начинается преобразование сквалена. 1 мг образующегося стерина соответствует биосинтезу 1000 мг сухого вещества дрожжей. Очевидно, что синтез стерина лимитирован внутриклеточной концентрацией, т.е. он прекращается, когда концентрация достигает определенной величины.

Существует также связь синтеза стеринов с запасом гликогена в клетке. На накопление гликогена в дрожжах во время брожения расходуется примерно 0,25 % экстракта. К началу брожения наблюдается стехиометрическая взаимосвязь между израсходованным гликогеном и образовавшимся стерином. На каждый грамм гликогена образуется порядка 69 мг стерина. Если же после созревания в дрожжах мало гликогена, то дальнейшее брожение происходит медленнее.

## 1.3. Производственно важные признаки, связанные с физиологическим состоянием дрожжей

Физиологическое состояние дрожжей определяет флокуляционную способность дрожжей; скорость и степень сбраживания сусла (бродильную активность); синтез побочных продуктов брожения, формирующих сенсорный профиль пива.

### 1.3.1. Флокуляционная способность

Флокуляция – это обратимая агрегация, или агглютинация, дрожжевых клеток. С этим свойством дрожжей связаны такие показатели, как степень сбраживания сусла, органолептические свойства пива, а также его биологическая и коллоидная стойкость.

Флокуляция определяется как штаммовыми особенностями дрожжей, так и их физиологической активностью. От этих характеристик зависят z-потенциал клеток и интенсивность процесса агрегации.

Поскольку многие метаболические процессы проходят на поверхности клеток, у дрожжей с высокой степенью флокуляции цикл главного брожения сокращается, что приводит к получению пива с высоким остаточным экстрактом. Такое пиво имеет низкую биологическую стойкость и характеризуется как недоброженное. При медленном оседании дрожжей пиво плохо осветляется, а избыточное содержание дрожжевых клеток при дображивании приводит к появлению привкуса автолизных дрожжей и запаха сероводорода.

На интенсивность флокуляции влияют факторы внешней среды:

– состав сусла. Ранней флокуляции дрожжей способствует несбалансированный состав сусла, а именно недостаток в нем аминного азота, факторов роста и низкая величина отношения сбраживаемых углеводов к несбраживаемым. Существует тесная взаимосвязь между бродильной активностью и флокуляционной способностью дрожжей: чем выше степень флокуляции, тем позже достигается конечная степень сбраживания пива;

– температура брожения. При повышении температуры до 20 ºС и выше происходит дефлокуляция дрожжей, которая вновь начинается при понижении температуры до 2–5 ºС;

– величина pH среды. Интенсивность флокуляции дрожжей возрастает с уменьшением величины pH с 5,6 до 4,3 – 4,0. Дрожжи дефлокулируют при повышении величины pH (более 6) или при ее снижении (менее 3);

– количество и качество семенных дрожжей. Процесс флокуляции ускоряется при увеличении нормы введения семенных дрожжей и снижении их биосинтетической активности.

### 1.3.2. Бродильная активность

Бродильная активность дрожжей определяет длительность главного брожения, физико-химические свойства пива, его биологическую и коллоидную стойкость, а также сенсорный профиль и его стабильность при хранении. Бродильная активность оценивается:

– по скорости потребления сбраживаемых углеводов;

– по количеству выделившегося при брожении диоксида углерода;

– по величине конечной степени сбраживания сусла.

Скорость и степень сбраживания экстракта пивного сусла зависит от состава питательной среды и, в частности, от соотношения между сбраживающимися сахарами (глюкоза, мальтоза, мальтотриоза). При увеличении концентрации глюкозы в среде снижается активность пермеаз, осуществляющих транспорт мальтозы и мальтотриозы в клетки, при этом наблюдается снижение скорости сбраживания сусла. Но это явление не всегда имеет место, так как существуют штаммы дрожжей, у которых глюкозная репрессия не происходит.

Бродильная активность дрожжей взаимосвязана со скоростью их размножения, которая важна для быстрого сбраживания сусла. Скорость роста и размножения клеток, в свою очередь, зависит от сбалансированности состава сусла (содержания в нем α-аминного азота, факторов роста и некоторых микроэлементов), наличия в нем растворенного кислорода (более 8 мг/дм$^3$).

Большую роль играет физиологическое состояние дрожжей и их концентрация в сусле. С увеличением величины засева скорость сбраживания сахаров сусла возрастает, в результате снижается длительность главного брожения. Длительно используемые дрожжи, а также дрожжи, которые неправильно хранились, имеют низкую бродильную активность.

### 1.3.3. Клеточный цикл дрожжей

Отличительная особенность популяции растущих дрожжевых клеток – наличие почек, образующихся при делении клеток (рис. 1.1). Дочерняя клетка растет в течение большей части клеточного цикла, пока не достигнет размера материнской клетки.

Время, за которое клетка образует себе подобную, называется клеточным циклом. Он включает в себя четыре основные стадии, их длительность примерно одинакова:

**$G_1$ –** предсинтетическая фаза, начинающаяся с синтеза ферментов, необходимых для синтеза почки и дубликации ДНК. Заканчивается наклевыванием почки;

**S** – синтетическая фаза, заканчивающаяся, когда почка достигает размера 1/3 материнской. Происходит удвоение ДНК;

**$G_2$ –** постсинтетическая фаза. В течение нее происходит дальнейшее увеличение размера клетки. Идет распределение ядерного материала между материнской и дочерней клеткой;

**M** – митоз, включающий кариокинез (деление ядра) и цитокинез – деление клеток, которое заканчивается образованием хитинового слоя.

Рост дрожжей происходит в основном во время формирования почек, поэтому почка к моменту ее отделения по размеру приближается к материнской клетке.

На месте отделения клеток друг от друга остаются следы, называемые у материнской клетки дочерним шрамом, а у дочерней клетки – родовым шрамом (рис.1.1). Эти шрамы состоят из хитина, который является барьером для транспорта питательных веществ в клетку. Следовательно, чем больше шрамов (рубцов), тем ниже биосинтетическая активность дрожжей.

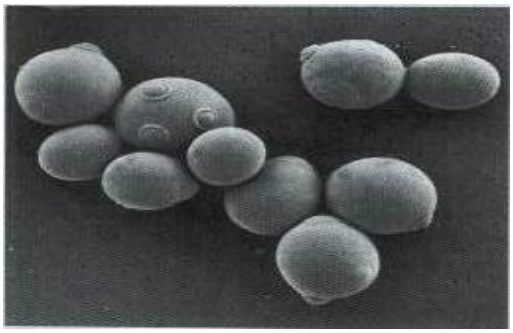

Рис. 1.1. Дочерние и родовые шрамы на поверхности дрожжевых клеток

На одном и том же месте клеточной стенки Saccharomyces cerevisiae никогда не появляются две почки. Таким образом, каждый раз почка оставляет новый дочерний шрам на стенке материнской клетки. Подсчитав число таких шрамов, можно определить, сколько

почек образовала данная клетка. По этой величине можно оценивать возраст клетки. Любая популяция дрожжей на 50 % состоит из клеток, образовавшихся во время последнего акта деления, поэтому на поверхности такой клетки имеется только один родовой шрам и нет ни одного дочернего. Из остальных 50 % клеток в 25 % обнаруживается один дочерний шрам, у 12,5 % – два и в остальных 12,5 % – больше двух дочерних шрамов. Современные исследователи связывают наблюдаемый в пивоварении эффект «вырождения дрожжей» с нарушением в популяции соотношения молодых и старых клеток, которое происходит по причине несовершенства технологии сбора дрожжей из бродильного аппарата.

### 1.3.4. Кривая роста дрожжей

Фаза роста дрожжей определяет химический состав клеток и устойчивость их к стрессовым факторам.

Кривая роста и размножения дрожжевых клеток подразделяется на несколько фаз.

**Начальная фаза (лаг-фаза, латентная фаза).** Видимые признаки размножения дрожжей отсутствуют, однако обменные процессы в клетках протекают активно: в среду выделяются экзоферменты для расщепления высокомолекулярных питательных веществ, внутри клетки синтезируются нуклеиновые кислоты и ферменты, необходимые для дальнейшего активного роста. Продолжительность фазы приспособления (адаптации) зависит от внешних условий, штаммовых особенностей дрожжей, нормы введения и возраста клеток и их состава. «Голодные», или старые, много раз делившиеся дрожжи содержат четко обозначенные вакуоли (рис.1.2). Вакуоли – видимые в обычном микроскопе органеллы, которые возникают из эндоплазматического ретикулума (ЭПР) или из аппарата Гольджи (рис. 1.3). Их возникновение является результатом снижения метаболической активности. Процесс возникновения вакуолей представляется следующим образом: канальцы и микроцистерны ЭПР утолщаются, соединяются друг с другом, образуя более крупные полости, которые постепенно становятся все крупнее. В молодых клетках вакуоли отсутствуют или нечетко оформлены.

«Голодные» клетки медленнее адаптируются к новым условиям, поэтому имеет место увеличение длительности этой фазы. Кроме того может наблюдаться снижение концентрации клеток в этот период за счет автолиза физиологически слабых особей.

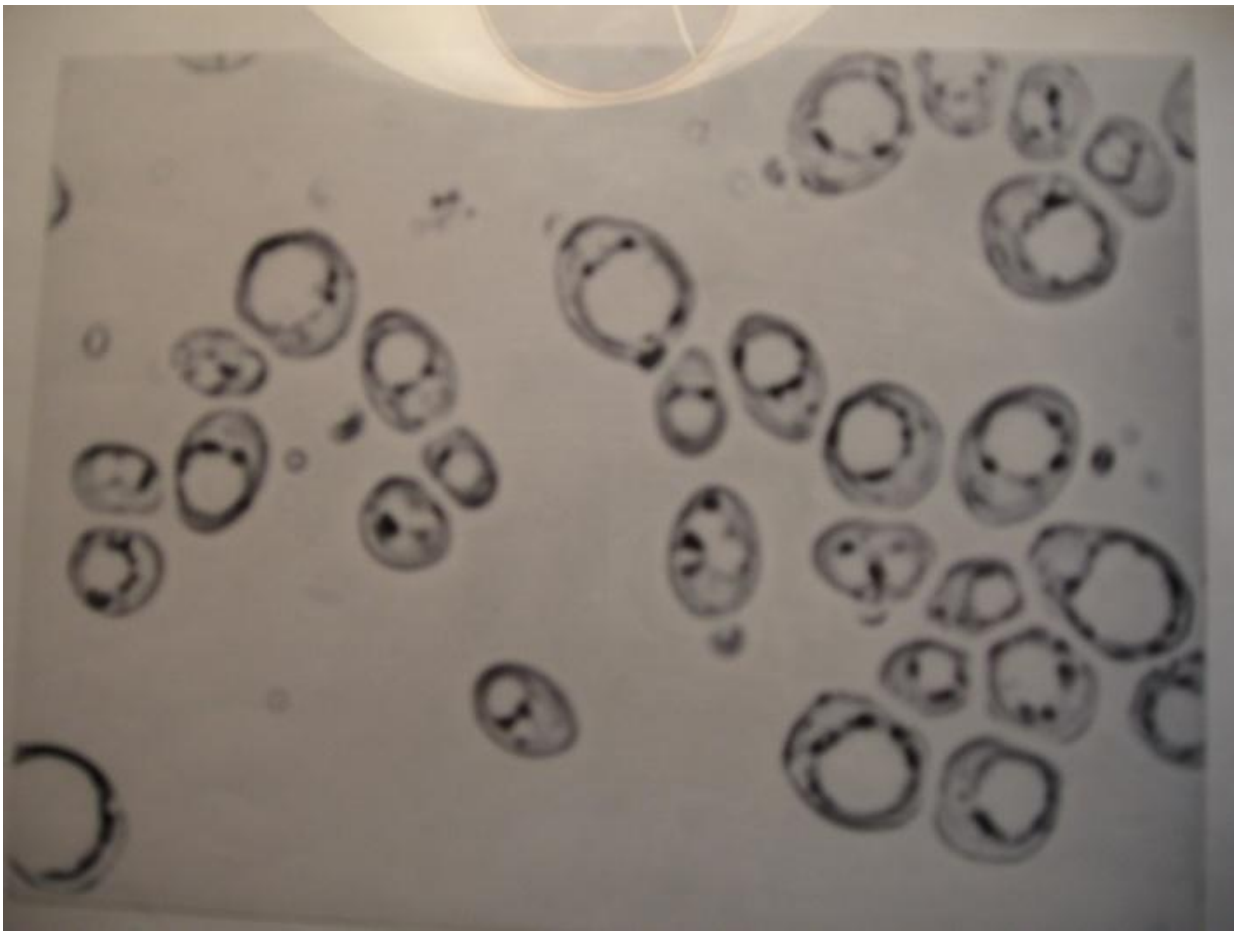

Рис. 1.2. Морфология голодных и старых клеток
(фотоувеличение 400х)

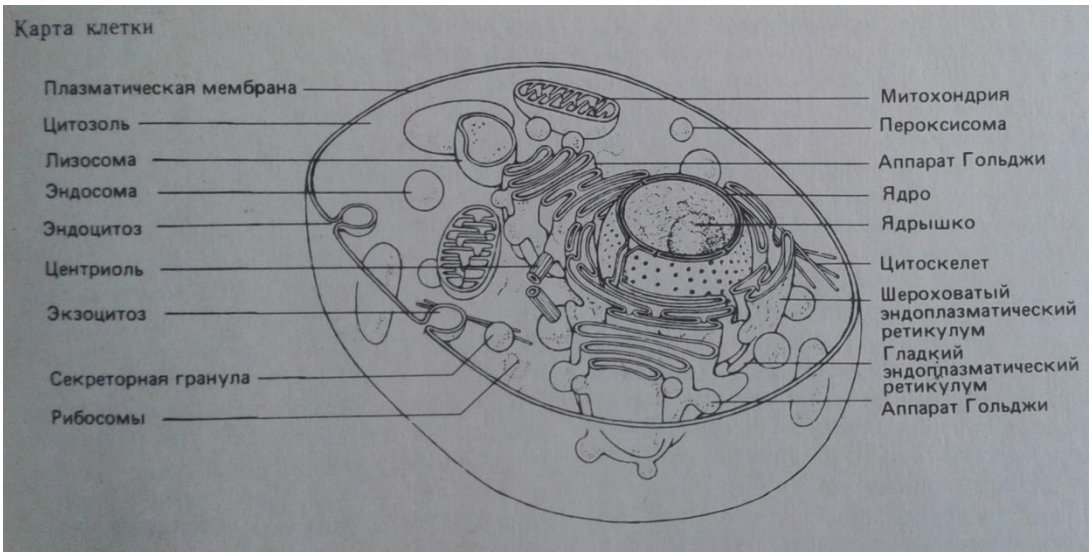


Рис.1.3. Морфологическая модель клетки

**Фаза ускорения роста** – это фаза постепенного начала размножения, скорость деления клеток возрастает с ускорением. Клетки увеличиваются в объеме и удлиняются. Количество мертвых клеток невелико, доля почкующихся клеток начинает возрастать. Клетки наиболее чувствительны к неблагоприятным факторам из-за большого количества молодых клеток, не содержащих резервные.

**Экспоненциальная (логарифмическая, лог-фаза) фаза.** Характеризуется максимальной скоростью размножения. Численность клеток и их биомасса возрастает в геометрической прогрессии. Все клетки находятся в диспергированном состоянии и активны. Потребление кислорода быстро достигает максимального. Клетки чувствительны к стрессовым факторам.

**Фаза замедления роста (фаза отрицательного ускорения)** – снижающаяся концентрация питательных веществ в среде, когда накапливаются токсичные продукты метаболизма и возрастает плотность биомассы клеток. Это приводит к замедлению роста размножения и даже к частичной гибели клеток. Потребление кислорода постепенно снижается. Понижается активность дыхательных ферментов. Синтезируются запасные углеводы. Клетки более устойчивы к стрессам.

**Стационарная фаза** – размножение дрожжей практически прекращается. Требуется отделить дрожжи от продуктов метаболизма дрожжей, оказывающих токсическое действие на клетки.

**Фаза затухания (отмирания, ускорения отмирания)** – период, когда в результате истощения питательной среды и максимального накопления продуктов обмена скорость отмирания и автолиза клеток превышает скорость их размножения.

## 1.4. Стрессы

### 1.4.1. Осмотический стресс

В настоящее время широко используется технология плотного пивоварения. В этих условиях высокая концентрация сусла вызывает осмотический стресс в дрожжевых клетках.

Осмотическое давление возникает из-за стремления воды проникнуть через полупроницаемую мембрану в сторону более концентрированного из двух разделенных этой мембраной растворов. Такое давление прямо пропорционально концентрации молекул, которые не могут пройти через мембрану. Цитоплазматическая мембрана дрожжевых клеток характеризуется полупроницаемостью относительно воды и гидрофильных соединений с высокой молекулярной массой. Следовательно, при низкой концентрации в питательной среде сухих веществ в дрожжевых клетках наблюдается гипоосмотический стресс, при котором в клетках увеличивается содержание воды. В более концентрированной среде (например, в сусле) в клетках отмечается гиперосмотический стресс, что приводит к утечке воды из клеток. При этом дрожжи, независимо от их штаммовых морфологических особенностей, приобретают округлую форму и их поверхность становится морщинистой.

Реакция клеток на осмотический стресс зависит от плотности сусла и его углеводного состава, физиологического состояния дрожжей и стадии роста клеток. Размножающиеся клетки (лог-фаза роста) более чувствительны к стрессу, чем клетки, находящиеся в стационарной фазе роста. Это объясняется разным химическим составом дрожжей, в частности, содержанием в них резервных углеводов гликогена и трегалозы.

Гиперосмотический стресс, который испытывают клетки в момент их внесения в питательную среду, требует некоторого времени для их адаптации к данным условиям перед процессом размножения дрожжей. Эта стадия в развитии клеток называется

лаг-фазой. В этот период существенно возрастает синтез глицерол-3-фосфатдегидрогеназы, что приводит к увеличению внутриклеточной концентрации глицерина. Может пройти несколько часов до регистрации существенного увеличения содержания внутриклеточного глицерина.

В обычных условиях глицерин может проникнуть через цитоплазматическую мембрану, но при гиперосмотическом стрессе поры, через которые он выходит, закрываются, и глицерин в период лаг-фазы не выделяется в среду. В процессе брожения стресс снимается и внутриклеточная концентрация глицерина уменьшается.

Как меру против этого явления в сбраживаемом сусле повышают содержание металлов или обогащают сусло факторами роста.

### 1.4.2. Этанольный стресс

Спирт образуется в процессе брожения, и влияние его на дрожжи определяется как этанольный стресс.

Токсические свойства этанола – результат увеличения проницаемости и пористости клеточной мембраны, что приводит к проблемам с транспортом питательных веществ. Кроме того, наблюдается дефицит доступной цитоплазме воды. Реакция клеток на воздействие этилового спирта в лабораторных условиях проявляется в увеличении степени ненасыщенности имеющихся в цитоплазматической мембране жирных кислот, в росте содержания эргостерина, синтезе трегалозы и продуцировании специфических белков термошока.

При содержании этанола в среде выше 1,2 % происходит снижение удельной скорости роста дрожжей. Концентрация спирта в среде от 2 % и более приводит к уменьшению выхода биомассы. Полностью рост дрожжей подавляется при наличии 8–9,5 % этанола.

Этанол влияет на продолжительность времени генерации дрожжевой клетки. Повышение концентрации этанола с 0 до 1 % повышает время генерации примерно с 2,3 до 3,5 ч, а при концентрации этанола 3,8 % она составляет уже 6,9 ч.

Промышленные дрожжи в результате плотного пивоварения подвергаются воздействию высоких концентраций этанола. При 23 %-й экстрактивности начального сусла объемная доля спирта со-

ставляет более 9,0 %. Образующийся спирт угнетает как скорость размножения дрожжей, так и процесс брожения.

### 1.4.3. Стресс, вызванный двуокисью углерода

При концентрациях, эквивалентных давлению газа свыше 0,2 атм, данное соединение стимулирует рост клеток. Давление около 0,5 атм ингибирует цикл трикарбоновых кислот, но спиртовое брожение продолжается вплоть до давления в 4,0 атм. Деление клеток прекращается при давлении от 2,5 до 3,0 атм. При этом клетки проходят через S-фазу (синтетическую фазу), но не почкуются, в результате чего они обладают двойным составом ДНК и большими, чем обычно, размерами. При концентрациях двуокиси углерода отмечается явное его влияние на формирование сенсорных характеристик пива, позволяющих клеткам расти.

Исследователи до сих пор не пришли к единому мнению о биохимическом механизме действия двуокиси углерода.

### 1.4.4. Окислительный стресс

Относительно способности дрожжей противостоять окислительному стрессу проведено большое количество исследований. У клеток имеются защитные механизмы – на субстратном уровне, например, глутатион, полиамины, ионы металлов и др., а на ферментном уровне – каталаза, супероксиддизмутаза, глутатионпероксидаза, тиоредоксинпероксидаза, а также редуктаза, метионинредуктаза и ДНК-восстанавливающие ферменты. В пивном брожении значение кислородного стресса не так велико, так как клетки подвергаются воздействию кислорода в течение короткого периода времени лишь в начале брожения, поэтому в ходе реакций, протекающих в митохондриях, в клетки поступает очень небольшое количество активного кислорода, способного отрицательно повлиять на жизнедеятельность дрожжей.

Как субстрат кислород очень важен для биосинтеза ненасыщенных жирных кислот и эргостерина, необходимых для роста клеток.

## 1.4.5. Температурный стресс

Температура оказывает значительное влияние на энергетический и конструктивный обмен клеток и, следовательно, влияет на удельную скорость роста дрожжей и время генерации (рис.1.4).

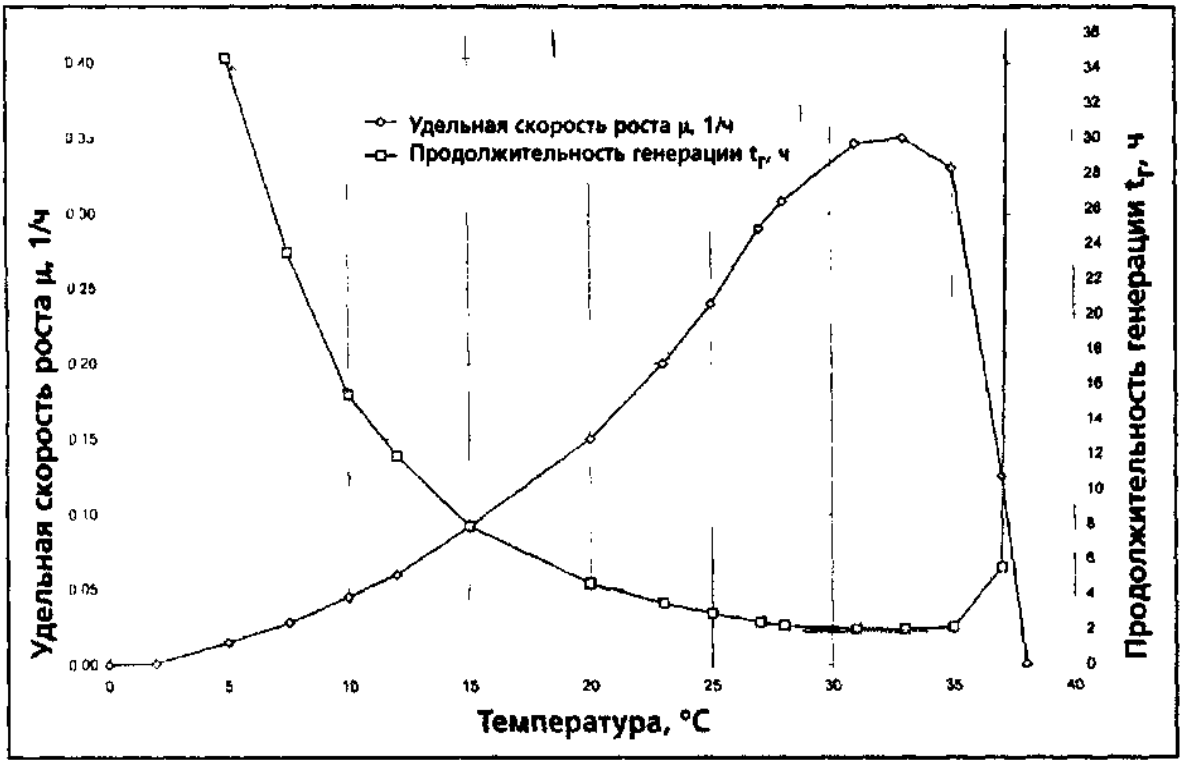


Рис. 1.4. Зависимость скорости роста дрожжей от температуры

В определенных производственных условиях клетки могут испытывать температурный стресс (шок). Этот эффект проявляется, если дрожжи на короткий период времени подвергнуть воздействию достаточно высокой (но не выше 37 °С) температуры. Устойчивость дрожжей к негативным внешним воздействиям связана с трегалозой, содержание которой в клетке определяется штаммовыми особенностями дрожжей и условиями культивирования.

Установлено, что клетки, пережившие воздействие высоких температур, приобретают не только термоустойчивость, но также и спирто- и осмоустойчивость.

### 1.4.6. Другие виды стресса

На жизнедеятельности дрожжевых клеток отрицательно сказываются:

– резкие колебания величины pH;

– гидростатический стресс;

– механический стресс в результате воздействия больших касательных напряжений (насосы, мешалки, регулировочные вентили).

**Величина pH** влияет на систему транспорта питательных веществ, на степень диссоциации компонентов среды, дисперсность, пространственную организацию и активность ферментных белков, на флокуляцию дрожжей.

Оптимальной величиной pH для размножения клеток пивных дрожжей является 4,8, так как при этом значении pH фермент транспорта мальтозы в клетку – мальтозопермеазы – имеет максимальную активность. При более низких pH ускоряется потребление аминного азота.

По мере подкисления среды уменьшается заряд клетки и наблюдается ослабление взаимного отталкивания клеток и усиление флокуляции. В целом дрожжи живут и размножаются в широком диапазоне pH от 2 до 6. Однако резкие колебания этого параметра также могут сказаться на активности ферментов, нарушении биосинтетической активности дрожжей и увеличении количества мертвых клеток.

**Гидростатический стресс** наблюдается при сбраживании сусла в высоких бродильных аппаратах (цилиндроконических танках– ЦКТ), высота которых может колебаться от 17 до 22 м. При этом происходит изменение проницаемости клеточных мембран и ферментной активности клеток.

**Механический стресс** возникает в результате действия больших касательных напряжений во время перемешивания дрожжей, перекачивания их из одной емкости в другую с помощью насосов. Такие механические операции могут «обдирать» поверхностный слой клеточной оболочки дрожжей, что снижает флокуляционные свойства клеток. В свою очередь это ведет к нарушениям процессов брожения и дображивания, в частности, не происходит естественного осветления пива.

# 2. ОЦЕНКА ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ ДРОЖЖЕЙ

Метаболическая активность дрожжей оценивается по следующим параметрам:

– жизнеспособности, т.е. количеству живых клеток;

– физиологической активности («жизненной силе»).

Под жизнеспособностью дрожжей понимают способность клеток расти, размножаться. Таким образом, показатель жизнеспособности, по существу, является критерием измерения количества живых клеток. Во многих случаях для оценки качества дрожжей достаточно точно определить количество жизнеспособных клеток в популяции, однако следует учитывать, что жизнеспособные клетки могут обладать различной степенью жизнестойкости, влияющей на определение их жизнеспособности.

## 2.1. Определение жизнеспособности клеток

Жизнеспособность клеток определяется либо методами культивирования, либо способами окрашивания.

### 2.1.1. Методы, основанные на прижизненном окрашивании

Способы окрашивания основаны либо на светлопольной, либо на флуоресцентной микроскопии. Наиболее широко распространенным красителем для светлопольной микроскопии является метиленовый синий («метиленовая синь»), который под действием ферментов восстанавливается живыми дрожжевыми клетками до бесцветных соединений. Эффективность данного метода зависит не только от состояния клеточной мембраны, но и от активности определенных оксидоредуктаз в клетке. Таким образом, отражается и жизнестойкость, и жизнеспособность дрожжей (мертвые клетки окрашиваются в синий цвет). Выяснилось, что, когда жизнеспособность клеток ниже уровня 90 %, этот метод несколько завышает оценку жизнеспособности.

Несмотря на относительную легкость применения, данный метод довольно субъективен и плохо воспроизводим, поскольку клетки могут являться жизнеспособными даже с частично поврежденными клеточными мембранами и пониженной ферментативной активностью.

Метиленовый синий (pH 4,6) можно заменить метиленовым фиолетовым (pH 10,6). В щелочной среде достигается более надежный и менее субъективный результат с лучшей корреляцией размножения клеток и их окислительной способности.

Поскольку у оптических отбеливателей (красителей, используемых при светлопольной микроскопии) существует много ограничений, вместо них были предложены флуоресцентные красители. Действие этих красителей основано на:

– целостности мембраны. Красители Mg-ANS – магниевая соль 1-анилино-8-нафтален сульфоновой кислоты, пропидия йодид, *Sytox* оранжевый; *Berberinej TZK, FUN*-1;

– потенциале мембраны *(Oxonol* и *Rhodamine* 123);

– использовании эстеразосодержащих субстратов (диацетат флуоресцеина, диацетат карбоксифлуоресцеина и уксуснометиловый эфир кальцеина).

Для оценки жизнеспособности пивоваренных дрожжей применяют Mg-ANS, *Oxonol, Sytox* оранжевый и *Berberinej TZK*. На некоторых пивоваренных предприятиях используют Mg-ANS, поскольку считается, что он дает хорошие результаты при исследовании дрожжей с низкой жизнеспособностью, иногда наблюдающейся при повышенной концентрации сусла. Преимуществом флуоресцентных красителей является возможность их использования с проточной цитометрией. Это повышает чувствительность и объективность метода и снижает его трудоемкость.

### 2.1.2. Методы, основанные на размножении клеток

Существуют два основных способа, основанных на размножении клеток: выращивание на чашках и на предметных стеклах. Выращивание клеток на чашках производится на поверхности агаризованной питательной среды, налитой в чашку. Жизнеспособность оценивается по количеству КОЕ (колониеобразующих единиц) после их культивирования в течение 72 ч при температуре 27 °С. Отношение КОЕ к общему числу клеток в разведении выражается в процентах. Коэффициент вариации (относительное стандартное отклонение) при использовании этих способов составляет 20 %. Этот метод может быть использован для прямого определения способности клетки

к размножению, но для получения результатов требуется длительное время (три дня). Кроме того, возникают трудности, если клетки обладают высокой флокулирующей способностью.

Метод выращивания на предметных стеклах основан на микроскопическом наблюдении микроколоний, вырастающих на пленке питательного агара через 18 ч после культивирования. Используя этот способ, можно определить способность к размножению отдельной клетки. Таким образом, оба эти метода прямо определяют способность клетки к размножению, но требуют значительного времени для получения результатов.

## 2.2. Определение физиологического состояния (жизнестойкости) дрожжей

Под жизнестойкостью (витальностью) дрожжей понимают их активность или способность восстанавливаться после физиологического стресса.

Физиологическое состояние пивных дрожжей оценивается путем измерения концентрации внутриклеточных компонентов (резервного гликогена, количества стерина или АТФ), либо путем оценки метаболической активности. Последнюю оценивают различными способами, включая измерение окислительной способности, продуцирование ионов магния, средний возраст клеток, внутриклеточное значение pH, скорость утилизации сахаров, образование этанола, высвобождение $CO_2$, потребление кислорода и активность ферментов.

### 2.2.1. Содержание стеринов и ненасыщенных жирных кислот

Стерины и ненасыщенные жирные кислоты являются важными компонентами мембраны клетки дрожжей, особенно при их росте в анаэробных условиях.

Поскольку молекулярный кислород необходим для биосинтеза эргостерина и ненасыщенных жирных кислот, стерины и ненасыщенные жирные кислоты при получении пива являются лимитирующими факторами роста дрожжей, и их содержание определяет физиологическое состояние дрожжевых клеток.

Следовательно, начальное содержание стеринов и ненасыщенных жирных кислот в клетке – важный показатель способности роста и брожения дрожжей. С другой стороны, если перед брожением используются дрожжи с низким содержанием стеринов в клетке, то может наблюдаться нормальное брожение при условии поступления достаточного количества кислорода на ранних стадиях брожения. Хотя стерины и ненасыщенные жирные кислоты являются важным фактором в определении хода брожения, вероятно, трудно использовать их начальное содержание как показатель жизненности дрожжей.

### 2.2.2. Содержание АТФ

Определение АТФ – популярный метод подтверждения жизнеспособности дрожжей, так как «мертвые» клетки АТФ не содержат. Если же оцениваются клетки одинакового физиологического состояния, то наблюдается корреляция между содержанием АТ в дрожжах и количеством живых клеток. Изменение условий культивирования дрожжей может привести к искажению результатов.

Следовательно, этот метод имеет свои ограничения, но он может быть полезным при определении физиологического состояния дрожжей в сочетании с другими параметрами.

### 2.2.3. Измерение $CO_2$ и скорость потребления кислорода

Измерение количества выделившегося $CO_2$ с помощью манометра Варбурга – стандартный микробиологический метод, адаптированный к оценке пивоваренных дрожжей в сусле. Образование $CO_2$ определяется через увеличение давления в закрытых сосудах.

Этот метод дает воспроизводимые результаты, которые прямо коррелируют с бродильной активностью дрожжей, но содержит мало информации о росте дрожжей.

С другой стороны, у дрожжей с жизнеспособностью менее 90 % существует корреляция между ходом брожения и потреблением кислорода. Снижение скорости потребления кислорода происходит

параллельно понижению содержания в дрожжах липидов и гликогена. Хотя физиологическое значение скорости потребления кислорода неясно, эти два метода дополняют друг друга и полезны для определения вариаций жизненности дрожжей.

### 2.2.4. Тест силы подкисления

Этот метод был разработан как показатель метаболической активности дрожжей. Он был адаптирован для предсказания хода брожения.

Тест силы подкисления – это метод, при котором измеряется снижение значения внеклеточного pH дрожжевой суспензии до (спонтанное снижение) и после добавления глюкозы. Уровень спонтанного подкисления является индикатором содержания гликогена, а индуцированный глюкозой уровень подкисления является индикатором скорости прохождения гликолитического пути. Этот метод является полезным, быстрым и удобным для определения жизнеспособности дрожжевых клеток.

Вариации активности дрожжей в условиях пивоварения очень незначительны, особенно у дрожжей с высокой жизненностью. Этот метод рекомендуется использовать, когда состояние различных образцов дрожжей значительно отличается друг от друга.

### 2.2.5. Метод измерения внутриклеточного pH

Метод измерения внутриклеточного значения pH более чувствителен относительно пивных дрожжей. Значение внутриклеточного pH, так же как и внеклеточного, зависит от протонового насоса и действия АТФ-азы в мембранах, активность которой взаимосвязана с интенсивностью размножения клеток. Причем существует определенная зависимость между силой подкисления ($Y$) и значением внутриклеточного pH ($X$):

$$Y = 3{,}40 - 6{,}68X + 2{,}13\,X^{2} - 0{,}17X^{3}.$$

### 2.2.6. Измерение ферментативной активности

Недостаток методов, измеряющих скорость размножения дрожжей, скорость сбраживания, подъем величины pH, количество определенных побочных продуктов брожения и т.д. – в том, что результаты становятся известны только после окончания сбраживания пробных образцов. А это продолжается, как правило, в течение трех дней. К этому времени дрожжи уже применяются, и нужно иметь в виду, что используются только дрожжи со слабой бродильной активностью.

В процессе накопления биомассы в целях получения чистой культуры дрожжей в разных значениях температуры исследуются следующие ферментивные активности: PDH (пируватдегидрогеназа), PDC (пируватдекарбоксилаза), ADH (алкогольдегидрогеназа), MAL (мальтаза) и PFK (пируватфосфокиназа).

## 2.3. Технологические факторы, снижающие физиологическое состояние дрожжей

Основными причинами ухудшения физиологического состояния семенных дрожжей могут быть:

– поздний съем дрожжей после их осаждения на дно ЦКТ;

– увеличение сроков хранения дрожжей;

– недостаточное перемешивание дрожжей;

– нарушение температурного режима во время хранения дрожжей; неправильное ведение дрожжей во время хранения; выбор среды хранения, например в воде; перемешивание (исключить кислород); хранение под небольшим давлением диоксида углерода.

# 3. ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ

## 3.1.Тест силы подкисления

Состояние (жизненность и жизнеспособность) засеваемых дрожжей – очень важный фактор для правильного хода брожения, который обеспечивает получение пива требуемого качества. Состояние дрожжей определяется терминами жизнеспособность и жизненность. Жизнеспособность измеряется числом «мертвых или живых» клеток, а жизненность, или жизненная сила, – это мера интенсивности метаболических процессов или физиологического состояния живых клеток.

Тест «силы подкисления» используется, когда наблюдаются существенные различия в физиологическом состоянии сравниваемых образцов дрожжей.

Измерение значения внеклеточного pH дрожжевой суспензии проводится до (в течение 10 мин) и после добавления глюкозы (в течение 20 мин). Величина снижения значения внеклеточного pH, вызванная выделением дрожжами ионов $H^+$, определяет физиологическое состояние дрожжей (рис. 3.1). Чем больше разница между начальным и конечным значениями pH, тем выше активность дрожжей.

Цель работы изучить:

– воздействие цветности пива на физиологическое состояние дрожжей;

– влияние номера генерации семенных дрожжей на физиологическую активность дрожжей;

– действие температурного стресса на физиологию дрожжей;

– воздействие осмотического стресса на физиологическую природу дрожжей.

*Приборы и посуда:*

– иономер лабораторный И-160 М (pH-метр);

– столик с магнитной мешалкой;

– аналитические весы;

– центрифуга;

– стеклянный стакан вместимостью 200 мл;

– пипетка объемом 10 мл;

– стеклянная палочка;
– мерный цилиндр вместимостью 100 мл.

*Реактивы:*
– вода;
– 20 %-й раствор глюкозы.
*Материалы:*
– дрожжи.

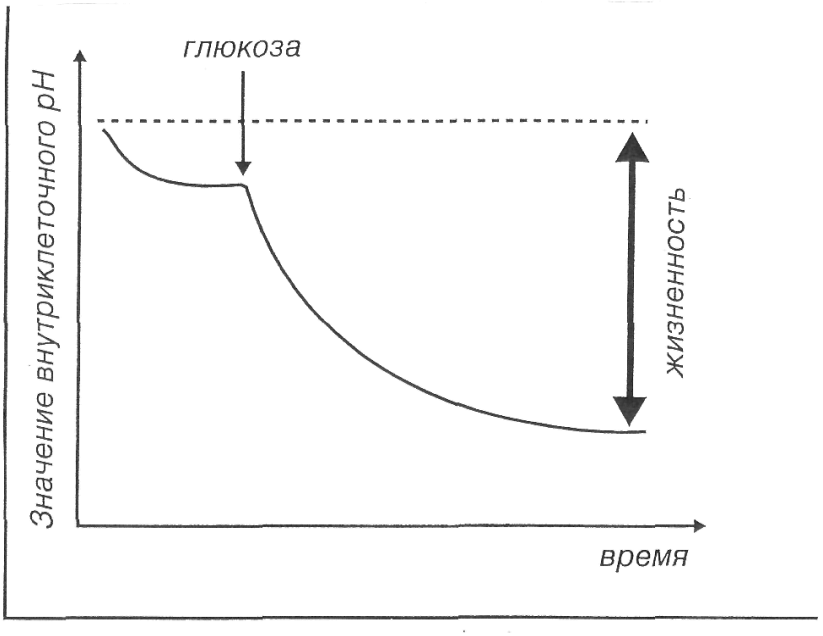


Рис 3.1. Измерение силы подкисления

*Методика определения*

На аналитических весах с точностью до 0,1 г взвешивают навеску дрожжей массой 4 г. Дрожжи промывают в 100 мл воды из-под крана, центрифугируют 10 мин при $N$=6000 об/мин, затем тщательно перемешивают в 100 мл воды и определяют начальное значение величины pH суспензии. Далее с целью установления запаса гликогена, который расходуется в период лаг-фазы роста дрожжей, проводятся измерения величины pH через 5 и 10 мин. Показания вносят в табл. 3.1. Затем по нижеприведенной формуле определяется скорость падения pH – $V_1$. Чем больше скорость падения pH, тем

больше содержание резервных углеводов в клетках и тем интенсивнее протекают процессы метаболизма и короче лаг-фаза роста дрожжей:

$$V = \frac{\ln [pH_1/pH_2]}{t_2 - t_1}.$$

Таблица 3.1

**Значения величины pH суспензии дрожжей до внесения углеводного субстрата**

| № опыта | Время, мин | | | $V_1$ |
|---|---|---|---|---|
| | 0 | 5 | 10 | |
| 1 | | | | |
| 2 | | | | |
| 3 | | | | |
| Средние значения | | | | |

После снятия показаний (через 10 мин) добавляют 5 мл 20 %-го раствора глюкозы и перемешивают еще 10 мин. В ходе инкубации в течение 20 мин ежеминутно измеряют значения величины pH суспензии. Определения повторяются трижды, результаты записываются в табл. 3.2.

Таблица 3.2

**Значения величины pH суспензии дрожжей после внесения углеводного субстрата**

| № опыта | Время, мин | | | | | Жизненность дрожжей |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 11 | 12 | 13 | …… | 30 | |
| 1 | | | | | | |
| 2 | | | | | | |
| 3 | | | | | | |
| Средние значения | | | | | | |

По средним значениям данных, приведенных в табл. 3.1 и 3.2, строят график изменения величины pH в зависимости от длительности инкубации дрожжей (рис. 3.2) и определяют жизненность

дрожжей по разнице между начальным значением величины pH и величиной pH через 30 мин инкубации клеток ($pH_0 - pH_{30}$).

Рис. 3.2. Динамика изменения величины pH суспензии дрожжей на среде с глюкозой

## 3.2. Методы, основанные на окрашивании препаратов клеток

Методы окрашивания основаны либо на микроскопировании в видимом (*обычном*) свете, либо на флуоресцентной микроскопии. Красителями для светового микроскопа являются метиленовый синий, раствор Люголя и др. Из флуоресцентных красителей применяют магниевую соль 1-анилино-8-нафтален сульфоновой кислоты (Mg-ANS), а также дигидродамин (табл. 3.3).

Таблица 3.3

**Классификация красителей**

| Красители для светового микроскопа | Флуоресцентные красители |
|---|---|
| Метиленовый синий | Родамин |
| Метиленовый синий+сафранин | Mg-ANS |
| Раствор Люголя | |
| Иодонитротетразолиум хлорид (INT) | |

### 3.2.1. Окраска дрожжей метиленовым синим

Наибольшее распространение получил метод выявления мертвых клеток с помощью метиленового синего.

После попадания в клеточную цитоплазму под действием ферментов редуктаз этот краситель восстанавливается живыми дрожжевыми клетками до бесцветных соединений. Мертвые клетки окрашиваются в синий цвет. Эффективность данного метода зависит не только от состояния клеточной мембраны, но и от активности оксидоредуктаз в клетке.

*Приборы и посуда:*

– микроскоп;

– предметные и покровные стекла;

– тонкая стеклянная палочка.

*Реактивы:*

– метиленовая синь.

*Материалы:*

– суспензия дрожжей концентрацией около $10^7$ клеток/мл.

*Методика окрашивания*

Для определения количества мертвых клеток на предметное стекло наносят по одной капле нефильтрованной дрожжевой суспензии и раствора метиленовой сини (1:5000). Каплю закрывают покровным стеклом, излишек жидкости собирают листком фильтровальной бумаги и через 2 мин наблюдают окрашенный препарат с помощью микроскопа. В поле зрения микроскопа считают общее количество дрожжевых клеток, затем только синие, после чего препарат передвигают и подсчет ведут в новом поле зрения. Таким образом подсчитывают общее количество клеток (не менее 500) в пяти полях зрения. После подсчета вычисляют количество мертвых клеток в процентах.

### 3.2.2. Окраска клеток метиленовым синим и сафранином

Более полную информацию о физиологическом состоянии дрожжей дает окрашивание фиксированных препаратов метиленовым синим, танином и сафранином. Сафранин применяется для выявления клеточных ядер, которые окрашиваются в красный цвет. Если клетки живые и содержат оксидоредуктазы, расщепляющие метиленовый синий, то окрашенный препарат приобретает красноватый, а не фиолетовой оттенок.

*Приборы и посуда:*

– микроскоп;

– предметные и покровные стекла;

– тонкая стеклянная палочка.

*Реактивы:*

– краситель метиленовый синий;

– краситель сафранин;

– 5 %-й раствор танина в воде;

– физиологический раствор (0,9 %-й раствор NaCl).

*Материалы:*

– суспензия дрожжей концентрацией около $10^7$ клеток/мл.

*Методика окрашивания*

Дрожжи отцентрифугировать в течение 5 мин при скорости 4000 об/мин. Слить надосадочную жидкость, промыть физиологическим раствором и снова отцентрифугировать. Приготовить суспензию дрожжей.

Нанести каплю суспензии дрожжей на обезжиренное мылом предметное стекло. Оставить высыхать на воздухе при комнатной температуре. После высыхания капли зафиксировать препарат (10 раз провести стеклом в пламени спиртовки). Нагревать несильно. Не пережигать. Залить стекло раствором метиленового синего и выдержать в течение 4 мин при комнатной температуре. Смыть краситель теплой водой. Залить стекло свежеприготовленным раствором танина на 2 мин. Смыть краситель под струей воды. Залить на 16 мин стекло раствором сафронина. Смыть краситель.

Микроскопирование следует проводить нефлюоресцирующим маслом при увеличении 400х.

## 3.2.3. Окраска клеток раствором Люголя

Физиологическое состояние можно определить также по составу клетки, например по запасным углеводам, одним из которых является гликоген.

Количество гликогена в клетках дрожжей меняется в зависимости от их возраста и условий культивирования. Для оценки используется раствор Люголя. Раствор Люголя окрашивает клетки в желтый цвет, а гликоген – в коричневый.

Количество гликогена в дрожжах меняется в зависимости от их возраста и условий культивирования. В зрелых клетках гликоген занимает от 1/3 до 2/3 клетки и более. В клетках с низкой физиологической активностью окрашенный гликоген занимает менее 1/4 клетки. В молодых клетках гликоген отсутствует, а клетки при окрашивании раствором йода приобретают бледно-желтый цвет.

*Приборы и посуда:*

– микроскоп;

– обезжиренные предметные и покровные стекла;

– тонкая стеклянная палочка.

*Реактивы:*

– краситель – раствор Люголя.

*Материалы:*

– суспензия дрожжей концентрацией около $10^7$ клеток/мл;

– фильтровальная бумага.

*Приготовление раствора Люголя:* 2 г йодистого калия растворяют в 5 мл дистиллированной воды; 1 г кристаллического йода добавляют к раствору. После растворения йода полученный раствор доводят дистиллированной водой до объема 300 мл.

*Методика окрашивания*

Для качественной оценки уровня гликогена в дрожжевых клетках на предметное стекло петлей наносят небольшое количество дрожжевой суспензии и 2–3 капли раствора Люголя. Каплю накрывают покровным стеклышком, излишек жидкости удаляют фильтровальной бумагой и микроскопируют. Через 2–3 мин клетки дрожжей окрашиваются в желтый цвет, а гликоген – в коричневый.

### 3.2.4. Окраска клеток иодонитротетразолиум хлоридом

Метод основан на редукции трифенилтеразолиновых солей и зависит от активности глицеральдегидфосфат-оксидоредуктазы, которая образуется в клетках в процессе их жизнедеятельности.

Проникая в дрожжевую клетку, иодонитротетразолиум хлорид (INT) образует за счет клеточных ферментов нерастворимые гранулы иодонитротетразолиум-формазана, которые имеют интенсивную красную окраску, наблюдаемую при микроскопировании. Количество и размер гранул свидетельствует об активности окислительно-восстановительных процессов в клетке.

*Приборы и посуда:*

– микроскоп;

– обезжиренные предметные и покровные стекла;

– стерильные пробирки;

– тонкая стеклянная палочка.

*Реактивы:*

– краситель – иодонитротетразолиум хлорид (INT);

– стерильная вода;

– физиологический раствор (0,9 %-й раствор NaCl).

*Материалы:*

– суспензия дрожжей концентрацией около $10^7$ клеток/мл;

– фильтровальная бумага.

*Приготовление раствора красителя:* 40 мг INT (Sigma) растворить в 10 мл стерильной воды. Раствор следует хранить при комнатной температуре в стеклянных бутылках из темного стекла.

*Методика окрашивания*

Дрожжи сначала центрифугировать в течение 5 мин при скорости 4000 об/мин, слить надосадочную жидкость и снова ресуспензировать в физиологическом растворе до конечной концентрации $1x10^7$ клеток/мл. В стерильных пробирках готовят смесь из 1 мл суспензии дрожжей и 0,4 мл раствора INT. Дрожжи инкубировать в течение 30 мин при температуре 30 $^oC$.

В живых клетках образуются красные гранулы, которые детектируются при микроскопировании в светлом поле (рис. 3.3).

Проводят подсчет клеток с большим, сниженным количеством и отсутствием гранул формазана.

Микроскопирование проводят с нефлюоресцирующим маслом при увеличении 400х.

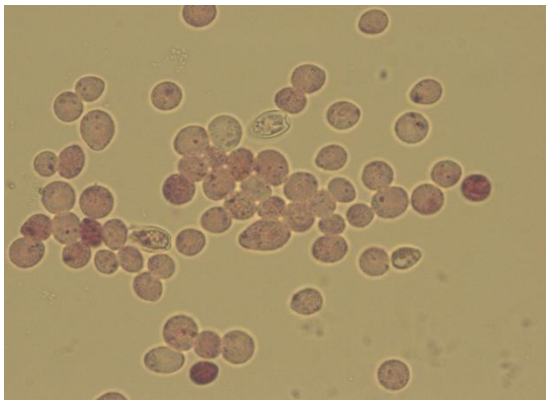

Рис. 3.3. Окраска клеток дрожжей иодонитротетразолиум хлоридом

### 3.2.5. Окраска клеток магниевой солью 1-анилино-8-нафтален сульфоновой кислоты (Mg-ANS)

Проникая в клетку, Mg-ANS образует флюоресцирующие желто-зеленые комплексы с белками цитоплазмы. Живые клетки не окрашиваются красителем, а мертвые клетки при микроскопировании имеют желто-зеленое флюоресцентное свечение.

В сравнении с метиленовым синим для окраски используется в 1000 раз меньше красителя, что снижает вероятность ингибирования клеток красителем. Результаты, полученные этим методом, считаются более точными, но требуют наличия хорошей техники для микроскопирования.

*Приборы и посуда:*

– микроскоп;

– обезжиренные предметные и покровные стекла;

– тонкая стеклянная палочка.

*Реактивы:*

– краситель – магниевой солью 1-анилино-8-нафтален сульфоновой кислоты (Mg-ANS);

– физиологический раствор (0,9 %-й раствор NaCl).

*Материалы:*

– суспензия дрожжей концентрацией около $10^7$ клеток/мл;

– фильтровальная бумага.

*Приготовление раствора красителя:* 300 мг Mg-ANS (Sigma) растворить в 2 мл этилового спирта. Добавить 98 мл стерильной воды. Раствор следует хранить при температуре 4 $^oC$ в стеклянных бутылках из темного стекла в течение 6 месяцев.

*Методика окрашивания*

Дрожжи центрифугировать в течение 5 мин при скорости 4000 об/мин, слить надосадочную жидкость и снова ресуспензировать в физиологическом растворе до конечной концентрации $1\times10^7$ клеток/мл. К 0,5 мл этой суспензии добавить 0,5 мл раствора Mg-ANS и инкубировать в течение 5 мин при температуре 25 $^oC$. Затем подсчитать количество мертвых и живых клеток.

Микроскопирование проводят при увеличении 400х, светоделитель 4. УФ лампу микроскопа включить за 20 мин до использования. Масло флюоресцирующее.

### 3.2.6. Окраска дигидродамином

Накопление свободных радикалов (ROS, reactive oxygen species) в клетке свидетельствует либо о ее старении, либо о том, что она находится в состоянии стресса. Метод дигидродаминового окрашивания позволяет оценивать статус ROS по количеству флуоресцирующих (красных или зеленых) клеток (рис. 3.4).

*Приборы и посуда:*

– микроскоп;

– обезжиренные предметные и покровные стекла;

– стерильные пробирки;

– тонкая стеклянная палочка.

*Реактивы:*

– краситель – дигидродамин;

– стерильная вода;

– физиологический раствор (0,9 %-й раствор NaCl).

*Материалы:*

– суспензия дрожжей концентрацией около $10^7$ клеток/мл.

*Методика окрашивания*

Дрожжи центрифугировать в течение 5 мин при скорости 4000 об/мин, слить надосадочную жидкость и снова ресуспензировать в физиологическом растворе до конечной концентрации $1\times10^7$ клеток/мл.

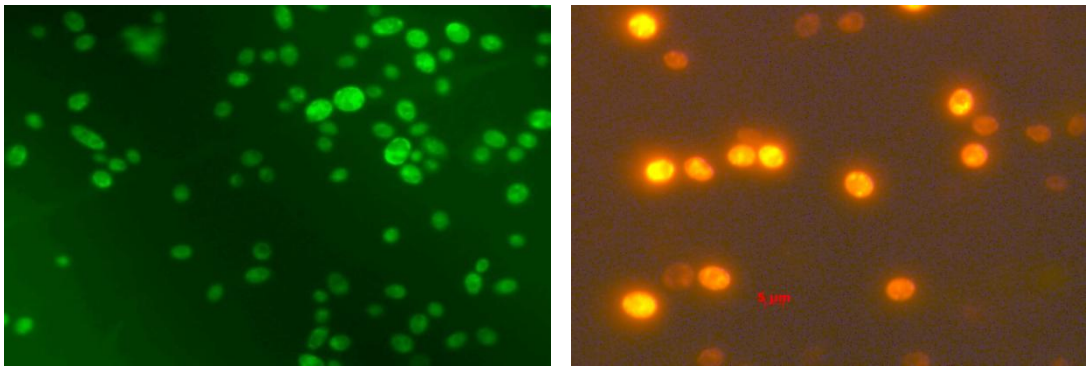

Рис. 3.4. Окраска клеток дигидродамином в зеленом и красном спектре

Метиленовый синий окрашивает уже мертвые клетки, в то время как родамин окрашивает клетки с плохим физиологическим состоянием. И благодаря такому окрашиванию можно спрогнозировать, как будут клетки вести себя во время брожения.

## 3.3. Экспресс-метод определения технологической оценки дрожжей

Для оценки жизненной силы дрожжей используется модификация метода определения интенсивности выделения диоксида водорода в аппарате Варбурга.

В основе модификации аппарата Варбурга лежит тот же метод технологической оценки активности дрожжей по интенсивности выделения $CO_2$, в котором учитывалось не время, затраченное на образование 10 мл диоксида углерода, а количество углекислоты,

выделенное изучаемыми дрожжами за 1 ч. Это позволяет использовать таймер и упрощает процедуру оценки активности дрожжей. Время инкубации при необходимости можно сократить.

Цель работы: сравнить способ окраски дрожжей и определения их бродильной активности. Указать наиболее чувствительный метод оценки активности клеток. Определить коэффициент вариации.

*Приборы и посуда:*

– одноразовый медицинский шприц объемом 10 мл;
– стеклянный стакан вместимостью 50 мл;
– пипетка емкостью 0,5 или 1,0 мл.

*Реактивы:*

– 40 %-й раствор глюкозы;
– 40 %-й раствор мальтозы;
– восьмикратная питательная среда YP (16 %-го пептона, 16 %-го дрожжевого экстракта).

*Материалы:*

– суспензия семенных дрожжей.

*Методика определения*

1 мл исследуемых семенных дрожжей из дрожжевого сборника поместить в стеклянный стакан объемом 50 мл и добавить 0,5 мл 40 %-й глюкозы или мальтозы, 0,25 мл 8-кратной среды YP (8×2 % пептона, 8×2 % дрожжевого экстракта) и 0,25 мл воды. Все тщательно перемешать пипеткой и набрать в одноразовый медицинский шприц объемом 10 мл, стараясь избежать образования пузырей воздуха. Выдавить остатки воздуха из шприца и герметично запаять его конец. Для этого следует нагреть конец шприца в пламени спиртовки и расплавившийся пластик сжать металлическим пинцетом (рис. 3.5).

Герметично запаянные шприцы поставить в термостат при температуре 30 °С на 1 ч. Через 1 ч замерить высоту подъема поршня в шприце. По высоте подъема поршня определить количество образовавшегося $CO_2$ . По количеству выделившегося диоксида углерода можно оценить бродильную активность семенных дрожжей.

1 2

Рис. 3.5. Увеличение высоты столба жидкости в результате образования дрожжами диоксида углерода

*Обработка результатов*

| Образец дрожжей | Методы окрашивания | | Количество $CO_2$, мл |
|---|---|---|---|
| | метиленовым синим | иодонитротетразолиум хлоридом INT | |
| 1 | | | |
| 2 | | | |

Вывод.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ


Активация пивных дрожжей / В.А. Помозова, Л.В. Пермякова, Е.А. Сафонова, В.В. Артемасов // Пиво и напитки. 2002. № 2. С. 26 – 27.

**Бэмфорт Ч.** Новое в пивоварении / Под ред. Ч. Бэмфорда. – СПб.: Профессия, 2007. – 520 с.

Влияние этанольного и осмотического стресса на пивные дрожжи / Т.И. Филимонова, Е.И. Несс, О.А. Борисенко, К.В. Кобелев // Пиво и напитки. 2002. № 5. С. 12 – 14.

**Давыденко С.Г.** Создание и применение нового экспресс-метода оценки качества семенных дрожжей // Пиво и напитки. 2012. № 5. С. 20 – 24.

**Карпенко Д.В., Чуланов Е.О.** Способы активации дрожжей при сбраживании плотного сусла // Пиво и напитки. 2008. № 5. С. 26 – 27.

**Кунце В., Мит Г.** Технология солода и пива. – СПб.: Профессия, 2003. – 912 с.

**Меледина Т.В., Дедегкаев А.Т., Афонин Д.В.** Качество пива: стабильность аромата, коллоидная стойкость, дегустация. – СПб.: Профессия, 2011. – 220 с.

Определение физиологического состояния пивных дрожжей путем измерения ферментативной активности // Мир пива. 2004. № 1. С. 48 – 49.

Применение методов окраски дрожжей для оценки их физиологического состояния / С.Г. Давыденко, Л.М. Васильева, Б.Э. Баташов, А.Т. Дедегкаев // Пиво и напитки. 2011. № 5. С. 8 – 11.

**Прист Ф.Дж., Кэмпбелл Й.** Микробиология пива / Под общ. ред. Т.В. Мелединой, Т. Сойлда. – СПб.: Профессия, 2005. – 368 с.

**Такео И.** Оценка жизненности дрожжей – прошлое и будущее // Спутник пивовара. 2001. № 9. С. 28 – 33.

**Шавел Я.** Факторы стресса для дрожжевых клеток // Пиво и напитки. 2001. № 1. С. 24 – 27.

**Шёненберг С., Гайгер Е.** Проточная цитометрия – новая опорная точка исследований дрожжей в Вайенштефане // Мир пива. 2009. № 4. С. 32 – 36.

## СОДЕРЖАНИЕ


ВВЕДЕНИЕ……..... 3
1. ФАКТОРЫ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ БИОСИНТЕТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ДРОЖЖЕЙ……. 5
1.1. Питание дрожжей……. 5
1.1.1. Факторы роста…….. 5
1.1.2. Минеральное питание дрожжей…… 6
1.2. Роль аэрации……. 11
1.3. Производственно важные признаки, связанные с физиологическим состоянием дрожжей……. 12
1.3.1. Флокуляционная способность…… 13
1.3.2. Бродильная активность…… 14
1.3.3. Клеточный цикл дрожжей……... 14
1.3.4. Кривая роста дрожжей……. 16
1.4. Стрессы…….. 19
1.4.1. Осмотический стресс……... 19
1.4.2. Этанольный стресс……... 20
1.4.3. Стресс, вызванный двуокисью углерода…… 21
1.4.4. Окислительный стресс……. 21
1.4.5. Температурный стресс……. 22
1.4.6. Другие виды стресса…… 23
2. ОЦЕНКА ФИЗИОЛОГИЧЕСКОГО СОСТОЯНИЯ ДРОЖЖЕЙ…… 24
2.1. Определение жизнеспособности клеток……. 24
2.1.1. Методы, основанные на прижизненном окрашивании. 24
2.1.2. Методы, основанные на размножении клеток……... 25
2.2. Определение физиологического состояния (жизнестойкости) дрожжей…… 26
2.2.1. Содержание стеринов и ненасыщенных жирных кислот…… 26
2.2.2. Содержание АТФ……. 27
2.2.3. Измерение $CO_2$ и скорость потребления кислорода…. 27
2.2.4. Тест силы подкисления…… 28
2.2.5. Метод измерения внутриклеточного pH…… 28
2.2.6. Измерение ферментативной активности…… 29
2.3. Технологические факторы, снижающие физиологическое состояние дрожжей……... 29

3. ЛАБОРАТОРНЫЕ РАБОТЫ…….. 30
3.1. Тест силы подкисления…… 30
3.2. Методы, основанные на окрашивании препаратов клеток.. 33
3.2.1. Окраска дрожжей метиленовым синим……. 34
3.2.2. Окраска клеток метиленовым синим и сафранином… 35
3.2.3. Окраска клеток раствором Люголя……. 36
3.2.4. Окраска клеток иодонитротетразолиум хлоридом…… 37
3.2.5. Окраска клеток магниевой солью 1-анилино-8-нафтален сульфоновой кислоты (Mg-ANS)…… 38
3.2.6. Окраска дигидродамином…… 39
3.3. Экспресс-метод определения технологической оценки дрожжей……. 40
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ ……..... 43

Меледина Татьяна Викторовна
Давыденко Светлана Геннадьевна
Васильева Любовь Михайловна

# ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ СОСТОЯНИЕ ДРОЖЖЕЙ

Учебное пособие

*Ответственный редактор*
Т.Г. Смирнова

*Редактор*
Р.А. Сафарова

*Компьютерная верстка*
И.В. Гришко

*Дизайн обложки*
Н.А. Потехина

---

Подписано в печать 28.08.2013. Формат 60×84 1/16
Усл. печ. л. 2,79. Печ. л. 3,0. Уч.-изд. л. 2,75
Тираж 30 экз. Заказ № С 54

---

НИУ ИТМО. 197101, Санкт-Петербург, Кронверкский пр., 49
ИИК ИХиБТ. 191002, Санкт-Петербург, ул. Ломоносова, 9