

ОЦЕНКА ИНТЕНСИВНОСТИ БИОСИНТЕТИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ У ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ НА СРЕДАХ С ДОБАВЛЕНИЕМ ПОРОШКООБРАЗНОГО ГРЕЧИШНОГО СОЛОДОВОГО ЭКСТРАКТА

И. В. Новикова¹, В. Н. Калаев², Г. В. Агафонов,¹ Е. А. Коротких¹, О. Ю. Мальцева¹, А. П. Гуреев²

¹Воронежский государственный университет инженерных технологий

²Воронежский государственный университет

Поступила в редакцию 12.01.2014 г.

Аннотация. Проведена оценка физиологического состояния дрожжевой культуры *Saccharomyces cerevisiae* в образцах, культивируемых на среде с добавлением порошкообразного гречишного солодового экстракта (ПГрСЭ). Изучена динамика изменения содержания сухих веществ суслу в процессе сбраживания. На основании изменения количества тотальной РНК и белка в клетках дрожжей показано влияние применения ПГрСЭ на интенсивность биосинтетических процессов. Установлено, что использование ПГрСЭ для получения кваса позволяет сократить продолжительность процесса брожения квасного суслу в среднем на 4 часа по сравнению с классической технологией. Полученный результат может оказать положительный эффект на экономическую составляющую квасоваренного производства.

Ключевые слова: гречиха, солодовые экстракты, биосинтетические процессы, РНК, белок, дрожжи, квас.

Abstract. Assessment of the physiological state of the yeast culture *Saccharomyces cerevisiae* in samples cultured in a powdery buckwheat malt extract (PBwME). Studied dynamics of changes in dry matter content of the wort during fermentation. On the basis of changes in the number of total RNA and protein in cells of yeast showed the effect using PBwME on the intensity biosynthetic processes. Established that used PBwME for getting kvass allows reduce the duration of fermentation process wort of kvass average for 4 hours as compared to the classical technology. This result may have a positive effect on the economic component production of kvass.

Keywords: buckwheat, malt extracts, intensity biosynthetic processes, RNA, protein, yeasts, kvass.

Изучение и широкое использование микроорганизмов в технологии продуктов питания, в том числе для производства напитков с наличием физиологически активных и ценных веществ, позволяет совершенствовать технологию производства напитков на основе натурального растительного сырья, повышая эффективность производства и качество выпускаемой продукции. Это в значительной мере определяется условиями культивирования микроорганизма. Образование промежуточных метаболитов в процессе жизне-

деятельности дрожжевой клетки обуславливается составом питательной среды и условиями культивирования. Оптимальный состав питательной среды оказывает влияние на гомеостаз клетки и на ее жизнедеятельность [1].

Основным источником сырья для производства хлебного кваса является концентрат квасного суслу (ККС), который традиционно производят из ржаного и ячменного солодов, ржаной, кукурузной муки и других зернопродуктов. Перечисленные злаковые культуры имеют в своём химическом составе глютен, который противопоказан группе потребителей, страдающих глютеновой непереносимостью – целиакией [2, 3]. Данная

© Новикова И. В., Калаев В. Н., Агафонов Г. В., Коротких Е. А., Мальцева О. Ю., Гуреев А. П., 2015

проблема обуславливает поиск новых альтернативных источников для производства концентрата квасного суслу.

Ранее солод из гречихи не производился в промышленных масштабах и не получил широкого распространения. В настоящее время разработана эффективная технология его производства [2]. Гречиха отличается от традиционного зернового сырья для производства напитков повышенным содержанием аминокислот, в том числе незаменимых, витаминов, минеральных веществ, содержание антиоксидантов в гречихе выше, чем в ячмене, кукурузе, горохе более чем в два раза, причём при солодоращении данный показатель увеличивается [2].

Применение солодовых экстрактов гречихи позволяет решить актуальную проблему расширения ассортимента безалкогольных напитков, в том числе для лечебно-профилактического питания, за счёт использования новых источников зернового сырья, не содержащих глютен.

В связи с вышеизложенным целью нашей работы является оценка уровня метаболизма в клетках дрожжей при разбраживании в квасном сусле с добавлением нетрадиционного сырья – порошкообразного гречишного солодового экстракта (ПГрСЭ). ПГрСЭ обладает пищевой и биологической ценностью, за счёт достаточного количества углеводов, аминокислот, в том числе незаменимых, витаминов, микро- и макроэлементов. Аминокислотный состав белков ПГрСЭ содержит полный набор незаменимых аминокислот, что указывает на их полноценность [2, 3].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Опытные колонии дрожжей культивировали с использованием в качестве основного компонента среды для размножения дрожжей порошкообразного гречишного солодового экстракта (ПГрСЭ). В качестве контроля использовали дрожжевую разводку с применением в качестве питательной среды концентрат квасного суслу (ККС) – традиционный компонент дрожжевой разводки.

Основными стадиями получения ПГрСЭ являлись: получение свежепросоженного солода гречихи; подготовка солода к затиранию с водой; затирание декокционным способом; фильтрация осахаренного суслу; упаривание на вакуум-выпарной установке до содержания сухих веществ (СВ) 35 – 40%; сушка на распылительной сушилке до содержания СВ 97.0 – 97.5%; упаковка в герметичную тару. Солодоращение гречихи

осуществляли по технологическим режимам, подобраным нами ранее [2]. Рекомендуемая продолжительность замачивания - 30 – 35 ч, оптимальная степень замачивания - 42 – 44 %, общая продолжительность солодоращения - 6 – 7 суток при температуре 15–16°C [3].

Физико-химические показатели и аминокислотный состав ПГрСЭ представлены в таблице 1. Сравнительная характеристика основных компонентов питательной среды для размножения дрожжей приведена в таблице 2.

Опытные и контрольные дрожжевые разводки получали предварительным разбраживанием сухих дрожжей на стерильном квасном сусле. Для этого, сухие дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* в количестве из расчёта 0.15 г на 1 дм³ суслу смешивали с водой при температуре 30°C в соотношении 2:1. В полученную суспензию добавляли пятикратный объём стерильного квасного суслу (предварительно прокипячённого в течение 30 мин и охлаждённого до температуры брожения) с массовой долей сухих веществ 8 % с добавлением сахарного сиропа. Суслу подкисляли с помощью молочной кислоты до значения рН 4.5 – 5.0. Разбраживание проводили в течение 3 ч при температуре 30°C.

Брожение квасного суслу осуществляли при температуре 29 – 30°C до снижения начальной концентрации сухих веществ на 1 %. Массовую долю сухих веществ в образцах суслу определяли рефрактометрическим методом в соответствии с требованиями ГОСТ 6687.2 – 90 с помощью рефрактометра ИРФ-454Б2М.

В процессе приготовления разводки проводили микрофотографирование на микроскопе «Микромед-3» полей зрения для морфологических исследований. Автоматическую обработку фотографий осуществляли с помощью программы Image J, которая включает подсчёт общего количества клеток дрожжей в объёме дрожжевой разводки; измерение эффективной поверхности дрожжевых клеток в 10 полях зрения микроскопа; формирование гистограмм при помощи пакета программного обеспечения Microsoft Excel. Погрешность подсчёта дрожжевых клеток программой составила 6 – 8 %.

В эксперименте пробы для определения количества тотальной РНК и белка в дрожжевой культуре отбирали на стадии логарифмической фазы роста, которая характеризуется наиболее высоким содержанием РНК [1].

Физико-химические показатели и аминокислотный состав ПГрСЭ [по 2].

Показатели	Значение показателей	Показатели	Значение показателей
Массовая доля СВ, %	97.0	Содержание аминокислот, мг%	
Кислотность, к.ед.	30.0	Аргинин	620.00
Цветность, ед. опт. плотности	0.49	Серин	540.00
Массовая доля водорастворимых углеводов, %	79.1	Тирозин	340.00
Белковые вещества, %	11.73	Аспарагиновая кислота	820.00
Зола, %	1.26	Гистидин	220.00
Массовая доля макроэлементов, мг %		Аланин	500.00
кальция	900.0	Глицин	570.00
фосфора	250.0	Цистеин	130.00
натрия	240.0	Глутаминовая кислота	1780.00
калия	340.0	Пролин	470.00
магния	270.0	Незаменимые аминокислоты:	
Содержание микроэлементов, мг %		Треонин	520.00
цинка	0.039	Лейцин	780.00
меди	0.004	Изолейцин	420.00
железа	0.029	Метионин	270.00
Содержание витаминов, мг %		Валин	510.00
В1 (тиамин)	0.91	Триптофан	110.00
В2 (рибофлавин)	0.76	Лизин	380.00
В4 (холин)	9.50	Фенилаланин	610.00

Таблица 2

Физико-химические показатели ПГрСЭ и ККС [по 2]

Наименование показателя	Значение показателя	
	ПГрСЭ	ККС
Внешний вид	Порошкообразная масса	Непрозрачная густая жидкость
Массовая доля СВ, %	97.0	71.1
Кислотность, к. ед.	30.0	28.0
Массовая доля водорастворимых углеводов, %	79.1	65.0
Белковые вещества, %	11.73	3.50
Аминный азот, мг %	530.9	220.0
Вязкость, мПа*с, при разбавлении 1:5	2.01	1.40
Размер частиц, мкм	1-250	–

Выделение тотальной РНК из клеточной культуры дрожжей проводилось по протоколу, описанному Ares, с модификациями [4].

Культуры клеток с концентрацией $4.4 \cdot 10^7$ - $91.4 \cdot 10^7$ кл/см³, центрифугировали 5 мин при 500 гм для осаждения клеточной массы. Осадок ресуспендировали с добавлением 400 мкл АЕ-буфера (3М ацетат натрия (pH=5.2), 0.5М EDTA (pH=8)) и переносили в чистую микроцентрифужную пробирку. Разрушение клеточной мембраны и экстракцию РНК осуществляли с добавлением 40 мкл 10% SDS и 400 мкл смеси фенола, хлороформа и изоамилового спирта в соотношении 25:24:1. Смесь инкубировали в термостате 10 мин при температуре 65°C, регулярно перемешивая на

вортексе модели FV-2400. После этого смесь инкубировали 5 мин на льду и центрифугировали в течение 5 мин при 14000 гм при температуре 4°C (центрифуга Hermle Z36HZK). Добавляли 400 мкл хлороформа к супернатанту, перемешивали инвертированием, центрифугировали в течение 5 мин при 14000 гм при температуре 4°C. Переносили супернатант в чистую микроцентрифужную пробирку. Добавляли 50 мкл 3М ацетата натрия (pH=5.2), и доводили объем до 2 см³ 100% этанолом. Центрифугировали 10 мин 14000 гм при температуре 4°C. Осадок ресуспендировали в 70% этаноле, центрифугировали в течение 5 мин при 14000 гм при температуре 4°C. Осадок высушивали от этанола и растворяли в 50 мкл де-

ионизированной H_2O . Качество выделенной РНК оценивали при помощи электрофореза в 2% агарозном геле, количество – по изменению оптической плотности на спектрофотометре «СФ-102» при длинах волн 260 нм, 280 нм и 320 нм. Расчет концентрации тотальной РНК проводили с использованием программы «Спектрофотометрическое измерение концентрации нуклеиновых кислот», находящейся в свободном доступе на сайте http://molbiol.ru/scripts/01_03.html [5].

В образцах дрожжевой разводки определяли концентрацию белка при помощи коммерческого набора «BCA Protein Assay Reagent» (The ThermoScientificPierce), по стандартной методике, описанной Smith [6]. 1 см³ дрожжевой разводки гомогенизировали в гомогенизаторе Поттера, затем 1 мкл реагента А (коммерческий набор), 20 мкл реагента В (коммерческий набор) и 5 мкл дрожжевого гомогената смешивали и инкубировали смесь в течение 30 мин в твердотельном термостате («Термит») при температуре 37 °С. После инкубации измеряли оптическую плотность смеси на спектрофотометре «СФ-102» при длине волны 562 нм. В качестве контроля использовали бычий сывороточный альбумин в концентрации 2 мг/см³, входящий в состав коммерческого набора. Концентрацию белка определяли при помощи калибровочного графика.

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета статистических программ «Stadia». Процедура группировки данных и их обработка изложены в работе Кулаичева [7]. Для оценки различий между двумя выборками применяли непараметрический статистический Х-критерий Ван-дер-Вардена.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Первый цикл жизнедеятельности хлебопекарных дрожжей соответствовал периоду 30 минут разбраживания дрожжевой разводки на стерильном квасном сусле. Второй цикл жизнедеятельности дрожжевой культуры соответствовал периоду последних 30 минут разбраживания. Разводка имела чистый дрожжевой запах, на поверхности образовалась пена.

В процессе приготовления разводки при микрофотографировании полей зрения под микроскопом визуально отмечалось увеличение общего количества дрожжевых клеток, почкующихся клеток, размеров клеток при культивировании в среде с применением ПГрСЭ (рис. 1).

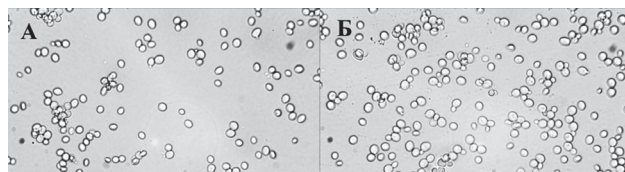


Рис. 1. Микрофотографии препарата разводки хлебопекарных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* при увеличении в 640 раз (второй цикл а) с применением ККС; б) с применением ПГрСЭ

В результате анализа гистограмм, приведенных на рис. 2, 3, можно частично судить о физиологическом состоянии дрожжевой культуры в процессе жизнедеятельности в зависимости от компонентного состава квасного суслу при приготовлении дрожжевой разводки. Для исследуемых образцов на основе ККС и ПГрСЭ характерно следующее: в первом цикле клетки дрожжей имели эффективную поверхность от 6 до 46 мкм², т. е. их размер характеризовался эквивалентным диаметром от 2.52 до 7.73 мкм (рис. 1а, 2а); во втором цикле после разбраживания увеличились значения следующих показателей: общее количество клеток дрожжей (в среднем на 40 %), значения эффективной поверхности дрожжевых клеток (до 63 мкм²), их эквивалентный диаметр (до 8.95 мкм) (рис. 2, 3).

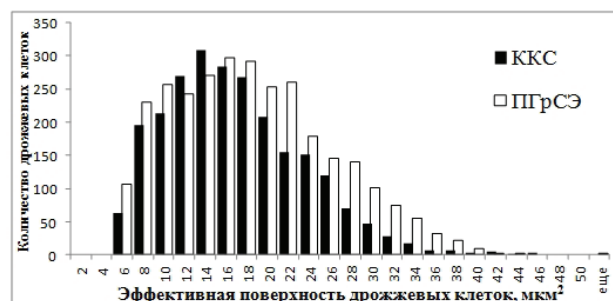


Рис. 2. Суммарное количество и эффективная поверхность клеток хлебопекарных дрожжей в образце квасного суслу на первом цикле.

В процессе приготовления дрожжевой разводки наблюдалась устойчивая тенденция дрожжевой культуры к росту, увеличению биомассы, изменениям морфологических и физиологических свойств в процессе жизненного цикла, за счёт усвоения ими питательных веществ среды, которыми являются сахара, аминокислоты, витамины, микроэлементы.

При анализе гистограмм в двух циклах жизнедеятельности дрожжей установлены особенности физиологического состояния дрожжевой культуры в разводках, приготовленных на основе

ПГрСЭ. В разводке, приготовленной на основе ПГрСЭ, общее количество дрожжевых клеток во втором цикле было на 40% больше по сравнению с образцами с применением ККС. Это свидетельствует о том, что сусло на основе ПГрСЭ является более благоприятной средой для жизнедеятельности дрожжей за счёт оптимизации химического состава.

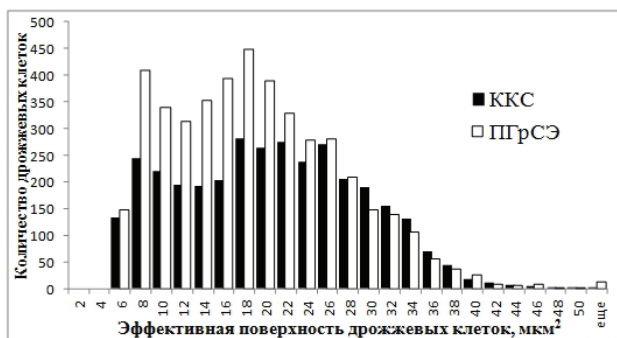


Рис. 3. Суммарное количество и эффективная поверхность клеток хлебопекарных дрожжей в образце квасного сусла на втором цикле.

Для оценки технологических свойств дрожжей интегральным показателем пригодности для сбраживания сред определенного состава может служить скорость брожения, которую косвенно оценивали по динамике снижения массовой доли сухих веществ (СВ) (рис. 4).

Более интенсивное снижение массовой доли СВ отмечали в опытном образце квасного сусла, чем в контрольном, а соответственно, продолжительность брожения снижается на 4 ч. Данный факт обусловлен более высоким содержанием в

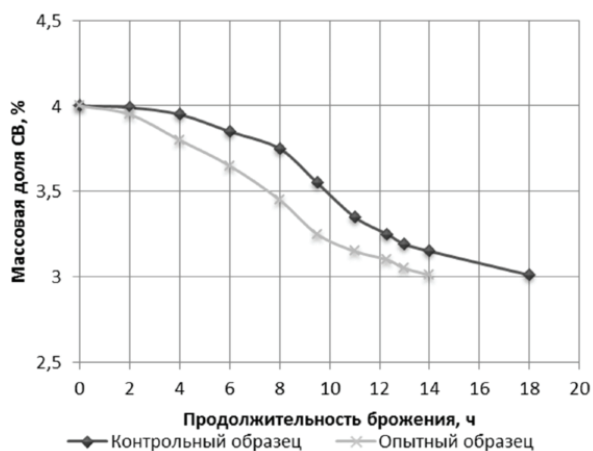


Рис. 4. Динамика снижения массовой доли СВ в процессе брожения квасного сусла на основе: ПГрСЭ – опытный образец, на основе ККС – контрольный образец

исходном сырье аминного азота (таблица 1), который стимулирует перестройку дрожжевых клеток с аэробного на анаэробный метаболизм [2, 3].

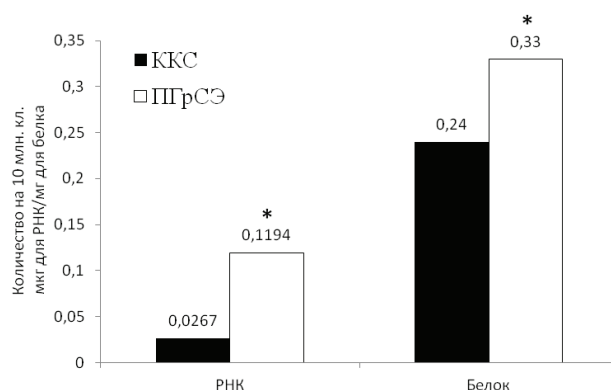


Рис. 5. Содержание totalной РНК и белка в клетках дрожжей, выращиваемых на средах, содержащих ККС и ПГрСЭ а) содержание totalной РНК, нг (на 10 млн. клеток); б) содержание белка, мг (на 10 млн. клеток) Обозначения: *- различие с дрожжами, культивируемыми на среде, содержащей ККС, достоверно ($P < 0.05$).

Активизация биосинтетических свойств клеток дрожжей подтверждается спектрофотометрическим определением концентрации РНК в исследуемых образцах. Содержание totalной РНК в препаратах образцов, выращиваемых на среде с добавлением ПГрСЭ, превышает по этому показателю препараты образцов, выращиваемых на среде с добавлением ККС, в 4.5 раза (различия достоверны ($P < 0.05$)) (рис. 5а). Электрофореграммы подтверждают качество препаратов totalной РНК, выделенной из дрожжевых клеток культуры *Saccharomyces cerevisiae*, культивируемых на среде с применением ПГрСЭ, ККС. Их анализ также указывает на более высокую концентрацию РНК в образцах дрожжей, выращенных на среде с применением ПГрСЭ (рис. 6).

Спектрофотометрическое определение концентрации РНК в исследуемых образцах позволило установить, что ее содержание в препаратах образцов, выращиваемых на среде с добавлением ПГрСЭ, статистически достоверно превышает таковое в препаратах образцов, выращиваемых на среде с добавлением ККС (рис. 5). Большое количество РНК в образцах препаратов дрожжей свидетельствует о том, что клетки, выращиваемые на среде с добавлением ПГрСЭ, обладают более высокой биосинтетической активностью по сравне-

нию с клетками дрожжей контрольных препаратов, выращиваемых на среде с добавлением ККС.

Определение концентрации белка показало, что, как и РНК, в клетках дрожжей образцов, выращиваемых на среде с добавлением ПГрСЭ, белка было больше (~ в 1.5 раза), чем в клетках образцов, выращиваемых на среде с добавлением ККС (рис. 5), что коррелирует с данными по увеличению количества биомассы и размеров клеток, представленными на рисунках 1 – 4.

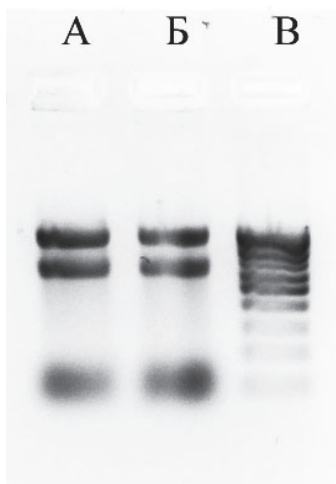


Рис. 6. Электрофореграмма РНК, выделенной из дрожжей. Обозначения: А - РНК дрожжей, культивируемых на среде с применением ПГрСЭ, Б - РНК дрожжей, культивируемых на среде с применением ККС, В - ДНК-линейка (DNA Mass Ruller).

Данные по концентрации тотальной РНК и белка у дрожжей, выращиваемых на разных средах, подтверждают высказанное выше предположение о том, что биосинтетические процессы у клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, культивируемых на среде с добавлением ПГрСЭ, протекают бо-

лее интенсивно по сравнению с таковыми в образце с традиционным составом среды, что позволяет, в частности, при приготовлении квасов, интенсифицировать процесс сбраживания квасного сусла.

Таким образом, применение порошкообразного гречишного солодового экстракта (ПГрСЭ) оказывает влияние на интенсивность биосинтетических процессов у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Использование ПГрСЭ для получения кваса позволяет сократить продолжительность процесса брожения квасного сусла в среднем на 4 ч по сравнению с классической технологией. Полученный результат может оказать положительный эффект на экономическую составляющую квасоваренного производства.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Помозова В.А. Производство кваса и безалкогольных напитков / В.А. Помозова. — СПб.: ГИОРД, 2006. — С. 192.
2. Коротких Е.А. Разработка технологии гречишного солода и порошкообразных солодовых экстрактов для производства кваса: Автореф. дис. ... канд. техн. наук / Е.А. Коротких. — Воронеж, 2011. — 20 с.
3. Квас специального назначения / Е. А. Коротких [и др.] // Вестник ВГУИТ. — 2013. — № 2. — С. 134 – 139.
4. Ares M. Isolation of total RNA from yeast cell cultures / M. Ares // Cold Spring Harbor Protocols. — 2012. — Vol. 2012, №. 10. — P. prot071456.
5. http://molbiol.ru/scripts/01_03.html
6. Measurement of protein using bicinchoninic acid / P. K. Smith [et al.] // Analytical biochemistry. — 1985. — Vol. 150, №. 1. — P. 76-85.
7. Кулаичев А.П. Методы и средства комплексного анализа данных / А.П. Кулаичев. - М.: ФОРУМ: ИНФА, 2006. — 512 с.

Новикова Инна Владимировна — канд. техн. наук, доцент, доцент кафедры технологии бро-дильных и сахаристых производств Воронежско-го государственного университета инженерных технологий; e-mail: noviv@list.ru

Novikova Inna V. — PhD (engineering science), Associate Professor, Department of fermentation technology and sugar industries Voronezh State University of Engineering Technologies; e-mail: noviv@list.ru

Калаев Владислав Николаевич — докт. биол. наук, профессор, проф. кафедры генетики, цитологии и биоинженерии Воронежского государственного университета; e-mail: Dr_Huixs@mail.ru

Kalaev Vladislav N. — Doctor of biology, Full Professor, professor of the Department of Genetics, Cytology and Bioengineering, Voronezh State University; e-mail: Dr_Huixs@mail.ru

Агафонов Геннадий Вячеславович — докт. техн. наук, профессор, заведующий кафедрой технологии бродильных и сахаристых производств Воронежского государственного университета инженерных технологий; e-mail: gvagafonov@mail.ru

Коротких Елена Анатольевна — канд. техн. наук, доцент, доцент кафедры технологии бродильных и сахаристых производств Воронежского государственного университета инженерных технологий; e-mail: dobruly@bk.ru

Мальцева Оксана Юрьевна — канд. техн. наук, доцент, доцент кафедры биохимии и биотехнологии Воронежского государственного университета инженерных технологий; e-mail: ksenia2002@list.ru

Гуреев Артем Петрович — магистр кафедры генетики, цитологии и биоинженерии Воронежского государственного университета; e-mail: gureev@bio.vsu.ru

Agafonov Gennadiy V. — Doctor engineering science, Full Professor, Head Department of fermentation technology and sugar industries Voronezh State University of Engineering Technologies; e-mail: gvagafonov@mail.ru

Korotkih Elena A. — PhD (engineering science), Associate Professor, Department of fermentation technology and sugar industries Voronezh State University of Engineering Technologies; e-mail: dobruly@bk.ru

Maltseva Oksana Y. — PhD (engineering science), Associate Professor, Department of biochemistry and biotechnology Voronezh State University of Engineering Technologies; e-mail: ksenia2002@list.ru

Gureev Artem Petrovich — Master of the Department of Genetics, Cytology and Bioengineering, Voronezh State University; e-mail: gureev@bio.vsu.ru