

<https://doi.org/10.21603/2074-9414-2018-2-89-99>
УДК 663.12

ВЛИЯНИЕ СПОСОБА ОБЕСПЕЧЕНИЯ ПИВНЫХ ДРОЖЖЕЙ КИСЛОРОДОМ НА СИНТЕЗ СТЕРИНОВ

Л. В. Пермякова 

Дата поступления в редакцию: 04.05.2018
Дата принятия в печать: 22.06.2018

ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет»,
650000, Россия, г. Кемерово, ул. Красная, 6

e-mail: delf-5@yandex.ru



© Л. В. Пермякова, 2018

Аннотация. Дрожжам для синтеза компонентов мембран (ненасыщенных жирных кислот и стеринов) необходим кислород, однако повышенное содержание его в среде при брожении увеличивает концентрацию продуктов окислительного обмена клеток, что замедляет созревание и ухудшает качество пива. Альтернативой может быть аэрация инокулята с целью накопления в клетках стеринов и снижения потребности клеток в кислороде. В работе исследовали влияние условий подготовки инокулята и содержания кислорода в среде сбраживания на образование стеринов пивными дрожжами *Saccharomyces cerevisiae*. Предферментационная обработка заключалась в кратковременной аэрации (30 мин) инокулята в воде, пивном сусле или молодом пиве с последующей выдержкой без доступа воздуха (1–3 ч). Содержание стеринов оценивали методами спектрофотометрии, хромато-масс-спектрометрии, тонкослойной (ТСХ) и газожидкостной (ГЖХ) хроматографии. Показано, что при аэрообработке дрожжей в молодом пиве в клетках синтезируется стеринов на 16 и 73 % больше, чем в воде и сусле соответственно, что объясняется наличием в пиве эффективных для стериногенеза источников углерода. При любом способе обеспечения дрожжей кислородом (на стадии подготовки культуры или ферментации сусле) в неомыляемой фракции по результатам ТСХ обнаружено шесть компонентов: эргостерин, эргоста-5,7-диен-3-β-ол, эргоста-7,22-диен-3-β-ол, фекостерин, зимостерин, ланостерин. ГЖХ выявила пять соединений: сквален (39–54 %), ланостерин, 24(28)-дигидроэргостерин, эргостерин (23–35 %) и неидентифицированный компонент, оказавшийся, по данным масс-спектрометрии, 24-метил-24,25-дигидроланостерином. Возрастание уровня кислорода в среде ферментации с 4,0 до 16,0 мг/дм³ способствует снижению прироста стеринов на единицу потребленного дрожжами кислорода. Предварительная аэрообработка позволила дрожжам при концентрации O₂ в сбраживаемом сусле 4,0 мг/дм³ нормально размножиться и сбродить экстракт среды на уровне образца с содержанием кислорода 8,0 мг/дм³. Это позволяет говорить о преимуществе использования предферментационной аэрации дрожжей и проведении процесса сбраживания пивного сусле без дополнительного насыщения кислородом воздуха.

Ключевые слова. Дрожжи пивные, кислород, стерин, среда инкубирования, брожение

Для цитирования: Пермякова, Л. В. Влияние способа обеспечения пивных дрожжей кислородом на синтез стеринов / Л. В. Пермякова // Техника и технология пищевых производств. – 2018. – Т. 48, № 2. – С. 89–99. <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2018-2-89-99>.

DEPENDENCE BETWEEN STEROLS SYNTHESIS AND THE METHOD OF BEER YEAST OXYGENATION

L.V. Permyakova 

Received: 04.05.2018
Accepted: 22.06.2018

Kemerovo State University,
6, Krasnaya Str., Kemerovo, 650000, Russia

e-mail: delf-5@yandex.ru



© L.V. Permyakova, 2018

Abstract. Oxygen is necessary for yeast to synthesize membrane components (unsaturated fatty acids and sterols), but its high content in the medium during fermentation increases the concentration of cell oxidative metabolism products. This slows down beer maturation process and impairs its quality. The alternative way is to aerate the inoculum to accumulate sterols in cells and reduce the cells' requirement for oxygen. The author studied the effect of inoculum preparation conditions and oxygen content in the fermentation medium on the formation of sterols by the brewer's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Pre-fermentation treatment involved a short aeration of the inoculum (for 30 min) in water, beer wort or young beer with further exposure in an anaerobic environment (for 1–3 hours). The content of sterols was evaluated by means of spectrophotometry, chromatography-mass spectrometry, thin-layer chromatography (TLC), and gas-liquid chromatography (GLC). The article reveals that when yeasts are aerated in young beer, cells synthesize by 16% and 73% more sterols than in water and wort, respectively. This is due to the presence of carbon sources in beer which are effective for sterols synthesis. After application of any method for providing yeast with oxygen (at culture preparation or wort fermentation stage) six components were detected in the unsaponifiable fraction using TLC: ergosterol, ergosta-5,7-diene-3β-ol, ergosta-7,22-diene-3β-ol, fecosterol, zymosterol, lanosterol. GLC revealed five compounds: squalene (39–54%), lanosterol, 24 (28) -dihydroergosterol, ergosterol (23–35%) and an unidentified component which according to mass spectrometry was 24-methylene-24,25-dihydroergosterol. An increase in the oxygen level in the fermentation medium from 4.0 to 16.0 mg/l contributes to the decrease in sterols accumulation per unit of oxygen consumed by the yeast. Preliminary aeration

allowed yeast to multiply regularly at oxygen concentration in the fermentable wort of 4.0 mg/l and ferment the extract of the medium at the level of the sample where oxygen content was 8.0 mg/l. This shows the advantage of using yeast pre-fermentation aeration and conducting beer wort fermentation process without additional saturation with oxygen.

Keywords. Brewer's yeast, oxygen, sterols, incubation medium, fermentation

For citation: Permyakova L.V. Dependence between sterols synthesis and the method of beer yeast oxygenation. *Food Processing: Techniques and Technology*, 2018, vol. 48, no. 2, pp. 89–99 (In Russ.). <https://doi.org/10.21603/2074-9414-2018-2-89-99>.

Введение

Стерины входят в состав обширного класса органических соединений – стероидов, широко распространенных в природе. По своему строению стерины представляют собой до конца гидрированную (пергидро)-1,2-циклопентенфенантроновую кольцевую систему. Это нейтральные, довольно устойчивые вещества, встречающиеся как в свободном состоянии, так и в виде сложных эфиров алифатических жирных кислот. Различные стерины заметно отличаются по своим физиологическим и химическим свойствам в зависимости от наличия и расположения двойных связей в боковой цепи и в кольцевой системе, а также от пространственной изомерии [1, 2].

Стерины обнаружены у представителей всех классов грибов [1, 3]. Наиболее богаты стеринами дрожжевые организмы, способные накапливать от 0,1 до 8,0 % стероидов.

Основным стеринем большинства дрожжей является эргостерин. Клетки *Saccharomyces cerevisiae* содержат его до 90 % от общей фракции стероидов [1]. Кроме эргостерина в дрожжах в незначительных количествах встречаются зимостерин, фекостерин, эпистерин, ланостерин и другие стерины.

скавален

↓ 1 – эпоксидаза, НАДН-цитохром P-450-редуктаза, цитохром P-450

скавален-2,3-оксид

↓ 2 – эпоксидоскваваленциклаза

ланостерин

↓ 3 – 14-деметилаза

4,4-диметилхолеста-8,24-диен-3β-ол

↓ 4 – оксидаза со смешанной функцией

4-метилхолеста-8,24-диен-3β-ол

↓ 5 – оксидаза

зимостерин

↓ 6 – C₂₄-метилтрансфераза

фекостерин

↓ 7 – изомераза

эпистерин

↓ 8 – C₂₂-дегидрогеназа

эргоста-7,22,24(28)-триен-3β-ол

↓ 9 – изомераза

эргоста-5,7,22,24(28)-тетраен-3β-ол

↓ 10 – C₂₄₍₂₈₎-метилредуктаза

эргостерин

Рисунок 1 – Превращение скавалена в эргостерин у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*

Figure 1 – Transformation of squalene into ergosterol by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*

В настоящее время с помощью меченого ацетата однозначно доказано, что исходной строительной единицей в синтезе стероидов является ацетил-КоА [2].

Важнейший этап в биосинтезе стероидов – образование мевалоновой кислоты, так как она является продуктом, лимитирующим дальнейший синтез. Между количеством этой кислоты в клетке и скоростью синтеза стероидов существует прямая зависимость. Из мевалоновой кислоты через цепь промежуточных веществ образуются изопреновые соединения. Одно из них – фарнезилпирофосфат – заканчивает реакции конденсации с образованием сквалена.

Сквален постоянно находится в дрожжах, культивируемых в анаэробных условиях. В этом случае он накапливается в клетке, и его содержание в 10 раз превосходит содержание эргостерина [1]. При аэрировании, особенно в присутствии глюкозы, количество сквалена в клетках быстро уменьшается.

Превращение сквалена путем циклизации в ланостерин и затем через ряд переходных соединений в эргостерин в соответствии с общепринятыми взглядами представлено на рис. 1 (цифрами 1–10 обозначены ферменты, катализирующие соответствующую реакцию) [1, 2].

Ферментные системы, осуществляющие биосинтез стероидов, связаны с митохондриями и микросомами [4].

Основными функциями стероидов в клетке являются: структурная, ростовая, защитная [2, 5–7].

Свободные стерины являются составной частью клеточных мембран, а этерифицированные запасаются в липосомах цитоплазмы. Важнейшие свойства клеточной мембраны (вязкость, стабильность, проницаемость, устойчивость к лизису) в существенной степени зависят от состава стероидов.

Некоторые исследователи предполагают, что стерины принимают участие в образовании митохондриальных структур [1, 8]. Имеется определенная взаимосвязь между нарушениями в митохондриях и содержанием стероидов в дрожжевых клетках. В дрожжах, растущих в аэробных условиях, при добавлении метразола, затрагивающего окислительный метаболизм клетки, либо при переносе их в анаэробные условия снижается количество стероидов с 2,5 до 0,5 %, убывает число частиц, подобных митохондриям, снижается уровень цитохрома c. При удалении яда из инкубационной среды все нарушенные структуры восстанавливаются, а содержание стероидов достигает первоначального уровня. В свою очередь эргостерин, возможно, является

активатором некоторых ферментных систем и дыхательных коферментов [9].

Дрожжевые организмы способны к определенному росту в анаэробных условиях только в присутствии эргостерина и олеиновой кислоты [10–12]. Рядом авторов [1, 13] выявлена зависимость между концентрацией экзогенного эргостерина и ростом клетки, а также состоянием клеточной мембраны. При минимальной концентрации (100 нг/см³), необходимой для роста, эргостерин, вероятно, только заполняет определенные области в клеточной мембране. При этом ее свойства существенно изменены, и клетка способна пройти 2–3 генерации. Это было названо критической доменной функцией эргостерина. Больше количество эргостерина (0,5–1,0 мг/см³) приводит к нормальному росту и размножению дрожжей, восстановлению свойств мембран и, следовательно, является достаточным для выполнения доменной функции в клетке. При повышении концентрации экзогенного эргостерина до 15 мг/см³ содержание его в клетке возрастает только до определенного уровня, который остается постоянным и при дальнейшем увеличении количества извне введенного стерина.

Дрожжевые клетки, выросшие при анаэробии и наличии эргостерина, имеют все хорошо выраженные мембранозные системы: ядерную, цитоплазматическую и вакуолярную мембраны [13]. В структуре клеток, растущих в отсутствие эргостерина, вместо типичных митохондрий имеются промитохондрии со слабой ферментативной активностью, небольшим количеством стерина, низким содержанием ненасыщенных жирных кислот и высоким – насыщенными с короткой цепью.

Аэрация анаэробно выращенных дрожжей в присутствии источника энергии индуцирует быстрый (за 1–8 ч) синтез вышеперечисленных компонентов, дыхательную активность. Клетки начинают делиться, и появляются типичные митохондриальные структуры. Энергетический обмен меняется с анаэробного на окислительный [8].

Стерины способны к комплексообразованию с мембранотропными токсинами (спиртами, солями, полиеновыми антибиотиками и др.), устраняя их негативное влияние на живой организм и выполняя тем самым защитную функцию в клетке [1, 14].

В настоящее время относительно хорошо исследованы условия, при которых происходит стеринобразование у дрожжевых организмов.

Аэрация – основной фактор, резко изменяющий уровень образования стерина в клетках дрожжей рода *Saccharomyces* [1, 15, 16]. В присутствии кислорода синтез стерина осуществляется очень быстро. Р. Д. Гальцова [1] отмечает, что клетки дрожжей с высокой бродительной активностью могут в условиях хорошей аэрации повысить содержание стерина в шесть и более раз по сравнению с дрожжами, обладающими значительной окислительной активностью. В первом случае окислительно-восстановительные ферментные

системы таким образом лимитируют процессы метаболизма, что накапливается достаточное количество исходного строительного материала, и в то же время наличие окислительных систем и доступ кислорода воздуха обеспечивают необходимую скорость биосинтеза стерина.

При длительном культивировании в отсутствие кислорода дрожжи теряют способность к брожению, прекращают размножаться, перестраивают свой энергетический обмен [8]. Потребность в молекулярном кислороде резко возрастает.

Требуемое количество кислорода зависит, с одной стороны, от свойств отдельных штаммов, с другой – от условий их предшествующего культивирования. У разных штаммов пивных дрожжей потребность в кислороде может колебаться от 2,0 до 40,0 мг/дм³ и выше [15, 17–19]. В зависимости от способа введения пивные дрожжи могут получаться в формах, требующих кислорода или не требующих его. Микробная культура, выросшая при доступе кислорода воздуха, не нуждается в этом компоненте и хорошо осуществляет процесс брожения как в аэрированном, так и деаэрированном сусле. Дрожжи, растущие длительное время без кислорода, после введения в неаэрированное сусло отличаются пониженной способностью к усвоению субстрата [16, 20].

При проведении процесса ферментации классическим периодическим способом необходимое количество растворенного кислорода в пивном сусле экстрактивностью 11–12 % определяется в размере 6,0–8,0 мг/дм³, но в ряде случаев предельной концентрацией кислорода на начальной стадии брожения считают 7,5–9,0 мг/дм³ [16–19]. Производство высокоплотных сортов пива, использование технологии «высокоплотного пивоварения» требует насыщения суслу растворенным кислородом на уровне 10,0–18,0 мг/дм³ [18, 21], что позволяет нивелировать дрожжам осмотический стресс, стимулировать сбраживание экстракта среды, снизить долю побочных продуктов, ухудшающих вкус и аромат пива.

Некоторые исследователи связывают потребность дрожжей в кислороде, а в свою очередь и скорость сбраживания либо с общей концентрацией стерина, синтезируемых в присутствии данного количества кислорода, либо с относительным содержанием различных стерина. Так, например, одни авторы предполагают, что дрожжи с низкой потребностью в кислороде характеризуются большим содержанием эргостерина, чем эпи- и ланостерина [13], другие – высокой концентрацией дигидроэргостерина по сравнению с эргостерином [21].

Накоплению эргостерина благоприятствует нейтральная или щелочная среда, синтез его максимален при 30 °С и почти прекращается при 40 °С. Значительный прирост стерина (до 10–12 % СВ) наблюдается при воздействии на дрожжи ионизирующих излучений. Более слабый

эффект дают вещества – ингибиторы окислительного фосфорилирования и некоторые полиеновые антибиотики [1, 22].

Состав среды культивирования существенно влияет на биосинтез стерина. Снижают выход стерина большое количество азота в среде, ионы калия, стимулируют образование эргостерина кальций и магний, не влияют на него фосфорные соединения, ионы натрия [1]. Наиболее эффективными источниками углерода для стеринаогенеза являются углеводы. Наибольший прирост наблюдается при использовании глюкозы, рафинозы (100–200 %). Мальтоза и фруктоза оказывают менее заметный эффект (30–35 %) [25].

Ряд исследователей отмечают значение не самих углеводов в синтезе стерина, а продуктов их распада [1, 23]. P. R. Starg и L. W. Parks [23] считают, что содержание продуктов деградации углеводов пропорционально уровню кофермента А в клетке. Авторы составили определенный ряд с уменьшающейся эффективностью в отношении стеринаобразования: ацетат, этиловый спирт, глюкоза, мальтоза, глицерин, ксилоза и сукцинат.

Этиловый спирт является хорошим экзогенным источником углерода для накопления стерина дрожжевыми организмами [1, 15]. Этанол включается в синтез стерина после превращения его в ацетат. При выдерживании дрожжевых клеток в атмосфере этилового спирта при хорошей аэрации содержание стерина увеличивается в 4–5 раз. Наилучшей концентрацией данного вещества считается 2–4 % об., так как в большем количестве проявляются токсичные свойства спирта.

Накоплению стерина в дрожжевых клетках способствуют и органические кислоты с небольшим числом углеродных атомов. Среди таких кислот по усвояемости и по своему действию на синтез стерина первое место занимает пировиноградная кислота (прирост стерина 295 %), янтарная кислота дает прирост около 195 %, молочная – 160–175 %, уксусная – 100–105 %, яблочная – 90–100 % [23].

Вышеприведенные результаты были получены в основном при работе с пекарскими дрожжами. Что касается изучения процесса стеринаобразования пивными дрожжами [15, 24–26], сведения об общем содержании стерина в различных штаммах, влиянии на количественный и качественный состав стерина разных условий снабжения культуры кислородом отражены в литературе недостаточно полно.

Кислород – важнейший фактор, регулирующий рост и физиологическую активность дрожжевой клетки [16]. Используемый чаще всего в практике пивоварения способ обеспечения дрожжей кислородом путем аэрации среды ферментации хотя и способствует снижению потребности культуры в данном компоненте, но имеет много недостатков, главный из которых – ухудшение качественных показателей готового пива [16, 27–29]. Возможно, более эффективным приемом снижения потребности дрожжей в кислороде

является аэрация инокулята перед введением в среду сбраживания.

Имеются немногочисленные сведения по предферментационной аэрации дрожжей [16, 20, 30, 31]. В одних работах рекомендуется осуществлять подобную обработку в условиях минипивзаводов в течение 15 мин перед засевом в сусле для улучшения физиологического состояния клеток, при этом не указывается среда инокуляции [31], в других (на примере получения вина) – проводить аэрацию как жидкой разводки, так и сухих реактивированных дрожжей для предотвращения замедления или преждевременной остановки брожения в случае повышенного количества фунгицидов в сусле [30].

Нами предлагается подготовка семенной культуры пивных дрожжей перед введением в среду ферментации путем кратковременной аэрации инокулята с последующей выдержкой без доступа воздуха [15]. насыщение кислородом воздуха дрожжевой суспензии направлено на синтез дополнительного количества в клетках факторов анаэробного роста, в первую очередь стерина, анаэробная инкубация предотвращает переход обмена веществ с брожения на дыхание.

Цель работы – изучение образования стерина пивными дрожжами *Saccharomyces cerevisiae* при кратковременной аэрации инокулята в зависимости от состава среды суспендирования, а также в процессе последующей ферментации с учетом содержания кислорода в сусле.

Объекты и методы исследований

Объектом исследований служила чистая культура пивных дрожжей *S. cerevisiae* низового брожения расы 8(а) М третьего пассажа. Выбор расы обусловлен ее высокой потребностью в кислороде [15]. Культуру выращивали при температуре 28 °С под высоким слоем 11%-го пивного сусле, что обеспечивало относительно анаэробные условия и низкое содержание стерина в биомассе. Данный образец служил контролем.

Для аэробной обработки полученную биомассу суспендировали в средах (1:2), в которых возможно хранение семенных дрожжей в условиях производства (в воде, 11%-ном пивном сусле, молодом пиве). Аэрацию инокулята проводили компрессором при расходе воздуха 100 дм³/ч·дм³ среды в течение 30 мин при температуре 2–4 °С. Последующую выдержку дрожжей в анаэробных условиях длительностью 1–3 ч вели в колбах, закрытых сернокислотными затворами. Посевной материал вводили в сбраживаемую среду (11%-ное солодовое охмеленное сусле) из расчета 20 · 10⁶ клеток/см³. Процесс ферментации вели при температуре 8–9 °С.

Для выделения стерина из дрожжей центрифугированную биомассу гидролизировали 40%-ным раствором КОН в 96%-ном этиловом спирте в течение 1 ч на кипящей водяной бане. Стериновую фракцию из остывшего раствора дважды экстрагировали гексаном. Соотношение

объема спиртового раствора стерина к объему гексана 1:0,75. Гексановый раствор промывали дистиллированной водой до нейтральной реакции и осушали над безводным сульфатом натрия в течение 1–2 суток. Затем раствор фильтровали и отгоняли из него гексан под вакуумом на роторном испарителе. Стерины хранили в закрытых бюксах при температуре не выше 4 °С. Для проведения дальнейших анализов продукт перерастворили в гексане.

Общее содержание стерина определяли УФ-спектрофотометрическим методом путем измерения оптической плотности гексанового раствора стерина при длине волны 282 нм. Найденную по калибровочному графику величину пересчитывали в проценты на сухое вещество дрожжей (% СВ).

Качественный состав стерина оценивали тонкослойной (ТСХ) и газофазной хроматографией (ГЖХ) [32]. Для ТСХ применяли пластины «Silufol» 200x200 мм, обработанные 20%-ным раствором AgNO_3 , в системе растворителей хлороформ-ацетон (95:5). Проявление хроматограмм вели FeCl_3 , растворенным в смеси кислот (ледяной уксусной и концентрированной серной). ГЖХ проводили на хроматографе «Цвет-100». Колонка стеклянная силанизированная, длиной 2,5 м, с внутренним диаметром 2 мм, заполненная фенилсиликоновой фазой ОУ-17 на носителе «Chromaton N-Super» (Чехия). Температура колонки – 280 °С, температура детектора – 290 °С, расход гелия – 25 см³/мин. Относительное время удерживания рассчитывали по холестерину.

«Свидетелями» при ТСХ служили индивидуальные стерин, выделенные из мутантных штаммов дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*: эргоста-5,7-диен-3 β -ол, эргоста-7,22-диен-3 β -ол, 24(28)-дигидроэргостерин, ланостерин, зимостерин; при ГЖХ дополнительно – эргоста-8-ен-3 β -ол, эргоста-8,24(28)-диен-3 β -ол. Кроме того, использовали сквален, эргостерин («Фармакон», г. Санкт-Петербург) и холестерин («Merck», Германия) как структурный аналог различных интермедиатов биосинтеза стерина у дрожжей.

Структуру неидентифицированных ранее стерина устанавливали методом хромато-масс-спектрометрии на приборе «КВ-2091» (Швеция). Ввод осуществляли через капиллярную колонку газофазного хроматографа. Фаза ОУ-17, температура колонки и сепаратора – 250 °С, ионного источника – 260 °С, ускоряющее напряжение – 3,5 кВ, энергия ионизирующих электронов – 70 эВ.

Физиологическое состояние дрожжей оценивали методом прямого счета в камере Горяева по количеству клеток во взвешенном состоянии и почкующихся. Массовую долю сухих веществ сбраживаемого сусле анализировали ареометрическим способом с последующим расчетом видимой степени сбраживания.

Технологические характеристики дрожжей (скорость сбраживания, выход клеток, время генерации) определяли в соответствии с рекомендациями Европейской пивоваренной конвенции (ЕВК), используя значения таких величин, как содержание экстракта и дрожжевых клеток в бродящей среде.

Исследования проводили в трех-четыре повторностях и обрабатывали статистически по Фишеру – Стьюденту при уровне надежности 95 %.

Результаты и их обсуждение

На первом этапе работы исследовали влияние предферментационной аэробной обработки дрожжей в разных средах на общее содержание стерина.

Из данных рис. 2 видно, что через 30 мин аэрации при достижении полного насыщения суспензии кислородом воздуха (от 11 мг/дм³ при инкубировании в молодом пиве до 15 мг/дм³ – в воде) в клетках дрожжей концентрация стерина возросла в 2,0–3,6 раза в сравнении с исходным значением и в зависимости от среды суспендирования. Интенсивный синтез стерина в этот период времени можно объяснить быстрым превращением образовавшихся на стадии анаэробного выращивания культуры предшественников. Уже на стадии циклизации сквалена кислород необходим для превращения его в сквален-2,3-оксид, который и подвергается циклизации в ланостерин при участии циклазы сквален-2,3-оксида. На последующих этапах в процессе деметилирования у C_4 и C_{14} атомов ланостерина тоже требуется кислород, так как в этих реакциях участвуют оксидазы со смешанной функцией [1]. В первые часы после прекращения аэрации биосинтез эргостерина продолжался с высокой скоростью с дальнейшим снижением ее по мере исчерпания кислорода из среды. После 2 ч инкубации без доступа кислорода воздуха наблюдался даже некоторый спад концентрации эргостерина в клетках, что, возможно, связано с потреблением его для построения мембран. Максимальное содержание эргостерина в дрожжах в 4,4–7,2 раза больше, чем в исходной культуре.

При использовании в качестве среды инкубации сусле, и особенно пива, стеринагенез дрожжей протекал более интенсивно. Сахара являются ценными источниками углерода для стеринаобразования [1, 10]. В результате их окисления образуется непосредственный предшественник эргостерина ацетил-КоА, из трех молекул которого синтезируется мевалоновая кислота. Этиловый спирт молодого пива может быть использован в биосинтезе эргостерина после окисления в ацетат в присутствии молекулярного кислорода. В молодом пиве кроме спирта содержатся и другие вещества, стимулирующие накопление стерина в клетках. Все это способствовало тому, что в дрожжах, суспендированных в молодом пиве, содержание эргостерина на 16 и 73 % выше, чем в биомассе, инкубированной в сусле и воде соответственно.

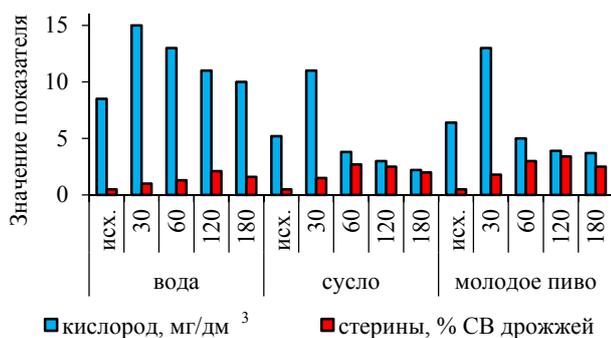


Рисунок 2 – Изменение концентрации кислорода и стерина в дрожжевой суспензии в процессе подготовки инокулята в разных средах (на оси абсцисс цифрами указана длительность аэрации (30 мин) и анаэробной выдержки инокулята (60–180 мин))

Figure 2 – Figures on the X-axis indicate the changes in oxygen and sterols concentration in the yeast suspension during preparation of the inoculum in different media (the duration of aeration (30 min) and anaerobic exposure of inoculum (60–180 min))

Таблица 1 – Влияние аэробной обработки дрожжей на количество клеток с гликогеном

Table 1 – Influence of yeast aeration on the number of cells with glycogen

| Среда обработки | Содержание клеток с гликогеном, % от общего | | | | |
|-----------------|---|------|---------------------|------|------|
| | длительность, ч | | | | |
| | аэрации | | анаэробной выдержки | | |
| | – | 30 | 1 | 2 | 3 |
| вода | 60,7 | 54,4 | 52,7 | 46,3 | 41,5 |
| пивное сусло | 60,7 | 59,2 | 58,0 | 54,0 | 50,3 |
| молодое пиво | 60,7 | 58,6 | 57,2 | 52,3 | 47,5 |

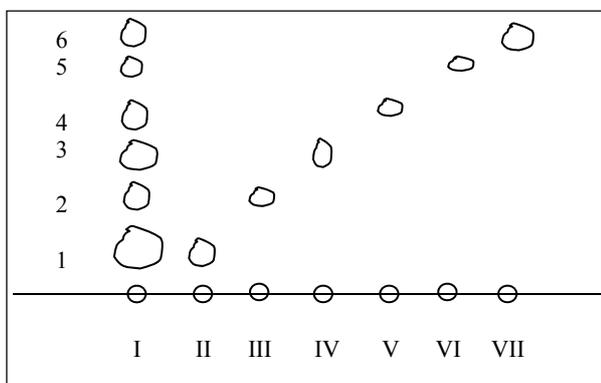


Рисунок 3 – Разделение фракций стерина у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (исходная культура) методом ТСХ: 1 – эргостерин, 2 – эргоста-5,7-диен-3-β-ол, 3 – эргоста-7,22-диен-3-β-ол, 4 – фекостерин, 5 – зимостерин, 6 – ланостерин; I – раствор стерина, выделенных из исходной культуры дрожжей, II–VII – свидетели

Figure 3 – Separation of sterol fractions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* (stock yeast culture) by means of thin-layer chromatography (TLC): 1 – ergosterol; 2 – ergosta-5,7-dien-3-β-ol; 3 – ergosta-7,22-dien-3-β-ol; 4 – fecosterol; 5 – zymosterol; 6 – lanosterol; I – solution of sterols isolated from the stock yeast culture, II–VII – markers

Необходимо отметить, что в отсутствие экзогенных источников углерода для синтеза стерина клетки могут использовать эндогенные

ресурсы, в первую очередь гликоген и трегалозу [1, 16]. Во всех исследуемых образцах наблюдается снижение количества клеток с резервным полисахаридом по отношению к исходному значению, особенно заметное в варианте с аэрацией в воде (табл. 1). Однако ограниченное количество эндогенных субстратов энергетического обмена не позволяет использовать кислород среды в полной мере и обеспечить тот же уровень стерина-копления, который наблюдается при суспендировании дрожжевой культуры в сусле и молодом пиве.

Учитывая, что углеводы и продукты их метаболизма стимулируют биосинтез стерина, при проведении аэрации культуры целесообразно использовать в качестве среды обработки молодое пиво. В дальнейшем подготовку инокулята вели в этой среде.

В ряде работ имеются указания на то, что нормальный ход брожения зависит не только от общего количества стерина в семенных дрожжах, но и от соотношения их различных фракций [21]. Спектрофотометрический метод анализа не может дать точной информации о составе стеринных фракций, так как позволяет судить лишь о наличии определенных функциональных группировок, характерных для структуры тех или иных стерина. Был изучен качественный состав стерина дрожжей в процессе их обработки. Предварительную идентификацию отдельных фракций стерина проводили методом тонкослойной хроматографии, а для уточнения состава и количественной оценки использовали газожидкостную хроматографию. Анализировали неомыляемые фракции исходной культуры дрожжей, а также клеток, суспендированных в молодом пиве, после 30 мин аэрации и последующей выдержки без доступа воздуха в течение 2 ч.

Результаты исследований показали, что раствор стерина при разгонке в тонком слое дает шесть фракций, которые по своему качественному составу сходны у всех анализируемых образцов и представлены следующими соединениями: эргостерин, эргоста-5,7-диен-3-β-ол, фекостерин, эргоста-7,22-диен-3-β-ол, зимостерин и ланостерин с его метилированными производными (рис. 3).

По данным газожидкостной хроматографии в отличие от ТСХ выявлено 5 соединений: сквален, ланостерин, 24(28)-дигидроэргостерин, эргостерин и неидентифицированный компонент (рис. 4, τ_r – относительное время удерживания по холестерину).

Из представленных результатов видно, что в процессе обработки дрожжей существенно изменяется содержание только двух компонентов: сквалена и эргостерина. Изменение количества ланостерина и 24(28)-дигидроэргостерина менее значительно. В исходных клетках дрожжей, выращенных анаэробно, накапливается эргостерин приблизительно в 2 раза меньше, чем сквалена. Однако предферментационная обработка инокулята кислородом воздуха приводит к снижению доли сквалена (на 23 %) и увеличению эргостерина (на 52 %) и его непосредственных предшественников по отношению к первоначальному значению.

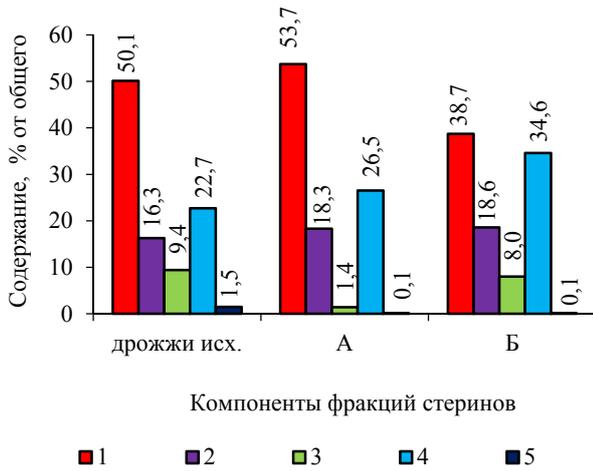


Рисунок 4 – Состав стериновых фракций дрожжей в процессе обработки культуры (А – после 30 мин аэрации, Б – после 2 ч выдержки без доступа воздуха):
 1 – сквален, $\tau_i = 0,38$; 2 – ланостерин, $\tau_i = 1,68$;
 3 – 24(28)-дигидроэргостерин, $\tau_i = 1,55$; 4 – эргостерин, $\tau_i = 1,33$; 5 – неидентифицированный компонент, $\tau_i = 2,10$
 Figure 4 – Composition of the yeast sterols fractions during the processing of the culture (A – after 30 min of aeration, B – after 2 hours of exposure without air access):
 1 – squalene, $\tau_i = 0,38$; 2 – lanosterol, $\tau_i = 1,68$;
 3 – 24 (28)-dihydroergosterol, $\tau_i = 1,55$; 4 – ergosterol, $\tau_i = 1,33$; 5 – unidentified component, $\tau_i = 2,10$

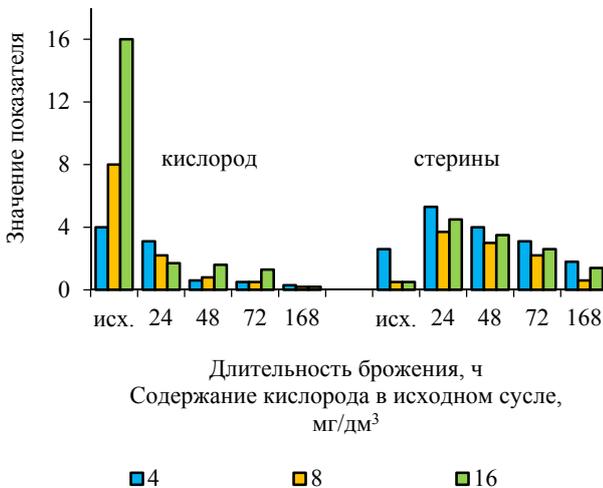


Рисунок 5 – Изменение концентрации кислорода (мг/дм³) в сусле и стеринов (% СВ) в дрожжах в процессе ферментации среды
 Figure 5 – Change in oxygen concentration (mg/l) in wort and sterols (percentage of dry matter) in yeast during medium fermentation

Таким образом, непродолжительная аэрация микробной биомассы в молодом пиве с последующей выдержкой без доступа воздуха позволяет значительно увеличить содержание в клетках эргостерина и тем самым обеспечить возможность анаэробного роста популяции дрожжей при сбраживании суслу.

В исследуемых образцах присутствует компонент с относительным временем

удерживания $\tau_i = 2,10$, который не удалось идентифицировать с использованием имеющихся свидетелей. Соединением с такой величиной τ_i должен быть стерин, имеющий молекулярную массу больше, чем ланостерин. Известно, что фермент 24-метилтрансфераза, осуществляющий реакцию метилирования 24 атома углерода боковой цепи стеринов, не имеет строгой субстратной специфичности [4]. Действию данного биокатализатора могут подвергаться различные метилированные предшественники эргостерина, в том числе и ланостерин.

Для установления структуры нераспознанного соединения использовали метод хромато-масс-спектрометрии. В полученном масс-спектре были выявлены пики, соответствующие фрагментации 24-метил-24,25-дигидроланостерина (m/z 200): M^+ 440 (24); 425 (61); 407 (20); 273 (5); 259 (16) (первая цифра – отношение массы иона (m) к заряду иона (z), вторая цифра в скобках – относительная интенсивность основного пика (M^+)). Такая идентификация подтверждается опубликованным масс-спектром этого соединения [22].

С целью выяснения целесообразности аэрации сбраживаемой среды для синтеза стеринов в дрожжах в сравнении с аэробной инокулята исследовали динамику стеринобразования при ферментации суслу с различным содержанием растворенного кислорода ($4,0 \pm 0,5$); ($8,0 \pm 0,5$); ($16,0 \pm 0,5$) мг/дм³). Концентрация кислорода ($4,0 \pm 0,5$) мг/дм³ обеспечивалась за счет естественного растворения его в сусле, ($8,0 \pm 0,5$) и ($16,0 \pm 0,5$) мг/дм³ – путем дополнительной аэрации среды сжатым воздухом. Суслу с концентрацией ($4,0 \pm 0,5$) мг O_2 /дм³ сбраживали инокулятом после предферментационной обработки, два других варианта суслу – исходными дрожжами (без подготовки).

Динамика количественного изменения в дрожжах фактора анаэробного роста в разных условиях снабжения популяции кислородом показывает (рис. 5), что во всех исследуемых вариантах максимум накопления стеринов в клетках достигался в первые 24 ч культивирования.

Наибольшее количество стеринов (5,3 % СВ) содержится в дрожжах, подвергнутых предварительной аэрации, хотя концентрация кислорода в среде незначительна ($4,0 \pm 0,5$ мг/дм³). В этом случае прирост стеринов в клетках за счет новообразования составил 1,9 % СВ, в вариантах с содержанием кислорода ($8,0 \pm 0,5$) и ($16,0 \pm 0,5$) мг/дм³ – 3,1 и 4,0 % СВ соответственно. В двух последних образцах основное количество стеринов в дрожжах образовалось непосредственно в ходе культивирования, т.е. дополнительный синтез стеринов зависел от концентрации кислорода в среде. В то же время возрастание уровня кислорода в сусле приводит к снижению прироста стеринов на единицу потребленного кислорода (рис. 6).



Рисунок 6 – Прирост стероидов в дрожжах после 24 ч брожения при разном исходном содержании O₂ в сусле

Figure 6 – Increase of sterols level in yeast after 24 hours of fermentation with different initial oxygen content in wort

Таблица 2 – Изменение количества почкующихся клеток (% от общего) в процессе главного брожения

Table 2 – Change in the budding yeast cells number (as percentage of total number) during the main fermentation

| Содержание O ₂ в сусле, мг/дм³ | Длительность брожения, сут | | | | | | | |
|---|----------------------------|----|----|----|----|----|----|----|
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| 4 | 20 | 48 | 71 | 58 | 50 | 32 | 22 | 12 |
| 8 | 14 | 45 | 57 | 70 | 53 | 35 | 20 | 14 |
| 16 | 14 | 50 | 62 | 84 | 60 | 42 | 21 | 10 |

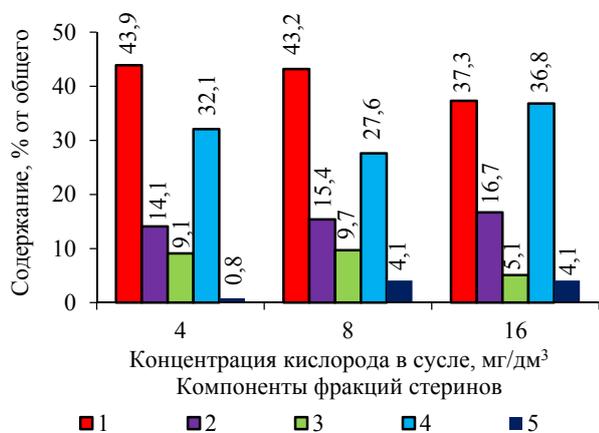


Рисунок 7 – Состав стероидных фракций дрожжей после 7 суток брожения (расшифровку обозначений см. на рис. 4)

Figure 7 – Composition of yeast sterol fractions after 7 days of fermentation (legend is given in Figure 4)

Таблица 3 – Технологические характеристики дрожжей и видимая степень сбраживания сусле (ВСС) в различных условиях снабжения кислородом

Table 3 – Yeast technological characteristics and the apparent degree of wort attenuation under different conditions of oxygen supply

| Показатель | Исходный уровень O ₂ в сусле, мг/дм³ | | |
|--|---|-------|-------|
| | 4 | 8 | 16 |
| Удельная скорость роста, ч ⁻¹ | 0,020 | 0,023 | 0,031 |
| Время генерации, ч | 33,8 | 31,2 | 26,4 |
| Выход клеток, 10 ⁶ /см ³ | 37,1 | 46,3 | 58,5 |
| ВСС, % | 62,7 | 63,2 | 59,1 |

В дальнейшем, в процессе ферментации, начавшееся размножение дрожжей (табл. 2) приводит к снижению содержания стероидов в результате их перераспределения между материнской и дочерней клетками. Не исключена также возможность использования стероидов и в энергетических процессах [1, 2]. В результате к концу культивирования клетки значительно обедняются стероидами. В образце с аэрацией инокулята и начальным содержанием кислорода в сусле (4,0 ± 0,5) мг/дм³ стероидов содержалось в 1,9 раза меньше в сравнении с исходным значением (сразу после аэрообработки), но в 1,3 и 3,0 раза больше, чем в дрожжах без подготовки, сбродивших сусле с концентрацией кислорода соответственно (16,0 ± 0,5) и (8,0 ± 0,5) мг/дм³.

Результаты ГЖХ показали (рис. 7), что по своему качественному составу стероидные фракции исследуемых дрожжей в вариантах сбраживания сусле с разным исходным содержанием кислорода сходны между собой, однако в количественном отношении различны. В дрожжах, прошедших предферментационную обработку, к 7-м суткам брожения содержание эргостерина на 14 % выше, чем в образце с аэрацией сусле (8,0 ± 0,5 мг/дм³) на тот же период времени, и на 7 и 13 % меньше по сравнению, соответственно, со своей стартовой величиной и вариантом насыщения среды кислородом воздуха (16,0 ± 0,5) мг/дм³.

Начальный относительно низкий уровень кислорода (4,0 ± 0,5 мг/дм³) в сусле способствовал накоплению сквалена в дрожжах к концу ферментации на 13 % больше, чем в исходном инокуляте. При последующем засеве такой культуры в сусле, даже с минимальным уровнем насыщения кислородом воздуха, исходного материала для синтеза эргостерина, будет достаточно для осуществления нормального процесса размножения биомассы. В то же время в условиях повышенного содержания кислорода ((8,0 ± 0,5) и (16,0 ± 0,5) мг/дм³) дрожжи характеризуются снижением (на 14 и 26 % соответственно) количества сквалена по отношению к первоначальному значению.

Дрожжи после предферментационной подготовки обеспечили интенсивность размножения и глубину сбраживания экстракта сусле при относительно низкой концентрации кислорода в среде ферментации на уровне образца с содержанием кислорода (8,0 ± 0,5) мг/дм³ (табл. 3), но при меньшем приросте биомассы с учетом исходного засева (20 · 10⁶ клеток/см³). Полученные результаты позволяют говорить о снижении потребности дрожжевой культуры в кислороде за счет синтеза стероидов на этапе предварительной аэрообработки инокулята.

В варианте с аэрацией сусле на уровне (16,0 ± 0,5) мг/дм³, несмотря на высокую удельную скорость размножения дрожжей, видимая степень сбраживания была на 6–7 % меньше, чем в других образцах, что, вероятно, связано с изменением направленности клеточного метаболизма в сторону

конструктивного обмена веществ. Подтверждением является более значительный (в 1,3 и 1,6 раза) выход биомассы по сравнению с использованием уровня кислорода в сусле ($8,0 \pm 0,5$) и ($4,0 \pm 0,5$) мг/дм³ соответственно.

Выводы

Таким образом, полученные результаты исследований свидетельствуют, что наиболее благоприятной для синтеза стерина средой инкубирования пивных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* низового брожения на стадии

предферментационной аэробработки является молодое пиво. Предварительная аэрация инокулята в среде, содержащей углеводы и продукты их деградации, обеспечивает высокий уровень содержания эргостерина в клетках на стадии ферментации при низкой концентрации кислорода в сусле, создавая условия для нормального роста культуры и сбраживания экстрактивных веществ. Это позволяет отказаться от традиционной аэрации суслу и использовать уровень насыщения среды кислородом воздуха, который обеспечивается в результате его естественного растворения.

Список литературы

1. Гальцова, Р. Д. Стеринообразование у дрожжевых организмов / Р. Д. Гальцова. – М. : Наука, 1980. – 224 с.
2. Валитова, Ю. Н. Растительные стеринны: многообразие, биосинтез, физиологические функции / Ю. Н. Валитова, А. Г. Сулкарнаева, Ф. В. Минибаява // Биохимия. – 2016. – Т. 81, вып. 8. – С. 1050–1068.
3. Yaoita, Y. Terpenoids and sterols from mushrooms / Y. Yaoita, M. Kikuchi, K. Machida // Studies in Natural Products Chemistry. – 2015. – Vol. 44. – P. 1–32. <https://doi.org/10.1007/s13205-014-0220-2>.
4. Localization of the enzymes involved in late stage of ergosterol biosynthesis in yeast / T. Nishimo [et al.] // Journal of Biochemistry. – 1981. – Vol. 89, № 5. – P. 1391–1396.
5. Мысякина, И. С. Роль стерина в морфогенетических процессах и диморфизме грибов / И. С. Мысякина, Н. С. Фунтикова // Микробиология. – 2007. – Т. 76, № 1. – С. 5–18.
6. Dufourc, E. J. The role of phytosterols in plant adaptation to temperature / E. J. Dufourc // Plant Signaling & Behavior. – 2008. – № 3. – P. 133–134. <https://doi.org/10.4161/psb.3.2.505>.
7. Мембранные липиды и углеводы цитозоля у *Aspergillus niger* в условиях осмотического, окислительного и холодного воздействий / Е. А. Януевич [и др.] // Микробиология. – 2016. – Т. 85, № 3. – С. 283–292. <https://doi.org/10.7868/S0026365616030174>.
8. Котельникова, А. В. Биохимия дрожжевых митохондрий / А. В. Котельникова, Р. А. Звягильская. – М. : Наука, 1973. – 239 с.
9. Influence of fatty acid and sterol composition on the lipid phase transition and activity of membrane-bound enzymes in *Acholeplasma laidlawii* / De Kruffyff B. [et al.] // Biochimica et Biophysica Acta. – 1973. – Vol. 330. – P. 269–282. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(73\)90232-0](https://doi.org/10.1016/0005-2736(73)90232-0).
10. Lees, N. D. Sterol biochemistry and regulation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* / N. D. Lees, M. Bard // Biochimica et Biophysica Acta. – 2003, December 6. – P. 141–150. https://doi.org/10.1007/978-3-540-40999-1_7.
11. Sterol regulatory element binding protein is a principal regulator of anaerobic gene expression in fission yeast / B. L. Todd [et al.] // Molecular and Cellular Biology. – 2006. – Vol. 26, № 7. – P. 2817–2831. <https://doi.org/10.1128/MCB.26.7.2817-2831.2006>.
12. Snoek, S. I. Factors involved in anaerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae* / S. I. Snoek, H. Y. Steensma // Yeast. – 2007. – Vol. 24, № 1. – P. 1–10. <https://doi.org/10.1002/yea.1430>.
13. Ergosterol synthesis and population analysis of a fed-batch fermentation in *Saccharomyces cerevisiae* / A. Pichová [et al.] // Folia Microbiologica. – 1985. – Vol. 30, № 2. – P. 134–140. <https://doi.org/10.1007/BF02922206>.
14. Ефимова, С. С. Исследование каналообразующей активности полиеновых антибиотиков в липидных бислоях с использованием дипольных модификаторов / С. С. Ефимова, Л. В. Щагина, О. С. Остроумова // Acta Naturae. – 2014. – Т. 6, № 4 (23). – С. 72–85.
15. Пермякова, Л. В. Исследование различных способов снижения потребности дрожжей в кислороде / Л. В. Пермякова // Техника и технология пищевых производств. – 2015. – Т. 38, № 3. – С. 41–50.
16. Annemuller, G. The yeast in the brewery / G. Annemuller, H.-J. Manger, P. Lietz. – Berlin : VLB Berlin, 2011. – 430 p.
17. Jakobsen, M. Oxygen requirements of brewing strains of *Saccharomyces uvarum* (*carlsbergensis*) – bottom fermentation yeast / M. Jakobsen, R. S. W. Thorne // Journal of the Institute of Brewing. – 1980. – Vol. 86, № 6. – P. 284–287. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1980.tb06882>.
18. Расы дрожжей для сбраживания плотного суслу / Т. И. Филимонова [и др.] // Пиво и напитки. – 2004. – № 1. – С. 22–23.
19. Косминский, Г. И. Выбор расы пивоваренных дрожжей для безалкогольного пива / Г. И. Косминский, Е. М. Моргунова, О. И. Иванчикова // Пиво и напитки. – 2006. – № 2. – С. 32–33.
20. Зубковская, О. Л. Влияние технологических факторов на сокращение процесса брожения при изготовлении фруктово-ягодных натуральных виноматериалов / О. Л. Зубковская, Т. М. Тананайко, А. Н. Гацевичус // Пищевая промышленность: наука и технологии. – 2014. – № 3 (25). – С. 50–57.
21. The role of oxygen in yeast metabolism during high cell density brewery fermentations / P. J. Verbelen [et al.] // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2009. – Vol. 82. – P. 1143–1156. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-1909-8>.
22. Михайлова, Н. П. Стерины некоторых мутантов дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, устойчивых к нистатину / Н. П. Михайлова, А. В. Мосейчук, К. В. Вьюнов // Биотехнология. – 1986. – № 1. – С. 31–35.

23. Starr, P. R. Some factors affecting sterol formation in *Saccharomyces cerevisiae* / P. R. Starr, L. W. Parks // Journal of Bacteriology. – 1962. – Vol. 83, № 5. – P. 1042–1045.
24. Ginova-Stojenova, T. Syntéza ergosterolu a aktivite pivovarských kvasinek / T. Ginova-Stojenova, V. Janeva / Kvasný průmysl. – 1985. – Vol. 31, № 9. – P. 201–204. (In Czech).
25. Basarová, G. Ergosterol v odpadních pivovarských kvasnicích / G. Basarová, L. Löblová // Kvasný průmysl. – 1987. – Vol. 33, № 3. – P. 65–68. (In Czech).
26. Логунова, А. С. Методы выделения и сравнительная характеристика эргостерина, полученного из пивных и хлебопекарных дрожжей / А. С. Логунова, Л. А. Бахолдина // Технологии и оборудование химической, биотехнологической и пищевой промышленности : материалы VIII Всероссийской научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых с международным участием. – Бийск, 2015. – С. 491–495.
27. Меледина, Т. В. Качество пива: стабильность вкуса и аромата, коллоидная стойкость, дегустация / Т. В. Меледина, А. Т. Дедегкаев, Д. В. Афонин. – СПб. : Профессия, 2011. – 220 с.
28. Kucharczyk, K. The effect of wort aeration on fermentation, maturation and volatile components of beer produced on an industrial scale / K. Kucharczyk, T. Tuszyński // Journal of the Institute of Brewing. – 2017. – Vol. 123, № 1. – P. 31–38. <https://doi.org/10.1002/jib.392>.
29. Рапота, М. О. Влияние фитостероидов на сенсорную стабильность пива / М. О. Рапота, М. Н. Елисеев // Успехи современной науки и образования. – 2016. – Т. 2, № 8. – С. 163–166.
30. Gnaegi, F. Fongicides viticoles et fermentation / F. Gnaegi // Revue Française d'Œnologie. – 1985. – Vol. 25, № 99. – P. 9–13. (In French).
31. Влияние кислорода на кинетику биологических процессов при сбраживании пивного сусла / В. Б. Тишин [и др.] // Хранение и переработка сельхозсырья. – 2010. – № 4. – С. 29–32.
32. Кейтс, М. Техника липидологии / М. Кейтс. – М. : Мир, 1975. – 322 с.

References

1. Gal'tsova R.D. *Sterinoobrazovanie u drozhzhevykh organizmov* [Sterol production by yeast]. Moscow: Nauka Publ., 1980. 224 p.
2. Valitova Yu.N., Sulkarnaeva A.G., Minibaeva F.V. *Rastitel'nyye steriny: mnogoobraziye, biosintez, fiziologicheskiye funktsii* [Plant sterols: Diversity, biosynthesis, and physiological functions]. *Biokhimiya* [Biochemistry], 2016, vol. 81, no. 8, pp. 1050–1068.
3. Yaoita Y., M. Kikuchi, K. Machida. Terpenoids and sterols from mushrooms. *Studies in Natural Products Chemistry*, 2015, vol. 44, pp. 1–32. <https://doi.org/10.1007/s13205-014-0220-2>.
4. Nishimo T., Hata S., Taketani S., Yabusaki Y., Katsuki H. Localization of the enzymes involved in late stage of ergosterol biosynthesis in yeast. *Journal of Biochemistry*, 1981, vol. 89, no. 5, pp. 1391–1396.
5. Mysyakina I.S., Funtikova N.S. Rol' sterinov v morfogeneticheskikh protsessakh i dimorfizme gribov [The role of sterols in plant growth and development]. *Mikrobiologiya* [Microbiology], 2007, vol. 76, no. 1, pp. 5–18.
6. Dufourc E.J. The role of phytosterols in plant adaptation to temperature. *Plant Signaling & Behavior*, 2008, no. 3, pp. 133–134. <https://doi.org/10.4161/psb.3.2.505>.
7. Yanutsevich E.A., Danilova O.A., Groza N.V., Tereshina V.M. Membrannyye lipidy i uglevody tsitozolya u *Aspergillus niger* v usloviyakh osmoticheskogo, oksiditel'nogo i kholodovogo vozdeystviy [Membrane lipids and cytosol carbohydrates in *Aspergillus niger* under osmotic, oxidative and cold impact]. *Mikrobiologiya* [Microbiology], 2016, vol. 85, no. 3, pp. 283–292. <https://doi.org/10.7868/S0026365616030174>.
8. Kotel'nikova A.V., Zvyagil'skaya R.A. *Biokhimiya drozhzhevykh mitokhondriy* [Biochemistry of yeast mitochondria]. Moscow: Nauka Publ., 1973. 239 p.
9. De Kruyff B., van Dijck P.W.M., Goldbach R.W., Demel R.A., van Deenen L.L.M. Influence of fatty acid and sterol composition on the lipid phase transition and activity of membrane-bound enzymes in *Acholeplasma laidlawii*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1973, vol. 330, pp. 269–282.
10. Lees N.D., Bard M. Sterol biochemistry and regulation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2003, December 6, pp. 141–150. https://doi.org/10.1007/978-3-540-40999-1_7.
11. Todd B.L., Stewart E.V., Burg J.S., Hughes A.L., Espenshade P.J. Sterol regulatory element binding protein is a principal regulator of anaerobic gene expression in fission yeast. *Molecular and Cellular Biology*, 2006, vol. 26, no. 7, pp. 2817–2831. <https://doi.org/10.1128/MCB.26.7.2817-2831.2006>.
12. Snoek S.I., Steensma H.Y. Factors involved in anaerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 2007, vol. 24, no. 1, pp. 1–10. <https://doi.org/10.1002/yea.1430>.
13. Pichová A., Beran K., Běhalová B., Zajicek J. Ergosterol synthesis and population analysis of a fed-batch fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Folia Microbiologica*, 1985, vol. 30, no. 2, pp. 134–140. <https://doi.org/10.1007/BF02922206>.
14. Efimova S.S., Shchagina L.V., Ostroumova O.S. Issledovaniye kanaloobrazuyushchey aktivnosti poliyenovykh antibiotikov v lipidnykh bisloyakh s ispol'zovaniyem dipol'nykh modifikatorov [Investigation of the channel-forming activity of polyene antibiotics in lipid bilayers using dipolar modifiers]. *Acta Naturae*, 2014, vol. 6, no. 4 (23), pp. 72–85.
15. Permyakova L.V. Issledovaniye razlichnykh sposobov snizheniya potrebnosti drozhzhey v kislorode [Investigation of different ways of reducing the oxygen requirement of yeast]. *Tekhnika i tekhnologiya pishchevykh proizvodstv* [Food Processing: Techniques and Technology], 2015, vol. 38, no. 3, pp. 41–50.
16. Annemuller G., Manger H.-J., Lietz P. *The yeast in the brewery*. Berlin: VLB Berlin, 2011. 430 p.

17. Jakobsen M., Thorne R.S.W. Oxygen requirements of brewing strains of *Saccharomyces uvarum* (*carlsbergensis*) – bottom fermentation yeast. *Journal of the Institute of Brewing*, 1980, vol. 86, no. 6, pp. 284–287. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1980.tb06882>.
18. Filimonova T.I., Borisenko O.A., Ryzhova T.P., Kobelev K.V. Rasy drozhzhey dlya sbrazhivaniya plotnogo susla [Yeast races for fermenting dense wort]. *Pivo i napitki* [Beer and Beverages], 2004, no. 1, pp. 22–23.
19. Kosminskiy G.I., Morgunova E.M., Ivanchikova O.I. Vybór rasy pivovarennykh drozhzhey dlya bezalkogol'nogo piva [Choosing a brewing yeast race for nonalcoholic beer]. *Pivo i napitki* [Beer and Beverages], 2006, no. 2, pp. 32–33.
20. Zubkovskaya O.L., Tananaiko T.M., Gatsевичus A.N. Vliyaniye tekhnologicheskikh faktorov na sokrashcheniye protsessa brozheniya pri izgotovlenii fruktovo-yagodnykh natural'nykh vinomaterialov [The impact of technological factors on the reduction of fermentation during production of fruit-and-berry natural wine materials]. *Pishchevaya promyshlennost': nauka i tekhnologii* [Food Processing Industry: Science and Technology], 2014, no. 3(25), pp. 50–57.
21. Verbelen P.J., Saerens M.G., Van Mulders S.E. Delvaux F., Delvaux F.R. The role of oxygen in yeast metabolism during high cell density brewery fermentations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009, vol. 82, pp. 1143–1156. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-1909-8>.
22. Mikhaylova N.P., Moseychuk A.V., V'yunov K.V. Steriny nekotorykh mutantov drozhzhey *Saccharomyces cerevisiae*, ustoychivyykh k nistatinu [Sterols of some yeast *Saccharomyces cerevisiae* mutants resistant to nystatin]. *Biotehnologiya* [Biotechnology], 1986, no. 1, pp. 31–35.
23. Starr P.R., Parks L.W. Some factors affecting sterol formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, 1962, vol. 83, no. 5, pp. 1042–1045.
24. Ginova-Stojenova T., Janeva V. Syntēza ergosterolu a aktivite pivovarskýh kvasinek [Synthesis of ergosterol and activity of brewing yeasts]. *Kvasný průmysl* [Kvasny Prumysl], 1985, vol. 31, no. 9, pp. 201–204. (In Czech).
25. Basarová G., Löblová L. Ergosterol v odpadních pivovarských kvasnicích Ergosterol in brewing yeasts. *Kvasný průmysl* [Kvasny Prumysl], 1987, vol. 33, no. 3, pp. 65–68. (In Czech).
26. Logunova A.S., Baholdina L.A. Metody vydeleniya i sravnitel'naya kharakteristika ergosterina, poluchennogo iz pivnykh i khlebopekarnykh drozhzhey [Methods of isolation and comparative characteristics of ergosterol obtained from beer and baker's yeast]. *Materialy VIII Vserossiyskoy nauchno-prakticheskoy konferentsii studentov, aspirantov i molodykh uchenykh s mezhdunarodnym uchastiyem "Tekhnologii i oborudovaniye khimicheskoy, biotekhnologicheskoy i pishchevoy promyshlennosti"* [Proceedings of VIII All-Russian international applied research conference of students, post-graduate students and young scientists "Technologies and equipment of chemical, biotechnological and food industries"]. Biysk, 2015, pp. 491–495.
27. Meledina T.V., Dedegkaev A.T., Afonin D.V. *Kachestvo piva: stabil'nost' vkusa i aromata, kolloidnaya stoylost', degustatsiya* [Beer quality: taste and flavor stability, colloidal stability, degustation]. St.Petersburg: Professiya Publ., 2011. 220 p.
28. Kucharczyk K., Tuszyński T. The effect of wort aeration on fermentation, maturation and volatile components of beer produced on an industrial scale. *Journal of the Institute of Brewing*, 2017, vol. 123, no.1, pp. 31–38. <https://doi.org/10.1002/jib.392>.
29. Rapota M.O., Eliseev M.N. Vliyaniye fitosterinov na sensornuyu stabil'nost' piva [The influence of phytosterols on the sensor stability of beer]. *Uspekhi sovremennoy nauki i obrazovaniya* [Successes of Modern Science and Education], 2016, vol. 2, no. 8, pp. 163–166.
30. Gnaegi F. Fongicides viticoles et fermentation. *Revue Française d'Œnologie*, 1985, vol. 25, no. 99, pp. 9–13. (In French).
31. Tishin V.B., Tamazyán G.A., Ogannisyan V.G., Meledina T.V. Vliyaniye kisloroda na kinetiku biologicheskikh protsessov pri sbrazhivanii pivnogo susla [The effect of oxygen on the kinetics of biological processes during fermentation of beer wort]. *Khraneniye i pererabotka sel'khozsy'r'ya* [Storage and processing of farm products], 2010, no. 4, pp. 29–32.
32. Cates M. *Techniques of lipidology. isolation, analysis and identification of lipids*. New York, Wiley, 1974. 521 p. (Russ. ed.: Cates M. *Tekhnika lipidologii*. Moscow, Mir Publ., 1975. 322 p.).

Пермякова Лариса Викторовна

канд. техн. наук, доцент, доцент кафедры технологии броидильных производств и консервирования, ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет», 650000, Россия, г. Кемерово, ул. Красная, 6, тел.: +7 (3842) 39-68-55, e-mail: delf-5@yandex.ru

 <https://orcid.org/0000-0003-1996-8903>

Larisa V. Permyakova

Cand.Sci.(Eng.), Associate Professor, Associate Professor of the Department of Technology of Fermentation Production and Conservation, Kemerovo State University, 6, Krasnaya Str., Kemerovo, 650000, Russia, phone: +7 (3842) 39-68-55, e-mail: delf-5@yandex.ru

 <https://orcid.org/0000-0003-1996-8903>

