

## **OCENA MOŻLIWOŚCI POMIARU ŚREDNICY KOMÓREK DROŻDŻY PIWOWARSKICH PRZY UŻYCIU LASEROWEGO ANALIZATORA WIELKOŚCI CZĄSTEK**

Barbara Foszczyńska, Ewelina Dziuba, Joanna Chmielewska

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

**Streszczenie.** Badano możliwości wykorzystania laserowego analizatora wielkości cząstek Mastersizer 2000 do monitorowania kondycji drożdży piwowarskich poprzez pomiar średnicy komórek. Stwierdzono, że średnicę komórek drożdży należy wyznaczać bezpośrednio po pobraniu biomasy ze środowiska hodowlanego lub fermentacyjnego, stosując wodę destylowaną jako ciecz dyspersyjną. Wykazano przydatność urządzenia do obserwacji zmian wielkości komórek drożdży w warunkach stresu osmotycznego i etanolowego.

**Słowa kluczowe:** drożdże piwowarskie, rozmiar komórek, analizator wielkości cząstek

### **WSTĘP**

Drożdże piwowarskie są jednym z podstawowych surowców browarniczych, w dużym stopniu decydującym o jakości piwa. W procesie fermentacji brzezki słodowej wytwarzają nie tylko etanol, ale również produkty uboczne, które nadają piwu właściwy profil aromatyczny. Ulegają one przy tym różnym stresom takim jak stres osmotyczny czy etanolowy, które są przyczyną pogorszenia żywotności komórek, osłabienia ich zdolności wzrostu oraz odfermentowania brzezki.

Rozwój nowoczesnych technologii w piwowarstwie wymusza konieczność poszukiwania metod umożliwiających szybką i dokładną ocenę kondycji drożdży nastawnych, jak również monitorowanie ich stanu fizjologicznego podczas procesu technologicznego. Rutynowe metody oceny żywotności drożdży oparte są na barwieniu komórek błękitem metylenowym. Jednakże fakt odbarwiania błękitu świadczy jedynie o potencjale redoks we wnętrzu komórki. Przykładem nowoczesnych technik pomiarowych jest mikroskopia fluorescencyjna [Kordialik-Bogacka 2007], pozwalająca, przy zastosowaniu odpowied-

---

© Copyright by Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Adres do korespondencji – Corresponding author: Foszczyńska B., Dziuba E., Chmielewska J., Katedra Technologii Rolnej i Przechowalnictwa Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, ul. Chelmońskiego 37/41, 51-630 Wrocław, e-mail: barbara.foszczyńska@up.wroc.pl

nich fluorochromów, na identyfikowanie komórek i niewidocznych pod mikroskopem struktur komórkowych. Cyfrowa analiza obrazu umożliwia liczenie i określenie wielkości komórek oraz badanie żywotności i zmian cech morfologicznych wynikających ze starzenia się lub wrażliwości na szok osmotyczny [Misiewicz i Czuba 2005]. Z kolei cytometria przepływowa pozwala na wykonanie kompleksowych badań określających żywotność i witalność drożdży poprzez oznaczenie liczby i wielkości komórek, zawartości DNA, 3 $\beta$ -hydroksysteroli, obojętnych lipidów, glikogenu, trehalozy, aktywności proteolitycznej oraz pH wewnątrzkomórkowego [Boyd i in. 2003, Hutter i in. 2005, Weigert i in. 2009]. Jednym z elementów oceny stanu fizjologicznego drożdży jest pomiar wielkości i kształtu komórek. Drożdże bowiem w różnych fazach wzrostu oraz pod wpływem rozmaitych czynników zmieniają swoje rozmiary. Do pomiaru populacji i wielkości komórek drożdży można wykorzystać urządzenia oparte na metodzie Coultera. Szansę łatwego i szybkiego sposobu pomiaru wielkości komórek drożdży stwarza także zastosowanie laserowego analizatora wielkości cząstek Mastersizer 2000 Malvern Instruments. Jest to urządzenie zaprojektowane do pomiaru wielkości cząstek w dyspersjach cieczowych i powietrznych, służy do analiz granulometrycznych cząsteczek ciał stałych i emulsji w zakresie wielkości 0,02–2000  $\mu\text{m}$  [Materiały firmy Malvern Instruments]. Oznaczenie polega na pomiarze rozproszenia światła laserowego przez cząstki, które po uprzedniej dyspersji zostają podane do jednostki optycznej urządzenia. Ze światła rozproszonego obliczana jest wielkość cząstek, przy czym kształt cząstek sprowadzany jest do kuli. Urządzenie umożliwia m.in. pomiar średniej średnicy D[4,3], tj. średnicy kuli o objętości badanej cząstki.

Celem niniejszych badań był dobór cieczy dyspersyjnej oraz czasu ekspozycji komórek drożdży piwowskich z rodzaju *Saccharomyces* przed pomiarem średnicy D[4,3] przy użyciu analizatora wielkości cząstek Mastersizer 2000 Malvern Instruments. Ponadto badano wpływ procesu odwirowania biomasy oraz różnych stężeń wodnych roztworów glukozy i etanolu na średnicę komórek drożdży.

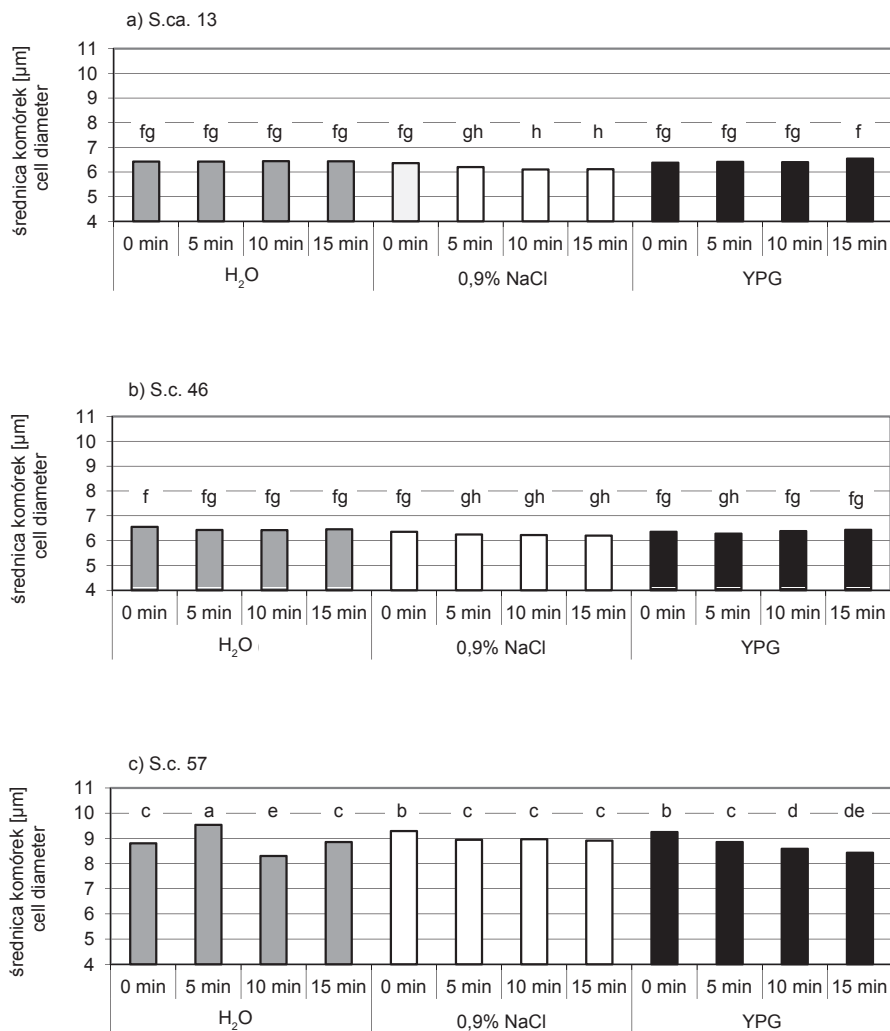
## MATERIAŁ I METODY

Materiał badawczy stanowiły trzy szczepy drożdży piwowskich z Kolekcji Kultur Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego w Warszawie:

- *Saccharomyces carlsbergensis* I-S.ca.13 – dolnej fermentacji, pylisty (I-S.ca.13)
- *Saccharomyces cerevisiae* I-S.c. 46 – górnej fermentacji, pylisty (I-S.c.46)
- *Saccharomyces cerevisiae* I-S.c. 57 – górnej fermentacji, kłaczkujący (I-S.c.57) [Rzędowska 1969].

Biomasę drożdży aktywowano w podłożu YPG w temp. 30°C (48 godz. hodowla stacjonarna (10 cm<sup>3</sup>), a następnie 48 godz. hodowla wstrząsana (100 cm<sup>3</sup>)).

Przy użyciu analizatora wielkości cząstek Mastersizer 2000 Malvern Instruments mierzono średnicę komórek D[4,3], stosując: a) wodę destylowaną, b) roztwór soli fizjologicznej (0,9% NaCl) oraz c) podłoże YPG jako cieczy dyspersyjne. Do zlewki zawierającej około 800 cm<sup>3</sup> cieczy dyspersyjnej wprowadzano zawiesinę drożdży w podłożu YPG w ilości zapewniającej optymalny zakres populacji komórek w czasie pomiaru. Pomiar wykonywano natychmiast po zawieszeniu biomasy w roztworze, ale także po upływie 5, 10 i 15 minut. Dodatkowo dla pomiarów w wodzie destylowanej biomasę odwirowywano (3000 obr./min; 10 min) i tuż przed dyspersją zawieszano w 10 cm<sup>3</sup> wody destylowanej.



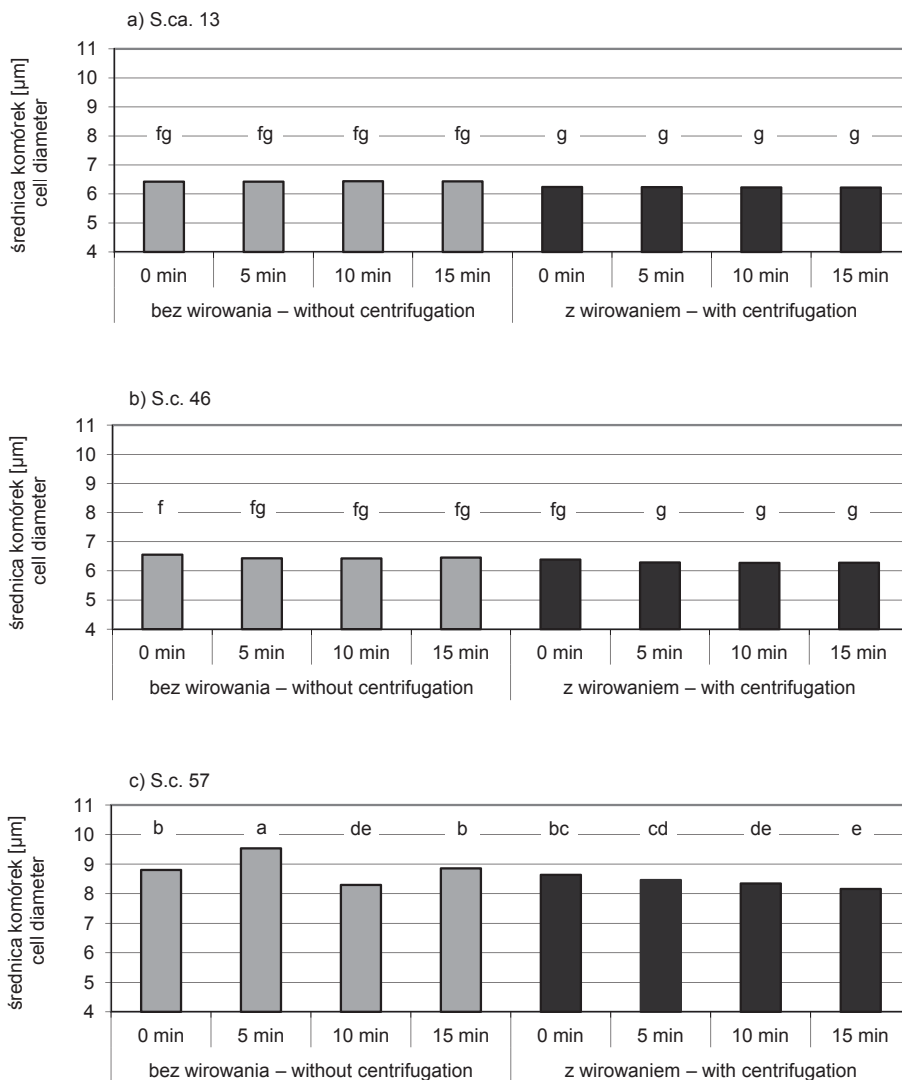
Rys. 1. Wpływ rodzaju medium dyspersyjnego (H<sub>2</sub>O, 0,9% NaCl, podłoże YPG) oraz czasu ekspozycji biomasy (0, 5, 10, 15 min) na średnicę D[4,3] komórek drożdży: a) S.ca.13, b) S.c. 46, c) S.c. 57 (NIR = 0,2097)

Fig. 1. The influence of dispersion medium ((H<sub>2</sub>O, 0.9% NaCl, YPG medium) and time of biomass exposition (0, 5, 10, 15 min) on volume mean diameter D[4,3] of yeast cells: a) S.ca.13, b) S.c. 46, c) S.c. 57 (NIR = 0.2097)

W kolejnym etapie badań określano zmiany wielkości komórek drożdży w wodnych roztworach glukozy (5,10 i 20% wag.) oraz etanolu (2,5, 5 i 10% obj.) jako mediach dyspersyjnych. Mierzono średnicę komórek po wprowadzeniu biomasy do roztworu oraz po upływie 5, 10 i 15 minut.

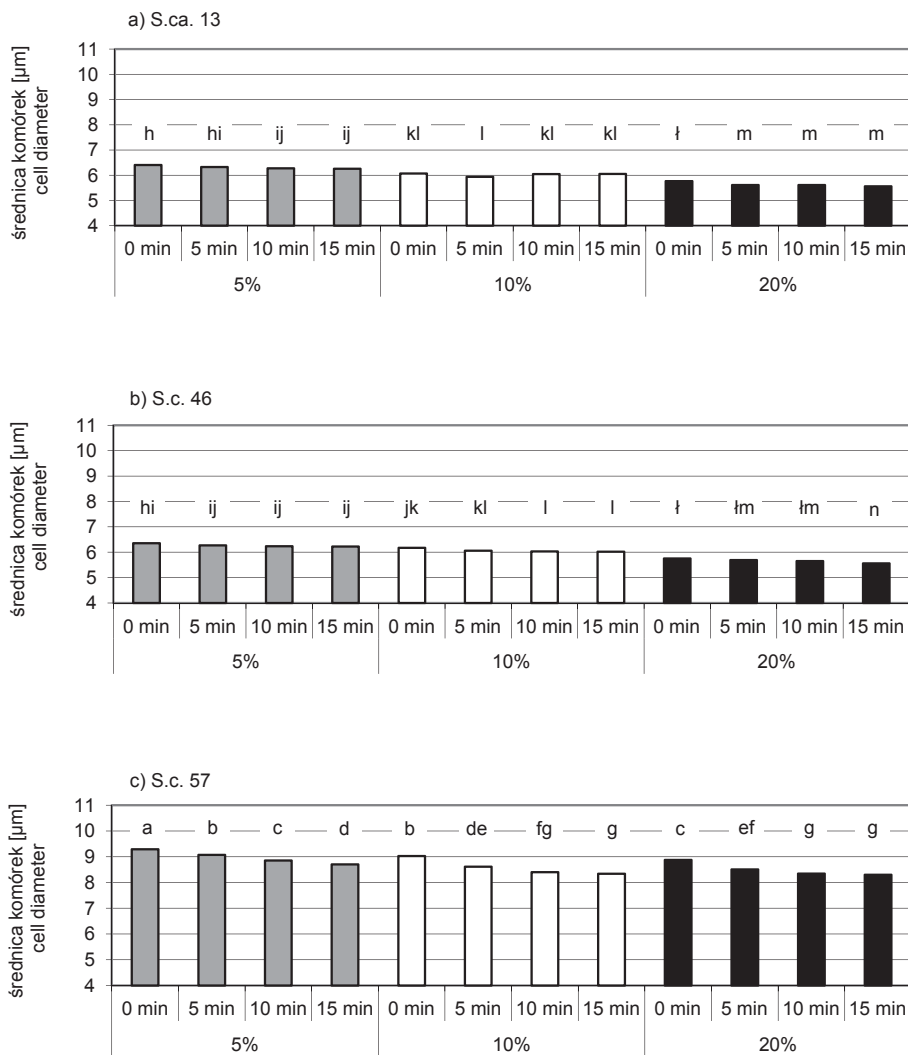
Badania wykonywano w trzech powtórzeniach. Uzyskane wyniki pomiaru średnicy D[4,3] poddano analizie wariancji Anova dla układów czynnikowych (test Duncana przy

$\alpha=0,05$ ) w programie STATISTICA 9.1. Grupy statystycznie jednorodne zaznaczono na rysunkach małymi literami alfabetu. Wyniki pomiaru średnicy komórek w badanych cieczach przedstawiono na rysunkach 1–4. Dokonano ponadto analizy procentowego rozkładu objętości komórek w próbkach biomasy w sześciu zakresach wielkości średnicy: 0–2  $\mu\text{m}$ ; 2–5  $\mu\text{m}$ ; 5–10  $\mu\text{m}$ ; 10–20  $\mu\text{m}$ ; 20–40  $\mu\text{m}$ ; > 40  $\mu\text{m}$ . Ze względu na dużą liczbę danych przedstawiono w pracy jedynie wyniki rozkładu objętości dla pomiarów bezpośrednio po zawieszeniu komórek w cieczach (tab. 3 i 4).



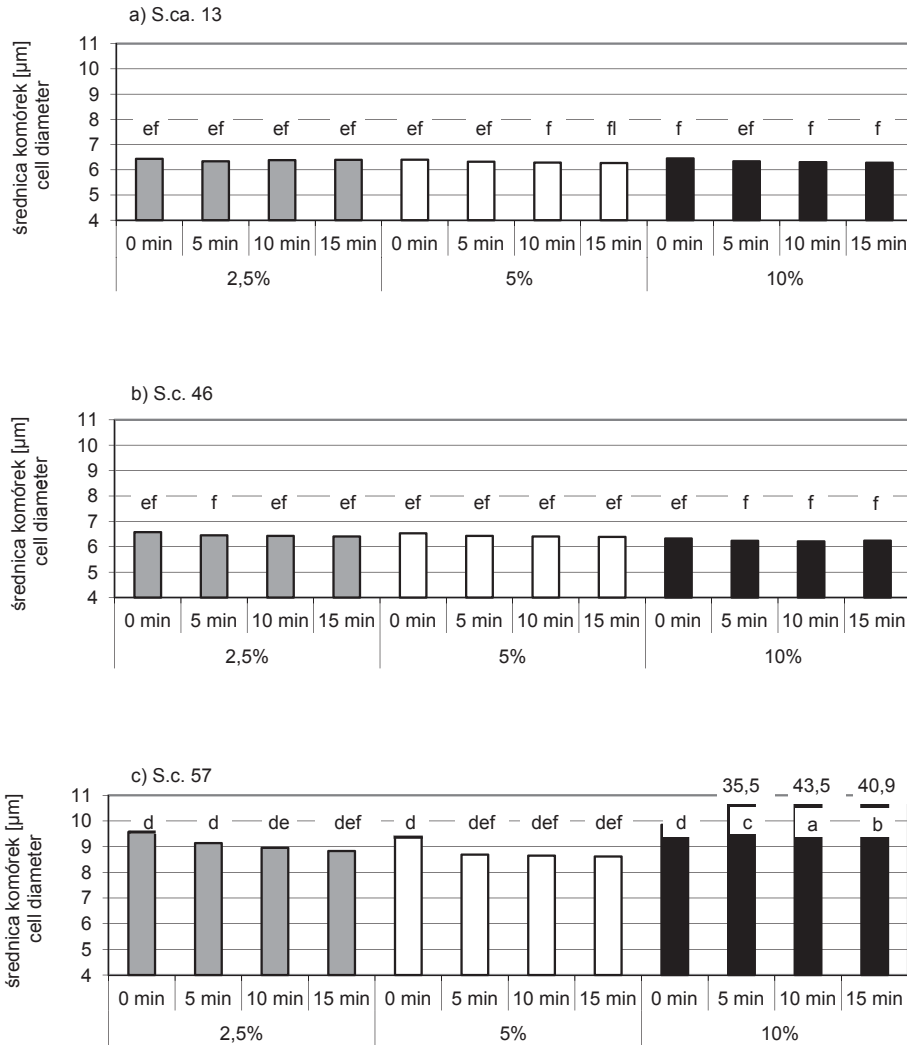
Rys. 2. Wpływ wirowania oraz czasu ekspozycji biomasy (0, 5, 10, 15 min) na średnicę  $D[4,3]$  komórek drożdży: a) S.c.a.13, b) S.c. 46, c) S.c. 57 (NIR = 0,1919)

Fig. 2. The influence of centrifugation and time of biomass exposition (0, 5, 10, 15 min.) on volume mean diameter  $D[4,3]$  of yeast cells: a) S.c.a. 13, b) S.c. 46, c) S.c. 57 (NIR = 0.1919)



Rys. 3. Wpływ stężenia roztworu glukozy (5, 10, 20%) oraz czasu ekspozycji biomasy (0, 5, 10, 15 min.) na średnicę  $D[4,3]$  komórek drożdży: a) S.ca.13, b) S.c. 46, c) S.c. 57 (NIR = 0,1232)

Fig. 3. The influence of glucose concentration (5, 10, 20%) and time of biomass exposition (0, 5, 10, 15 min.) on volume mean diameter  $D[4,3]$  of yeast cells: a) S.ca.13, b) S.c. 46, c) S.c. 57 (NIR = 0.1232)



Rys. 4. Wpływ stężenia roztworu etanolu (2.5, 5, 10%) oraz czasu ekspozycji biomasy (0, 5, 10, 15 min.) na średnicę D[4,3] komórek drożdży: a) S.ca.13, b) S.c. 46, c) S.c. 57 (NIR = 2,1329)

Fig. 4. The influence of glucose concentration (2.5, 5, 10%) and time of biomass exposition (0, 5, 10, 15 min.) on volume mean diameter D[4,3] of yeast cells: a) S.ca.13, b) S.c. 46, c) S.c. 57 (NIR = 2.1329)

Dodatkowym elementem badań było porównanie wielkości komórek drożdży wyznaczonych przy użyciu analizatora Mastersizer 2000 Malvern Instruments oraz metodą mikroskopową z wykorzystaniem śruby mikrometrycznej. Z biomasy drożdży w stacjonarnej fazie wzrostu (18–20 godz. hodowla wstrząsana w podłożu YPG) sporządzono przyżyciowy preparat mikroskopowy i dokonano pomiaru 50 losowo wybranych komórek drożdży. Równolegle dokonywano pomiaru średnicy D[4,3]. Na podstawie uzyskanych wyników

obliczono średnią objętość komórek. W przypadku metody mikrometrycznej zastosowano równanie:  $V=4/3 \Pi (a/2)^2 (b/2)$ , gdzie: a – długość krótszej osi komórki; b – długość dłuższej osi komórki [Sakai i in. 1986]. Dla pomiaru z wykorzystaniem analizatora Mastersizer 2000 zastosowano równanie:  $V=4/3 \Pi (d/2)^3$ , gdzie d – średnica D[4,3].

## WYNIKI

Badane szczepy drożdży różniły się pod względem cech morfologicznych komórek. Najmniejszą ich objętością zarówno w badaniu mikroskopowym, jak i przy użyciu analizatora Mastersizer 2000 charakteryzowały się drożdże I-S.ca.13 (tab.1). Komórki drożdży I-S.c.57 były większe od drożdży I-S.ca.13 oraz I-S.c.46, ponadto w obrazie mikroskopowym tego szczepu obserwowano liczne skupiska komórek. Objętość komórek drożdży wyliczona na podstawie średnicy D[4,3] była znacznie mniejsza od objętości wyznaczonej poprzez pomiar mikroskopowy. Warto podkreślić, że pomiarem laserowym objęte były wszystkie obiekty znajdujące się w celi pomiarowej, natomiast w badaniu mikroskopowym mierzono wybrane, na ogół dojrzałe, komórki drożdży.

Podstawowym celem prowadzonych badań była próba doboru cieczy do dyspersji biomasy drożdży przed podaniem jej do celi pomiarowej analizatora Mastersizer 2000. Poszukiwano medium, które w najmniejszym stopniu wpływa na wielkość komórek podczas pomiaru. Stwierdzono, że komórki drożdży I-S.ca.13 oraz I-S.c.46 zachowywały się podobnie w zastosowanych mediach dyspersyjnych (rys. 1a i 1b). Średnica D[4,3] komórek tych szczepów była porównywalna i nie zmieniała się istotnie w ciągu całego okresu ekspozycji w wodzie destylowanej oraz w podłożu YPG. Drożdże obydwu szczepów wykazywały także podobną średnicę tuż po przeniesieniu ich do roztworu soli fizjologicznej. Jednak w miarę upływu czasu średnica zmniejszała się, zwłaszcza u drożdży I-S.ca.13. Komórki szczepu I-S.c.57 wykazywały zróżnicowaną średnicę w wodzie destylowanej (rys. 1c). Po 5 min ekspozycji w wodzie średnica zwiększyła się, po 10 min malała i ponownie zwiększyła się w końcowym etapie oznaczenia. W roztworze soli fizjologicznej komórki tego szczepu zmniejszyły swoją średnicę w ciągu pierwszych 5 min, a następnie utrzymały ją na stałym poziomie do końca pomiaru. Natomiast w podłożu YPG średnica komórek drożdży I-S.c.57 zmniejszała się istotnie w miarę wydłużania czasu ekspozycji.

Tabela 1. Rozmiary komórek drożdży piwowarskich wyznaczone metodą mikrometryczną oraz przy użyciu laserowego analizatora wielkości cząstek Mastersizer 2000

Table 1. Cell size of brewing yeast calculated with micrometric method and with the use of Mastersizer 2000 particle size analyzer

Drożdże Yeast	Pomiar mikrometryczny Measurement with micrometer			Pomiar laserowy Measurement with laser size analyzer	
	Krótsza oś [μm] Shorter axis	Dłuższa oś [μm] Longer axis	Objętość komórki [μm <sup>3</sup> ] Cell volume	Średnica D[4,3] [μm] Diameter D[4,3]	Objętość komórki [μm <sup>3</sup> ] Cell volume
	I-S.ca.13	7,2	9,6	260	6,54
I-S.c.46	7,4	11,1	325	6,64	153
I-S.c.57	8,3	12,5	397	7,15	191

Tabela 2. Porównanie objętościowego rozkładu wielkości komórek drożdży [%] po zawieszeniu w różnych mediach dyspersyjnych

Table 2. Comparison of volume distribution of yeast cell size [%] after dispersion in different media

Drożdże Yeast	Medium	Zakresy wielkości komórek Range of cell size					
		0–2 $\mu\text{m}$	2–5 $\mu\text{m}$	5–10 $\mu\text{m}$	10–20 $\mu\text{m}$	20–40 $\mu\text{m}$	> 40 $\mu\text{m}$
I-S.ca.13	H <sub>2</sub> O	0	27,0	66,9	6,1	0	0
	0,9% NaCl	0	27,2	67,5	5,3	0	0
	YPG	0	26,9	67,8	5,3	0	0
I-S.c.46	H <sub>2</sub> O	0	24,8	68,3	6,9	0	0
	0,9% NaCl	0	27,3	67,5	5,2	0	0
	YPG	0	27,4	67,6	5,2	0	0
I-S.c.57	H <sub>2</sub> O	0	24,3	46,5	24,4	4,7	0,1
	0,9% NaCl	0	23,7	44,4	25,1	6,7	0,1
	YPG	0	23,5	44,5	25,4	6,5	0,1

Tabela 3. Porównanie objętościowego rozkładu wielkości komórek drożdży [%] po zawieszeniu w roztworach glukozy lub etanolu

Table 3. Comparison of volume distribution of yeast cell size [%] after dispersion in glucose or ethanol solutions

Drożdże Yeast	Medium	Zakresy wielkości komórek Range of cell size						
		0–2 $\mu\text{m}$	2–5 $\mu\text{m}$	5–10 $\mu\text{m}$	10–20 $\mu\text{m}$	20–40 $\mu\text{m}$	> 40 $\mu\text{m}$	
I-S.ca.13	Glukoza Glucose	5%	0	28,5	64,8	6,7	0	0
		10%	0	32,8	63,4	3,8	0	0
		20%	0	40,7	55,8	3,5	0	0
	Etanol Ethanol	2,5%	0	26,9	67,0	6,2	0	0
		5%	0	27,0	67,3	5,7	0	0
		10%	0	26,3	67,7	6,1	0	0
I-S.c.46	Glukoza Glucose	5%	0	27,2	67,6	5,2	0	0
		10%	0	30,6	65,1	4,3	0	0
		20%	0	39,8	56,3	3,9	0	0
	Etanol Ethanol	2,5%	0	24,6	68,4	7,0	0	0
		5%	0	24,5	69,1	6,4	0	0
		10%	0	26,6	68,9	4,6	0	0
I-S.c.57	Glukoza Glucose	5%	0	21,4	45,6	27,2	5,6	0,2
		10%	0	24,1	46,4	23,8	5,3	0,4
		20%	0	30,1	42,1	22,1	5,4	0,3
	Etanol Ethanol	2,5%	0	21,8	44,7	26,3	7,2	0,1
		5%	0	22,0	44,7	26,5	6,9	0
		10%	0	21,4	43,6	26,9	7,9	0,3



W tabeli 2 przedstawiono wyniki objętościowego rozkładu wielkości komórek (w sześciu zakresach wielkości) tuż po ich rozproszeniu w poszczególnych cieczach. Niezależnie od rodzaju medium rozkład wielkości komórek drożdży I-S.ca.13 oraz I-S.c.46 był podobny. Zaledwie 5–6% całkowitej objętości komórek tych dwóch szczepów dotyczyło obiektów o średnicy 10–20  $\mu\text{m}$ . W żadnym z badanych środowisk nie stwierdzono obiektów większych niż 20  $\mu\text{m}$ . Z kolei szczep I-S.c. 57 miał znacznie mniejszy udział objętości komórek w zakresach średnicy 2–5 i 5–10  $\mu\text{m}$  oraz blisko 5-krotnie większy udział objętości w zakresie 10–20  $\mu\text{m}$ . W przypadku tego szczepu, we wszystkich mediach dyspersyjnych, występowały obiekty o wielkości 20–40  $\mu\text{m}$  (ok. 4,7–6,5% objętości) oraz cząstki o średnicy powyżej 40  $\mu\text{m}$  (0,1%).

Kolejnym etapem badań było określenie wpływu procesu wirowania biomasy przed wprowadzeniem ich do medium dyspersyjnego na średnicę komórek. Komórki wszystkich badanych szczepów drożdży poddane wirowaniu wykazywały w wodzie destylowanej istotnie mniejszą średnicę  $D[4,3]$  w porównaniu z komórkami biomasy nie wirowanej (rys. 2). Ponadto, odwirowane komórki szczepu I-S.c.57 zmniejszały się podczas całego okresu pomiarowego.

Podsumowując, największą wrażliwość na zastosowane media dyspersyjne oraz proces wirowania wykazał szczep I-S.c.57. Szczep ten odróżniał się od dwóch pozostałych większym rozmiarem komórek, odmiennym rozkładem objętości, wskazującym na obecność zespołów komórek w formie kłaczków. Spośród przebadanych płynów najmniejszy wpływ na średnicę komórek drożdży miała woda destylowana. Czas ekspozycji w wodzie nie zmieniał średnicy komórek drożdży I-S.ca.13 oraz I-S.c.46. Przyjęto więc, że do badania wielkości komórek drożdży przy użyciu analizatora wielkości cząstek Mastersizer 2000 nie należy wirować biomasy, można ją wprowadzić do wody destylowanej, pobierając materiał z podłoża hodowlanego lub fermentacyjnego, a pomiaru dokonywać bezpośrednio po dyspersji.

Ważnym elementem doświadczenia była ocena reakcji komórek drożdży w warunkach stresu osmotycznego i etanolowego, czyli po zawieszeniu w roztworach wodnych glukozy (5, 10 i 20% wag) lub etanolu (2,5, 5 i 10% obj.). Stwierdzono, że zastosowane medium oraz jego stężenie miało istotny wpływ na średnicę komórek. Wszystkie badane szczepy drożdży zmniejszały swoje rozmiary w miarę wzrostu stężenia glukozy, przy czym reakcja komórek była zauważalna tuż po dyspersji (rys. 3). Drożdże I-S.ca.13 oraz I-S.c.46 reagowały szczególnie na 20% roztwór glukozy. Z kolei szczep I-S.c.57 wykazał znaczącą wrażliwość w 10% roztworze. Średnica komórek drożdży zmniejszała się istotnie w ciągu 10 minut ekspozycji, po tym czasie wielkość komórek na ogół stabilizowała się. Może to wskazywać na przystosowanie się drożdży do środowiska zasobnego w podstawowe źródło węgla.

W tabeli 3 przedstawiono wyniki analizy objętościowego rozkładu wielkości komórek drożdży tuż po ich dyspersji w roztworach glukozy lub etanolu. Udział objętości komórek I-S.ca.13 oraz I-S.c.46 o średnicy 2–5  $\mu\text{m}$  zwiększył się z ok. 28% w 5% roztworze glukozy do ok. 40% w roztworze 20%. Nastąpiło to kosztem komórek większych zarówno z przedziału 5–10, jak i 10–20  $\mu\text{m}$ . Drożdże I-S.c.57 zachowywały się podobnie, z tym że objętościowy rozkład wielkości komórek był bardziej rozproszony. Był on porównywalny z tym, jaki obserwowano po dyspersji biomasy w wodzie destylowanej, soli fizjologicznej oraz podłożu YPG.

Komórki drożdży I-S.ca.13 oraz I-S.c.46 zachowywały swoje rozmiary w 2,5 i 5% obj. roztworach etanolu (rys. 4). W 10% roztworze wystąpiło zmniejszenie średnicy komórek po 5 i 10 min ekspozycji. Komórki szczepu I-S.c.57 zmniejszały swoje rozmiary w miarę upływu czasu już przy stężeniu etanolu na poziomie 2,5% obj. Kurczenie się komórek postępowo w 5% roztworze. Zastosowanie 10% roztworu etanolu wywołało prawdopodobnie zjawisko flokulacji komórek szczepu I-S.c.57, ponieważ średnia wartość średnicy zwiększyła się do 9,8  $\mu\text{m}$  tuż po zawieszeniu komórek oraz do ok. 35–44  $\mu\text{m}$  po 5–15 min ekspozycji. Analiza rozkładu wykazała wzrost udziału obiektów o średnicy powyżej 40  $\mu\text{m}$  z 0,3 do 18–25%.

## DYSKUSJA

Ocena właściwości drożdży wykorzystywanych w procesach biotechnologicznych uwzględnia wiele aspektów, w tym także cechy morfologiczne komórek. Kształt i rozmiar komórki może nieść informację o stadium wzrostu i jej zdolności do pączkowania. Celem wielu badań jest m.in. wyjaśnienie mechanizmów regulacji wielkości komórek w różnych fazach cyklu życiowego [Bryan i in. 2010, Turner i in. 2012]. Okazuje się np., że rozmiar komórki jest czynnikiem limitującym ilość cykli replikacyjnych, a tym samym długość jej życia [Yang i in. 2011, Zadrag-Tecza i in. 2009].

Na rozmiar komórek mają wpływ czynniki zewnętrzne. Drożdże w różnych środowiskach odznaczają się określoną wielkością komórek, a pod wpływem różnorodnych czynników, w tym czynników stresowych, zdolne są do zmiany swoich rozmiarów. Warunki stresowe są typowe dla fermentacji stężonych brzeczek piwowskich (High Gravity Brewing). Dlatego też pomiar średnicy komórek może być pomocny przy opisywaniu stanu fizjologicznego drożdży oraz przebiegu i efektów fermentacji brzeczki piwowskiej.

Przeprowadzone badania własne dotyczyły oceny możliwości wykorzystania laserowego analizatora wielkości cząstek Mastersizer 2000 (Malvern Instruments) do badania średnicy komórek drożdży piwowskich. Rywińska i in. [2005] potwierdzili przydatność tego urządzenia do charakterystyki populacji drożdży *Yarrowia lipolytica* w czasie długoterminowej biosyntezy kwasu cytrynowego.

W prezentowanej pracy uwagę skupiono na doborze parametrów pomiaru, zakładając, że średnica komórek drożdży może się zmieniać po ich przeniesieniu z naturalnego środowiska wzrostowego lub fermentacyjnego do środowiska, w którym dokonywany jest pomiar. Dlatego też w celu ustalenia najlepszych warunków oznaczenia wykorzystano różne cieczy dyspersyjne oraz różny czas ekspozycji.

Spośród zastosowanych płynów najmniejszy wpływ na średnicę komórek badanych szczepów drożdży wywierała woda destylowana oraz podłoże YPG – takie, jakie stosowano do przygotowania biomasy. Uznano zatem, iż do pomiaru średnicy komórek drożdży przy użyciu laserowego analizatora wielkości cząstek możliwe i wystarczające jest stosowanie wody destylowanej jako cieczy dyspersyjnej. Jest to rozwiązanie, które nie podnosi znacząco kosztów oznaczenia, co jest ważne przy wykonywaniu serii pomiarów (na jedną próbę trzeba przygotować ok. 800 ml cieczy). Zawieszenie biomasy drożdży bezpośrednio pobranej ze środowiska hodowlanego oraz wykonywanie pomiaru tuż po dyspersji komórek upraszcza i skraca procedurę oznaczenia i daje możliwość uzyskania powtarzalnych wyników.

W dalszej części pracy badano, w jaki sposób zmienia się wielkość komórek drożdży po przeniesieniu ich do środowiska wywołującego zjawisko stresu komórkowego. Wraz ze wzrastającym stężeniem glukozy średnica komórek wszystkich badanych szczepów drożdży ulegała zmniejszeniu. Wyniki te były zgodne z wynikami Morrisa i in. [1986], którzy wykazali, że wzrost ciśnienia osmotycznego środowiska powoduje kurczenie się komórek drożdży oraz z wynikami Cahilla i in. [2000], którzy obserwowali zmniejszanie się rozmiarów komórek wystawionych na działanie różnych stężeń czynników wywołujących stres osmotyczny. Tego typu reakcja była odpowiedzią drożdży na zmiany ciśnienia osmotycznego. W warunkach stresu hipertonicznego komórki zmniejszają, a w warunkach hypotonicznych zwiększają swoją wielkość, co jest wynikiem próby zrównoważenia wewnątrzkomórkowego stężenia substancji ze stężeniem tej substancji w środowisku zewnętrznym [Morris i in. 1986]. Odbywa się to poprzez utratę wody z komórki lub pobieranie jej ze środowiska zewnętrznego. Według Pratt i in. [2003] podwyższone ciśnienie osmotyczne powoduje nie tylko skurczenie się komórek drożdży, zmienia także normalny, gładki, sferyczny bądź owalny kształt komórki na skręcony albo pofałdowany. Ponadto stres osmotyczny zakłóca metabolizm drożdży oraz pogarsza ich żywotność.

Stres etanolowy, podobnie jak stres osmotyczny, wpływa niekorzystnie na komórkę drożdży. Etanol ujawnia swe destrukcyjne działanie zarówno na poziomie metabolizmu wewnątrzkomórkowego, wywołując zakłócenia w organizacji struktury chemicznej i funkcji biologicznej błon komórkowych, jak również na poziomie vitalności, przyczyniając się do obniżenia żywotności i objętości komórek drożdżowych [Antkiewicz i Poreda 2003].

W badaniach własnych nie wykazano istotnego wpływu 2,5, 5 i 10% obj. roztworów etanolu na średnicę komórek drożdży I-S.ca.13 oraz I-S.c.46. Natomiast w przypadku drożdży I-S.c.57 efekt oddziaływania etanolu był widoczny. Wydłużenie czasu ekspozycji komórek tego szczepu w roztworze etanolu o stężeniu 2,5 i 5% obj. powodowało zmniejszanie się ich średnicy, co mogło być związane z próbą przystosowywania się drożdży do nowego środowiska. Pratt i in. [2003] wykazali, że wystawienie drożdży na działanie stresu etanolowego (10% obj. r-r etanolu) przez 15 min wywołuje kurczenie się komórek, powoduje ponadto istotne zmiany w kształcie i właściwościach komórek.

Podczas ekspozycji drożdży I-S.c.57 w 10% obj. roztworze etanolu prawdopodobnie doszło do flokulacji komórek, na co wskazywały wysokie wartości średnicy  $D[4,3]$  oraz fakt, że 18–25% objętości badanej biomasy tworzyły obiekty o średnicy powyżej 40  $\mu\text{m}$ . Etanol wymieniany jest w literaturze jako czynnik indukujący flokulację drożdży [Kamada i Murata 1984]. Mechanizm odpowiedzialny za wpływ etanolu na flokulację nie jest dokładnie poznany, ale uważa się, że może on działać jak surfaktant [Suzzi 1996]. Adsorpcja etanolu może również modyfikować układ i właściwości powierzchniowych polimerów. Dengis i in. [1995] wykazali, że drożdże fermentacji górnej i dolnej nie ulegały flokulacji pod wpływem etanolu w fazie wzrostu wykładniczego. Etanol nie miał także wpływu na flokulację szczepów dolnej fermentacji w fazie stacjonarnej. Natomiast w przypadku szczepów fermentacji górnej flokulacja była indukowana już przy stężeniu 5%obj. etanolu. Drożdże I-S.c.57 są szczepem górnej fermentacji o silnych skłonnościach do flokulacji.

Podsumowując, na podstawie przeprowadzonych badań uznano, że analizator Mastersizer 2000 może być przydatny do obserwacji zmian rozmiarów komórek, zwłaszcza tych, które występują jako komórki osobne, tj. nie wykazują zdolności tworzenia zespo-

łów komórek, w tym kłaczków. Proponowana metoda jest szybka, zaś przygotowanie próbek do pomiaru proste – wymaga jedynie zawieszenia badanej biomasy w wodzie. To najkorzystniejsze i najtańsze środowisko do pomiaru średnicy objętościowej komórek.

W dalszych badaniach planowane jest wykorzystanie laserowego analizatora wielkości cząstek do oceny stanu fizjologicznego drożdży piwowarskich podczas wzrostu i fermentacji w podłożach modelowych.

## WNIOSKI

1. Analizator wielkości cząstek Mastersizer 2000 może być przydatny do obserwacji zmian rozmiarów komórek drożdży piwowarskich występujących w postaci komórek osobnych.

2. Najkorzystniejszym środowiskiem do pomiaru średnicy komórek drożdży jest woda destylowana.

3. Średnicę komórek należy wyznaczać bezpośrednio po zawieszeniu biomasy w cieczy dyspersyjnej.

4. Komórki drożdży zmniejszyły swoje rozmiary w miarę wzrostu stężenia roztworu glukozy lub etanolu.

5. Badane szczepy drożdży różniły się pod względem zachowania w zastosowanych mediach. Największą wrażliwość na warunki środowiska wykazał szczep górnej fermentacji *S. cerevisiae* I-S.c. 57.

## PIŚMIENNICTWO

- Antkiewicz P., Poreda A., 2003. Zdolność adaptacji drożdży piwowarskich w warunkach zmiennego natężenia czynników stresowych. *Agro Przemysł*, 4, 26–27.
- Boyd A.R., Gunasekera T.S., Attfield P.V., Simic K., Vincent S.F., Veal D.A., 2003. A flow-cytometric method for determination of yeast viability and cell number in a brewery. *FEMS Yeast Research*, 3, 11–16.
- Bryan A.K., Goranov A., Amon A., Manalis S.R., 2010. Measurement of mass, density, and volume during the cell cycle of yeast. *PNAS*, 107(3), 999–1004.
- Cahill G., Murray D. M., Walsh P. K., Donnelly D., 2000. Effect of the concentration of propagation wort on yeast cell volume and fermentation performance. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 58, 219–280.
- Dengis P.B., Nélisten L.R., Rouxhet P.G., 1995. Mechanisms of yeast flocculation: comparison of top- and bottom-fermenting strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61(2), 718–728.
- Hutter K.J., Miedl M., Kuhmann B., Nitzsche F., Bryce J.H., Stewart G.G., 2005. Detection of proteinases in *Saccharomyces cerevisiae* by flow cytometry. *J. Inst. Brew.*, 111(1), 26–32.
- Kamada K., Murata M., 1984. On the mechanism of brewers yeast flocculation. *Agric. Biol. Chem.*, 48, 2423–2433.
- Kordialik-Bogacka E., 2007. Metody fluorescencyjne w ocenie jakości drożdży. *Materiały XII Szkoły Technologii Fermentacji – Piwowarstwo w Unii Europejskiej*, Wrocław-Kliczków 2007, 44–45.
- Misiewicz A., Czuba J., 2005. Charakterystyka i różnicowanie drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. *Cz. I. Metody tradycyjne. Prace Instytutów i Laboratoriów Badawczych Przemysłu Spożywczego*, t. 60, 7–19.

- Morris G.J., Winters L., Coulson G.E., Clarke K.J., 1986. Effect of osmotic stress on the ultrastructure and viability of the yeast. *J. Gen. Microbiol.*, 132(7), 2023–2034.
- Pratt L.P., Bryce H.J., Steward G.G., 2003. The effects of osmotic pressure and ethanol on yeast viability and morphology. *J.Inst.Brew.*, 109 (3), 218–228.
- Rzędowska H. (red.), 1969. Katalog kultur drobnoustrojów przemysłowych. WNT, Warszawa.
- Sakai T., Koo K., Saitoh K., 1986. Use the protoplast fusion for the development rapid starch-fermenting strains of *Saccharomyces diastaticus*. *Agric.Biol.Chem.*, 50(2), 297–306.
- Suzzi G., 1996. Flokulacja drożdży, Materiały I Szkoły Technologii Fermentacji – Drożdże w technologii fermentacji. Wrocław, 261–277.
- Materiały firmy Malvern Instruments (niepublikowane).
- Weigert C., Steffler F., Kurz T., Shellhammer T.H., Methner F.J., 2009. Application of a short intracellular pH method to flow cytometry for determining *Saccharomyces cerevisiae* vitality. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75(17), 5615–5620.
- Yang J., Dugrawala H., Hua H., Manukyan A., Abraham L., Lane W., Mead H., Wright J., Schneider B.L., 2011. Cell size and growth rate are major determinants of replicative lifespan. *Cell Cycle*, 10(1), 144–155.
- Turner J.J., Ewald J.C., Skotheim J.M., 2012. Cell size control in yeast. *Curr. Biol.*, 22(9), 350–359.
- Rywińska A., Rymowicz W., Żarowska B., Zięba T., Gryszkin A., 2005. Wykorzystanie laserowego analizatora cząstek do oceny stanu fizjologicznego drożdży *Yarrowia lipolytica* podczas ciągłej biosyntezy kwasu cytrynowego. *Inżynieria i Aparatura Chemiczna*, 4, 92–94.
- Zadrag-Tezca R., Kwolek-Mirek M., Bartosz G., Bilinski T., 2009. Cell volume as a factor limiting the replicative lifespan of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biogerontology*, 10(4), 481–488.

## EVALUATION OF MEASUREMENT OF BREWING YEAST DIAMETER CAPABILITIES WITH THE USE OF LASER PARTICLE SIZE ANALYZER

**Abstract.** The use of Mastersizer 2000 particle size analyzer for determination of brewing yeast volume mean diameter was examined. It seems that the best way of cell size measurement is to transfer a biomass sample directly from the growth or fermenting media to the distilled water as a dispersant. The analyzer can be useful to observe cell size changes in the conditions of osmotic or ethanol stress.

**Key words:** brewing yeast, cell size, particle size analyzer

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 30.06.2013

Do cytowania – For citation: Foszczyńska B., Dziuba E., Chmielewska J., 2013. Ocena możliwości pomiaru średnicy komórek drożdży piwowarskich przy użyciu laserowego analizatora wielkości cząstek *Acta Sci. Pol. Biotechnol.*, 12 (2), 15–28.