

Скрининг штаммов спиртовых дрожжей для сбраживания высококонцентрированного сусла

ДАВЫДЕНКО С. Г.

ОАО «Пивоваренная компания “Балтика”, Санкт-Петербург

УСТИНОВА А.С., МЕЛЕДИНА Т.В., БАРАКОВА Н.В.

ustinova.alisa@list.ru

Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет ИТМО

Институт холода и биотехнологий

191002, Санкт-Петербург, ул. Ломоносова, 9

*Использование высококонцентрированного сусла является одним из наиболее эффективных способов интенсификации производства этанола. Однако его применение осложнено неполным выбраживанием углеводов дрожжами. Частичного решения этой проблемы можно добиться за счет правильного выбора штамма спиртовых дрожжей. Был произведен скрининг штаммов по устойчивости к осмотическому, этанольному и кислотному стрессу, а также к действию различных температур, в результате которого удалось отобрать наиболее перспективные штаммы. **Ключевые слова:** спиртовые дрожжи, скрининг, высококонцентрированное сусло.*

Screening the alcohol yeast strains for high gravity wort fermentation

DAVIDENKO S.G.

Baltika Breweries

USTINOVA A.S., MELEDINA T.V., BARAKOVA N.V.

National Research University of Information Technologies, Mechanics and Optics

Institute of Refrigeration and Biotechnologies

191002, St. Petersburg, Lomonosov str., 9

Fermentation of the high gravity wort is one of the most efficient method of ethanol production intensification. But its usage is complicated by incomplete carbohydrate utilization by yeast. This problem can be partially solved by adequate choice of the alcohol yeast strain. As a result of yeast screening by the ability to resist the osmotic, ethanol, acidic and temperatures stresses the most perspective strains were selected.

Keywords: alcohol yeast, screening, high gravity wort.

В настоящее время актуальным направлением развития спиртовой промышленности является поиск путей снижения затрат сырья и энергоресурсов. Одним из наиболее эффективных и не требующих капитальных затрат способом решения данной проблемы является использование технологии сбраживания высококонцентрированного сусла. Однако применение этой технологии осложняется проблемой неполного выбраживания углеводов сусла дрожжами. Показатель количества несброженных углеводов в зрелой бражке зависит от физиологического состояния дрожжей в процессе брожения. Во время сбраживания высококонцентрированного сусла дрожжи испытывают повышенные уровни осмотического, этанольного и кислотного стрессов. Чтобы добиться нормативных показателей зрелой бражки необходимо, чтобы дрожжи, применяемые в технологии получения спирта из высококонцентрированного сусла, выдерживали высокие концентрации сухих веществ в сусле и были устойчивыми к продуктам своей жизнедеятельности - этиловому спирту и кислотам. Повышение температуры брожения считается одним из способов интенсификации производства спирта на стадии брожения. Небольшое увеличение температуры брожения способно сократить длительность лаг-фазы и повысить бродильную активность дрожжей. Поэтому желательно, чтобы дрожжи, используемые для сбраживания высококонцентрированного сусла, были также устойчивы к повышенной температуре. Восприимчивость клетки к перечисленным факторам внешней среды является штаммовой характеристикой и определяется ферментативной системой микроорганизма [1].

Для выявления штаммов дрожжей, способных к полному выбраживанию углеводов в условиях высококонцентрированного сусла, был произведен скрининг штаммов спиртовых дрожжей, рекомендуемых производителями для сбраживания высокоплотных сред. Скрининг проводили по устойчивости к осмотическому, этанольному и кислотному стрессу, а также к действию различных температур. Для сравнения были выбраны штаммы 2, 3, 4 и 5, а также в качестве контрольного образца – штамм 1, применяемый для сбраживания сусла нормальной концентрации. Штаммы 1 и 2 были взяты из коллекции лаборатории Санкт-Петербургского государственного института управления и пищевых технологий, а штаммы 3, 4 и 5 – отобраны из сухих препаратов спиртовых дрожжей зарубежного производства.

Скрининг был произведен методом посева серии последовательных разведений суспензий культур с помощью репликатора [2]. Концентрация исходной суспензии дрожжей составляла 10^7 кл/мл. Были приготовлены образцы четырех последовательных десятикратных разведений исходной суспензии для каждого штамма. Также были приготовлены питательные среды на основе сусла-агара (концентрация сухих веществ в сусле - 12%, концентрация агара - 3%).

На поверхности питательных сред, разлитых в чашки Петри, были сделаны отпечатки полученных образцов суспензий с помощью штампа-репликатора. После этого чашки Петри с культурами инкубировали в термостате при температуре 30 °С. Тест на устойчивость к температуре проводили при 10, 25, 37, 41 и 48 °С. Устойчивость или чувствительность штаммов к действию исследуемых факторов оценивали по количеству и размеру колоний, выросших на отпечатках репликатора, соответствующих разведениям.

Тест на спиртоустойчивость. Для определения устойчивости штаммов дрожжей к действию этанола были приготовлены питательные среды с добавлением этилового спирта до достижения концентрации 4, 6, 8, 10, 12 и 16 об. %. Образец без

добавления спирта использовался в качестве контрольного. После инкубации образцов в течение 72 часов на месте отпечатков штампа-репликатора выросли колонии дрожжей, фотографии которых представлены на рисунке 1. Спиртоустойчивость штаммов оценивали по количеству и размеру колоний, выросших на отпечатках репликатора.

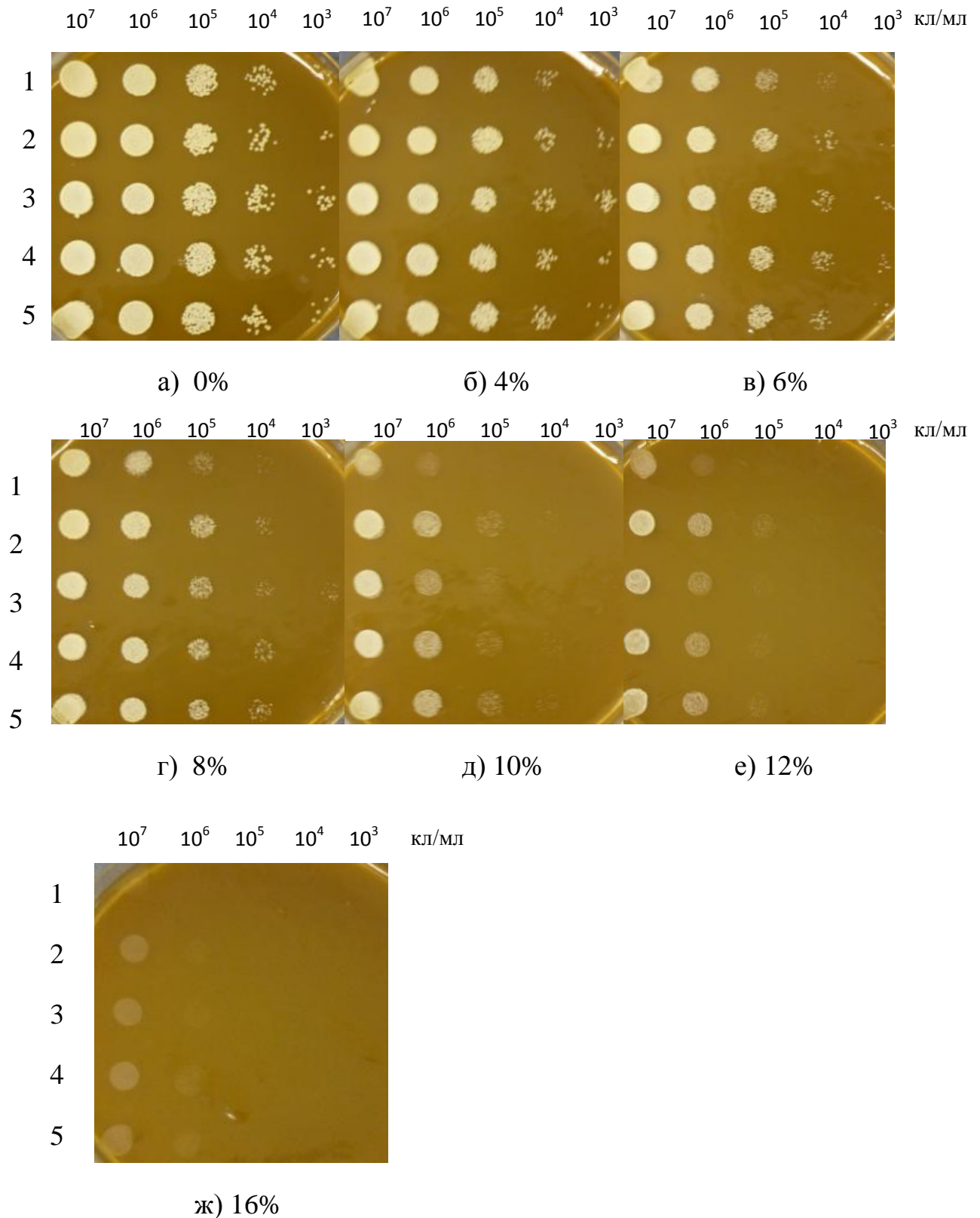


Рис.1 Фотографии колоний штаммов спиртовых дрожжей, выросших на отпечатках репликатора (а-ж – среды с различной концентрацией этанола)

Из рисунка 1 видно, что наиболее чувствительным к действию этанола оказался спиртовой штамм 1. Остальные штаммы были более устойчивы к спирту и дали практически одинаковые результаты. Однако, следует отметить, что колонии штаммов 2, 4 и 5 на высоких концентрациях спирта были более четко выраженными. Поэтому их можно считать более устойчивыми к действию этанола по сравнению с другими штаммами.

Тест на осмоустойчивость. Для определения устойчивости штаммов дрожжей к высоким уровням осмотического давления со стороны окружающей среды были приготовлены питательные среды с добавлением глицерина до достижения концентрации 2,5; 5,0 и 10,0% . Образец без добавления глицерина использовался в качестве контрольного. После инкубации образцов в течение 72 часов на месте отпечатков штампа-репликатора выросли колонии дрожжей, фотографии которых представлены на рисунке 2.

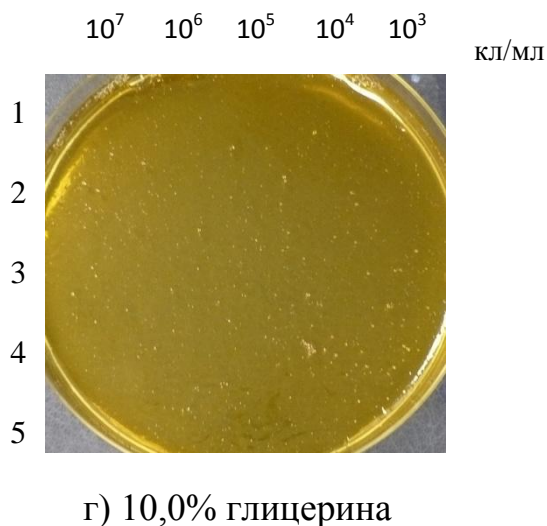
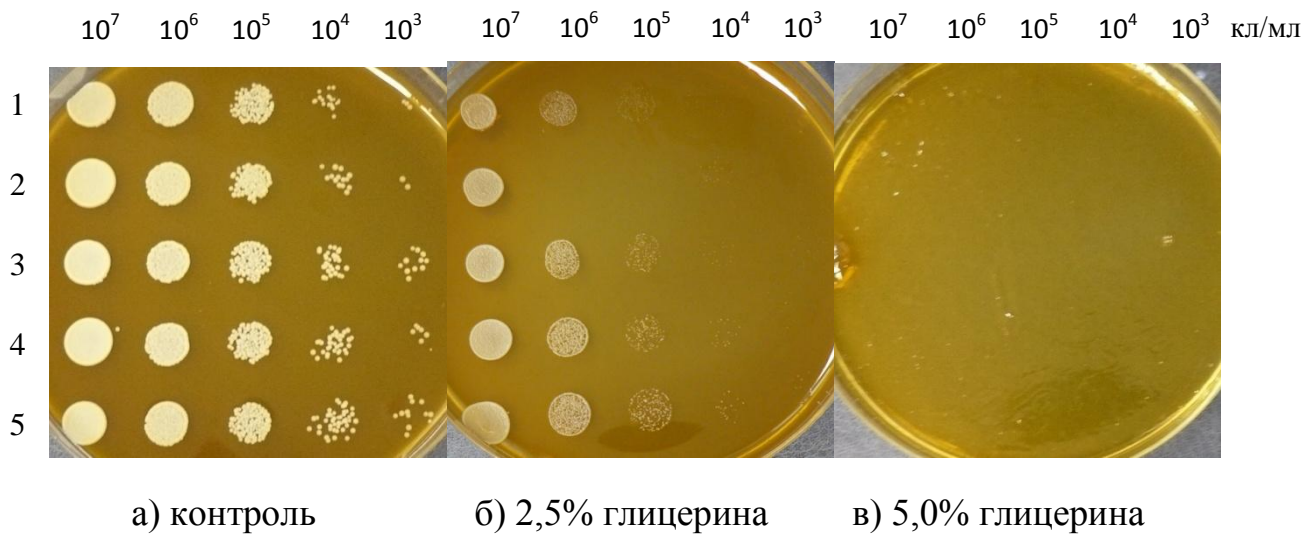


Рис.2 Фотографии колоний штаммов спиртовых дрожжей, выросших на отпечатках репликатора (а-г – среды с различной концентрацией глицерина)

Осмоустойчивость штаммов оценивали по количеству и размеру колоний, выросших на отпечатках репликатора. Из рисунка 2 видно, что спиртовые дрожжи чувствительны к высоким уровням осмотического давления, и уже на среде с концентрацией глицерина 5,0% не наблюдается роста колоний. В целом из результатов можно выделить, что колонии на отпечатках всех разведений штамма 1 были более прозрачными и менее яркими по сравнению с другими образцами, что говорит о более высокой чувствительности этого штамма к осмотическому стрессу. Штамм 5, напротив, показал более высокую устойчивость к высоким концентрациям осмотически активных веществ.

Тест на устойчивость к температуре. Для определения устойчивости штаммов дрожжей к различным температурам были сделаны отпечатки репликатора на сусле-агаре. Полученные образцы инкубировали в термостате при различных температурах (10, 25, 37, 41, 48 °С) в течение 72 часов. Фотографии полученных колоний представлены на рисунке 3.

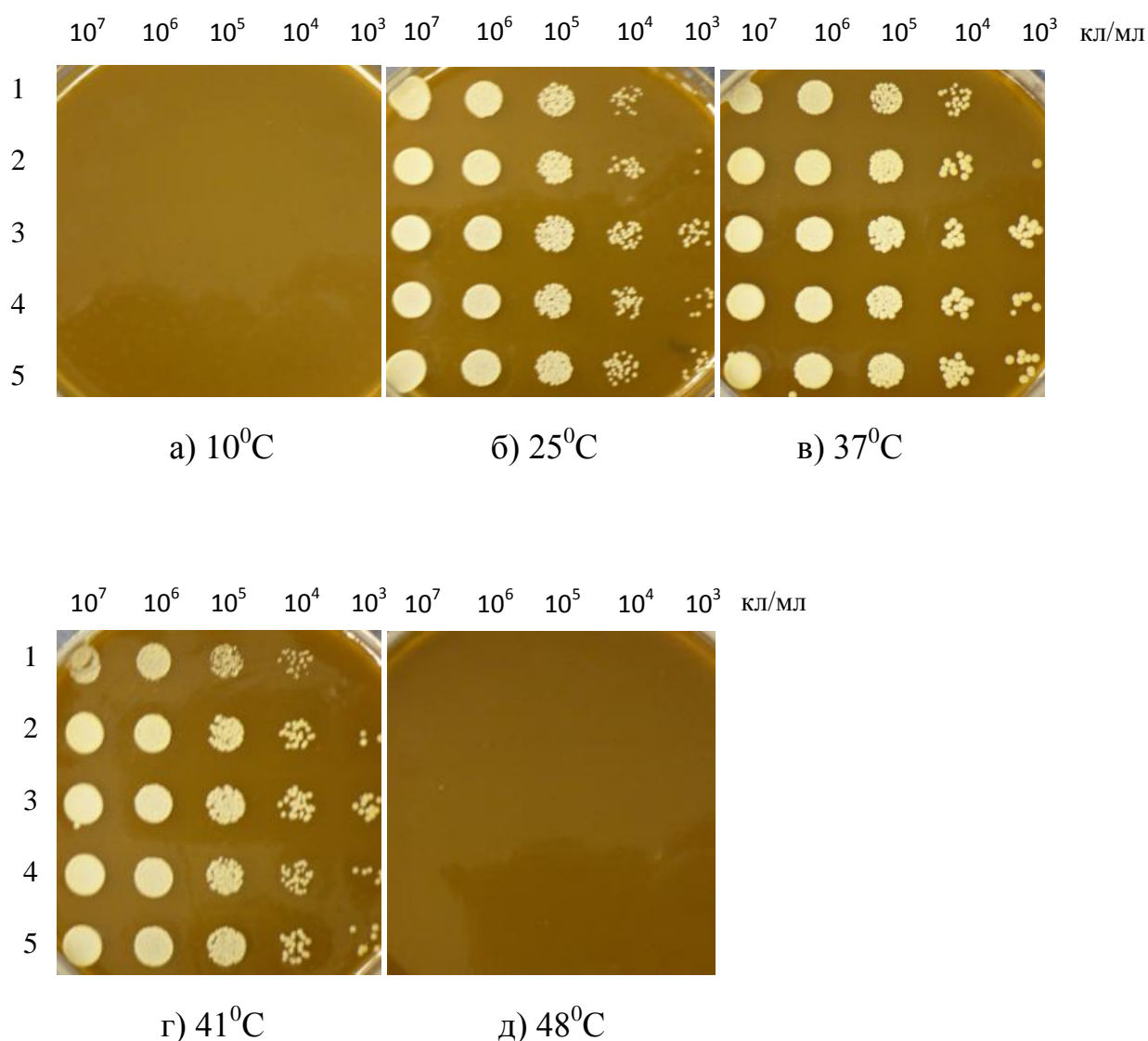


Рис.3. Фотографии колоний штаммов спиртовых дрожжей, выросших на отпечатках репликатора (а-д – колонии, выросшие в результате инкубирования при различных температурах)

Термоустойчивость штаммов оценивали по количеству и размеру колоний, выросших на отпечатках репликатора. Из фотографий видно, что при температурах 10 °С и 48 °С размножение дрожжей всех исследуемых штаммов не наблюдается, что свидетельствует об ингибировании развития клеток температурами данного уровня. При температуре 37 °С и 41 °С заметно менее активное развитие колоний штамма 1 на отпечатках, соответствующих разведениям в 100, 1000 и 10000 раз, по сравнению с другими штаммами, из чего следует сделать вывод о более высокой чувствительности данного штамма к высоким температурам. Штамм 3 можно, напротив, выделить как наиболее термоустойчивый.

Тест на устойчивость к кислоте. В результате сбраживания высококонцентрированного суслу и выделения дрожжами основных и побочных продуктов брожения, в бражке накапливаются не только высокие концентрации этанола, но и высокие концентрации органических кислот, которые могут негативно сказываться на физиологическом состоянии дрожжей. Для определения устойчивости штаммов дрожжей к химическому стрессу, вызванному повышенной кислотностью среды, были приготовлены питательные среды с добавлением соляной кислоты с концентрацией 6N в количестве 0,02 мл и 0,2 мл. Образец без добавления кислоты использовался в качестве контрольного. После инкубирования образцов в течение 72 часов на месте отпечатков штампа-репликатора выросли колонии дрожжей, фотографии которых представлены на рисунке 4.

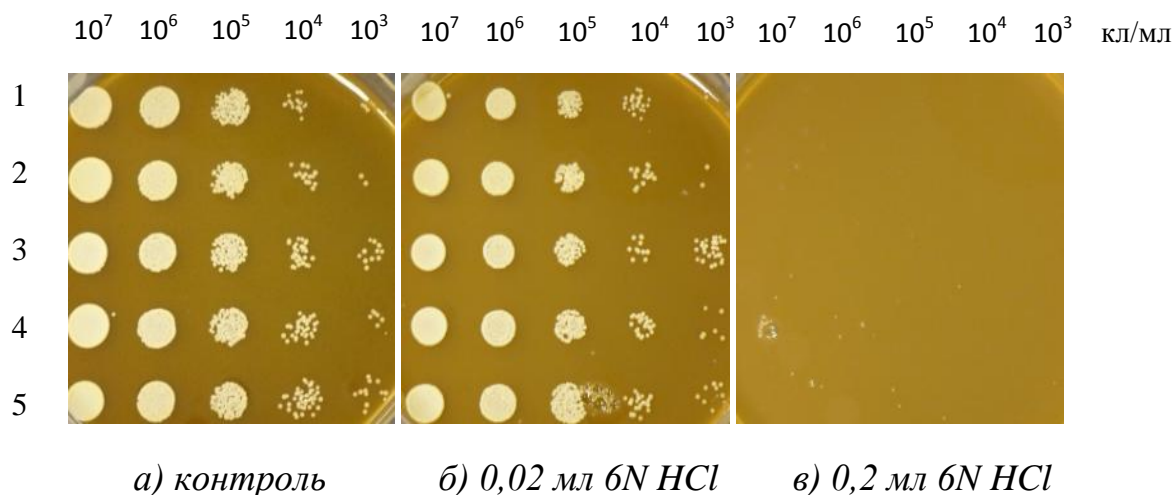


Рис.4. Фотографии колоний штаммов спиртовых дрожжей, выросших на отпечатках репликатора (а-в – колонии, выросшие на средах с различной концентрацией соляной кислоты)

Из рисунка 4 видно, что добавление 6N соляной кислоты в количестве 0,2 мл оказало губительное действие на все исследуемые штаммы, а добавление ее в количестве 0,02 мл не имело такого сильного эффекта. Штамм 3 можно выделить как наиболее устойчивый к повышенной кислотности среды.

В результате скрининга штаммов спиртовых дрожжей 1, 2, 3, 4 и 5 можно сделать следующие выводы:

- штамм 1 нельзя рекомендовать для сбраживания высококонцентрированного сусла, т.к. он обладает более высокой чувствительностью к таким факторам, как высокие концентрации этанола, высокое осмотическое давление среды, высокие температуры и концентрации кислот, по сравнению с другими исследуемыми штаммами;

- штаммы 2, 4 и 5 можно рекомендовать для сбраживания высококонцентрированного сусла, т.к. они по сравнению с другими исследуемыми штаммами обладают большей устойчивостью к наиболее важным факторам в данном аспекте, а именно к высоким концентрациям этанола и, особенно в случае 5, высокому осмотическому давлению среды;

- штамм 3 обладает большей термоустойчивостью и кислотоустойчивостью по сравнению с остальными штаммами и может быть рекомендован для интенсификации производства путем сбраживания зернового сусла при повышенных температурах.

Список литературы

1. Помозова В.А. Технология спиртового и ликеро-водочного производств: учебное пособие / Помозова В.А.; Кемеровский технологический институт пищевой промышленности. - Кемерово, 2005. - 124 с.

2. Захаров, И.А. Сборник методик по генетике дрожжей-сахаромицетов / И.А. Захаров, С.А. Кожин, Т.Н. Кожина, И.В. Федорова. – Л.: Наука, 1984 – 112