

## БРОДИЛЬНА АКТИВНІСТЬ ДРІЖДЖІВ – ПРОДУЦЕНТІВ ЕТИЛОВОГО СПИРТУ

**Анотація.** Досліджено вплив температур кріоконсервування  $-17\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  та  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  на бродильну активність штамів спиртових дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* Fermiol, Quikferm Super, VKM-Y381, 288C і вміст етилового спирту в зброджених сулах. Встановлено, що найвищу бродильну активність і найбільшу кріостійкість мав штамів спиртових дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* Fermiol. Оптимальною температурою кріоконсервування спиртових дріжджів є  $-17\text{ }^{\circ}\text{C}$ , за якої не тільки зберігається, а й підвищується їх бродильна активність.

**Ключові слова:** спиртові дріжджі, бродильна активність, кріоконсервування

**Palianytsia L., Berezovska N., Kosiv R., Pankiv N.**

## FERMENTATION ACTIVITY OF YEASTS - PRODUCERS OF ETHANOL

**Summary.** The effect of cryopreservation temperature  $-17\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  and  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  on strains of ethanol yeasts *Saccharomyces cerevisiae* Fermiol, Quikferm Super, VKM-Y381, 288C fermentation activity and content of ethanol in the fermented worts were investigated. The highest fermentation activity and the most cryoresistance had strain of ethanol yeasts *Saccharomyces cerevisiae* Fermiol. The optimum temperature of cryopreservation of ethanol yeasts is  $-17\text{ }^{\circ}\text{C}$ , which is not only preserved, but also enhanced their fermentation activity.

**Keywords:** ethanol yeasts, fermentation activity, cryopreservation.

### 1. Вступ

Одержання спирту високої якості значно залежить від біохімічної активності дріжджів, яка впливає на швидкість перебігу процесів дріжджогенерування та зброджування сула і склад побічних продуктів бродіння. На бродильну здатність дріжджів – продуцентів етилового спирту, впливають такі параметри: біосинтетична активність дріжджів та здатність адаптуватися до змін навколишнього середовища під час бродіння [5].

Спиртове бродіння представляє собою біотехнологічний процес, який залежить від життєдіяльності дріжджових клітин, що здійснюють біоконверсію зернової сировини в етанол. Тому особлива увага приділяється стану та фізіологічній активності промислових рас дріжджів, одержанню нових більш перспективних штамів [11]. Для зброджування оцукреної крохмалистої сировини використовують дріжджі *Saccharomyces cerevisiae* рас 12, 2, М, 12-Т, К-81 та *Schizosaccharomyces pombe* 80 [13].

Селекціоновані штами дріжджів, які використовують для біосинтезу етанолу, потребують ефективних способів зберігання, що забезпечували б відновлення бродильних властивостей. Відомо багато способів зберігання культур мікроорганізмів: періодичні пересіви, зберігання в 25%-му розчині гліцеролу при температурі  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , у дистильованій воді, під вазеліновою олією на агаризованому середовищі та в ліофілізованому стані. Жоден з відомих способів не є універсальним [4, 14].

Збереження ферментативної активності промислових штамів дріжджів можна забезпечувати шляхом заморожування протягом певного періоду часу. Кріоконсервування є більш перспективним, ніж інші способи зберігання мікроорганізмів [10]. Ефективність цього способу залежить від вибору режимів заморожування. Оптимальними режимами кріоконсервування для дріжджових клітин вважають повільні швидкості заморожування:  $7 - 10\text{ }^{\circ}\text{C/хв}$ . [7, 15, 16].

При охолодженні в клітині відбуваються явища виділення води у вигляді льоду; концентрування розчинів; зменшення об'єму клітини; осадження розчинених речовин [10].

Існує декілька механізмів пошкодження клітин мікроорганізмів в умовах низьких температур. За одним з них висока концентрація електроліту, яка виникає в результаті заморожування, впливає на ліпиди мембрани, порушуючи цілісність дріжджової клітини. У результаті клітини перенасичуються катіонами і піддаються підвищеному осмотичному тиску через надходження води під час заморожування [10].

За іншим механізмом пошкодження дріжджів відбувається не від концентрації електроліту, а через нездатність клітин стискатися більше, ніж на 50 % від їхнього початкового об'єму. Це створює змінний градієнт тиску на мембрану і збільшує її проникність [3].

Дослідники [12] вважають, що висока внутрішньоклітинна концентрація солей веде до пош-

кодження білків у результаті зміни показника рН всередині клітини.

Більшість досліджень підтверджують, що основні об'єкти пошкодження клітин внаслідок заморожування – мембрани. Це зумовлює інгібування мембранно-локалізованих процесів окислювального фосфорилування, а не втрату активності розчинних ферментів [3, 8, 12].

У роботах [2, 6, 8] створенню кількісній моделі кріопошкодження дріжджоподібних грибів *Saccharomyces cerevisiae* на етапі кристалізації при заморожуванні суспензії цих мікроорганізмів, яка дозво-

ляє оцінити ефективність різних режимів охолодження.

Таким чином, актуальним є створення оптимальних умов перебування дріжджових культур в екстремальних температурних режимах без значних втрат їхньої життєздатності і фізіологічної активності.

Мета роботи: дослідження впливу температур кріоконсервування  $-17\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  та  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  на бродильну активність спиртових дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* і показники зброджених сусел.

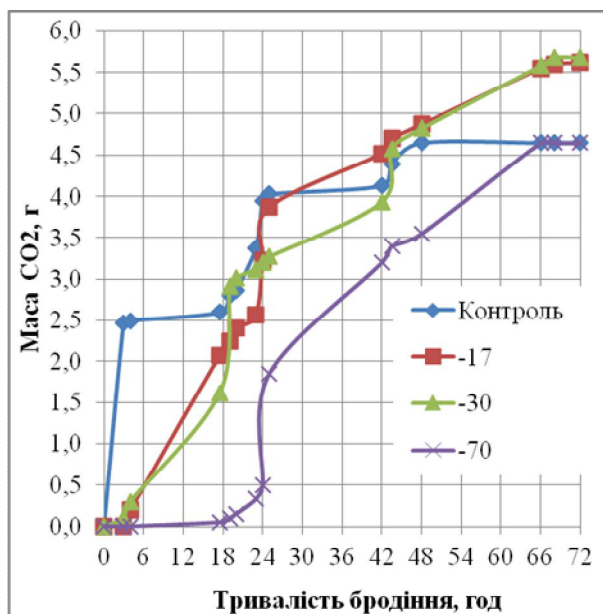


Рис. 1. Динаміка збродження суслу дріжджами штаму Fermiol після їх кріоконсервування при температурах  $-17\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$

Джерело: за результатами експериментальних досліджень

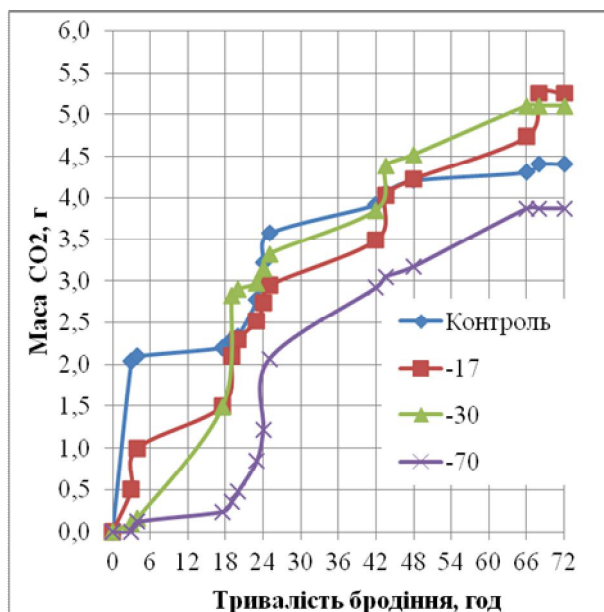


Рис. 2. Динаміка збродження суслу дріжджами штаму VKM-Y381 після їх кріоконсервування при температурах  $-17\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$

Джерело: за результатами експериментальних досліджень

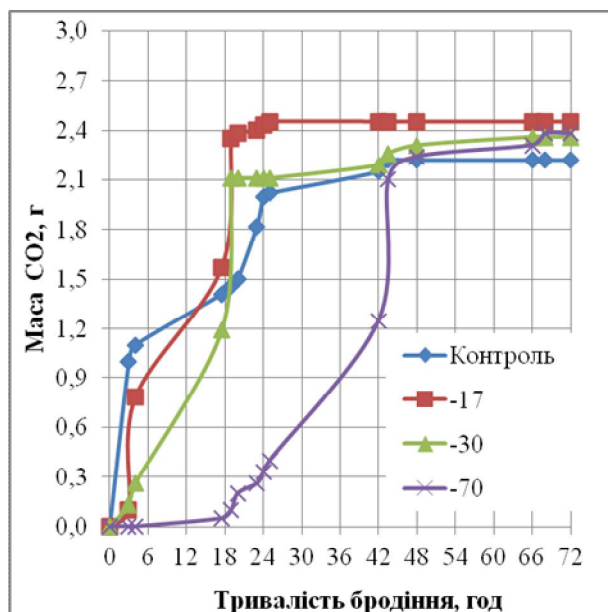


Рис. 3. Динаміка зброджування сусла дріжджами штаму 288С після їх криоконсервування при температурах –17 °С, –30 °С, –70 °С

Джерело: за результатами експериментальних досліджень

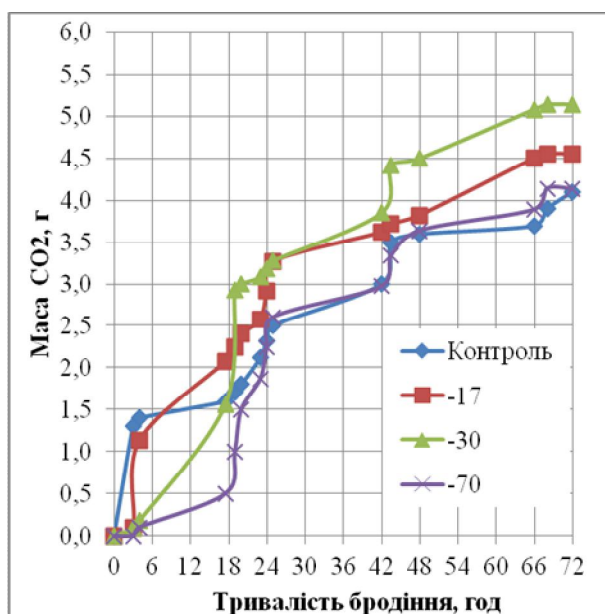


Рис. 4. Динаміка зброджування сусла дріжджами штаму Quikferm Super після їх криоконсервування при –17 °С, –30 °С, –70 °С

Джерело: за результатами експериментальних досліджень

## 2. Результати досліджень властивостей штамів спиртових дріжджів

Об'єктами досліджень були штами спиртових дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* Fermiol, Quikferm Super, VKM-Y381, 288С, вирощені у солодовому суслі концентрацією 8 % сухих речовин. Клітини дріжджів заморожували протягом 3 год. при температурі –17 °С, –30 °С та –70 °С. Відтанення здійснювали при температурі +20 °С.

Бродильну активність дріжджів досліджували методом бродильної проби при +30 °С [9]. Вміст спирту в зброженому суслі визначали пікнометрично після його дистиляції [1].

Дослідження впливу низьких температур на бродильну активність дріжджів штаму Fermiol показали, що найінтенсивніше зброжували сусло дріжджі, які заморожували при температурах –17 °С та –30 °С (рис. 1).

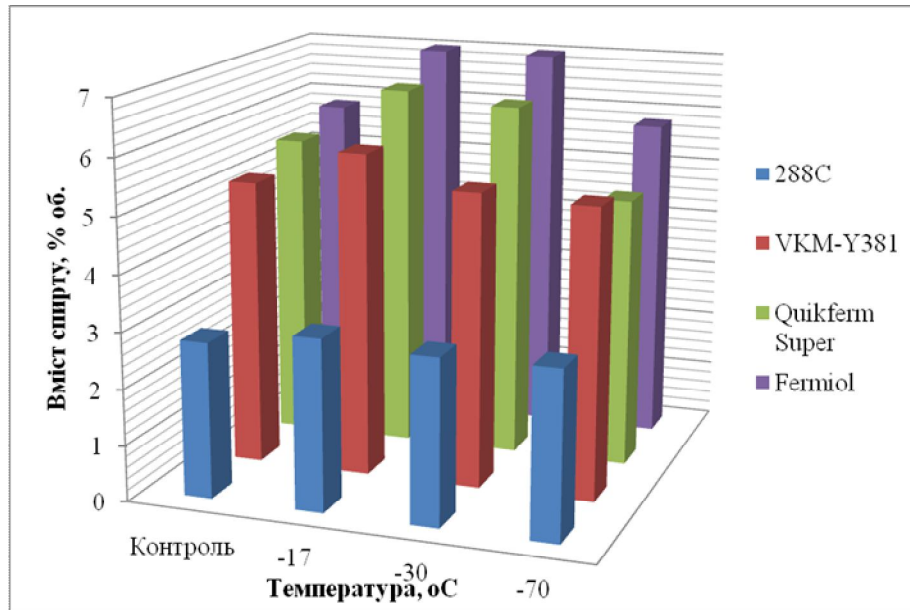


Рис. 5. Залежність вмісту етилового спирту в зброджених суслах від температури кріоконсервування

Джерело: за результатами експериментальних досліджень

Аналогічні закономірності спостерігались при дослідженні бродильних активностей дріжджів штамів VKM-Y381 і 288C (рис. 2 і 3). При цьому бродильна активність дріжджів штаму 288C усіх досліджуваних зразків була нижчою порівняно з іншими штамми спиртових дріжджів.

На відміну від досліджуваних раніше зразків дріжджів зниження температури кріоконсервування дріжджів штаму Quikferm Super від  $-17^{\circ}\text{C}$  до  $-70^{\circ}\text{C}$  (рис. 4) приводило до незначного збільшення тривалості лаг-фази.

Вміст спирту в суслах, зброджених спиртовими дріжджами після їх кріоконсервування при температурах  $-17^{\circ}\text{C}$ ,  $-30^{\circ}\text{C}$ ,  $-70^{\circ}\text{C}$ , представлено на рис. 5.

Аналіз одержаних результатів показав, що кріоконсервування усіх досліджуваних штамів спиртових дріжджів (крім штаму VKM-Y381) при  $-70^{\circ}\text{C}$  дозволяє нагромаджувати таку ж кількість етилового спирту в збродженому суслі, як у контрольному зразку. Концентрація спирту в суслах, зброджених кріоконсервованими при температурах  $-17^{\circ}\text{C}$  і  $-30^{\circ}\text{C}$  дріжджами, була вищою, ніж у контролях.

### 3. Висновки

Встановлено, що зі зниженням температури кріоконсервування усіх досліджуваних штамів дріжджів зростає тривалість лаг-фази зброджування сусел за їх участю. Проте маса виділеного  $\text{CO}_2$  в кінці зброджування сусел дріжджами, кріоконсервованими при  $-17^{\circ}\text{C}$  і  $-30^{\circ}\text{C}$ , була більша, ніж у контрольних зразках. Однакова маса вуглекислого газу виділилась при зброджуванні сусел дріжджами контрольного зразка та замороженими при  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Кріоконсервування дріжджів при  $-70^{\circ}\text{C}$  дозволяє нагромаджувати таку ж кількість етилового спирту в збродженому суслі, як у контрольному зразку. Концентрація спирту в суслах, зброджених кріоконсервованими при температурах  $-17^{\circ}\text{C}$  і  $-30^{\circ}\text{C}$  дріжджами, була вищою, ніж у контролях. Найбільший вміст спирту був у збродженому суслі, одержаному за участю консервованих при  $-17^{\circ}\text{C}$  дріжджів.

Найвищу бродильну активність і найбільшу кріостійкість мав штам спиртових дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* Fermiol.

Оптимальною температурою кріоконсервування спиртових дріжджів є  $-17^{\circ}\text{C}$ , за якої не тільки зберігається, а й підвищується їх бродильна активність.

### СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Бойко Л. М. Физико-химические методы контроля бродильных производств: справочник / Л. М. Бойко. – К.: Техніка, 1986. – 200 с.
2. Гордієнко Є. О. Удосконалена модель пасивного масопереносу крізь плазматичну мембрану клітини / Є. О. Гордієнко, О. І. Гордієнко, В. В. Марущенко, О. В. Сакун // Біофізичний Вісник. – 2008. – Вип. 21. – № 2. – С. 75-80.
3. Кашнер Д. Жизнь микробов в экстремальных условиях / Д. Кашнер. – М.: Мир, 1981. – 521 с.
4. Куплетская М. Б. Методы длительного хранения коллекции микроорганизмов кафедры микробиологии МГУ / М. Б. Куплетская, З. А. Аркадьева // Микробиология. – 1997. – Т. 66. – № 2. – С. 283-288.
5. Меледина Т. В. Физиологическое состояние дрожжей / Т. В. Меледина, С. Г. Давыденко, Л. М. Васильева. – СПб.: НИУ ИТМО, 2013. – 48 с.

6. Саун А. В. Влияние разброса скоростей охлаждения в цилиндрическом контейнере на выживаемость клеток при быстром двухступенчатом замораживании / А. В. Саун, А. Ю. Сиренко, Е. А. Гордиенко // Криоконсервация как способ сохранения биологического разнообразия: Материалы Международной научной конф. – Пушино, 2008. – Т. 9. – С. 115-116.
7. Саун О. В. Механізми кріопшкодження дріжджових грибів *Saccharomyces cerevisiae* при заморожуванні у водному розчині диметилсульфоксиду з постійною швидкістю у контейнерах циліндричної форми / О. В. Саун // Проблеми криобіології. – 2010. – Т.20. – № 1. – С. 59-65.
8. Саун О. В. Теоретична оцінка значення оптимальної з погляду двохфакторної теорії кріопшкодження швидкості охолодження при лінійних режимах заморожування клітинної суспензії / О. В. Саун, О. І. Гордієнко // Біофізичний вісник. – 2009. – Вип. 22. – № 2. – С. 63-68.
9. Слюсаренко Т. П. Лабораторный практикум по микробиологии пищевых производств / Т. П. Слюсаренко. – М.: Легкая и пищевая пром-сть, 1984. – 208 с.
10. Цуцаева А. А. Криобиология и биотехнология / А. А. Цуцаева, В. Г. Попов, К. М. Сытник. – Киев: Наук. думка, 1987. – 216 с.
11. Шиян П. Л. Іноваційні технології спиртової промисловості. Теорія і практика / П. Л. Шиян, В. В. Сосницький, С. Т. Олійничук. – К.: Вид. дім. «Асканія», 2009. – 424 с.
12. Borst-Pauwels, G. Ion transport in yeast // *Biochim. Et biophys. Acta.* – 1981. – Vol. 650. – No 2. – P. 88-127.
13. Dorofeyeva, T., Pishko, O. Integrity of Microorganisms Cells after Immobilisation in Different Gels with Following Freezing Down to  $-70^{\circ}\text{C}$  // *Problems of Cryobiology.* – 2011. – Vol. 21. – No 2. – P. 215.
14. Fernandez-Segovia, I., Escriche, A., Fuentes, A., Serra, I. Microbial and sensory changes during refrigerated storage of desalted cod (*Gadus morhua*) preserved by combined methods // *Int. J. Food Microbiol.* – 2007. – V. 116. – No 1. – P. 64-72.
15. Gehrke, H., Pralle, K., Deckwer, W. Freeze drying of microorganism. Influence of cooling rate on survival // *Food Biotechnol.* – 1992. – No 6. – P. 35-49.
16. Uzunova-Doneva, T., Donev, T. Influence of the freezing rate on the survival of strains *Saccharomyces cerevisiae* after cryogenic preservation // *Journal of culture collections.* – 2000–2002. – Vol. 3. – P. 78-83.