

pretreatment of switchgrass // Ind. Eng. Chem. Res. – 2011. – Vol. 50. – P. 4225-4230.

7. Новый справочник химика и технолога. Сырье и продукты промышленности органических и неорганических веществ. Ч. II. – СПб.: НПО «Профессионал», 2006. – С. 600.

8. Будаева В.В., Бычин Н.В., Сакович Г.В. Свойства мискантуса после обработки в реакторе высокого давления – 2009 // Ползуновский вестник. – 2010. – № 4-1. – С. 144-149.

9. Цуканов С.Н., Будаева В.В. Предобработка мискантуса китайского в условиях гидротермобарического взрыва в нейтральной среде // Ползуновский вестник. – 2010. – № 4-1. – С. 209-214.

10. Цуканов С.Н., Будаева В.В. Гидротермобарический способ получения целлюлозы из отходов злаков // Ползуновский вестник. – 2011. – № 4-1. – С. 236-239.

11. Будаева В.В., Макарова Е.И., Скиба Е.А., Сакович Г.В. Ферментативный гидролиз продуктов гидротермобарической обработки мискантуса и плодовых оболочек овса // Катализ в промышленности. – 2013. – № 3. – С. 60-66.

Чибиряев Дмитрий Андреевич, студент группы БТ-73 Бийского технологического института

АлтГТУ им. И.И. Ползунова, практикант-дипломник 2013 года в лаборатории биоконверсии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения Российской академии наук (ИПХЭТ СО РАН), chidimdogngs.ru, ул. Социалистическая, 1, Бийск, 659322, Россия. Тел. (3854) 30-59-85, факс (3854) 30-17-25.

Цуканов Сергей Николаевич, младший научный сотрудник лаборатории синтеза высокоэнергетических соединений Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения Российской академии наук (ИПХЭТ СО РАН), 7tstdogmail.ru, ул. Социалистическая, 1, Бийск, 659322, Россия. Тел. (3854) 30-14-89, факс (3854) 30-17-25.

Якушева Анна Александровна, младший научный сотрудник лаборатории биоконверсии, аспирант Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения Российской академии наук (ИПХЭТ СО РАН), Yakusheva89_21.rudogmail.ru, ул. Социалистическая, 1, Бийск, 659322, Россия. Тел. (3854) 30-59-85, факс (3854) 30-17-25.

УДК 612.015.16

ИЗУЧЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ ШТАММА *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* ВКПМ У-1693 К ФЕРМЕНТАТИВНЫМ ГИДРОЛИЗНЫМ СРЕДАМ

Е.А. Скиба, О.В. Байбакова

В статье приведены результаты по изучению устойчивости штамма Saccharomyces cerevisiae ВКПМ У-1693 к продуктам своего обмена и отсутствию питательных веществ при длительном культивировании на среде солодового сусле и дистиллированной воде. Устойчивость дрожжей к ферментативным гидролизным средам изучена методом длительного культивирования и методом пересевов. Показана высокая устойчивость штамма У-1693 и доброкачественность ферментативных водных гидролизатов технических целлюлоз мискантуса и плодовых оболочек овса.

Ключевые слова: дрожжи, штамм, устойчивость, питательная среда, ферментативный гидролизат, техническая целлюлоза, мискантус, плодовые оболочки овса, биосинтез, биоэтанол.

ВВЕДЕНИЕ

Применение микроорганизмов для получения биоэтанола является экологически чистым способом. Основным продуцентом биоэтанола в России являются дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, применяемые в производстве этилового спирта с использованием как пищевого, так и непищевого сырья.

Из литературы известно, что гидролизаты целлюлозосодержащего сырья не являются

полноценной средой для культивирования дрожжей, поскольку в них недостаточное содержание азотных и фосфорных соединений, отсутствуют витамины и стимуляторы роста, и, кроме того, в них могут содержаться различные вредные примеси, снижающие биологическую доброкачественность сред и нарушающие нормальные физиологические функции дрожжей (например, фурфурол, оксиметилфурфурол, формальдегид, лигногуминовые вещества).

Спиртообразующие расы дрожжей должны быстро накапливать максимальное количество этилового спирта, используя при этом все сбраживаемые сахара среды, сбраживать сахара в возможно короткий промежуток времени, быть устойчивыми к посторонней микрофлоре, быть стойкими к своим продуктам обмена и неблагоприятным условиям внешней среды [1-3].

Целью данной работы являлось изучение устойчивости дрожжей к ферментативным гидролизным средам, полученных ферментализмом технических целлюлоз мискантуса и плодовых оболочек овса.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объектом исследований являлся штамм *Saccharomyces cerevisiae* Y-1693 Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (г. Москва). Штамм был выделен из ферментера Котласского целлюлозно-бумажного комбината и использовался для производства этанола на гидролизатах древесины. Особенностью штамма является его устойчивость к вредным примесям гидролизатов.

С целью изучения устойчивости штамма к продуктам собственного обмена и отсутствию в среде питательных веществ штамм культивировали в термостате в течение 12 месяцев на двух средах: стерильном солодовом сусле (среда А) и стерильной дистиллированной воде (среда Б) при температуре 28 °С. В стерильное неохмелённое солодовое сусло и стерильную дистиллированную воду было внесено по 5 % засевных дрожжей, находящихся в экспоненциальной фазе развития и имеющих следующие характеристики: общее количество – 135 КОЕ/мл; из них 14 % почкующихся, 80 % упитанных и 0 % мёртвых. После внесения дрожжей среды были стерильно разлиты в стеклянные химические пробирки по 10 мл в каждую и закрыты ватно-марлевыми пробками. С целью исключения возможности инфицирования для проведения текущих анализов каждый раз отбиралась одна пробирка.

Через 12 месяцев культивирования данные дрожжи, отличающиеся только историей популяции [4], были использованы как инокулянт для синтеза этанола на эталонной среде солодового сусла. Стерильное солодовое сусло характеризовалось содержанием сухих веществ – 11 % (по рефрактометру), концентрацией редуцирующих веществ (РВ) – 40 г/л, рН 5,5 ед. рН. Спиртовое брожение на эталонной среде проводилось в анаэробных условиях при 28 °С в течение трех суток.

Далее были проведены опыты по определению устойчивости *S. cerevisiae* ВКПМ Y-1693 к ферментативным водным гидролизатам (ФВГ) технических целлюлоз (ТЦ) мискантуса и плодовых оболочек овса (ПОО) – двух основных видов сырья, используемых для получения биоэтанола в ИПХЭТ СО РАН. Использовались целлюлоза мискантуса, полученная азотнокислым способом (АС) и целлюлоза ПОО, полученная комбинированным способом (КС). ФВГ получены ферментализмом целлюлоз в водной среде смесью ферментных препаратов «Брюзайм ВГХ», «Целлолюкс-А» и «Рапидаза-СR», более подробно описание получения гидролизатов описано в [5]. Характеристики ФВГ ТЦ приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Характеристики ферментативных водных гидролизатов ТЦ

Характеристика ФВГ	ТЦ, используемая для получения ФВГ и способ варки ТЦ		
	ТЦ М (АС)	ТЦ ПОО (КС)	ТЦ ПОО (АС)
Концентрация РВ, г/л, в том числе пентоз, г/л	56,7 1,7	48,6 3,1	50,0 –
Активная кислотность, ед. рН	4,6-4,7	4,6-4,7	4,6-4,7

Постановку исследований устойчивости штамма к ФВГ ТЦ осуществляли двумя способами:

- длительным культивированием в термостате;
- методом пересевов.

Длительное культивирование осуществляли следующим образом. В гидролизаты внесено по 10 г/л сульфата аммония для дополнительного азотного питания дрожжей, среды стерилизованы в автоклаве в течение 30 минут при 0,5 атм. После проверки стерильности в среды внесено по 5 % засевных дрожжей, находящихся в экспоненциальной фазе развития и имеющих следующие характеристики: общее количество – 158,5 КОЕ/мл; из них 19 % почкующихся, 70 % упитанных и 1 % мёртвых. Среда с внесёнными дрожжами были разлиты в химические пробирки аналогично условиям, описанном выше. Культивирование на средах ФВГ проводилось в течение трёх месяцев.

Проверка устойчивости к гидролизату методом пересевов заключается в последова-

тельном пересеве засевных дрожжей, выращенных на эталонной среде, на анализируемую среду. Метод применяется в производстве хлебопекарных дрожжей, устойчивыми считаются дрожжи, выдерживающие 6 пересевов на анализируемую мелассу без снижения генеративной и/или бродильной активности, меласса при этом считается доброкачественной [6]. Устойчивость штамма ВКПМ У-1693 определялась на среде ФВГ технической целлюлозы ПОО, полученной азотнокислым способом. Было проведено 8 пересевов дрожжей в нативный гидролизат, длительность каждого посева составила 3 суток. Отбор проб для определения РВ, микробиологических показателей проводился ежедневно, отбор проб для определения объемной доли этанола производился на 2 и 3 сутки. Культивирование проводилось при 28 °С, в анаэробных условиях, pH поддерживался на уровне 4,7. Было внесено 10 % суспензии засевных дрожжей, находящихся в экспоненциальной фазе развития и имеющих следующие характеристики: общее количество – 120 КОЕ/мл; из них 13,3 % почкующихся, 5 % упитанных и 0 % мёртвых.

Общая численность дрожжей выявлялась с использованием камеры Горяева. Морфологические характеристики дрожжей (количество почкующихся, упитанных и мёртвых клеток) определялись согласно методикам, принятым в спиртовой отрасли [6]. Концентрация РВ устанавливалась спектрофотометрически с помощью реактива 3,5-динитросалициловой кислоты (спектрофотометр «UNICO» UV-2804, США) в пересчёте на глюкозу, активная кислотность измерялась потенциометрически (рН-метр Cheser-1), крепость бражек (объемная доля спирта) определялась ареометром для спирта в дистилляте, полученном после предварительной перегонки спирта из бражки, согласно ГОСТ Р 51135-98-2003. По крепости полученных бражек и концентрации РВ в исходной среде рассчитывался выход этанола.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Изучение устойчивости штамма к продуктам своего обмена и отсутствию питательных веществ в среде

Изменение общей численности дрожжей в процессе культивирования в течение 12 мес. на среде солодового суслу и дистиллированной воде показано на рисунке 1. Однако представленные данные нельзя считать однозначными, поскольку жидкость в пробирках,

закрытых ватно-марлевыми пробками, постепенно испарялась, и через 6 мес. вместо 10 мл осталось 2 мл. Таким образом, реальная численность через 6 мес. культивирования меньше в пять раз и составляет 146 млн. КОЕ/мл на среде солодового суслу (что соответствует их численности через 1 мес. культивирования на данной среде) и 5,2 млн. КОЕ/мл – на дистиллированной воде (что в 3 раза меньше, чем через 1 мес. их культивирования на данной среде).



Рисунок 1 – Изменение общей численности дрожжей в процессе культивирования на среде солодового суслу (среда А) и дистиллированной воде (среда Б)

Результат оказался неожиданным: дрожжи демонстрируют устойчивость к продуктам собственного обмена и исключительную жизнеспособность на обеих средах. Численность дрожжей на дистиллированной воде ниже в 10 раз, что вполне обосновано, т.к. питательных веществ в среде не было. Упитанных клеток на дистиллированной воде не наблюдалось, на среде солодового суслу их доля составила 70 % на вторые сутки культивирования, а к 9-ым – сократилась до 1 %. Доля почкующихся клеток также экспоненциально уменьшалась в процессе культивирования (рисунок 1). Тем не менее через 6 мес. 4 % клеток на среде солодового суслу и 3 % на дистиллированной воде продолжали почковаться. В данных условиях можно предположить, что мёртвые

клетки являются субстратом для живых. Через 6 мес. доля мёртвых клеток на обеих средах составила 90-96 %.

Через 12 мес. жидкость в пробирках полностью испарилась, дрожжи были равномерно распределены на дне и стенках пробирок на высоте до 1 см. Для их извлечения в пробирки было добавлено 10 мл стерильного солодового сусла, а через сутки культивирования содержимое пробирок использовано как инокулят и внесено с соблюдением правил асептики в количестве 7 % в стерильное солодовое сусло с целью биосинтеза этанола на эталонной среде.

Поставили три варианта биосинтеза с использованием в качестве инокулята популяций дрожжей, имеющих разную историю:

А – 12 мес. культивирования на солодовом сусле;

Б – 12 мес. культивирования на дистиллированной воде;

контроль – двухсуточная культура, культивированная на солодовом сусле.

Во всех вариантах дрожжи находились в хорошем морфофизиологическом состоянии на протяжении 3 суток брожения. Через сутки брожения общее количество клеток для контроля составляло 172 млн. КОЕ/мл, доля упитанных 90 %, почкующихся 11,6 %, мертвых 0 %; для варианта А: общее количество клеток 186,6 млн. КОЕ/мл, упитанных 90 %, почкующихся 12,3 %, мертвых 0 %; для варианта Б: общее количество клеток 199,5 млн. КОЕ/мл, упитанных 90 %, почкующихся 16 %, мертвых 0 %. При микроскопировании наблюдались клетки дрожжей овальной формы, среднего размера: от 5,0x7,5 до 7,5x10,0 мкм.

Факт увеличения генеративной активности для вариантов А и Б по сравнению с контролем был зафиксирован и через 8 мес. культивирования, так же с преимуществом варианта Б. Ответом популяций на экстремальные условия существования стал, по видимому, стабильный синтез конститутивных ферментов, позволивший увеличить их генеративную активность в благоприятной питательной среде.

Главным показателем эффективности брожения является выход этанола. Максимальное накопление этанола для всех вариантов наблюдается уже на вторые сутки. Выход этанола и экономический коэффициент брожения приведен в таблице 2. Выход этанола рассчитан по стехиометрическому уравнению: 40 г/л РВ в сусле позволит получить этанол крепостью 2,6 об. %, что соответствует теоретическому выходу 100 %.

Экономический коэффициент представляет собой отношение концентрации продукта (этанола) к концентрации субстрата (РВ).

Сравнение выхода этанола, полученного с использованием дрожжей, имеющих разную историю популяции, показывает, что больший выход этанола по сравнению с контролем обеспечивает инокулят, полученный длительным культивированием на дистиллированной воде. Можно сделать вывод, что продукты обмена оказывают негативное воздействие на клетки дрожжей и их присутствие в среде более критично, чем отсутствие в среде питательных веществ.

Таблица 2 – Выход этанола и экономический коэффициент брожения в зависимости от истории популяции

Показатель	Вариант		
	А	Б	Контроль
Крепость бражки, об. %	1,9	2,1	2,2
Экономический коэффициент P/S	0,47	0,52	0,55
Выход этанола, % от теоретического	73	81	85

Таким образом, культивирование дрожжей на средах, не содержащих вредных примесей, позволяет клеткам сохранить свою биохимическую активность в течение очень длительного времени. Ранее нами было показано, что вредные примеси, содержащиеся в нецелевых гидролизатах целлюлозосодержащего сырья (на примере мискантуса), угнетают жизнедеятельность дрожжей уже на вторые сутки культивирования [7].

Определение устойчивости штамма к ферментативным водным гидролизатам технических целлюлоз мискантуса и плодовых оболочек овса

При культивировании штамма на ФГВ ТЦ М и ФВГ ТЦ ПОО в течение 80 сут не наблюдалось снижения общего количества дрожжевых клеток (рисунок 2), затем их численность медленно снижается. Длительная стационарная фаза указывает на доброкачественность питательных сред. Объяснить, почему численность дрожжей на среде ФВГ ТЦ М почти в 2 раза выше, чем на ФВГ ТЦ ПОО, достаточно сложно, поскольку различались не только виды сы-

рья, но и способы получения самих ТЦ. Этот вопрос требует дополнительного изучения.

Морфофизиологических различий при культивировании штамма на ФВГ ТЦ М и ФВГ ТЦ ПОО не обнаружено. На обоих видах сред доля почкующихся клеток с 50 % на вторые сутки культивирования снизилась до 15 % через 80 сут. Доля упитанных клеток составила 10 % на вторые сутки культивирования, а на пятые сутки снизилась до 0 %. Мёртвых клеток на вторые сутки не зарегистрировано, а через 90 суток их доля составила 80 %.

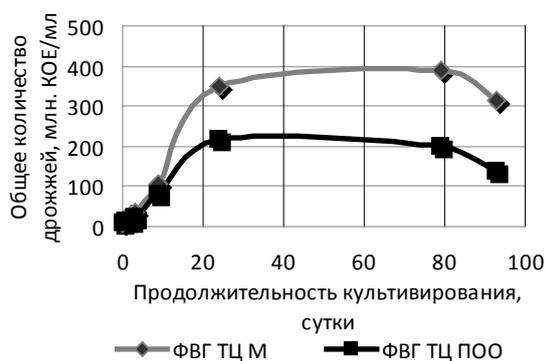


Рисунок 2 – Зависимость общего количества дрожжей от продолжительности культивирования на ферментативных гидролизатах

Хорошее морфофизиологическое состояние дрожжей косвенно указывает на отсутствие в средах вредных примесей (фурфурола, оксиметилфурфурола, летучих кислот, формальдегида, лигногуминовых и других веществ, характерных для химических гидролизатов). Можно сделать вывод, что дрожжи достаточно устойчивы к гидролизным средам, что указывает на высокое качество ФВГ ТЦ М и ФВГ ТЦ ПОО.

Сравнивая кривые роста, представленные на рисунках 2 и 1, отметим, что на среде солодового суслу и на дистиллированной воде не наблюдается снижения численности дрожжей через 3 мес. культивирования, в отличие от сред ФВГ. Следовательно, в средах ФВГ всё же содержится небольшое количество неблагоприятных примесей, представленных, предположительно альдегидами, зафиксированными в этаноле, полученном биосинтезом на этих средах, методом ГЖХ [8].

Чтобы оценить влияние этих примесей на процесс спиртового брожения, устойчивость к ФВГ ТЦ ПОО была определена вторым методом: по количеству пересевов, которые вы-

держивают дрожжи на данной среде. Физиологические показатели дрожжей на первые сутки брожения после каждого пересева приведены в таблице 3. Фактически все показатели находятся примерно на одном уровне в каждом пересеве, кроме II. Возможно, это связано с адаптивными процессами, происходящими в клетках. Через 8 пересевов дрожжи демонстрируют более высокие физиологические показатели.

Таблица 3 – Физиологические показатели дрожжей в процессе пересевов на ФВГ ТЦ ПОО (24 часа брожения)

№ пересева	Количество дрожжей			
	всего, млн. КОЕ/мл	почкующихся, %	упитанных, %	мёртвых, %
I	113,5	11,4	95	1
II	41,0	7,8	35	3
III	92,0	15,2	70	1
IV	71,3	12,8	80	1
V	63,1	9,4	80	1
VI	87,5	12,6	90	1
VII	100,5	13,9	80	1
VIII	98,6	11,2	75	1

Изменения концентрации РВ в течение 8-ми последовательных пересевов дрожжей на ФВГ ТЦ ПОО представлено на рисунке 3.

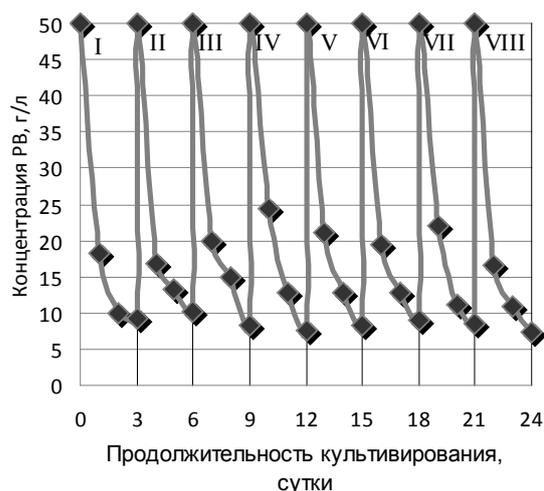


Рисунок 3 – Изменения концентрации РВ в течение 8-ми последовательных пересевов дрожжей на ФВГ ТЦ ПОО

Для всех пересевов кривые убывания РВ фактически совпадают. В первые двое суток брожения расходуется основная часть сахаров и образуется максимальное количество

этаноло, выход которого приведен в таблице 4.

Таблица 4 – Выход этанола и экономический коэффициент брожения в зависимости от числа пересевов

№ пере-сева	Показатель		
	Крепость бражки, об. %	Экономический коэффициент P/S	Выход этанола, % от теоретического
I	1,9	0,39	59,4
II	1,8	0,36	56,3
III	2,5	0,50	78,0
IV	2,2	0,44	69,0
V	1,5	0,30	56,0
VI	1,7	0,34	53,0
VII	1,8	0,36	56,3
VIII	1,8	0,36	56,3

Биосинтетическая способность дрожжей не снижается после 8-ми пересевов, выход этанола остается на уровне 56,3 %, следовательно, гидролизаты являются биологически доброкачественными, пригодными для получения биоэтанола, и не нуждаются в дополнительной технологической обработке для освобождения их от вредных примесей.

Выход выработанного штаммом этанола невысок, что свидетельствует о необходимости введения в состав среды дополнительного азотного и фосфорного питания, а также витаминов.

ВЫВОДЫ

Показано, что через 12 мес. культивирования штамма *Saccharomyces cerevisiae* ВКПМ Y-1693 на среде солодового суслу и на дистиллированной воде сохраняется их биосинтетическая активность по этанолу и генеративная способность. Штамм устойчив как к продуктам своего обмена, так и к отсутствию питательных веществ в среде, с преимуществом второго фактора.

Выявлена устойчивость дрожжей к ферментативным водным гидролизатам технических целлюлоз мискантуса и плодовых оболочек овса. Показано, что гидролизаты являются биологически доброкачественными.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Агеев, Л.М. Химико-технический контроль и учёт гидролизного и сульфитно-спиртового производства / Л.М. Агеев, С.И. Корольков. – М., Л.: ГОСЛЕСБУМИЗДАТ, 1953. – 403 с.
2. Шарков, В.И. Технология гидролизных производств / В.И. Шарков, С.А. Сапотницкий,

О.А. Дмитриева, М.: Лесная промышленность, 1973. – 408 с.

3. Холькин, Ю.И. Технология гидролизных производств. Учебник для вузов / Ю.И. Холькин. – М.: Лесная промышленность, 1989. – 496 с.

4. Бейли, Дж. Основы биохимической инженерии; пер с англ.: в 2-х частях. / Дж. Бейли, О.Оллис. – М.: Мир, 1989. – Ч.1. 692 с., ил.

5. Скиба Е.А., Будаева В.В., Павлов И.Н., Макарова Е.И., Золотухин В.Н., Сакович Г.В. Получение ферментативных гидролизатов технических целлюлоз мискантуса и их спиртовое брожение // Биотехнология. – 2012. – № 6. – С. 42-52.

6. Новаковская, С.С. Справочник технолога дрожжевого производства / С.С. Новаковская. – М.: Пищевая промышленность, 1972. – 289 с., ил.

7. Римарёва, Л.В. Микробиологический контроль спиртового и ферментного производств / Л.В. Римарёва, Н.Н. Воронцова. – М.: Россельхозакадемия, 2005. – 200 с.

8. Скиба Е.А., Будаева В.В., Митрофанов Р.Ю. Сбраживание нецелевых гидролизатов с помощью *Saccharomyces cerevisiae* (штамм Y-1693) // Ползуновский вестник. – 2010. – № 4. – С. 180-183.

Скиба Екатерина Анатольевна, старший научный сотрудник лаборатории биоконверсии, кандидат технических наук, доцент Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения Российской академии наук (ИПХЭТ СО РАН), eas08988@mail.ru, ул. Социалистическая, 1, Бийск, 659322, Россия. Тел. (3854) 30-59-85, факс (3854) 30-17-25.

Байбакова Ольга Владимировна, студент Бийского технологического института АлтГТУ им. И.И. Ползунова, практикант-дипломник 2013 года в лаборатории биоконверсии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института проблем химико-энергетических технологий Сибирского отделения Российской академии наук (ИПХЭТ СО РАН), ул. Социалистическая, 1, Бийск, 659322, Россия. Тел. (3854) 30-59-85, факс (3854) 30-17-25.