

Куц А.М., канд техн. наук

Ольга Сакчас, професор-ауксільяр

(Гаванський політехнічний інститут)

Голандо Контрерас, канд. техн. наук

(Гаванський центр наукових досліджень)

Рамоа Дельгадо

(Гаванський центр наукових досліджень)

НОВІ ТЕРМОТОЛЕРАНТНІ РАСИ ДРІЖДЖІВ ДЛЯ СПИРТОВОГО ЗБРОДЖУВАННЯ МЕЛЯСИ

Проведено порівняльний аналіз спиртового зброджування м'ясного сусла новими термотолерантними расами дріжджів, вилученими з відходів цукрового виробництва. Встановлено, що всі досліджувані дріжджі добро зброджують вуглеводи сусла і утворюють етиловий опирт.

За утворенням спирту та іншими показниками бродіння нові раси значно перевершують контрольну і розмішують у такій послідовності: C-45 > C-30 > C-19 > C-23 > *Sacch. cerevisiae*.

При виробництві етилового спирту з м'яси використовують головним чином різні раси дріжджів родини *Saccharomyces cerevisiae*, які з великою швидкістю зброджують цукри м'яси, утворюючи при цьому відносно великі концентрації етилового спирту. Вони мають температурний оптимум близько 30°C. Але під час бродіння температура середовища може досягати 37...40 і більше градусів за Цельсієм, Це в свою чергу призводить до зниження ефективності бродіння. Крім того, підтримання заданої температури потребує досить великих витрат питної води і електроенергії. Тому пошук нових термотолерантних рас дріжджів доцільний з теоретичної та практичної точок зору.

Метою роботи було вивчення нових рас дріжджів, вилучених із м'яси, що збродила, та зовнішнього середовища цукрових заводів республіки Куба, стосовно до умов спиртового бродіння. Досліджували такі раси дріжджів:

Candida pseudotropicalis C-23, вилучену з відходів цукрового виробництва: максимальна температура росту 45-50 °C; температурний оптимум росту - 37-40 °C; зброджує сахарозу,

глюкозу, лактозу; не зброджує мальтозу [1, 5, 8];

Kluyveromyces fragilis C-45, вилучену із зовнішнього середовища відходів цукрового виробництва: максимальна температура росту 45-50 °C; температурний оптимум росту - 37-40 °C; зброджує цукрозу, глюкозу, лактозу [7, 8];

Saccharomyces carlbergensis (Hansen) C-30, отримано з музею чистої культури Чеської Академії наук: максимальна температура росту 45-50 °C; температурний оптимум росту - 37 °C; зброджує цукрозу, галактозу, мальтозу, рафінозу; не зброджує лактозу [7, 8];

Kluyveromyces marxianus C-19, вилучену із зовнішнього середовища відходів цукрового виробництва: максимальна температура росту 45-50 °C; температурний оптимум росту - 37-40 °C; зброджує цукрозу, глюкозу, лактозу; не зброджує мальтозу [7, 8].

Як контрольні використовували дріжджі раси *Saccharomyces cerevisiae* SC, адаптовані до умов спиртового заводу Santa Crus: температурний оптимум росту - 30 °C; зброджує цукрозу, глюкозу, галактозу, мальтозу і на 1/3 рафінозу; не зброджує лактозу [3, 7, 8].

Чисту культуру дріжджів розмножували в синтетичному середовищі, яке містило 5 % редукуючих цукрів, 5 г/л екстракту дріжджів, 3,9 г/л сульфату магнію. Розмноження проводили на качалці в колбах об'ємом 300 мл. Через 24 год їх вміст пересівали в колби місткістю 5 л і розмноження тривало ще 24 год. Потім з колби центрифугуванням вилучали дріжджову суспензію, яку промивали дистильованою водою з рН 4. Після повторного центрифугування в отриманій дріжджовій суспензії за допомогою камери Нейбаура визначали кількість дріжджів для гарантування їх кількості в засівних дріжджах - 124 млн. в 1 мл сусла. Одночасно знаходили кількість клітин мертвих і таких, що брунькуються [6].

Зброджування проводили 48 год при 37 °C в колбах Ерлемейєра об'ємом 5 л, в які вносили 3 л мелясного сусла з вмістом 16,4 % редукуючих цукрів і рН 4,5. Через кожні 6 год у бражці визначили вміст редукуючих цукрів, етилового спирту, рН, загальну кількість дріжджових клітин, мертвих і таких, що брунькуються. Повторність дослідних була п'яти-, а аналітичних визначень - триразова.

Для зброджування використовували несольфітовану (традиційної технології) і сольфітову тростинну мелясу з таким хімічним складом, % мас., відповідно: сухих речовин - 86,0 і 93,0; редукуючих цукрів - 61,2 і 65,8, в тому числі таких, що не зброджуються - 6,4 і 7,9; загального азоту - 1,02 і 0,85; дікису сірки - 0,15 і 0,19; рН 5,8 і 5,9, зольністю - 6,85 і 7,55.

Аналіз меляси та бражки проводили за загально прийнятими методиками [1, 6]. Крім того, на підставі отриманих результатів розраховували такі показники: вихід спирту практичний ВСП, ефективність бродіння ЕБр, середні швидкості зброджування цукрів ШЦук і накопичення спирту ШСП, константу бродіння КБр, ферментативну активність дріжджів за відповідними формулами:

$$ВСП = C_{n1} \cdot 100 / (Цук_0 - Цук_1) \text{ дал із 1 т глюкози,}$$

$$ЕБр = ВСП \cdot 100 / ВСП_{т} \%;$$

$$ШЦук = (Цук_0 - Цук_1) \cdot 100 / (t_1 - t_0) \text{ г/год};$$

$$ШСП = (C_{n1} - C_{n0}) / (t_1 - t_0) \% \text{ мас/год};$$

$$КБр = 1 / (t_1 - t_0) \ln Цук_1 / Цук_0 \text{ год}^{-1};$$

$$ФАД = (Цук_0 - Цук_1) / (Б \cdot (t_1 - t_0)) \text{ г/г-год},$$

де C_{n0} , C_{n1} і $Цук_0$, $Цук_1$ - початковий і кінцевий вміст в бражці відповідно спирту, г/100 мл, і цукру, % мас; ВСП - теоретичний вихід спирту, дал із 1 т глюкози, $(t_1 - t_0)$ - термін бродіння, год; Б - середній вміст біомаси дріжджів у бражці, г/л.

Вихідні меляси суттєво відрізнялися між собою за хімічним складом. Так, сульфітована меляса мала концентрацію сухих речовин на 7 % мас, і редукуючих вуглеводів на 4,6 % мас. вищі порівняно з нессульфітованою. Але остання характеризувалася більшим вмістом загального азоту. Крім того, в ній визначено на 26,6 % менше діоксиду сірки.

З даних таблиці, в якій подано техніко-економічні показники зброджування середовища та зрілих бражок, видно, що незалежно від виду меляси найкращі показники по утворенню спирту мала раса С-45. Взагалі щодо сиירוутворюючої властивості нові раси перевершували контрольну і за цим показником розмістились у такій послідовності: С-45 > С-30 > С-19 > С-23 > 8С. Але зброджування нессульфітованої меляси супроводжувалося більшим накопиченням спирту в бражці в порівнянні з бродінням меляси сульфітованої. Можна припустити, що підвищений вміст діоксиду сірки в сульфітованих мелясах негативно впливає на утворення спирту дріжджам під час бродіння. Ці результати відповідають підвищеному вмісту незброджених цукрів у таких бражках, константі бродіння, ферментативній активності дріжджів, швидкості зброджування цукрів і накопиченню спирту.

Для дріжджів раси С-45 ефективність бродіння дорівнювала 80,56 % для сульфітованої меляси і 84,88 % для нессульфітованої. Для інших рас дріжджів вона була нижче на 8,7-15,6 %, особливо при зброджуванні сульфітованої меляси.

Близько 50 % цукрів зброджувалося протягом перших 18 год бродіння 0,7—1,05 г цукру на годину. У наступні 30 год швидкість бродіння поступово зменшувалась від 0,30 до 0,03 г цукру на годину. Вид меляси також значно впливає на ступінь збродження цукрів меляси. Для несольфітованої меляси вона становила 71,22...78,37 % ,тоді як для сольфітованих – всього 67,65...71,55 %. Взагалі незалежно від виду меляси отримані бражки мали досить невисоку концентрацію незброджених цукрів - 3,46... 5,80 % мас. Це явище характерне для збродження тростинних меляс [3], і тому підвищення ступеня використання цукрів меляси є суттєвим джерелом збільшення виходу спирту.

Збродження цукрів сусли і утворення з них спирту за своїми швидкостями істотно відрізнялися в перші і останні години бродіння: в перші години швидкість збродження цукрів значно перевищувала швидкість накопичення спирту. Так, дріжджі раси С-45 в перші 24 год бродіння збродили близько 65 % цукрів сусли й утворили з них всього 32 % спирту. Проте в останні години бродіння спостерігалася зворотна картина. Пояснюється це тим, що в перші години бродіння з цукрів утворювалися проміжні продукти бродіння, які потім перетворювалися в етиловий спирт.

Константа бродіння тісно пов'язана з швидкістю бродіння. Обидва ці показники у контрольної раси були менші, ніж досліджуваних дріжджів, які мали майже одного типу меляси (див. таблицю). Але ферментативна активність дріжджів SC була дещо вищою, ніж у контрольних, що обумовлено їх меншою кількістю в бражці. Швидкість збродження перебувала також у відповідності з кількістю дріжджових клітин у бражці. Максимальна концентрація останніх спостерігалася через 24 год бродіння і перевищувала початкову в 1,7-1,9 рази. Незалежно від раси дріжджів на цей час кількість живих клітин у бражці з несольфітованої меляси була вищою (74,18-96,42 %), ніж у бражках з сольфітованої меляси (71,02-89,28 %). Ця тенденція збереглася до кінця бродіння. Аналогічна закономірність спостерігалася і для клітин, що брунькуються (див. таблицю).

Раси дріжджів	Вміст					Швидкість		Активність дріжджів, г/г-год	Константа бродіння, год ⁻¹
	Незбродж еного цукру, % мас.	Спирту, % мас.	Дріжджів, у тому числі			Бродіння, г/год	Накопичення спирту, % мас./год		
			Всього, млн / мл	Живих ,%	Таких, що брунькуються, %				

Вихідне зброджуване середовище

	16,40	—	124,0	99,8	29,6	—	—	—	—
--	-------	---	-------	------	------	---	---	---	---

Зріла бражка, отримана внаслідок зброджування несольфітованої меляси

Sacchar. Cerevisiae	4,88	5,20	188,0	60,0	4,8	0,24	0,108	0,219	0,0252
C-23	4,27	5,40	219,0	87,5	16,6	0,25	0,112	0,206	0,2080
C-19	4,65	6,00	210,0	80,7	6,2	0,24	0,125	0,203	0,0282
C-45	4,18	6,80	202,0	66,7	12,2	0,25	0,120	0,219	0,0284
C-30	4,46	6,20	218,0	69,2	4,5	0,26	0,129	0,206	0,0319

Зріла бражка, отримана внаслідок зброджування сольфітованої меляси

Sacchar. Cerevisiae	5,30	5,06	170,0	57,0	4,1	0,23	0,105	0,222	0,0235
C-23	5,20	5,20	196,0	69,3	21,4	0,23	0,108	0,205	0,0239
C-19	4,80	5,60	201,0	66,2	2,3	0,24	0,116	0,211	0,0255
C-45	4,66	6,00	198,0	63,2	8,7	0,24	0,125	0,212	0,0262
C-30	5,13	5,80	198,0	64,2	4,3	0,23	0,120	0,207	0,0246

Через 24 год бродіння зі зменшенням швидкості бродіння кількість клітин почала зменшуватись. Мікробіологічним контролем у бражці сторонньої мікрофлори не виявлено.

Статистична обробка результатів показала, що за накопиченням спирту дріжджів рас C-45 і C-30 перевершують інші досліджувані раси.

За отриманими результатами дріжджів раси C-45 були рекомендовані для виробничої перевірки, яка потвердила результати лабораторних досліджень.

Висновки. Результати досліджень чотирьох нових термотолерантних рас дріжджів у порівнянні з расою *Saccharomyces cerevisiae* показали, що вони добре зброджують цукри меляси і утворюють етиловий спирт. За спиртоутворенням та іншими показниками бродіння досліджені дріжджі розмістилися у такій послідовності: C-45 > C-30 > C-19 > C-23 > *Saccharomyces cerevisiae*

Наявність підвищеної кількості діоксиду сірки в сольфітованій мелясі негативно впливає на розмноження дріжджів, утворення спирту та інші показники спиртового бродіння.

Література:

- 1.Фертман Г. И., Шойхет М. И. Химико-технологический контроль спиртового и ликеро-водочного производства М.: Пищ. Пром-сть, 1975.
- 2.Andreytr K. P.Reproduction of Distilltrs Yests // Biotechnology and Bioengetnrng. – 1967. – Vol. 2, № 2.
- 3.Blanko G. La produccion de alcohol a partier de la industria azucarera y sus posibilidades. – Hanada. Editorial Cientifico-Tehnico, 1982.
4. Brown S. W. Isolation of Ethahol-tolerant mutants of yeasts by continous selection // European J. Microb. Biotech/ - 1982. 16.
5. Contreras R. y colbs Efecto economic de la cepa de levadura termofila C-23 en la production de alcohol // Rev. Latinoamericana de Microbiologia. – 1982. –Vol. 24. № 3.
6. Harrigan W. F., Mc Cance M. Metodos de laboratorio en Microbiologia. – Espana: Editorial Acadtmia Leon, 1969.
7. Jimenes O. Examen general del proceso de sulfitacion azucarers // Revista ATAC. – 1982. - № 2. P. 11 – 22.
8. Koskova K. A. Candida ethanolica // Zeitschrift fur Allgemeine Microbiologie. – 1980. – Vol. 20.