

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ДОБАВОК НА ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТЬ ДРОЖЖЕЙ В УСЛОВИЯХ ФЕРМЕНТАЦИИ ВЫСОКОКОНЦЕНТРИРОВАННОГО СПИРТОВОГО СУСЛА

Е. А. Цед

Белорусский государственный университет пищевых и химических технологий,
Республика Беларусь

АННОТАЦИЯ

Введение. Одним из современных направлений развития технологии пищевого этанола является ферментация высококонцентрированного спиртового сусла (VHG-технология), что обеспечивает высокий выход этанола, снижение потребления энергии и технологической воды, улучшение экологического состояния производства и позволяет увеличить эффективность производства в целом. Однако, применения VHG-технологии сопряжено с ингибированием бродильной активности дрожжевых клеток, изменениями их физиологического состояния, снижением скорости ферментации спиртового сусла и увеличением концентрации несброженных углеводов, что приводит к потерям сбраживаемых веществ и снижению выхода целевого продукта. Научная задача – исследовать влияние различных биологически значимых для жизнедеятельности дрожжей веществ на процессы спиртового брожения в условиях высокого осмотического стресса, что позволит разработать технологические мероприятия по повышению клеточных функций дрожжевых клеток и увеличить эффективность сбраживания высококонцентрированного спиртового сусла.

Материалы и методы. Основным объектом исследования являлись дрожжи *Zygosaccharomyces fermentati Naganishi* расы CD БИМ У-225 Д (далее дрожжи расы CD), депонированные в коллекции непатогенных микроорганизмов ГНУ «Институт микробиологии НАН Беларуси». Для получения спиртового сусла использовали две зерновые культуры белорусской селекции: рожь сорта «Пуховчанка» и тритикале сорта «Антось» в соотношении 60:40. Водно-тепловую обработку замеса осуществляли по режимам механико-ферментативной схемы. Для осуществления биоконверсии углеводов сусла применяли ферментные препараты амилолитического («Liquoflow», «Saczyme Plus 2X» производства «Novozymes A/S») и целлюлолитического («Вискоферм» производства «Novozymes A/S») спектра действия. В работе был использован комплекс физико-химических, микробиологических и биохимических методов исследований, а также общепринятые в спиртовой отрасли методы определения показателей качества для конкретного вида сырья, полуфабрикатов и готовой продукции.

Результаты. Использование в составе спиртового сусла метаболитических добавок в виде янтарной кислоты и магния приводит к повышению физиологических показателей используемых дрожжей, что способствует повышению их бродильной активности и соответственно показателей зрелой бражки, а также изменяет направление синтеза основных и побочных продуктов брожения. Определены оптимальные концентрации метаболитических добавок в составе спиртового сусла – янтарной кислоты (0,03 г/дм³) и магния (0,01 г/дм³), позволяющие повысить стрессоустойчивость дрожжевых клеток в условиях ферментации VHG-сусла, и увеличить выход этилового спирта до 35 %.

Выводы. Полученные экспериментальные результаты расширяют область научно-практических знаний о жизнедеятельности дрожжевых клеток в условиях осмотического стресса и позволяют регулировать их обмен веществ в направлении повышения эффективности сбраживания спиртового сусла. Разработанные технологические приемы рекомендованы для применения в промышленности, так как не требуют дополнительного оборудования и других капитальных затрат.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: высококонцентрированное спиртовое сусло; дрожжи; ферментация; метаболитические добавки; янтарная кислота; магний; этиловый спирт; зрелая бражка.

ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ: Цед, Е. А. Исследование влияния метаболитических добавок на жизнедеятельность дрожжей в условиях ферментации высококонцентрированного спиртового сусла / Е. А. Цед // Вестник МГУП. – 2021. – № 1(30). – С. 51–61.

STUDIES ON THE INFLUENCE OF METABOLIC ADDITIVES ON VITAL ACTIVITY OF YEAST UNDER VERY HIGH GRAVITY FERMENTATION OF ALCOHOLIC WORT

E.A. Tsed

Belarusian State University of Food and Chemical Technologies, Republic of Belarus

ABSTRACT

Introduction. One of the current trends in the development of food ethanol technology is very high gravity fermentation (VHG-technology) that provides a high ethanol yield, savings in energy and process water usage, better ecological effect in the production and makes it possible to increase productive efficiency in general. However, the use of VHG technology is associated with inhibition of the fermentative activity of yeast cells, changes in their physiological state, decrease in the rate of fermentation of alcohol wort and increase in the concentration of unfermented carbohydrates, thus reducing fermentable substances and yield of the end product. The scientific task is to study the influence of various substances biologically vital for the yeast activity on the processes of alcoholic fermentation under conditions of high osmotic stress, which will allow developing technological measures aimed at improving the cellular functions of yeast cells as well as increasing the fermentation efficiency of highly concentrated alcoholic wort.

Materials and methods. The main object of the study was the yeast *Zygosaccharomyces fermentati* Nagaiishi of CD BIM Y-225 D race (hereinafter yeast of CD race), deposited in the collection of non-pathogenic microorganisms of the State Scientific Institution "Institute of Microbiology of the National Academy of Sciences of Belarus". Two grain crops of Belarusian selection such as rye of the Pukhovchanka variety and triticale of the Antos variety in a ratio of 60:40 were used to obtain alcoholic wort. The water-heat treatment of the batch was carried out according to the modes of the mechanical-enzymatic scheme. Amylolytic enzyme preparations (Liquoflow, Saczyme Plus 2X manufactured by Novozymes A/S) and cellolytic one (Viskoferm manufactured by Novozymes A / S) were used to carry out the bioconversion of wort carbohydrates. A number of physicochemical, microbiological and biochemical research methods as well as methods generally accepted in the alcohol industry for determining quality indicators for a specific type of raw material, semi-finished products and finished products were used in the study.

Results. The use of metabolic additives in the form of succinic acid and magnesium in the alcoholic wort results in an increase in the physiological parameters of the yeast used, thus contributing to an increase in their fermentation activity and, accordingly, the indicators of fermented mash, and also changes the direction of synthesis of the main and by-products of fermentation. There were determined the optimal concentrations of metabolic additives in alcohol wort: succinic acid ($0,03 \text{ g/dm}^3$) and magnesium ($0,01 \text{ g/dm}^3$), which makes it possible to increase the stress resistance of yeast cells under conditions of VHG wort fermentation and increase the yield of ethyl alcohol to 35 %.

Conclusions. The obtained experimental results develop the field of scientific and practical knowledge about the vital activity of yeast cells under conditions of osmotic stress and make it possible to regulate their metabolism in terms of increasing the efficiency of fermentation of alcoholic wort. The developed technological methods are recommended for commercial use, because no additional equipment and capital costs are required.

KEY WORDS: *very high gravity fermentation of alcoholic wort; yeast; fermentation; metabolic additives; succinic acid; magnesium; ethyl alcohol; fermented mash.*

FOR CITATION: Tsed E. A. Studies on the influence of metabolic additives on vital activity of yeast under very high gravity fermentation of alcoholic wort. Bulletin of Mogilev State University of Food Technologies. – 2021. – No. 1(30). – P. 51–62 (in Russian).

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время весьма актуально применение новых технологических решений в производстве пищевого этилового спирта, направленных на увеличение выхода этанола, снижение издержек его производства и повышение его качества [1]. Одним из перспективных

направлений в развитии биоэтанольной ферментации является сбраживание высококонцентрированного сусла (VHG–Very High Gravity). По данным F. W. Bai, D. P. Baygock, концентрация сухих веществ в сусле, относящегося к VHG, составляет от 19 % и выше (обычная концентрация спиртового сусла находится на уровне 15–18 %) [2, 3]. Это позволяет увеличить концентрацию целевого продукта в зрелой бражке, повысить уровень энергосбережения и эффективность производства в целом, без каких-либо изменений в аппаратурно-технологическом оснащении производственных площадок [4–6]. Таким образом, VHG – это новая технология ферментации, позволяющая существенно увеличить производственные мощности имеющихся бродительных емкостей при одновременной экономии энергии, технологической воды, а также снижении количества сточных вод [7, 8].

Вместе с тем, имеются ограничения по использованию VHG-ферментации в бродительных производствах, что обусловлено высоким осмотическим давлением питательной среды и сопряжено с ингибированием жизненных функций дрожжевых клеток, и снижением их биосинтетических способностей [9–11]. По данным K. Sigler, D. Matoulkova, M. Dienstbier [12], высокая концентрация сбраживаемых углеводов в питательной среде приводит к морфологическим и физиологическим изменениям в клетках дрожжей, снижению их жизнеспособности и активности внутриклеточных ферментов. Кроме того, T. Graves с авторами [13], указывает на ингибирующий эффект высоких концентраций сусла на гидролитические ферменты, что в свою очередь препятствует полному осахариванию сусла и снижает эффективность ферментации.

По данным ряда публикаций [14–16], осмотический стресс – это клеточный дисбаланс, возникающий, при нахождении клеток в питательной среде с высоким осмотическим потенциалом, превышающим его внутриклеточное содержание, что приводит к потере клеточной воды [15]. Данный осмотический эффект сопровождается уменьшением размеров дрожжевой клетки и изменением ее формы, деформацией плазматической мембраны [17], что приводит к потере жизнеспособности клеток [18]. При снятии осмотического давления дрожжевые клетки, как правило, восстанавливают свой объем. Однако, как указывает A. I. Rapoport [17], возможны некоторые необратимые физиологические изменения, которые могут негативно повлиять на последующие сбраживание сусла.

Briggs D. E. отмечает, что дрожжевая клетка имеет тенденцию корректировать свой метаболический механизм, чтобы сдерживать последствия осмотического стресса [4]. Способность дрожжевой клетки адаптироваться к гиперосмотическому состоянию известна как толерантность к осмострессу [19]. Дрожжевые клетки способны проявлять две формы устойчивости к осмострессу, а именно, осмоотолерантность и осмоадаптацию [7]. Sharma S. C. отмечает, что осмоотолерантность – это адаптация, обусловленная присущими ей свойствами, которые позволяют клетке справляться с сублетальным осмотическим стрессом [20]. Данные клеточные свойства, включающие в себя устойчивую структуру мембраны, правильное функционирование вакуолей и наличие углевода трегалозы, обеспечивают клетке некоторую степень защиты [21]. Повышенная осмоотолерантность проявляется в высокой концентрации осмопротекторных молекул например, пролина, метиона, изолейцина, фенилаланина чьи функции заключаются в стабилизации клеточных мембран, ферментов и других белков [12]. Меледина Т. В. с авторами отмечает, что находящаяся в цитоплазме, и частично связанная с клеточной стенкой трегалоза наряду с энергетической функцией, участвует в поддержании структуры цитозоля, и может выполнять роль осмотического барьера [22]. Синтез трегалозы активируется при переходе из фазы логарифмического роста в фазу замедленного роста, т. е. во время снижения удельной скорости роста. В бродящих дрожжах ее содержание составляет до 6 %, у дышащих дрожжей – до 18 %. Трегалоза потребляется в клетке в первые 45 минут ферментации, после чего начинает утилизироваться глюкоза. Таким образом, высокая концентрация гликогена и трегалозы в дрожжевых клетках является показателем устойчивости клеток к стресс-факторам [22].

В свою очередь осмоадаптация [17], предполагает включение синтеза буферных макромолекул или нейтральных полиолов, которые в совокупности называются совместимыми растворенными веществами, посредством пути передачи сигнала глицерина с высокой осмолярностью (HOG) [23, 24], предполагает, что у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* при осмотическом шоке запускаются метаболические сигналы через два отдельных осмосенсора, расположенных в плазматической мембране к каскаду трансдукции сигнала протеинкиназами, активируемого митогеном (MAP). Баланс осмолярности также сопровождается стабильностью ферментов, мембранных белков и фосфолипидов, в которых важную роль играют совместимые растворенные вещества [25]. Pulingundla, P. S. считает, что уровень осмотолерантности и осмоадаптации у дрожжей зависит от штамма и генетических свойств применяемых микроорганизмов [26].

Помимо осмотического стресса при сбраживании высококонцентрированного суслу может проявляться этанольный стресс [27]. По данным [28] при этанольном стрессе у дрожжевых клеток могут проявляться различные формы физиологических дефектов, которые варьируют от потери клеточного ионного гомеостаза (нуклеотидов, фосфатов, кофакторов), повышенной проницаемости мембран, до инактивации ферментов и ингибирования роста, что часто приводит к лизису. Эти клеточные дисфункции являются результатом ингибирующего действия высоких концентраций этанола на интегральные гликолитические ферменты (например, фосфофруктокиназу) и изменения липидного и белкового состава клеточных мембран [4]. Воздействие этанольного стресса проявляется в процессе ферментации в виде медленной ферментации, снижения роста и жизнеспособности клеток, получение низкой биомассы дрожжей, что оказывает влияние на производительность процесса брожения в целом.

Другие метаболиты дрожжевой клетки, такие как алифатические спирты, также оказывают неблагоприятное воздействие на метаболизм дрожжей, причем, степень их влияния зависит от длины цепи молекул – чем длиннее цепь (высшие спирты, ацетат), тем они более токсичны [11, 15].

Минеральные вещества играют важную роль в жизнедеятельности дрожжевых клеток, проявляя функции жизненно важных активаторов и регуляторов многочисленных биологических процессов [29]. Наличие минеральных веществ в составе питательной среды имеет решающее значение для полноценной ферментации и выживания дрожжей в условиях осмотического и этанольного стресса. Исследователи [17, 18] обращают внимание на присутствие в питательной среде таких ионов как калий, магний, цинк и др., которые участвуют в широком спектре биологических реакций. Известно [29], что калий необходим при углеводном обмене и отвечает за усвоение низкомолекулярных углеводов, так как входит в состав ионного насоса и отвечает за регулировку pH в клетке.

Магний также играет важную роль в клеточных обменных процессах за счет того, что входит в состав ферментов, осуществляющих гликолиз, включается в мембранную стабилизацию нуклеиновых кислот, рибосом, жиров, полисахаридов. Многие авторы [14, 20, 21] отмечают осмопротекторные свойства магния по отношению к осмотическому и этанольному стрессу. Цинк также участвует в углеводном, белковом, фосфолипидном обменах, другие ионы не могут его заменить.

Таким образом, решение проблемы ферментации высококонцентрированного суслу возможно за счет исследования факторов, влияющих на внутренний гомеостаз дрожжевых клеток, что позволяет выявить пути регулировки клеточного метаболизма на основании корректировки состава питательной среды, в которой они развиваются. В связи с вышеуказанной целью настоящей работы являлись исследования по определению влияния различных метаболических добавок на жизнедеятельность дрожжей в условиях VHG ферментации.

Научная задача исследований заключается в изучении влияния различных биологически значимых веществ на процессы жизнедеятельности дрожжей, включающие в себя процессы

спиртового брожения в условиях высокого осмотического стресса, и на основании полученных экспериментальных данных, разработать технологические мероприятия по повышению клеточных функций дрожжевых клеток, увеличивающих эффективность сбраживания высококонцентрированного спиртового сусла.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Научно-исследовательская работа проводилась в учреждении образования «Белорусский государственный университет пищевых и химических технологий» на кафедре технологии пищевых производств. Основным объектом исследования являлись дрожжи *Zygosaccharomyces fermentati* Naganishi расы CD БИМ У-225 Д (далее дрожжи расы CD), задепонированные в коллекции непатогенных микроорганизмов ГНУ «Институт микробиологии НАН Беларуси». Культуральные и морфологические характеристики первой культуры дрожжей: штрих-культура белая, псевдомицелий образует; при температуре 25 °С через 3 суток на питательном субстрате – сусло-агар образуются круглые или овальные клетки, иногда цилиндрической формы, размеры клеток – (2,0–7,0)×(3,0–8,0) мкм; вид вегетативного размножения – мультиполярное почкование; образованию асков (образуется 1–4 круглых гладких аскоспоры) предшествует конъюгация клеток (рис. 1–2). Физиолого-биохимические признаки дрожжей данного вида: сбраживают глюкозу, мальтозу, раффинозу, сахарозу. Не сбраживают лактозу и галактозу. Ассимилируют: сахарозу, глюкозу, l-сорбозу, трегалозу, галактозу, мальтозу, целлобиозу, раффинозу, инулин, мелецитозу, этанол, сорбит, маннит, салицин, α-метил-d-глюкозид, янтарную и молочную кислоты. Не ассимилируют: мелибиозу, крахмал растворимый, лактозу, l-арабинозу, l-рамнозу, d-ксилозу, инозит, d-арабинозу, глицерин, d-рибозу, маннит, рибит, эритрит, кислоту лимонную, дульцит. Не усваивают нитраты. Не растут в среде без витаминов. Ауксотрофы. Растут при температуре 37 °С. По совокупности признаков, согласно определителю «The yeasts. A taxonomic study» (1998 г.), первая исследуемая чистая культура дрожжей относится к виду *Zygosaccharomyces fermentati* Naganishi [30].



Рис. 1. Вид колоний дрожжей *Zygosaccharomyces fermentati* Naganishi

Fig.1. Appearance of yeast colonies *Zygosaccharomyces fermentati* Naganishi



Рис. 2. Вид клеток дрожжей *Zygosaccharomyces fermentati Naganishi* под микроскопом (увеличение $90^{\times} \times 10^{\times} = 900^{\times}$)

Fig.1. Appearance of yeast cells *Zygosaccharomyces fermentati Naganishi* under microscope (magnification $90^{\times} \times 10^{\times} = 900^{\times}$)

Материалами исследований являлись селекционированные и выращенные в Республике Беларусь зерновые культуры: рожь сорта «Пуховчанка» (ГОСТ 16990-88), тритикале сорта «Антось» (ГОСТ 1522-2005); ферментные препараты амилолитического («Liquoflow», «Saczyme Plus 2X» производства «Novozymes A/S») и целлюлолитического («Вискоферм» производства «Novozymes A/S») спектра действия; образцы спиртового сусла и зрелых бражек. В работе был использован комплекс физико-химических, микробиологических и биохимических методов исследований, а также общепринятые в спиртовой отрасли методы определения показателей качества для конкретного вида сырья, полуфабрикатов и готовой продукции. Определение содержания крахмала в зерне – по ГОСТ 10845-98, определение абсолютной массы зерна – по ГОСТ 10842-89, натуру зерна – по ГОСТ 10840-64, титруемую кислотность зерна – по болтушке (ГОСТ 10844-74), влажность зерна – по ГОСТ 13586.5-93, засоренность и зараженность зерна – по ГОСТ 13586.2-81, содержание белка – методом Кельдаля по ГОСТ 26889. Определение концентрации этилового спирта, содержание действительной концентрации сухих веществ в зрелой бражке – по ГОСТ 12787-8, общее содержание растворимых несброженных углеводов в зрелой бражке – колориметрическим методом [31], содержание редуцирующих веществ – методом Бертрана [31], общее количество дрожжевых клеток, содержание мертвых клеток, гликогена и почкующихся клеток – по общепринятым микробиологическим методикам [32]. Статистическую обработку результатов исследования и формирование базы данных с результатами исследований проводили с использованием программы MS Excel.

Для получения спиртового сусла использовали соотношение зерновых культур рожь:тритикале – 60:40. Водно-тепловую обработку замеса осуществляли по режимам механико-ферментативной схемы следующим образом: дробленое зерно (проход через сито $d=1$ мм – 100 %); гидромодуль 1:3,0–1:3,5; первый подогрев замеса до температуры 55 °С с последующей выдержкой при этой температуре 20 минут (при этой выдержке в замес с целью его разжижения вносили ферментные препараты: амилолитического спектра действия –

Liquoflow и целлюлолитического спектра действия – Вискоферм). Затем температуру поднимали до 75 °С и выдерживали в течение 40 минут. Далее температуру в замесе повышали до значения 92 °С и осуществляли выдержку в течение 120 минут. Затем разваренную массу охлаждали до температуры 56 °С и при этой температуре проводили осахаривание, используя ферментный препарат глюкоамилазного спектра действия – Saczyme Plus 2X.

Осахаривание проводили в течение 30 минут, полноту осахаривания определяли по йодной пробе.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В первой серии данной научной работы были определены основные технологические характеристики используемого зернового сырья. В исследуемых зерновых культурах определяли следующие показатели качества: влажность, натуру, абсолютную массу, содержание крахмала, аминный азот, титруемую кислотность, содержание белка и другие. Результаты исследований представлены в табл. 1.

Исследуемые зерновые культуры использовали для получения спиртового сусла по вышеуказанным технологическим режимам механико-ферментативной схемы. В полученном спиртовом сусле определяли основные технологические показатели: концентрацию сухих веществ, растворимых сбраживаемых углеводов, аминного азота, титруемую кислотность (табл. 2).

Табл. 1. Показатели качества ржи и тритикале

Table 1. Quality indicators of rye and triticale

Наименование исследуемых показателей	Исследуемые зерновые культуры	
	Рожь сорта «Пуховчанка» (ГОСТ 16990-88)	Тритикале сорта «Антось» (ГОСТ 1522-2005)
Влажность, %	12,5±0,6	11,4±0,5
Сорная примесь, %	1,6±0,1	0,8±0,04
Зерновая примесь, %	2,2±0,1	0,1±0,01
Зараженность вредителями	–	–
Натура, г/дм ³	655±32	710±35
Абсолютная масса, г	42,5±2,3	45,4±2,27
Содержание крахмала, %	56,4±2,8	58,9±2,9
Аминный азот, мг/100 г	3,01±0,1	2,45±0,1
Титруемая кислотность, град.	2,18±0,1	1,11±0,1
Содержание белка, %	11,54±0,6	12,06±0,6

Табл. 2. Показатели качества сусла

Table 2. Quality indicators of wort

Наименование исследуемых показателей	Диапазон концентраций спиртового сусла, %			
	18,0	20,0	22,0	24,0
Содержание растворимых сбраживаемых углеводов, г/100 см ³	15,4±0,8	16,6±0,83	17,6±0,88	19,4±0,97
Титруемая кислотность, град.	0,20	0,20	0,21	0,22
Аминный азот, мг	16,2±0,81	16,3±0,82	16,6±0,83	17,4±0,87

Как следует из полученных экспериментальных данных, с повышением концентрации сухих веществ в образцах спиртового сусла наблюдалось пропорциональное увеличение содержания сбраживаемых и азотистых веществ, что позволило создать моделируемый осмотический эффект в исследуемых образцах сусла.

На следующем этапе работы были проведены исследования по определению влияния различных технологических добавок в составе спиртового суслу на биосинтетические процессы при сбраживании суслу с разным осмотическим давлением. В качестве метаболитических добавок нами были использованы следующие биологически ценные вещества – препараты янтарной кислоты (далее янтарная кислота) и магния (далее магний). Выбор данных метаболитических добавок обусловлен их биологической ролью в обменных процессах живых клеток. Янтарная кислота – это двухосновная карбоновая кислота, которая является промежуточным продуктом обмена веществ, образующимся в процессе окисления и взаимопревращения белков, жиров и углеводов в живой растительной клетке. Янтарная кислота, являясь естественным веществом, присутствует во всех организмах и выполняет важные функции, например, участвует в клеточном дыхании, способствует усвоению кислорода клетками. В клетках янтарная кислота играет роль энергетического субстрата, участвуя в различных биохимических реакциях, способствует выработке аденозинтрифосфата (АТФ), который дает энергию всему организму. Она, обезвреживая свободные радикалы, является мощным антиоксидантом [29].

Магний – является кофактором многочисленных клеточных ферментативных реакций, обеспечивающих жизнедеятельные функции дрожжей [26]. Данный элемент необходим для превращения креатина-фосфата в АТФ–нуклеотид, являющийся универсальным поставщиком энергии в живых клетках организма. Магний является тем элементом, который контролирует энергетику организма. Кроме того, он необходим на всех этапах синтеза белка. Была выдвинута гипотеза о том, что магний действует как преобразователь размера клеток и усилитель их роста, поскольку снижение и повышение его внутриклеточного содержания соответствовали началу каждой фазы клеточного цикла дрожжей. Эта гипотеза была подтверждена работой Мейнарда (1993 г.), где вхождение клеток в стационарную фазу и время максимального биосинтеза этанола и минимальной концентрации сахаров совпадали с максимальным содержанием ионов Mg в питательной среде [33]. Процессы брожения регулируются изменением концентрации ионов магния в результате присоединения ионов к органическим веществам, что приводит к усилению скорости потребления дрожжами глюкозы. Магний повышает устойчивость дрожжей к спирту; включается в мембранную стабилизацию нуклеиновых кислот, рибосом, жиров, полисахаридов; стимулирует сбраживание плотного суслу; нейтрализует электростатические силы из полифосфатов, нуклеиновых кислот, белков; участвует в росте и делении [29].

Для выявления метаболитического эффекта выбранных компонентов при ферментации спиртового суслу с высоким содержанием сухих веществ, в полученные образцы спиртового суслу вносили янтарную кислоту в количестве 0,03 г/дм³ суслу; 0,06 г/дм³ суслу; 0,09 г/дм³ суслу. Магний в образцы суслу вносили в концентрации 1 г/дм³ суслу; 0,1 г/дм³ суслу; 0,01 г/дм³ суслу; 0,001 г/дм³ суслу.

В качестве контрольного образца служил образец спиртового суслу с концентрацией сухих веществ 18 % и без внесения янтарной кислоты. Далее в полученные образцы вносили предварительно разведенную чистую культуру дрожжей расы CD в количестве 10 % от объема суслу. Общая концентрация дрожжевых клеток в разводке составляла 145 млн/см³. Брожение проводили в течение 72 часов при температуре 30 °С. По истечении каждых суток брожения в бражке определяли содержание этилового спирта, концентрацию видимых и действительных сухих веществ, содержание редуцирующих сахаров, титруемую кислотность, содержание аминного азота.

Кроме того, определяли общее содержание дрожжевых клеток, содержание мертвых клеток, количество почкующихся клеток, упитанность по гликогену. Результаты исследований представлены в табл. 3–5.

Как следует из полученных экспериментальных данных, в случае использования янтарной кислоты, не зависимо от исходной концентрации сухих веществ в сусле наблюда-

лась однотипная динамика – наилучшие показатели качества отмечались в зрелых бражках с концентрацией янтарной кислоты – $0,03 \text{ г/дм}^3$, что позволяет сделать вывод об оптимальности ее дозировки в данном количестве. Однако, следует отметить, что наилучший стимулирующий эффект на дрожжевые клетки янтарная кислота оказывала в спиртовом сусле в диапазоне концентраций сухих веществ 20–22 %. В образце спиртового сусле с содержанием сухих веществ 24 % стимулирующего эффекта не наблюдалось, что требует дополнительной серии экспериментальных исследований.

Табл. 3. Биохимические и микробиологические показатели зрелых бражек с оптимальной дозировкой янтарной кислоты ($0,030 \text{ г/дм}^3$) на третьи сутки ферментации

Table 3. Biochemical and microbiological parameters of fermented mash with an optimal dosage of succinic acid ($0,030 \text{ г/дм}^3$) during the third day of fermentation

Наименование показателя	Диапазон концентраций янтарной кислоты, г/дм^3			
	контроль	0,03	0,06	0,09
Концентрация видимых сухих веществ, %	2,4	1,6	1,8	3,6
Концентрация действительных сухих веществ, %	5,4	3,2	4,4	4,8
Содержание этилового спирта, % об.	8,4	11,4	10,0	9,6
Титруемая кислотность, град.	0,43	0,48	0,49	0,50
Содержание редуцирующих сахаров, г/100 см^3	0,52	0,27	1,29	1,36
Содержание растворимых несброженных углеводов, г/100 см^3	0,54	0,21	0,45	0,54
Содержание аминного азота, мг/100 см^3	24,9	28,9	27,0	23,8
Количество мертвых клеток, %	11,0	5,0	8,0	14,5
Упитанность дрожжевых клеток по гликогену, %	64,0	86,5	83,5	82,5
Количество почкующихся клеток, %	20,5	36,0	35,5	23,0
Общее количество дрожжевых клеток, млн/ см^3	159,0	210,5	189,0	164,5

Табл. 4. Биохимические и микробиологические показатели зрелых бражек с разной дозировкой магния на третьи сутки ферментации

Table 4. Biochemical and microbiological parameters of fermented mash with various dosage of magnesium during the third day of fermentation

Наименование показателя	Диапазон концентраций магния, г/дм^3			
	контроль	0,001	0,01	0,1
Концентрация видимых сухих веществ, %	2,4	1,8	1,4	4,2
Концентрация действительных сухих веществ, %	5,4	4,6	4,2	5,2
Содержание этилового спирта, % об.	8,4	10,2	11,8	9,4
Титруемая кислотность, град.	0,43	0,45	0,48	0,50
Содержание редуцирующих сахаров, г/100 см^3	0,52	0,32	0,46	0,74
Содержание растворимых несброженных углеводов, г/100 см^3	0,54	0,35	0,49	0,79
Содержание аминного азота, мг/100 см^3	24,9	23,6	24,0	27,8
Количество мертвых клеток, %	11,0	13,0	14,0	16,0
Упитанность дрожжевых клеток по гликогену, %	64,0	82,5	86,5	60,5
Количество почкующихся клеток, %	20,5	24,0	19,5	17,5
Общее количество дрожжевых клеток, млн/ см^3	159,0	197,0	150,5	109,5

При использовании различных дозировок магния динамика показателей качества соответствующих зрелых бражек была неоднородная. Внесение магния в питательную среду существенно повышало физиологические показатели дрожжей и соответственно процессы спиртообразования в бражках.

Наилучшие показатели качества наблюдались в образцах спиртового сусле с содержанием магния в концентрации 0,01 г/дм³. Это, вероятно, объясняется тем, что магний стимулирует действие всех важнейших ферментов клетки, а энергетический обмен может осуществляться только в его присутствии. Это позволило сделать вывод о том, что оптимальной дозировкой магния при сбраживании высококонцентрированного сусле является – 0,01 г/дм³. Внесение магния в питательную среду в концентрации 0,1 г/дм³ вызывало обратный эффект – ингибирование метаболизма дрожжевых клеток, что согласуется с литературными данными о возможности отрицательного эффекта при избыточном содержании ионов магния в питательной среде [14].

Исследования в данном направлении будут продолжены с целью установления взаимосвязи предельно максимальной концентрации сухих веществ в сусле и защитного эффекта исследуемых метаболических добавок.

Табл. 5. Биохимические и микробиологические показатели зрелых бражек с оптимальной дозировкой ионов магния (0,01 г/дм³) на третьи сутки ферментации

Table 5. Biochemical and microbiological parameters of fermented mash with an optimal dosage of magnesium ions (0,01 г/дм³) during the third day of fermentation

Наименование показателя	Диапазон концентраций сухих веществ сусле,			
	%			
	контроль	20,0	22,0	24,0
Концентрация видимых сухих веществ, %	2,4	1,4	1,8	3,6
Концентрация действительных сухих веществ, %	5,4	3,2	4,4	4,8
Содержание этилового спирта, % об.	8,4	10,8	11,8	9,6
Титруемая кислотность, град.	0,43	0,48	0,49	0,50
Содержание редуцирующих сахаров, г/100 см ³	0,52	0,21	1,1	1,5
Содержание растворимых несброженных углеводов, г/100 см ³	0,54	0,31	0,40	0,48
Содержание аминного азота, мг/100 см ³	24,9	28,9	27,0	23,8
Количество мертвых клеток, %	11,0	8,5	12,0	24,5
Упитанность дрожжевых клеток по гликогену, %	64,0	86,5	83,5	82,5
Количество почкующихся клеток, %	20,5	46,0	40,5	13,0
Общее количество дрожжевых клеток, млн/ см ³	159,0	245,5	170,0	164,5

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные экспериментальные исследования позволили обосновать использование метаболических добавок в спиртовом производстве с целью повышения эффективности процесса ферментации спиртового сусле с применением VHG-технологии. Установлено, что при сбраживании спиртового сусле с применением VHG-технологии, дрожжи расы CD проявляют чувствительность к осмотическому и этанольному стрессу. Определено влияние на биохимические и микробиологические характеристики дрожжей расы CD таких метаболических добавок как янтарная кислота и магний. Определены оптимальные дозировки вышеуказанных метаболических добавок в спиртовом производстве в случае применения VHG-технологии.

Проведенные исследования имеют важное научное значение, так как расширяют и дополняют научно-практические основы технологии получения пищевого этилового спирта с высоким выходом этанола из единицы переработанного сырья. Установлено, что выход этилового спирта при использовании VHG-технологии в сочетании с оптимизированными дозировками метаболических добавок повышается до 35 %.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Шаршунов, В. А. Технология и оборудование для производства спирта и ликеро-водочных изделий. В двух частях / В. А. Шаршунов, Е. А. Цед, Л. М. Кучерявый, А. В. Киркор. – Минск: Мисанта, 2013. – 520 с и 780 с.
- 2 Bai, F. W. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstock / F. W. Bai, W. A. Anderson, M. Moo-Young // *Biotechnol. Adv.* – 2008. – 26:89–105.
- 3 Bayrock, D. P. Application of multistage continuous fermentation for the production of fuel alcohol by very high gravity fermentation technology / D. P. Bayrock, I. W. Michael // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* – 2001. – 27(2):87–93.
- 4 Briggs, D. E. *Brewing Science and Practice* / D. E. Briggs, C. A. Boulton, P. A. Brookes, R. Stevens // Woodhead, Cambridge, UK. – 2004. pp. 410–439.
- 5 Yu, Z. Selection of *Saccharomyces pastorianus* variants with improved fermentation performance under very high gravity wort conditions. / Z. Yu, H. Zhao, H. Li, Q. Zhang, H. Lei // *Biotechnol. Lett.* – 2012. – 34:365–370.
- 6 Blicek, L. Isolation and characterization of brewer's yeast variants with improved fermentation performance under high-gravity conditions / L. Blicek, G. Toye, F. Dumortier, K. J. Vertrepen, F. D. Delvaux, J. M. Thevelein // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2007. – 73:815–824.
- 7 I. Bafrncová, P. Improvement of very high gravity ethanol fermentation by media supplementation using *Saccharomyces cerevisiae* / P. Bafrncová, D. Kmogrovibová // *Biotechnol Lett.* – 1999. – 21:337–341
- 8 Bai, F. W. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks / F. W. Bai, W.A. Anderson, M. Moo-Young // *Biotechnol Adv.* – 2008. – 26:89–105.
- 9 Gibson, R. B. Improvement of higher gravity brewery fermentation via wort enrichment and supplementation / R. B. Gibson // *J. Inst. Brew.* – 2011. – 117(3):268–284.
- 10 Ding, J. Tolerance and stress response to ethanol in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* / J. Ding, X. Huang, L. Zhang, N. Zhao, D. Yang // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2009. – 85:253–263.
- 11 Zhao, X. Q. Impact of Zinc Supplementation on the improvement of ethanol tolerance and yield of self-flocculating yeast in continuous / X. Q. Zhao, C. Xue, X. M. Ge, W. J. Yuan, J. Y. Wang, F. W. Bai // *Ethanol fermentation. J. Biotechnol.* – 2009. – 139:55–60.
- 12 Sigler, K. Net effect of wort osmotic pressure on fermentation course, yeast vitality, beer flavour, and haze. / K. Sigler, D. Matoulkova, M. Dienstbier // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2009. – 82:1027–1035.
- 13 Graves, T. Development of a «stress model» fermentation system for fuel ethanol yeast strains. / T. Graves, N. Narendranath, R. // *J. Inst. Brew.* – 2007. – 113(3):263–271.
- 14 Gibson, R. B. Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling. / R. B. Gibson, J. S. Lawrence, D. Chris // *FEMS.* – 2007. – 31:535–569.
- 15 Klipp, E. Integrative model of the response of yeast to osmotic shock / E. Klipp, B. Nordlander, R. Kruger, P. Gennemark, S. Hohmann // *Natl. Biotechnol.* – 2005. – 23:975–982.
- 16 Querol, A. Adaptive evolution of wine yeast / A. Querol, M.T. Fernandez-Espinar // *Intl. J. Food Microbiol.* – 2003. – 86:3–10.
- 17 Rapoport, A. I. Yeast anhydrobiosis: permeability of the plasma membrane. / A. I. Rapoport, G. M. Khrustaleva, G. Y. Chammanis, M. E. Beker // *Ikobiologiya.* – 1995. – 64:275–278.
- 18 D'Amore, T. Improving yeast fermentation performance / T. D'Amore // *J. Inst. Brew.* – 1992. – 98:375–382.
- 19 Mager, W.H. Metabolism of wort by yeast. In: *Brewing Science and Practice* / W.H. Mager, J.C. Varela // Woodhead, Cambridge, UK. – 2004. – p. 410.
- 20 Sharma, S. C. Salt-induced changes in lipid composition and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* / S. C. Sharma, D. Raj, M. Forouzandeh, M. P. Bansal // *Appl. Biochem. Biotech.* – 1996. – 56:189–195.
- 21 Hohmann, S. Osmotic stress signalling and Osmoadaptation in yeast / S. Hohmann // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 2002. – 66:300–372.
- 22 Меледина, Т. В. Особенности метаболизма трегалозы у пивных дрожжей низового брожения / Т. В. Меледина, С. А. Черспанов // *Пиво и напитки.* – 2004. – № 4 – С. 24–27.
- 23 Phisalaphong, M. Mathematical modeling to investigate temperature effect on kinetic parameters of ethanol fermentation. / M. Phisalaphong, N. Srirattana, W. Tanthapanichakoon // *Biochem. Eng. J.* – 2006. – 28(1):36–43.
- 24 Bolat, I. The importance of trehalose in brewing yeast survival. *Inno. Roma* / I. Bolat // *Food Biotech.* – 2008. – 2:1–10.
- 25 Boulton, C. A. *Brewing yeast and fermentation* / C. A. Boulton, D. Quain // Blackwell Science Ltd, Oxford, United Kingdom. – 2001. – p. 81–96.
- 26 Pulingundla, P. S. Very high gravity (VHG) ethanolic brewing and fermentation: a research update / P. S. Pulingundla, K. Sanghoon // *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* – 2010. – 38:1133–1144.
- 27 Boulton, C. A. Trehalose, glycogen and sterol. In: *Brewing yeast fermentation performance. Smart KA (First edition)* / C. A. Boulton // Blackwell Science Ltd, Oxford. – 2000. – 29(1):36–43.
- 28 Smith, A. Yeast PKA represses Msn2p/Msn4p-dependent gene expression to regulate growth, stress response and glycogen accumulation / A. Smith, M. P. Ward, S. Garrett // *EMBO J.* – 1998. – 17:3556–3564.
- 29 Мудрецова-Висс, К. А. Микробиология / К. А. Мудрецова-Висс, Ф.М. Чистяков. – М.: Экономика. 1971. – 263 с.
- 30 Цед, Е. А. Использование дрожжей-ассоциантов рисового гриба в спиртовом производстве / Е. А. Цед // *Вестник МГУП.* – 2013. – № 2(14) – С. 45–50.

- 31 Химико-технологический контроль производства солода и пива /под ред. Мальцева П. М. – М.: Пищевая промышленность, 1976. – 447 с.
- 32 Слюсаренко, Т. П. Лабораторный практикум по микробиологии пищевых производств / Т. П. Слюсаренко. – М.: Пищевая промышленность, 1984. – 207 с.
- 33 Treger, J. M. Transcriptional factor mutations reveal regulatory complexities of heat shock and newly identified stress genes in *Saccharomyces cerevisiae* / J. M. Treger, A. P. Schmitt, J. R. Simon // J. Biol. Chem. – 1998. – 273:26875–26879.

Поступила в редакцию 17.05.2021 г.

ОБ АВТОРАХ:

Елена Алексеевна Цед, доктор технических наук, доцент, заведующий кафедрой технологий пищевых производств, Белорусский государственный университет пищевых и химических технологий, e-mail: tsedelena@inbox.ru.

ABOUT AUTHORS:

Elena A. Tsed, D. Sc. (Engineering), Associate Professor, Head of the Department of Food Production Technologies, Belarusian State University of Food and Chemical Technologies, e-mail: tsedelena@inbox.ru.