

УДК 579.66

**АВТОСЕЛЕКЦИЯ ПРОИЗВОДСТВЕННОГО ШТАММА СПИРТОВЫХ ДРОЖЖЕЙ SACCHAROMYCES CEREVISIAE В ПОЛУНЕПРЕРЫВНЫХ УСЛОВИЯХ С ЦЕЛЬЮ ПОВЫШЕНИЯ ЕГО ОСМО-, ТЕРМО- И АЦИДОТОЛЕРАНТНОСТИ****Олейникова Е.А., Кузнецова Т.В., Саубенова М.Г., Райымбекова Л.Т.,  
Айтжанова А.А., Шорманова М.М.***РГП «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК, Алматы, e-mail: raduga.30@mail.ru*

С целью повышения продукции биоэтанола производственным штаммом спиртовых дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* проведена его автоотбор в условиях полунепрерывного культивирования на пшеничном сусле с возрастающими концентрациями хлорида натрия в среде от 8% до 12%, повышением температуры культивирования с 31 °С до 40 °С и снижением показателя pH среды с 5,0 до 2,5. Получен вариант дрожжей, отличающийся от исходной культуры более высоким уровнем осмо-, термо- и ацидотолерантности. Полученная культура спиртовых дрожжей характеризуется также высокой бродительной активностью и более полным потреблением углеводов субстрата. Отселекционированный вариант будет использован для дальнейшей работы по интенсификации процесса получения этанола в производственных условиях. Использование отобранного штамма будет способствовать снижению затрат на производство этилового спирта.

**Ключевые слова:** биоэтанол, *Saccharomyces cerevisiae*, осмоустойчивость, термоустойчивость, ацидотолерантность

**AUTOSELECTION OF THE PRODUCTION STRAIN OF ETHANOL YEAST SACCHAROMYCES CEREVISIAE IN SEMI-CONTINUOUS CONDITIONS TO INCREASE ITS OSMOTIC, THERMAL AND ACIDOTOLERANCE****Oleynikova E.A., Kuznetsova T.V., Saubenova M.G., Rayymbekova L.T.,  
Aytzhanova A.A., Shormanova M.M.***SNE «Institute of Microbiology and Virology» SK MES RK, Almaty, e-mail: raduga.30@mail.ru*

In order to increase the production of bioethanol by the production strain of alcoholic yeast *Saccharomyces cerevisiae*, its autoselection was carried out under conditions of semicontinuous cultivation in wheat wort with increasing concentrations of sodium chloride from 8% to 12% in the medium, increasing the cultivation temperature from 31 °C to 40 °C and lowering the pH of the medium from 5,0 to 2,5. A variant of yeast that differs from the original culture by a higher level of osmotic, thermo- and acid tolerance is obtained. The obtained culture of alcohol yeast is also characterized by high fermentation activity and a more complete consumption of carbohydrates of the substrate. The selected variant will be used for further work on intensification of the ethanol production process in production conditions. The use of the selected strain will help reduce the cost of producing ethyl alcohol.

**Keywords:** bioethanol, *Saccharomyces cerevisiae*, osmotic resistance, thermal stability, acid tolerance

Вклад автотранспорта в суммарный выброс загрязняющих веществ в атмосферу крупных городов мира составляет более 80%. Являясь прекрасным антидетонатором, этанол может заменить существующие высокооктановые добавки, обладающие высокой токсичностью, такие как толуол и нитробензол [1–3]. Сегодня около 2/3 всего мирового производства этилового спирта используется в качестве добавки к топливу для двигателей внутреннего сгорания и лишь около 15% – для производства спиртных напитков.

Существует мнение, что производство этилового спирта оправдано даже в тех случаях, когда себестоимость сырья и/или выпускающего его завода высока. По прогнозам специалистов биоэтанол будет иметь преимущество перед биодизелем, так как себестоимость его производства снижается

быстрее, чем биодизеля. Поскольку этанол производится из возобновляемого сельскохозяйственного сырья, он является единственным топливом, которое способствует замедлению глобального потепления. К сегодняшнему дню для продукции биоэтанола используются многочисленные источники биомассы, которые в целом могут быть классифицированы как сахара, крахмалсодержащее сырье и лигноцеллюлозная биомасса [4, 5].

Для повышения выхода конечного продукта и сокращения расходов при производстве этилового спирта большое значение наряду с бродительной активностью культур продуцентов имеют их осмоустойчивость, термо- и кислотоустойчивость [6–9]. Для придания культурам требуемых характеристик используются различные подходы. S.-J. Dong с соавторами [10] показано, что

клетки *Saccharomyces cerevisiae* перестраивают цитоплазматическую мембрану в процессе ферментации. Длительное и повторное воздействие стрессовых факторов ведет к значительным структурным перестройкам в клетках, имеющим адаптивное значение. Более изменчивая цитоплазматическая мембрана вносит вклад в более высокую устойчивость к воздействию на нее повреждающим факторам.

**Целью** настоящей работы была автоселекция производственного штамма спиртовых дрожжей в полунепрерывных условиях для повышения его термо-, кислото- и осмоустойчивости.

### Материалы и методы исследования

В работе использован производственный штамм спиртовых дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* с повышенной бродильной активностью.

Автоселекция проведена в условиях полунепрерывного культивирования на пшеничном сусле с концентрацией сухих веществ 16,4%. Контрольные высевы для учета количества колониеобразующих единиц (КОЕ) производили на среду Ридер (г/л: глюкоза – 10;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 2,1;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 1,0;  $\text{MgSO}_4$  – 0,2;  $\text{K}_2\text{SO}_4$  – 0,2; дрожжевой автолизат – 0,5; агар-агар – 20,0).

Для повышения осмоустойчивости использовали хлорид натрия в концентрации 8–12%. В колбу со 100 мл суслу с добавлением NaCl вносили 5% чистой культуры дрожжей ( $10^8$  КОЕ/мл). Инкубирование проводили при температуре 30°C. Через каждые 12 ч производили замену 80% культуральной жидкости на чистую среду с добавлением нужного количества хлорида натрия. Через семь сливов-доливок среды в пределах одной концентрации хлорида натрия производили пересев на среду с повышенной на 1% концентрацией соли. Для этого предварительно культуру высевали на агаризованную питательную среду Ридер. Для дальнейшего посева отбирали самые крупные колонии дрожжей, так как они отличаются наиболее высокой активностью накопления биомассы. Контролем служила исходная неадаптированная культура дрожжей, однократно культивированная на сусле с данным содержанием соли.

Пробы для контроля роста дрожжей отбирали сразу после засева и по истечении 12 ч при каждом пассаже культуры. Количество колониеобразующих единиц определяли путем посева на плотную питательную среду Ридер методом предельных разведений.

Автоселекцию штамма спиртовых дрожжей к повышенным температурам культивирования проводили на пшеничном сусле с изменением температуры от 31°C до 40°C. В опыте использовали адаптированную к высокому содержанию NaCl культуру. Для первого посева в колбу со 100 мл суслу вносили 5% культуры дрожжей ( $10^8$  КОЕ/мл). Замену 80% среды осуществляли через каждые 12 часов семикратно для каждого значения температуры. Периодичность изменения температуры составляла 1°C. Пробы для контроля роста культуры отбирали сразу после засева и по истечении 12 ч при каждом пассаже. Отбор дрожжей для каждого последующего посева с увеличением температуры культивирования проводился после посева на агаризованную питательную среду Ридер из образцов проб методом десятикратных

разведений. Контролем служила исходная культура дрожжей, однократно культивированная при данной температуре.

Для автоселекции штамма спиртовых дрожжей к низким показателям кислотности среды использовали отселекционированную осмо- и термоустойчивую культуру. Культивирование вели при следующих значениях pH среды: 5,0; 4,0; 3,0; 2,5. Инкубировали при температуре 30°C. Контролем служила исходная культура дрожжей. Эксперимент проводили по описанной выше схеме опыта.

Высевы на плотную питательную среду производили в трех повторностях. Статистическая обработка результатов исследований проведена по стандартной методике с использованием критерия Стьюдента. Для подсчета количества колоний на питательной среде уровень значимости  $p = 0,05$ .

Бродильную активность исходной и селекционной культур определяли в трубках Дунбара с отфильтрованным пшеничным сусликом. Культивировали при 30°C в течение 1 суток.

Степень использования углеводов среды исследовали на среде Ридер с 15 и 25% глюкозы. Культивировали при 30°C в течение 3 суток. Остаточное содержание сахара в среде определяли сахарометром.

### Результаты исследования и их обсуждение

С увеличением концентрации хлорида натрия в среде от 8 до 12% прирост биомассы спиртовых дрожжей значительно уменьшается (рис. 1).

Так, при культивировании спиртовых дрожжей на среде, содержащей 8% NaCl, накопление биомассы было выше на 2 порядка, чем в среде с 12% NaCl. Количество колониеобразующих единиц составляло соответственно  $(4,6 \pm 0,4) \times 10^8$  и  $(9,0 \pm 0,1) \times 10^6$  КОЕ/мл у адаптируемой культуры и  $(3,7 \pm 0,2) \times 10^8$  и  $(6,7 \pm 0,2) \times 10^6$  КОЕ/мл у исходной.

Как видно из полученных данных, в среде с 8% NaCl количество КОЕ селекционной культуры дрожжей выше на 24% в сравнении с исходным штаммом. После автоселекции в условиях полунепрерывного культивирования активность ее роста культуры на среде с 9–11% хлорида натрия на 40–50% выше, чем у исходного штамма.

Полученная в результате автоселекции с повышенным содержанием хлорида натрия культура использована для дальнейшей селекции с увеличением температуры культивирования.

В результате анализа данных динамики роста культуры установлено, что с увеличением температуры культивирования среды прирост биомассы увеличивается (рис. 2).

Показано, что штамм, подвергнутый автоселекции, обладает более высокой активностью роста при повышенных температурах в сравнении с исходной культурой. Наиболее велико различие в накоплении биомассы между исходной и селекционной культурами при температурах 38° и 39°C.

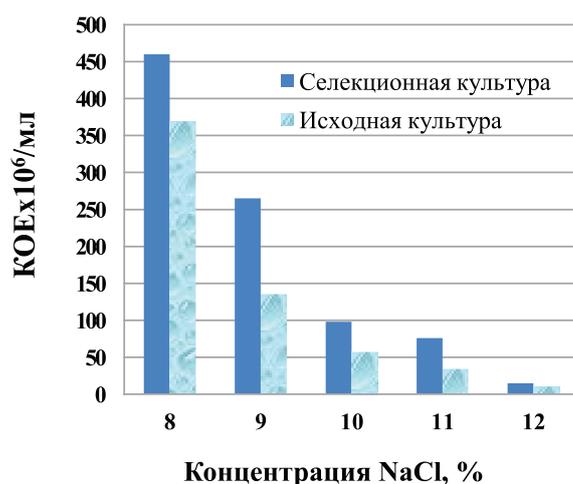


Рис. 1. Рост спиртовых дрожжей с 8–12% хлорида натрия в среде культивирования

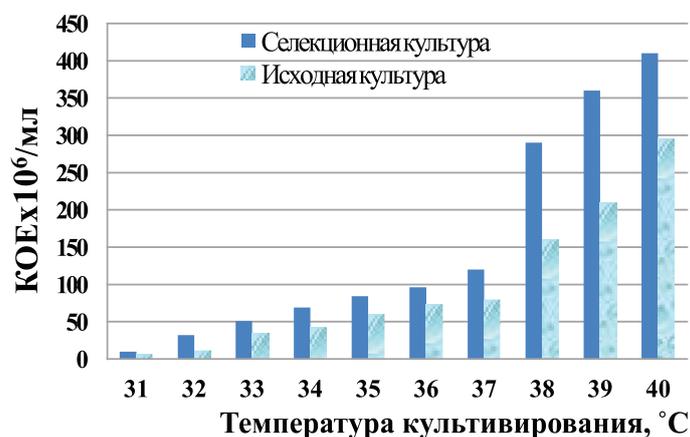


Рис. 2. Рост спиртовых дрожжей с 8–12% хлорида натрия в среде культивирования

С увеличением температуры культивирования колонии при высеве на агаризованную среду Ридер колонии дрожжей становились крупнее, исходные форма и размеры клеток при этом сохранялись.

Полученная осмо- и термоустойчивая культура дрожжей была использована для дальнейшей селекции в условиях полунепрерывного культивирования с повышением кислотности среды.

Наибольший прирост биомассы дрожжей отмечали при значении pH 5,0. С уменьшением кислотности до pH 2,5 прирост биомассы снизился на два порядка (рис. 3).

Выживаемость селекционной культуры при понижении pH среды значительно выше, чем у исходной культуры.

В ходе эксперимента отмечено, что при повышении кислотности среды клет-

ки дрожжей мельчали и приобретали более округлую форму, также уменьшались размеры колоний при росте на агаризованной среде Ридер.

Таким образом, в ходе полунепрерывного культивирования получена культура спиртовых дрожжей с наиболее высокими показателями устойчивости к осмотическому, кислотному и температурному стрессам, чем исходная культура.

Отселекционированная и исходная культура проверены на уровень бродительной активности в трубках Дунбара. Бродительная активность обеих культур была высокой.

При сравнительном культивировании селекционной и исходной культур на средах Ридер с 15 и 25% глюкозы отмечено наиболее полное потребление сахара среды отселекционированной культурой (таблица).

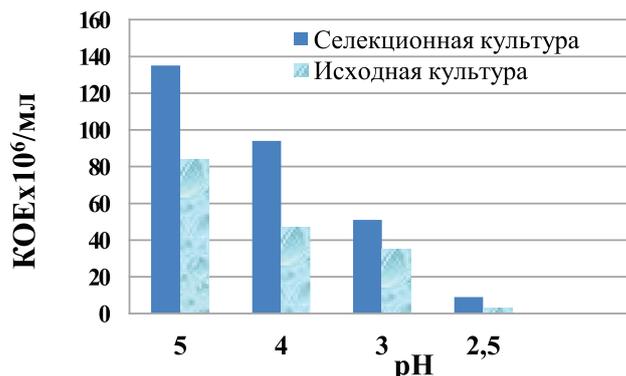


Рис. 3. Динамика роста спиртовых дрожжей в среде культивирования с рН 5,0–2,5

Сбраживание углеводов среды селекционной и исходной культурами дрожжей

Содержание глюкозы в среде, %	Культура	Остаточный сахар, %
15	Селекционная	3,0
15	Исходная	5,0
25	Селекционная	7,0
25	Исходная	8,5

Так, если при культивировании на среде с 15% глюкозы содержание остаточных сахаров в среде культивирования исходной культуры составляет 33% от исходной дозы, то у селекционной культуры этот показатель снижается до 20%. На среде с 25% глюкозы остаточные сахара составили соответственно 34% и 28% от исходного содержания.

### Заключение

Таким образом, в условиях полунепрерывного культивирования проведена автоселекция штамма спиртовых дрожжей с повышенной бродильной активностью. Получен вариант дрожжей, обладающий более высокими показателями осмоотолерантности, устойчивости к низким значениям рН среды и высоким температурам культивирования. Снижение проницаемости цитоплазматической мембраны клеток в ходе автоселекции способствует наиболее стабильному росту культур в среде с повышенным содержанием стрессовых соединений. Сниженная клеточная проницаемость проявляется в сокращении поступления в клетки ограничивающих и угнетающих рост соединений из среды культивирования, что в итоге ограничивает торможение роста и жизнедеятельности дрожжевых клеток конечным продуктом брожения – этиловым спиртом и способствует более высокой его продукции. Повышенная осмоустойчивость также способствует более полному сбраживанию концентрированных сред при производстве этанола.

Полученная культура наряду с осмоотолерантностью обладает также повышенной кислототолерантностью и характеризуется активным ростом при высоких температурах культивирования.

Использование отобранного штамма будет способствовать снижению затрат на производство этилового спирта. Отселекционированный штамм будет использован для дальнейшей работы по интенсификации процесса получения этанола в производственных условиях.

### Список литературы

1. Ajanovic A., Haas R. On the future prospects and limits of biofuels in Brazil, the US and EU // *Applied Energy*. – 2014. – Vol. 135. – P. 730–737.
2. Sato A.G., Silva C.D., Paganin V.A. et al. New, efficient and viable system for ethanol fuel utilization on combined electric/internal combustion engine vehicles // *Journal of Power Sources*. – 2015. – Vol. 294. – P. 569–573.
3. Фахрутдинова А.Р. Биотанол – топливо будущего // *Пищевые технологии и биотехнологии: матер. XV междунар. конф. молодых ученых* (Казань, 13–14 апр. 2016 г.). – Казань, 2016. – С. 378–379.
4. Baeyens J., Kang Q., Appels L. et al. Challenges and opportunities in improving the production of bio-ethanol // *Progress in Energy and Combustion Science*. – 2015. – Vol. 47. – P. 60–88.
5. Zabel H., Sahu J.N., Suely A. et al. Bioethanol production from renewable sources: current perspectives and technological progress // *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. – 2017. – Vol. 71. – P. 475–501.
6. Zheng D.Q., Wu X.C., Tao X.L. et al. Screening and construction of *Saccharomyces cerevisiae* strains with improved multi-tolerance and bioethanol fermentation performance // *Bioresource Technology*. – 2011. – Vol. 102. – P. 3020–3027.
7. Mitsumasu K., Liu Z.-S., Tang Y.-Q. et al. Development of industrial yeast strain with improved acid- and thermo-tolerance through evolution under continuous fermentation conditions followed by haploidization and mating // *Journal of Bioscience and Bioengineering*. – 2014. – Vol. 118. – P. 689–695.
8. Gao L., Liu Y., Sun H. et al. Advances in mechanisms and modifications for rendering yeast thermotolerance // *Journal of Bioscience and Bioengineering*. – 2016. – Vol. 121. – P. 599–606.
9. Ma K., Ruan Z., Shui Z. et al. Open fermentative production of fuel ethanol from wood waste by an acid-tolerant mutant strain of *Zymomonas mobilis* // *Bioresource Technology*. – 2016. – Vol. 203. – P. 295–302.
10. Dong S.-J., Yi C.-F., Li H. Changes of *Saccharomyces cerevisiae* cell membrane components and promotion to ethanol tolerance during the bioethanol fermentation // *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. – 2015. – Vol. 69. – P. 196–203.