



УКРАЇНА

(19) UA (11)

5393

(13) C1

(51) C 12 N 1/18

ДЕРЖАВНЕ
ПАТЕНТНЕ
ВІДОМСТВООПИС ДО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІД(54) ШТАМ ДРІЖДЖІВ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*, MEYEU ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ ХЛІБОПЕКАРНИХ ДРІЖДЖІВ ТА ЕТАНОЛУ НА МЕЛЯСІ

1

(20) 94250560, 12.04.93
(21) 4907195/13
(22) 06.12.90, SU
(46) 28.12.94. Бюл. № 7-1
(56) 1. Авторское свидетельство № 1306949, кл. C 12 N 1/18, 1987.
(71) Інститут загальної генетики ім. В.І.Вавилова (RU); Всесоюзний науково-дослідний Інститут нових харчових продуктів і добавок, (UA)
(72) Куренная Ольга Ніколасівна (RU), Ільїна Лада Дмитрівна, Ткаченко Алла Феодосіївна,

2

Коваль Катерина Олександрівна, Середа Лілія Оксентіївна, Рудніченко Людмила Вікторівна, Мосендз Валентина Григорівна, Янчевський Віктор Казимирович
(73) Український науково-дослідний Інститут спирту і біотехнології продовольчих товарів (UA)
(57) Штамм дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*, Meyen ВКПМ У-1330 для отримання хлібопекарних дріжджів і етанолу на меласі.

Изобретение относится к пищевой промышленности, в частности к спирто-дрожжевой промышленности и микробиологическому синтезу и может быть использовано для производства этилового спирта с одновременным получением прессованных хлебопекарных дрожжей с улучшенными качественными показателями.

Известен штамм дрожжей – гибрид 112, обладающий мальтазной активностью, который используется в смешанной культуре со спиртовой расой В для ферментации мелассы с одновременным получением этанола и прессованных дрожжей (хлебопекарных).

Штамм дрожжей гибрид 112 имеет следующую характеристику.

Технологические свойства. Дрожжи расы В наряду с высокими бродильными свойствами обладают также хорошими хлебопекарными особенностями, что позволяет на спиртовых заводах отделять их от бражки и выпускать их в прессованном виде для хлебопекарной промышленности. Но мальтазная активность таких дрожжей низкая – 800 мин. Поэтому в двухпродуктовом произ-

водстве при сбраживании мелассы на спирт с получением хлебопекарных дрожжей осуществляют брожение по двухстадийному способу, применяя гибрид 112 и расу В. Недостатком известной смешанной культуры 112 и расы В является то, что в готовой продукции прессованных дрожжей мальтазная активность достигает 100 – 120 мин, что является недостаточным для современных требований в новых ускоренных технологиях хлебопечения. Недостатком является также усложнение технологического процесса, связанного с необходимостью раздельного ведения двух культур со смешиванием их в анаэробной стадии технологического процесса двухпродуктового производства, а также низкое содержание трегалозы в биомассе.

Известен применяемый в промышленности на мелассно-спиртовых заводах для получения хлебопекарных дрожжей гибридный штамм дрожжей У-563 [1].

Штамм дрожжей У-563 имеет следующую характеристику.

(19) UA (11) 5393 (13) C1

Морфологические признаки. Размер вегетативных клеток после 24 часов роста при 30°C на солодовом сусле концентрации 8% СВ составляет $7,0 \pm 0,72 \times 8,3 \pm 0,75$ мкм (средний). Форма клеток преобладает яйцевидная, вегетативное размножение – почкованием. На ацетатной среде на 5-ые сутки образуется около 40% асков, спор в аске от 1 до 4-х. Асков с 4-мя спорами около 55%. Форма спор круглая, размер 2,2 x 2,2 мкм.

Культуральные признаки. На солодовом сусле концентрации 8% СВ образуются кольцо и островки пленки на 4-5 сутки, осадок обильный белого цвета. На полной органической агаризованной среде при 80°C клетки штамма образуют колонии круглые, белого цвета, диаметр 4-4,5 мм. Середина сферическая, выпуклая.

На мелассной агаризованной среде при тех же условиях роста колонии вырастают круглые, плоские, с возвышением в центре, белого цвета, диаметр 2,5-3 мм.

Физиологические признаки. Факультативный анаэроб. Оптимум роста 30°C.

Сбраживает: глюкозу, фруктозу, сахарозу, мальтозу, галактозу, раффинозу. Не сбраживает: лактозу, ксилозу, инулин, арабинозу. Желатину не разжижает. Крахмал не сбраживает.

Усваивает: глицерин, этанол.

Технологические свойства. Сбраживает концентрированные меласные рассиропки с содержанием сухих веществ 24-26% с получением концентрации спирта в готовой бражке 9,0-10,0 об.%. Накапливает в дрожжегенераторах 450-500 млн. клеток в 1 мл с высокой физиологической активностью. Мальтазная активность дрожжей 240-300 мин. Недостатком известного штамма является низкая мальтазная активность, которая не позволяет использовать хлебопекарные дрожжи в новых ускоренных технологиях тестоведения, для которых дрожжи должны обладать мальтазной активностью не менее 60-90 мин. Постановление Совмина СССР № 1151 от 14.01.1987 г.).

Задачей изобретения является селекция нового штамма дрожжей, позволяющего при ферментации мелассы синтезировать этанол с одновременным получением хлебопекарных дрожжей с улучшенными показателями качества: высокой мальтазной активностью и высоким содержанием трегалозы.

Заявленный новый штамм дрожжей-314 (ВКПМ У-1330) синтезирует этанол с одновременным получением хлебопекарных дрожжей с улучшенными показателями качества: мальтазной активностью 60-90 мин и содержанием трегалозы к СВ 14-18%, высокими хлебопекарными свойствами, что по-

зволяет использовать его в новых ускоренных безопасных технологиях тестоведения.

Достигается технический результат гибридизацией дрожжей культур с определенными свойствами, получением триплоидных гибридов с последующей селекцией нового штамма по продуктивным и экономическим критериям.

Новый штамм дрожжей – триплоидный гибрид, получен методом популяции клеток родительских штаммов, отличающихся по типам спаривания, с применением генетических маркеров и селективных сред. Родительскими культурами являются диплоидный осмофильный штамм вида *Saccharomycetes cerevisiae* M-5 (Авт.свид.СССР № 658895, 1.07.77), от которого получен мутант с дыхательной недостаточностью и штамм 1109-22 *ahis*, мутантный по гистидиновому локусу и с высокой мальтазной активностью – гаплоидный сегрегант производственной линии хлебопекарных дрожжей.

От одного из родителей гибрид наследовал повышенную генеративную активность, спиртоустойчивость, высокие экономические показатели продуктивности при анаэробной ферментации мелассы, от другого родителя – улучшенные хлебопекарные свойства, активный ферментный зимазный и мальтазный комплексы, способность синтезировать в клетке трегалозу, являющуюся одним из условий сохранения физиологической активности при обезвоживании.

С полученным таким образом триплоидным гибридом проведена селекционная работа по продуктивным и экономическим критериям.

Морфологические признаки. Размер вегетативных клеток после 24 часов роста при 30°C на солодовом сусле крепости 8% СВ составляет $9,3 \pm 0,71 \times 7,4 \pm 0,76$ мкм (средний). Форма клеток преобладает овальная и яйцевидная; вегетативное размножение – почкованием. На ацетатной среде на 5-ые сутки образуется не менее 50% асков, спор в аске от 1 до 4-х, асков с 4-мя спорами не менее 70%. Форма спор круглая, размер от 3,5 мкм до 5 мкм в зависимости от пloidности.

Культуральные признаки. Клетки штамма активно сбраживают солодовое сусло плотностью 8% СВ на первые сутки, на 4-5 сутки на стенке пробирки образуется кольцо, поверхность среды чистая, на дне обильный осадок белого цвета.

На полной органической агаризованной среде при 30°C клетки штамма образуют колонии круглые, гладкие, белого – чуть кремового цвета, с ровным краем, хорошо выпуклые, через 96 часов роста достигают 5-6

мм в диаметре (посев на чашку Петри 10 см в диаметре около 50 клеток).

На мелассной агаризованной среде (меласса 7% СВ, pH 5,5-6,0) при тех же условиях роста колонии вырастают круглые, гладкие, слегка кремовые, с гладким краем, середина сферически выпуклая.

Физиологические признаки. Факультативный анаэроб. Оптимум роста при 30°C. Желатину не разжижает, крахмал не сбраживает.

Отношение к сахарам: сбраживает глюкозу, фруктозу, сахарозу, мальтозу, галактозу, раффинозу на 1/3, не сбраживает ксилозу, лактозу, инулин, арабинозу. Отношение к спиртам: усваивает глицерин, этанол; не усваивает маннит, дульцит, сорбит.

Отношение к кислотам: усваивает уксусную и молочные кислоты; не усваивает янтарной, яблочной, винной и лимонной кислот. Без источников азота в среде не размножаются, усваивают неорганический азот. Клетки штамма чувствительны к нистатину и циклогексимиду, практически нечувствительны к бактериальным антибиотикам.

Технологические свойства. Клетки штамма сбраживают мелассное сусло с содержанием сухих веществ 20-22%, синтезируют этанол до 7-8 об.% и биомассу в количестве 3,5-5,0 кг/дал спирта, которая используется для получения прессованных хлебопекарных дрожжей, соответствующих по качественным показателям ГОСТу 171-81. Дрожжи содержат активный мальтазный комплекс, сбраживающий 5% раствор мальтозы (в приборе Елецкого) за 60-80 мин. и содержит трегалозу в количестве 14-18% к сухим веществам биомассы.

Штамм характеризуется высокой генеративной активностью на аэробной стадии дрожжегенерирования, равной 0,30-0,32 час⁻¹. Большие размеры клеток придают штамму хорошие технологические свойства на стадии выделения и прессования.

Технологические и продуктивные свойства заявляемого штамма У-1330 иллюстрируются следующим примером

Пример. Оценка производственных качеств штамма ВК ПМ У-1330 дрожжей проводилась на стендовой установке, состоящей из дрожжегенератора с рабочим объемом 1,0 л и батареи ферментеров, состоящих из четырех сосудов с общим рабочим объемом 8,0 л. Скорость обмена батареи (аэробной стадии и анаэробной ферментации) при непрерывном процессе сбраживания составляла 24 часа.

Ферментация мелассы проводилась по усовершенствованной однопоточной схеме

брожения соответствующей регламентным нормам. При ферментации мелассы использовалась одна партия мелассы со следующими показателями: массовая доля сухих веществ - 79,9, pH 6,4; прямая поляризация 45,25; инверсионная поляризация - 16,25; инвертный сахар - 0,827; массовая доля сбраживаемых сахаров - 47,03; доброкачественность - 56,6.

Концентрация мелассной рассиропки при непрерывном процессе составляла 19,7-20,5% с содержанием сахара 125,0-128,2 г/л.

Для дрожжегенерирования (аэробной стадии) вводили дрожжи: У-1330 (заявляемый штамм), У-563, Г-112 в смеси с расой В, используемые на заводах отрасли.

После анаэробного сбраживания из зрелой бражки на вакуум-фильтрах получали прессованные дрожжи и определяли их качественные показатели по ГОСТ 171-81, а также мальтазную активность и содержание трегалозы.

Зрелую бражку перегоняли, в дистиллятах определяли концентрацию спирта пикнометрическим методом, в бражке определяли несброженные сахара колориметрическим методом с применением реорцина.

Наряду с технологическими показателями рассчитывали также следующие характеристики процесса:

- количество спирта, синтезированного в опыте, в об.% и г/л (P_1);

- количество биомассы, синтезированной при ферментации, в пересчете на 75% влажности и в виде абсолютно сухой биомассы (P_2 , г/л);

- общее количество целевых продуктов $P = P_1 + P_2$, г/л;

- количество сахара, использованного в процессе синтеза спирта и хлебопекарных дрожжей, в г/л ($S_0 - S_1$);

- экономический коэффициент биосинтеза суммы целевых продуктов, рассчитанный на введенный и использованный сахар (V_{S_0} и $V_{S_0 - S_1}$).

Концентрация сбраживаемого сусла составляла во всех опытах 19,6-20,5% СВ, и в среднем была одинакова во всех вариантах опытов с разными штаммами дрожжей

Техно-химические показатели анаэробной ферментации мелассы с получением этанола и хлебопекарных дрожжей приведены в табл.1.

При использовании засевных дрожжей нового штамма У-1330 получена зрелая бражка с содержанием спирта 7,28-7,47 об.% (57,44-58,91 г/л) и прессованные хлебопекарные дрожжи в пересчете на 75%

влажности 33,5-35,8 г/л. По отношению к синтезированному этанолу выход хлебопекарных дрожжей составил 4,6-4,8 кг/дал. По общей продуктивности целевого продукта, этанола г/л + биомассы, АСБ г/л, который для заявляемого штамма составил 65,81-67,86 г/л, новый штамм не уступает известным промышленным штаммам У-563 и смешанной культуре гибрида Г-112 с расой В. При этом экономический коэффициент синтеза совокупного целевого продукта на введенный сахар составил у заявляемого штамма У-1330 - 52-65%-52,93%, у штамма-прототипа У-563-52,30%-52,52% у смеси штаммов Г-112 - расы В (аналог) - 51,93% - 52,18%, что свидетельствует о хороших продуктивных качествах нового штамма для двухпродуктовой технологии анаэробной ферментации мелассы.

Показатели качества хлебопекарных дрожжей приведены в табл.2. Качество хлебопекарных дрожжей, полученных с применением нового штамма У-1330, соответствовало ГОСТу 171-81.

Преимущество нового штамма У-1330 по сравнению с известными У-563 и Г-112 + раса В, состоящее в улучшении качества хлебопекарных дрожжей (высокая мальтазная активность* по прибору Елецкого 57-89 мин., по двум подъемам теста 65-82 мин.), сочетается с высоким содержанием трегалозы (12-18% к СК биомассы).

Высокая ферментативная, в том числе мальтазная, активность и высокое содержание трегалозы и биомассы, полученной в двухпродуктовом производстве после анаэробной ферментации мелассы, являются отличительными признаками нового штамма.

Таким образом, новый триплоидный гибрид У-1330 позволяет в двухпродуктовой технологии ферментации мелассы получить этанол и хлебопекарные дрожжи с экономичностью синтеза целевых продуктов на уровне известных промышленных штаммов, но с улучшенными показателями качества, высокой мальтазной активностью не менее 60-90 мин. и высоким содержанием трегалозы в биомассе - 12-18% к СВ.

25

Таблица 1

Техно-химические показатели анаэробной ферментации мелассы с получением этанола и хлебопекарных дрожжей штаммами дрожжей У-1330 (заявляемый) У-563 и смеси культуры Г-112 и расы В

Показатели	Штаммы дрожжей		
	У-1330 (заявляемый)	У-563	Г-112+раса В
Концентрация начальная, % СВ	19,6-20,5	19,6-20,5	19,6-20,5
Видимая концентрация, % СВ	6,7-6,9	6,5-6,8	6,5-6,8
Истинная концентрация, % СВ	9,3-9,8	9,7-10,1	9,3-9,8
Реакция среды, рН	4,8-4,9	4,8-4,9	4,8-5,0
Кислотность, °Д	0,9-1,0	0,9-1,0	0,9-1,0
Введенный сахар, г/л	125,0-128,2	125,0-128,2	125,0-128,2
Остаточный сахар, г/л	1,7-2,0	1,6-1,9	1,8-2,1
Использованный сахар, г/л	123,3-126,2	123,4-126,3	123,2-126,1
Этанол, об. %	7,28-7,47	7,27-7,45	7,35-7,50
Этанол, г/л, Р ₁	57,44-58,91	57,36-58,78	57,99-59,17
Биомасса 75% влажности, г/л	33,5-35,8	32,1-34,2	27,7-30,5
Биомасса, АСД, г/л	8,37-8,95	8,02-8,55	6,92-7,62
Совокупный целевой продукт, г/л, Р (Р ₁ +Р ₂)	65,81-67,86	65,38-67,33	64,91-66,79
Экономический коэффициент синтеза на введенный сахар, %	52,65-52,93	52,30-52,52	51,93-52,10

Продолжение табл 1

Показатели	Штаммы дрожжей		
	У-1330 (заявляемый)	У-563	Г-112+раса В
Экономический коэффициент синтеза на использованный сахар, %	53,37-53,77	53,33-53,98	52,69-52,97
Выход дрожжей, кг/дал	4,6-4,8	4,4-4,6	3,8-4,1

Таблица 2

Показатели качества прессованных хлебопекарных дрожжей, полученных на штаммах У-1330 (заявляемый), У-563 и Г-112+раса при анаэробной ферментации мелассы

Показатели	ГОСТ 171-81 изменения	У-1330 (заявляемый)	У-563	Г-112+раса В
Цвет	Равномерный, сероватый без пятен, допускается кремовый оттенок	Равномерный светлый с кремовым оттенком	Равномерный светлый с кремовым оттенком	Равномерный светлый с кремовым оттенком
Консистенция	Плотная, дрожжи должны легко ломаться	Плотная, легко ломаются	Плотная, легко ломаются	Плотная, легко ломаются
Запах	Свойственный дрожжам, не допускается запах плесени и др. посторонние запахи	Свойственный дрожжам, без постороннего запаха	Свойственный дрожжам, без постороннего запаха	Свойственный дрожжам, без постороннего запаха
Вкус	Пресный, свойственный дрожжам, без постороннего привкуса	Пресный, свойственный дрожжам, без постороннего привкуса	Пресный свойственный дрожжам, без постороннего привкуса	Пресный, свойственный дрожжам, без постороннего привкуса
Плотность, %, не более	75	72,3-74,0	72,3-73,9	74,3-74,6
Подъемная сила (подъем теста до 70мм), мин. не более	70	47-59	50-60	50-64
Кислотность 100г дрожжей в день выработки в пересчете на уксусную к-ту, мг, не более	120	82-94	90-98	95-107

Продолжение табл.2

Показатели	ГОСТ 171-В, изменения	У-1330 (заявляемый)	У-563	Г-112+раса В
Стойкость при хранении при 35°С, час не менее	48	90	90	90
Содержание трегалозы, % на СВ	—	12,0-18,0	13,7-17,0	5,8-9,2
Мальтазная активность, мин, по прибору Елецкого	—	57-89	240-300	100-120
Мальтазная активность по двум подъемам теста, мин	—	65-82	90	90

Упорядник А.Артюхова

Техред М.Моргентал

Коректор М.Ткач

Замовлення 606

Тираж

Підписне

Державне патентне відомство України,
254655, ГСП, Київ-53, Львівська пл., 8

Виробничо-видавничий комбінат "Патент", м. Ужгород, вул.Гагаріна, 101