

О.Д. Янева, С.В. Сичкарь, А.А. Воронина, В.С. Подгорский

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К. Заболотного НАН Украины
ул. Академика Заболотного, 154, Киев ГСП, Д03680, Украина

ОТБОР ТЕРМОФИЛЬНЫХ ШТАММОВ ДРОЖЖЕЙ, АКТИВНО СБРАЖИВАЮЩИХ ЛАКТОЗУ

Проведен скрининг и отбор лактозоферментирующих штаммов дрожжей среди 97 штаммов разных таксономических групп дрожжей Украинской коллекции микроорганизмов с целью получения этанола из лактозы сыворотки. Из 18 штаммов дрожжей, способных ферментировать лактозу при 48°C (1 штамм *K.lactis*, 16 штаммов *K.marxianus* и 1 штамм *S.kefyr*), 15 штаммов активно утилизировали лактозу в первые 24-48 ч культивирования. Наблюдалось значительное ингибирование роста отобранных штаммов (более 80 %) в среде, содержащей 6 % этанола.

Ключевые слова: сыворотка, лактозоферментирующие дрожжи, этанол.

Биоэтанол является самым распространенным видом биотоплива. В нынешнее время его получают преимущественно путем ферментации растительного сырья, чаще всего сахарного тростника и зерновых [2, 9]. Однако в связи с ростом цен на пищевые продукты возникает необходимость поиска альтернативных источников сырья для производства этанола. К таким можно отнести сыворотку, которая является основным отходом производства сыра и может приводить к загрязнению окружающей среды. Сыворотка – это недорогой и богатый питательными веществами продукт, который содержит лактозу (4,5-5 %), растворимые белки (0,6-0,8 %), липиды (0,4-0,5 %), минеральные соли (8-10 % сухого веса), и может служить источником питания для некоторых дрожжей. Хотя к аэробной ассимиляции лактозы способны многие виды дрожжей, лактозоферментирующих дрожжей гораздо меньше, среди них – *Kluveromyces marxianus* и *Kluveromyces lactis* [5].

В результате производства 1 кг сыра получают 9 л сыворотки. По разным данным, больше половины сыворотки, производимой в мире, попадает в отходы [6]. В связи с этим использование активных штаммов дрожжей, способных сбраживать лактозу сыворотки, может служить одним из альтернативных и перспективных процессов получения биоэтанола, что одновременно позволит решить проблему загрязнения окружающей среды отходами производства сыра [5].

Ряд авторов отмечают преимущества использования термофильных штаммов дрожжей в ферментационных процессах: снижение риска инфицирования, уменьшение затрат на охлаждение [3, 8].

Целью данной работы было провести скрининг и отбор штаммов дрожжей, способных ферментировать лактозу в широком диапазоне температур.

Материалы и методы. В работе использовали 97 штаммов дрожжей из Украинской коллекции микроорганизмов: *Kluveromyces marxianus* (36 штаммов), *Kluveromyces lactis* (11 штаммов), *Kluveromyces dobzhanskii* (5 штаммов), *Kluveromyces wickerhamii* (1 штамм), *Candida kefyr* (9 штаммов), *Candida odintsovae* (1 штамм), *Candida intermediae* (1 штамм), *Candida cacaioi* (1 штамм), *Candida rugosa* (6 штаммов), *Candida parapsilosis* (15 штаммов), *Dekkera bruxellensis* (8 штаммов) и *Saccharomyces bayanus* (3 штамма).

Способность дрожжей ферментировать лактозу исследовали в среде, содержащей 0,5% дрожжевого экстракта и 2 % лактозы, в трубках Дунбара на протяжении 28 суток при температуре 28°C, а также при температуре 42 °C и 48 °C в течении 7 суток.

Для определения способности дрожжей ферментировать лактозу использовали среду следующего состава (г/л): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 3, MgSO_4 – 0,5, KH_2PO_4 – 1, дрожжевой экстракт – 3. Поскольку кляйверомицетам для брожения сахаров предпочтительны анаэробные или лимитированные по кислороду условия [13], в среду добавляли 200 мг/л тиогликолята натрия [11]. В качестве единственного источника углерода добавляли лактозу (30 г/л). Также использовали среду на основе сыворотки, которую готовили следующим образом: нативную сыворотку прогревали до 85-90°C, фильтровали через фильтровальную бумагу несколько раз до осветления жидкости и доводили pH среды до 5 с помощью серной кислоты, добавляли минеральные

© О.Д. Янева, С.В. Сичкарь, А.А. Воронина, В.С. Подгорский, 2012

соли и дрожжевой экстракт в концентрациях, указанных выше. Суточную культуру дрожжей вносили в среду и культивировали в стационарных условиях (без перемешивания) при 28 °С.

Устойчивость дрожжей к этанолу определяли в среде YPD (г/л): глюкоза – 20, пептон – 20, дрожжевой экстракт – 10, рН=5,5. Этанол добавляли после стерилизации непосредственно перед инокуляцией дрожжей. Культивирование проводили при 28 °С на качалках при 240 об/мин. Биомассу определяли на колориметре КФК-2 при 540 нм с пересчетом по калибровочной кривой.

Концентрацию лактозы в среде определяли с помощью колориметрического метода с антроном [10].

Все эксперименты проводили в 3 повторностях.

Результаты и их обсуждение. Способность ассимилировать лактозу в аэробных условиях характерна для многих видов дрожжей, а сбраживать лактозу с образованием этанола способны лишь немногие, в их числе *Kluyveromyces marxianus* и *Kluyveromyces lactis* [5]. Нами было исследовано 97 штаммов дрожжей, принадлежащих к разным таксономическим группам, которые, согласно литературным данным [4, 14], способны хотя бы к слабой ферментации лактозы (табл. 1).

Таблица 1

Ферментация лактозы коллекционными штаммами дрожжей при 28 °С

Вид	Общее количество штаммов	Количество штаммов, ферментирующих лактозу														
		7 суток культивирования					14 суток культивирования					28 суток культивирования				
		'	+	±	++	+++	'	+	±	++	+++	'	+	±	++	+++
<i>K. dobzhanskii</i>	5	5				5					5					
<i>K. lactis</i>	11	8			2	1	7			1	3	7			1	3
<i>K. marxianus</i>	36	11	3	2	1	19	9	2	1	2	22	5	3	2	2	24
<i>K. wickerhamii</i>	1	1					1					1				
<i>C. cacaoi</i>	1	1					1					1				
<i>C.intermedia</i>	1	1					1					1				
<i>C. kefir</i>	9	6			1	2	6				3	6				3
<i>C.odintsovae</i>	1	1					1					1				
<i>C.parapsilosis</i>	15	15					15					15				
<i>C.rugosa</i>	6	6					6					6				
<i>S. bayanus</i>	3	3					3					3				
<i>D. bruxellensis</i>	8	8					8					8				

Примечание: «+» – слабая ферментация лактозы, «++» – образовавшийся газ вытесняет среду из трубки Дунбара на ½, «+++» – образовавшийся газ вытесняет среду из трубки Дунбара на 2/3, «++++» – образовавшийся газ полностью вытесняет среду из трубки Дунбара, «-» – лактоза не ферментируется.

Было показано, что подавляющее большинство штаммов, принадлежащих к виду *K.marxianus* (31 штамм из 36 исследованных) и ряд штаммов, принадлежащих к видам *K.lactis* (4 штамма) и *C.kefir* (3 штамма) сбраживали лактозу при 28 °С. Часть из них ферментировали лактозу уже в первые 2-3 суток культивирования. Однако ряд штаммов продемонстрировали замедленную ферментацию лактозы, т.е. после 7 суток культивирования.

Штаммы, принадлежащие к видам *K.dobzhanskii*, *K.wickerhamii*, *C.odintsovae*, *C.intermedia*, *C.cacaoi*, *C.rugosa*, *C.parapsilosis*, *D.bruxellensis* и *S.bayanus* не сбраживали лактозу.

Для дальнейших исследований было отобрано 32 штамма дрожжей, активно сбраживающих лактозу. Была исследована способность отобранных штаммов ферментировать лактозу при повышенной температуре (42 °С та 48 °С). Значительная часть отобранных штаммов дрожжей активно сбраживали лактозу при 42 °С, однако при повышении температуры до 48 °С количество штаммов, ферментирующих лактозу, резко сократилось: из 32 исследованных штаммов 28 ферментировали лактозу при 42°С, и лишь 18 штаммов были способны сбраживать лактозу при 48°С – 1 штамм *K.lactis*, 16 штаммов *K.marxianus* и 1 штамм *C.kefir* (табл. 2). Все они были отобраны для дальнейших исследований.

Ферментация лактозы коллекционными штаммами дрожжей при повышенной температуре

№ п/п	Штамм (УКМ Y-)	Ферментация лактозы при 42°C	Ферментация лактозы при 48°C	№ п/п	Штамм (УКМ Y-)	Ферментация лактозы при 42°C	Ферментация лактозы при 48°C
1	<i>K.lactis</i> 325	-		17	<i>K.marxianus</i> 315	++++	-
2	<i>K.lactis</i> 327	+++	±	18	<i>K.marxianus</i> 317	++++	+++
3	<i>K.lactis</i> 328	++	-	19	<i>K.marxianus</i> 318	++++	++++
4	<i>K.lactis</i> 331	++	-	20	<i>K.marxianus</i> 319	++++	++++
5	<i>K.marxianus</i> 295	±	-	21	<i>K.marxianus</i> 320	++++	++++
6	<i>K.marxianus</i> 296	-		22	<i>K.marxianus</i> 1996	++++	+
7	<i>K.marxianus</i> 297	++++	++	23	<i>K.marxianus</i> 2071	++++	+++
8	<i>K.marxianus</i> 301	++++	±	24	<i>K.marxianus</i> 2096	++++	+++
9	<i>K.marxianus</i> 302	+++	-	25	<i>K.marxianus</i> 2098	++++	++++
10	<i>K.marxianus</i> 303	++++	++++	26	<i>K.marxianus</i> 2387	++++	++
11	<i>K.marxianus</i> 304	+++	-	27	<i>K.marxianus</i> 2388	++++	++++
12	<i>K.marxianus</i> 306	++	-	28	<i>K.marxianus</i> 13	+	-
13	<i>K.marxianus</i> 308	++++	++++	29	<i>K.marxianus</i> 17	++++	++++
14	<i>K.marxianus</i> 309	++++	-	30	<i>C.kefyr</i> 900	++++	++++
15	<i>K.marxianus</i> 312	++	-	31	<i>C.kefyr</i> 2511	-	
16	<i>K.marxianus</i> 313	++++	++++	32	<i>C.kefyr</i> 60	-	

Примечание: «+» – слабая ферментация лактозы, «++» – образовавшийся газ вытесняет среду из трубки Дунбара на 1/2, «+++» – образовавшийся газ вытесняет среду из трубки Дунбара на 2/3, «++++» – образовавшийся газ полностью вытесняет среду из трубки Дунбара, «-» – лактоза не ферментируется.

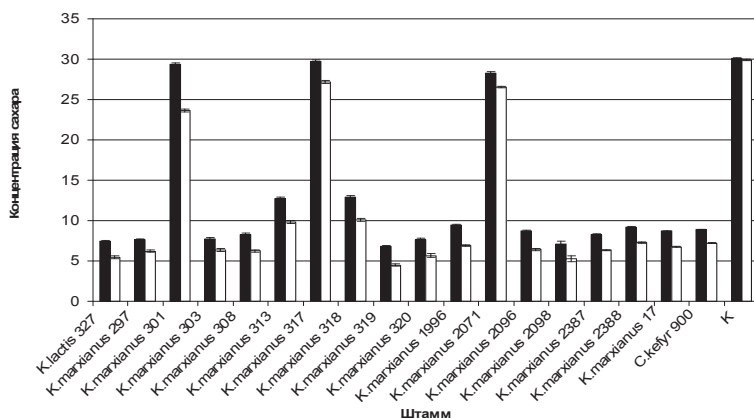
Как известно, для наиболее эффективного сбраживания лактозы клейверомицетам необходимо низкое содержание кислорода в среде [13]. Для этого в среду был добавлен тиогликолат натрия в концентрации 200 мг/л [11]. Была исследована способность отобранных штаммов ферментировать лактозу в стационарных условиях (без перемешивания) в потенциально анаэробных условиях в среде, где единственным источником углерода служила лактоза (30 г/л) или лактоза сыворотки (40 г/л) (рис. 1).

Было показано, что подавляющее большинство исследованных штаммов в стационарных условиях (без перемешивания) за 48 ч культивирования при 28 °C утилизировали 75-85 % лактозы в среде с лактозой и 70-78 % лактозы в среде с сывороткой. 3 штамма *K.marxianus* УКМ Y-301, Y-317 и Y-2071 в данных условиях утилизировали лактозу значительно медленнее.

Наиболее активная утилизация лактозы клейверомицетами происходила уже в первые сутки культивирования. Неполная ассимиляция лактозы отобранными штаммами (до 80% лактозы за 48 ч культивирования) может быть связана с невысокой устойчивостью данных штаммов к этанолу, который образуется в результате брожения лактозы. В связи с этим была изучена устойчивость к этанолу 15 отобранных штаммов дрожжей, сбраживающих лактозу. Первоначально был изучен рост данных штаммов в аэробных условиях на качалках с 240 об/мин в среде YPD, содержащей 6 % этанола (рис. 2). Согласно данным ряда авторов [1,7] подобная концентрация этанола в среде приводит к заметному подавлению роста клейверомицетов. Спустя 20 ч культивирования при 28°C в среде YPD, содержащей 6 % этанола, накопление биомассы у большинства штаммов составляло менее 20 % от контроля (в среде YPD без этанола). Наиболее чувствительными к действию этанола были штаммы *K.marxianus* УКМ Y-308 и *C.kefyr* УКМ Y-900, накопление биомассы которых снижалось на 97,28 % и 97,58 %, соответственно. Штаммы *K.marxianus* УКМ Y-320 и Y-2098 характеризовались наибольшей устойчивостью к этанолу, в частности, рост штамма Y-320 снижался на 79,14 %, а штамма Y-2098 – на 79,57 %. Во всех случаях наблюдали значительную задержку начала экспоненциальной фазы роста, как показано на рис. 3 на примере штаммов *K.marxianus* УКМ Y-313 и Y-319. Такую невысокую устойчивость к этанолу клейверомицетов по сравнению с другими штаммами дрожжей, широко применяемыми для получения биоэтанола,

– *Saccharomyces cerevisiae*, отмечали и другие авторы [7,12]. Необходимы дополнительные исследования относительно перспективности отобранных штаммов для получения этанола.

А



Б

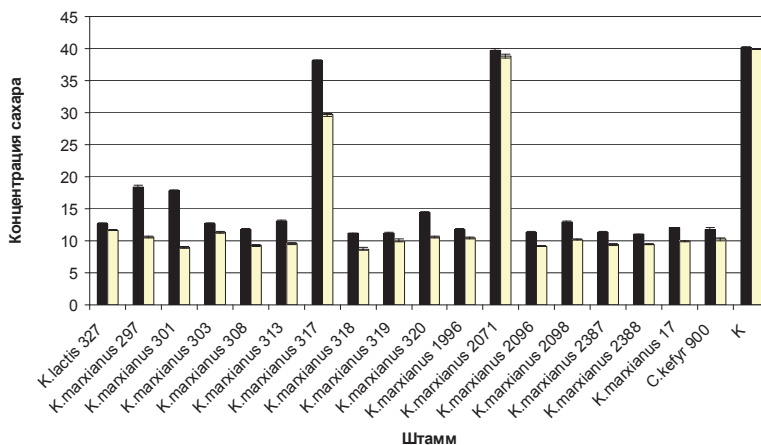


Рис. 1. Утилизация лактозы коллекционными штаммами дрожжей в среде с лактозой (А) и сывороткой (Б) в стационарных условиях. Колонки черного цвета – 24 ч культивирования, белого – 48 ч культивирования.

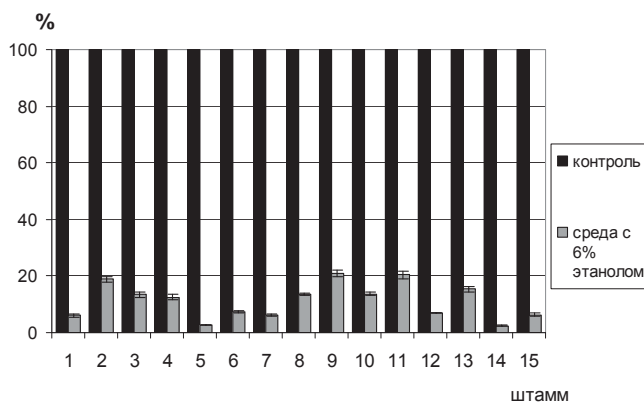


Рис. 2. Влияние этанола на накопление биомассы лактозоферментирующими дрожжами: 1 – *K.marxianus* УКМ Y-1996, 2 – *K.marxianus* УКМ Y-17, 3 – *K.marxianus* УКМ Y-297, 4 – *K.marxianus* УКМ Y-303, 5 – *K.marxianus* УКМ Y-308, 6 – *K.marxianus* УКМ Y-313, 7 – *K.marxianus* УКМ Y-318, 8 – *K.marxianus* УКМ Y-319, 9 – *K.marxianus* УКМ Y-320, 10 – *K.marxianus* УКМ Y-2096, 11 – *K.marxianus* УКМ Y-2098, 12 – *K.marxianus* УКМ Y-2387, 13 – *K.marxianus* УКМ Y-2388, 14 – *C.kefyr* УКМ Y-900, 15 – *K.lactis* УКМ Y-327.

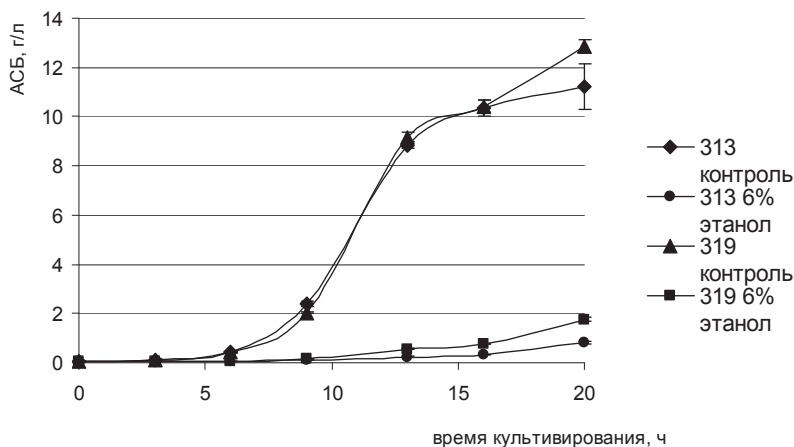


Рис. 3. Динамика роста штаммов *K.marxianus* УКМ Y-313 и Y-319 в среде, содержащей 6 % этанола.

Таким образом, представленные данные свидетельствуют о значительных различиях в способности ферментировать лактозу, а также устойчивости к этанолу изученных штаммов дрожжей. Дальнейший отбор штаммов для получения биоэтанола будет определяться не только высокой сбраживающей активностью, но и устойчивостью штамма-производителя к температуре, повышенным концентрациям этанола и субстрата.

О.Д. Янсва, С.В. Січкач, Г.О. Вороніна, В.С. Підгорський

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України, Київ

ВІДБІР ТЕРМОФІЛЬНИХ ШТАМІВ ДРІЖДЖІВ, АКТИВНО ФЕРМЕНТУЮЧИХ ЛАКТОЗУ

Резюме

Проведено скринінг та відбір штамів дріжджів, здатних ферментувати лактозу, серед 97 штамів різних таксономічних груп Української колекції мікроорганізмів, з метою отримання етанолу з лактози сироватки. З 18 штамів дріжджів, здатних ферментувати лактозу при 48°C (1 штам *K.lactis*, 16 штамів *K.marxianus* та 1 штам *C.kefyr*) 15 штамів активно утилізували лактозу в перші 24-48 год культивування. Спостерігали значне пригнічення росту відібраних штамів (більш ніж 80%) в середовищі, що містило 6% етанолу.

Ключові слова: сироватка, лактозоферментуючі дріжджі, етанол

O.D. Ianiava, S.V. Sichkar, A.A. Voronina, V.S. Pidgorskyi

Zabolonty Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

SELECTION OF THERMOPHILIC LACTOSE-FERMENTING YEAST STRAINS

Summary

The screening and selection of lactose-fermenting yeasts among 97 collection yeast strains belonging to different taxonomic groups has been conducted to obtain ethanol from whey. The strains (n=18) (1 strain of *K.lactis*, 16 strains of *K.marxianus* and 1 strain of *C.kefyr*) fermented lactose at 48 °C and 15 selected strains rapidly consumed lactose within 24-48 h of cultivation. The presence of 6% of ethanol in the medium resulted in a considerable growth inhibition (more than 80%) of the selected strains.

The paper is presented in Russian.

Key words: whey, lactose-fermenting yeasts, ethanol.

The author's address: Ianiava O.D., Zabolonty Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine; 154, Acad. Zabolonty St., Kyiv, D 03680, Ukraine.

1. Голубев В.И., Голубев Н.В. Отбор и характеристика дрожжей, активно сбраживающих лактозу // Прикладная биохимия и микробиология. – 2004. – **40**, №3. – С. 332–336.
2. Antoni D., Zverlov V.V., Schwarz W.H. Biofuels from microbes // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2007. – **77**, N 1. – P. 23–35.
3. Banat I.M., Nigam P., Singh D., Marchant R., McHale A.P. Review: ethanol production at elevated temperatures and alcohol concentrations: Part 1 – Yeasts in general // World J. Microb. Biot. – 1998. – **14**, N6. – P. 809–821
4. Barnett J.A., Payne R.W., Yarrow D., Barnett L. Yeasts: Characteristics and Identification. Third edition. – Cambridge: Cambridge University Press, 2000. – 1150 p.
5. Guimaraes PM, Teixeira JA, Domingues L. Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey // Biotechnol. Adv. – 2010. – **28**, N 3. – P. 375–384.
6. Kosikowski F.V. Whey utilization and whey products // J. Dairy Sci. – 1979. – **62**, N 7. – P. 1149–1160.
7. Lee C.H., Yang S.A., Rho J.W., Lee S.Y., Nam D.H. Ethanol fermentation in lactose medium using a fusant strain of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces fragilis* // J. Microb. Biotechnol. – 1992. – **2**, N2. – P. 108–114.
8. Limtong S., Sringiew C., Yongmanitchai W. Production of fuel ethanol at high temperature from sugar cane juice by a newly isolated *Kluyveromyces marxianus* // Bioresour. Technol. – 2007. – **98**, N 17. – P. 3367–3374.
9. Mabee W.E. Policy options to support biofuel production // Adv. Biochem. Eng. Biotechnol. – 2007. – **108**. – P. 329–357.
10. Scott T.A., Mlevin E.H. Determination of dextran with anthrone // Anal. Chem. – 1953. – **25**, N 11. – P. 1656–1661.
11. Ozmihci S., Kargi F. Kinetics of batch ethanol fermentation of cheese-whey powder (CWP) solution as function of substrate and yeast concentrations // Bioresour. Technol. – 2007. – **98**, N 16. – P. 2978–84.
12. Rosa M.F., Sá-Correia I. Ethanol tolerance and activity of plasma membrane ATPase in *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* // Enzyme Microb. Technol. – 1992. – **14**, N 1. – P. 23–7.
13. Silveira W.B., Passos F.J.V., Mantovani H.C., Passos F.M.L. Ethanol production from cheese whey permeate by *Kluyveromyces marxianus* UFV-3: a flux analysis of oxido-reductive metabolism as a function of lactose concentration and oxygen levels // Enzyme Microb. Technol. – 2005. – **36**, N 7. – P. 930–936.
14. *The Yeasts* A Taxonomic Study. Forth edition / Ed. C.P. Kurtzman and J.W. Fell. – Amsterdam etc.: Elsevier, 1998. – 1055 p.

Отримано 12.09.2011