

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

SERIES OF BIOLOGICAL AND MEDICAL

ISSN 2224-5308

Volume 1, Number 319 (2017), 112 – 117

E. A. Oleinikova, T. V. Kuznetsova, M. G. Saubenova, A. A. Aytzhanova, M. M. Shormanova

Republican State Enterprise "Institute of Microbiology and Virology",
Committee of Science, Ministry of Education and Science, Almaty, Kazakhstan.
E-mail: physiol_lab@bk.ru

ADAPTATION OF ETHANOL PRODUCING YEAST TO INCREASED OSMOTIC PRESSURE OF THE MEDIUM

Abstract. The aim of this work is the adaptation of ethanol producing yeast *Saccharomyces cerevisiae* to increasing osmotic pressure of the medium to improve cells resistance to high concentrations of ethanol. Adaptation was performed by successive cultivation in media with increasing NaCl content of 5 to 15%. The growth activity was evaluated by the optical density of yeast suspensions for 96 hours of culturing. With increasing concentration of sodium chloride in the medium the number of actively growing variants was reduced, lag phase elongation was observed. Two variants of the 18 adapted cultures with the highest resistance to increased osmotic pressure of the medium, characterized by changes in cell permeability, were selected. These variants had a high fermentation activity when cultured in the wort with 10% (according to the volume) of ethanol in the absence of CO₂ emission by initial cultures in these conditions. Thus, alcohol yeast adaptation to elevated concentrations of sodium chloride in the medium contributes to modify their cell walls and to enhance their stability to the final product of fermentation ethanol. Using selected variants will allow intensifying the process of bioethanol production and increasing its economic efficiency by increasing the yield of the final product at the same manufacturing costs.

Keywords: yeast, bioethanol, osmotic pressure, adaptation, ethanol tolerance, fermentative activity.

УДК 579.6

Е. А. Олейникова, Т. В. Кузнецова, М. Г. Саубенова, А. А. Айтжанова, М. М. Шорманова

РГП "Институт микробиологии и вирусологии" КН МОН РК, Алматы, Казахстан

АДАПТАЦИЯ ЭТАНОЛ ПРОДУЦИРУЮЩИХ ДРОЖЖЕЙ К ПОВЫШЕННОМУ ОСМОТИЧЕСКОМУ ДАВЛЕНИЮ СРЕДЫ

Аннотация. Целью работы была адаптация спиртовых дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* к возрастающему осмотическому давлению среды для повышения устойчивости клеток к высоким концентрациям этанола. Адаптация проведена путем последовательного культивирования на средах с повышающимся содержанием NaCl от 5 до 15%. Об активности роста дрожжей судили по оптической плотности суспензий в течение 96 ч культивирования. С повышением концентрации хлорида натрия в среде количество активно растущих вариантов снижалось, отмечено удлинение лаг фазы. Из 18 адаптированных культур отобраны два варианта с наиболее высокими показателями устойчивости к повышенному осмотическому давлению среды, характеризующиеся измененной клеточной проницаемостью. Полученные варианты обладали высокой бродительной активностью при культивировании на сусле с 10% (по объему) этилового спирта при отсутствии выделения CO₂ исходными культурами в этих условиях. Таким образом, адаптация спиртовых дрожжей к повышенным концентрациям хлорида натрия в среде способствует модификации их клеточных стенок и повышению устойчивости к конечному продукту брожения этанолу. Использование отобранных вариантов позволит интенсифицировать процесс продукции биоэтанола и повысить его экономическую эффективность за счет повышения выхода конечного продукта при одинаковых производственных затратах.

Ключевые слова: дрожжи, биоэтанол, осмотическое давление, адаптация, толерантность к этанолу, бродительная активность.

Продукция биоэтанола вызывает огромный интерес в связи с потребностью в возобновляемых источниках энергии и сокращении отрицательного воздействия выхлопных газов на окружающую среду. В качестве основного возобновляемого биотоплива рассматривают биодизель и биоэтанол [1-3]. Даже довольно незначительная добавка этанола к топливу, используемому для двигателей внутреннего сгорания, существенно экономит энергоресурсы и снижает токсичность выхлопных газов. В настоящее время уже более половины мирового производства этанола используется в качестве добавки к бензину и только 15% для производства спиртных напитков [4]. При этом топливный биоэтанол имеет наибольший потенциал по сравнению с биодизелем, поскольку характеризуется неисчерпаемыми источниками получения. Ими могут быть как различное растительное сырье, так и отходы сельского хозяйства и деревообрабатывающей промышленности.

Основным направлением развития спиртовой промышленности является поиск путей снижения производственных затрат сырья и энергоресурсов. При этом одним из наиболее эффективных и не требующих капитальных затрат способов решения этой проблемы выступает использование технологии сбраживания высококонцентрированного суслу. Увеличения продуктивности в производстве этанола достигают как путем усовершенствования технологии [5-7], так и повышением эффективности микробиологического процесса. Среди технологических решений большое внимание уделяется в последние годы иммобилизации дрожжевых клеток на различных носителях [7-11], что позволяет использовать культуру продуцента биоэтанола до четырех-семи циклов.

Тем не менее, периодичность процесса спиртового брожения вызывает необходимость возобновления ферментации после накопления около 8-10% этанола из-за его высокой токсичности для дрожжей. Поэтому важнейшим аспектом интенсификации микробиологической промышленности является повышение устойчивости штамма-продуцента. Актуальна селекция штаммов спиртовых дрожжей для сбраживания высококонцентрированного суслу, устойчивых к повышенной кислотности и температуре [12-14], толерантных к этанолу [15-19]. Рассматривается также возможность подбора новых субстратов для сбраживания и использования дрожжей другой таксономической принадлежности, способных к утилизации гемицеллюлоз, пентоз и др. как отдельно, так и в смешанных культурах [20-23].

В процессе спиртового производства клетки дрожжей подвергаются воздействию гиперосмотического и этанольного стресса. Повышение концентрации этанола, как и любое другое неблагоприятное воздействие, вызывает ряд неспецифических реакций клетки на раздражение. В начале практически у всех клеток при действии повреждающих агентов наблюдается резкое увеличение проницаемости клеточных мембран для ионов с последующей активацией различных внутриклеточных систем. Затем в ответ на стресс запускаются механизмы адаптации клеток к повреждению, в частности уменьшения выраженности или устранения дисбаланса ионов и активации процессов энергетического обеспечения ионных насосов. Адаптация клеток в условиях повреждения происходит не только на метаболическом и функциональном уровнях. Длительное, повторное или значительное повреждение ведёт к существенным структурным перестройкам в клетке, имеющим адаптивное значение [24-26]. Такая адаптация к действию повреждающих факторов происходит путём стереотипных приспособительных изменений клетки или клеточной системы.

Целью настоящей работы была адаптация спиртовых дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* к возрастающей концентрации хлорида натрия в среде для повышения устойчивости клеток к воздействию конечного продукта брожения этилового спирта.

Материалы и методы исследования. Объектами исследования служили 18 штаммов спиртовых дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, два из которых являются производственными штаммами, используемыми ТОО «Талгар-Спирт».

Спиртовые дрожжи выращивали на жидкой среде Ридер с постепенно повышающейся концентрацией хлорида натрия от 5% до 15% (при увеличении концентрации хлорида натрия на 1%). В колбу со 100 мл среды вносили 5% чистой культуры дрожжей (10^8 КОЕ/мл). Инкубирование проводилось при температуре 30°C в течение 72 ч в условиях периодической культуры. Далее производили засев в среду с более высокой концентрацией NaCl. Сразу после засева и по истечении 24, 48, 72 ч отбирали пробы для определения оптической плотности (ОП) суспензии дрожжей нефелометрическим методом (при длине волны $\lambda = 540$ нм и зеленом светофилтре). Для контроля брали среду Ридер с таким же содержанием хлорида натрия, что и в опыте.

Бродильную активность отобранных и исходных вариантов исследовали в трубках Дунбара на сусле из тритикале с концентрацией сухого вещества 16,4% и рН 4,3. Культивирование производили в течение 24 ч при 28⁰С.

Эксперименты проводили в трех повторностях. Результаты исследований статистически обрабатывали по стандартной методике с использованием критерия Стьюдента. Для замеров оптической плотности уровень значимости составил $p < 0,001$, для определения бродильной активности уровень значимости составил $p < 0,05$.

Результаты исследования и обсуждение. Проведено повышение осмотолерантности спиртовых дрожжей путем их адаптации к постепенно повышающейся концентрации хлорида натрия в среде. Для отбора штаммов, обладающих модифицированной клеточной проницаемостью, определяли накопление ими биомассы через каждые 24 часа в течение 4 суток культивирования с изменением в среде концентрации хлорида натрия от 5% до 15%.

В таблице 1 представлены результаты исследования динамики роста дрожжей на среде с 5% NaCl. Из полученных данных видно, что оптическая плотность засеваемых культур была примерно одинаковой и колебалась в пределах 0,381-0,430 единиц при 0,357 ед. в контроле. Через 24 ч культивирования ОП составила 0,407-0,714 ед. Через 48 ч культивирования оптическая плотность достигала у некоторых вариантов 0,600-0,700 ед. По истечении трех-четырех суток ОП варьировала в пределах 0,507-0,796 ед. и 0,559-0,896 ед. соответственно. Наибольшие показатели оптической плотности и ее увеличения за каждые сутки культивирования выделены жирным шрифтом. Разница в длительности лаг фазы исследуемых вариантов хорошо заметна по кратности увеличения оптической плотности суспензий. У наиболее толерантных к NaCl вариантов (№№ 1, 2, 6, 7, 8, 12, 15, 16, 17) лаг фаза короче и максимальное увеличение плотности суспензий отмечено через одни сутки культивирования. У вариантов №№ 3, 4 и 5 наибольший прирост биомассы отмечен через двое суток культивирования. Увеличение прироста оптической плотности за четвертые сутки культивирования у ряда вариантов (10, 11, 15, 17, 18) по сравнению с третьими сутками связано с их адаптацией к повышенному осмотическому давлению. Тем не менее, несмотря на активизацию роста некоторых вариантов после удлиненной лаг фазы, наибольшие показатели оптической плотности при культивировании на среде с 5% NaCl выявлены через 96 ч культивирования у вариантов с короткой лаг фазой.

Таблица 1 – Динамика роста спиртовых дрожжей на среде с 5% NaCl

№	ОП, ед		24ч/0ч	ОП, ед		48ч/24ч	ОП, ед	72ч/48ч	ОП, ед		96ч/72ч
	0 ч	24 ч		48 ч	72 ч				96 ч		
1	0,381±0,002	0,541±0,005	1,42	0,690±0,002	1,28	0,747±0,004	1,08	0,896±0,003	1,2		
2	0,407±0,004	0,562±0,007	1,38	0,694±0,004	1,23	0,706±0,005	1,02	0,745±0,001	1,06		
3	0,410±0,001	0,448±0,005	1,09	0,589±0,002	1,31	0,676±0,007	1,15	0,706±0,001	1,04		
4	0,384±0,001	0,413±0,001	1,08	0,510±0,001	1,23	0,664±0,004	1,30	0,710±0,002	1,07		
5	0,387±0,002	0,439±0,004	1,13	0,651±0,001	1,48	0,702±0,003	1,08	0,739±0,007	1,05		
6	0,382±0,007	0,554±0,008	1,45	0,616±0,005	1,11	0,688±0,001	1,12	0,747±0,005	1,09		
7	0,408±0,005	0,714±0,002	1,75	0,786±0,001	1,10	0,796±0,001	1,01	0,875±0,004	1,10		
8	0,402±0,004	0,614±0,003	1,53	0,740±0,004	1,21	0,756±0,002	1,02	0,816±0,009	1,08		
9	0,404±0,003	0,407±0,004	1,01	0,484±0,003	1,19	0,507±0,005	1,05	0,548±0,004	1,08		
10	0,397±0,002	0,418±0,005	1,05	0,443±0,008	1,06	0,516±0,007	1,16	0,664±0,003	1,29		
11	0,430±0,001	0,490±0,001	1,14	0,549±0,004	1,12	0,591±0,006	1,08	0,678±0,004	1,15		
12	0,409±0,004	0,610±0,002	1,49	0,715±0,007	1,17	0,753±0,001	1,05	0,788±0,007	1,05		
13	0,409±0,002	0,501±0,002	1,22	0,520±0,006	1,04	0,542±0,003	1,04	0,583±0,007	1,08		
14	0,384±0,002	0,473±0,007	1,23	0,520±0,001	1,10	0,537±0,004	1,03	0,559±0,005	1,04		
15	0,404±0,001	0,528±0,004	1,31	0,603±0,001	1,14	0,635±0,007	1,05	0,765±0,001	1,20		
16	0,386±0,005	0,580±0,005	1,50	0,600±0,005	1,03	0,767±0,004	1,28	0,858±0,001	1,12		
17	0,382±0,003	0,537±0,001	1,41	0,667±0,007	1,24	0,680±0,003	1,02	0,789±0,003	1,16		
18	0,381±0,001	0,445±0,001	1,17	0,495±0,005	1,11	0,520±0,001	1,05	0,622±0,004	1,20		
К	0,357±0,001	0,357±0,003	1,00	0,357±0,001	1,00	0,357±0,005	1,00	0,357±0,001	1,00		

При дальнейших пересевах спиртовых дрожжей на среду Ридер с последовательно повышающейся концентрацией хлорида натрия от 6 до 10% количество активно растущих вариантов постепенно снижалось. Наиболее устойчивыми к воздействию этанола были варианты № 3, 7, 15, 16. Эти варианты характеризовались наиболее короткой лаг фазой и более высоким накоплением биомассы на протяжении всего периода культивирования на среде с 10% хлорида натрия (таблица 2). Наиболее высокие показатели оптической плотности отмечены у варианта №7.

Таблица 2 – Динамика роста спиртовых дрожжей на среде с 10% NaCl

№	ОП, ед		24ч/0ч	ОП, ед	48ч/24ч	ОП, ед	72ч/48ч	ОП, ед	96ч/72ч
	0 ч	24 ч		48 ч		72 ч		96 ч	
1	0,541±0,004	0,556±0,001	1,03	0,568±0,004	1,02	0,591±0,006	1,04	0,608±0,003	1,03
2	0,562±0,004	0,584±0,003	1,04	0,597±0,001	1,02	0,675±0,001	1,13	0,693±0,005	1,03
3	0,446±0,002	0,534±0,002	1,20	0,675±0,006	1,26	0,706±0,001	1,05	0,778±0,003	1,10
4	0,397±0,005	0,423±0,004	1,07	0,467±0,004	1,10	0,501±0,002	1,07	0,518±0,005	1,03
5	0,501±0,001	0,547±0,007	1,09	0,593±0,002	1,08	0,605±0,003	1,02	0,628±0,007	1,04
6	0,410±0,003	0,457±0,006	1,11	0,483±0,007	1,06	0,512±0,001	1,06	0,538±0,006	1,05
7	0,419±0,007	0,571±0,002	1,36	0,630±0,002	1,10	0,762±0,005	1,21	0,812±0,001	1,07
8	0,388±0,001	0,384±0,007	0,99	0,457±0,001	1,19	0,578±0,002	1,26	0,678±0,003	1,17
9	0,384±0,003	0,403±0,009	1,05	0,425±0,003	1,05	0,471±0,001	1,11	0,518±0,004	1,10
10	0,405±0,002	0,458±0,005	1,13	0,504±0,004	1,10	0,520±0,001	1,03	0,548±0,007	1,05
11	0,547±0,002	0,559±0,004	1,02	0,584±0,005	1,04	0,613±0,008	1,05	0,642±0,002	1,05
12	0,446±0,008	0,479±0,007	1,07	0,518±0,004	1,08	0,527±0,005	1,02	0,545±0,003	1,03
13	0,384±0,006	0,419±0,008	1,09	0,452±0,006	1,08	0,493±0,003	1,09	0,522±0,001	1,06
14	0,396±0,007	0,420±0,001	1,06	0,475±0,002	1,13	0,510±0,007	1,07	0,549±0,005	1,08
15	0,401±0,002	0,481±0,005	1,20	0,599±0,002	1,25	0,654±0,001	1,09	0,712±0,007	1,09
16	0,425±0,004	0,540±0,007	1,27	0,652±0,004	1,21	0,694±0,004	1,06	0,714±0,003	1,03
17	0,400±0,001	0,447±0,004	1,12	0,475±0,001	1,06	0,489±0,003	1,03	0,530±0,004	1,08
18	0,381±0,003	0,449±0,008	1,18	0,492±0,006	1,10	0,503±0,001	1,02	0,586±0,004	1,17
К	0,359±0,002	0,359±0,004	1,00	0,359±0,001	1,00	0,359±0,006	1,00	0,359±0,003	1,00

При дальнейшем повышении содержания хлорида натрия в среде наблюдалось еще большее растягивание лаг фазы, накопление оптической плотности дрожжами снижалось. При содержании NaCl в среде 15% (таблица 3) через 48 ч культивирования наибольшая ОП суспензий составляла 0,524-0,581 ед., через 72 ч - 0,646-0,647 ед. и лишь к 96 ч достигала

0,686-0,747 ед. (варианты №7 и №15). У большинства штаммов ОП через 96 ч составляла 0,450-0,598 ед.

Исходя из полученных данных, были отобраны варианты №7 и 15 и исследована их бродильная активность в сравнении с исходными вариантами и с неадаптированным штаммом спиртовых дрожжей с ТОО "ТалгарСпирт", полученным в 2014 году. Отобранные адаптированные варианты характеризовались высокой бродильной активностью при отсутствии выделения CO₂ исходными культурами и производственным штаммом спиртовых дрожжей через 24 часа культивирования на сусле с 10% (по объему) этилового спирта.

Таким образом, адаптация спиртовых дрожжей к повышенным концентрациям хлорида натрия в среде способствует модификации их клеточных стенок и повышению устойчивости к конечному продукту брожения этанолу. Отобранные варианты будут способствовать интенсификации процесса продукции этилового спирта и повышению рентабельности производства за счет повышения выхода этанола при одинаковых затратах.

Таблица 3 – Динамика роста спиртовых дрожжей на среде с 15% NaCl

№	ОП, ед		24ч/0ч	ОП, ед	48ч/24ч	ОП, ед	72ч/48ч	ОП, ед	96ч/72ч
	0 ч	24 ч		48 ч		72 ч		96 ч	
1	0,426±0,001	0,432±0,002	1,01	0,489±0,006	1,13	0,587±0,005	1,2	0,598±0,004	1,02
2	0,428±0,004	0,441±0,001	1,03	0,485±0,002	1,1	0,562±0,003	1,16	0,582±0,002	1,04
3	0,395±0,003	0,410±0,004	1,04	0,457±0,004	1,12	0,502±0,001	1,1	0,567±0,006	1,13
4	0,374±0,001	0,406±0,003	1,09	0,430±0,002	1,06	0,428±0,001	1	0,450±0,007	1,05
5	0,431±0,002	0,434±0,005	1,01	0,442±0,003	1,02	0,449±0,002	1,02	0,454±0,002	1,01
6	0,475±0,004	0,481±0,001	1,01	0,486±0,004	1,01	0,506±0,004	1,04	0,521±0,001	1,03
7	0,402±0,005	0,476±0,008	1,18	0,524±0,004	1,1	0,646±0,005	1,23	0,747±0,003	1,16
8	0,493±0,007	0,506±0,007	1,03	0,518±0,002	1,02	0,532±0,004	1,03	0,549±0,001	1,03
9	0,367±0,002	0,371±0,005	1,01	0,387±0,003	1,04	0,409±0,003	1,06	0,413±0,005	1,01
10	0,420±0,001	0,435±0,008	1,04	0,462±0,004	1,06	0,480±0,001	1,04	0,491±0,001	1,02
11	0,510±0,003	0,516±0,003	1,01	0,538±0,008	1,04	0,576±0,004	1,07	0,594±0,001	1,03
12	0,433±0,004	0,439±0,007	1,01	0,442±0,006	1,01	0,449±0,002	1,02	0,451±0,006	1
13	0,478±0,002	0,482±0,005	1,01	0,486±0,001	1,01	0,491±0,003	1,01	0,500±0,004	1,02
14	0,346±0,001	0,387±0,002	1,12	0,410±0,003	1,06	0,503±0,004	1,23	0,527±0,006	1,05
15	0,496±0,001	0,514±0,004	1,04	0,581±0,004	1,13	0,647±0,007	1,11	0,686±0,002	1,06
16	0,394±0,003	0,405±0,001	1,03	0,451±0,002	1,11	0,502±0,004	1,11	0,548±0,001	1,09
17	0,516±0,005	0,534±0,001	1,04	0,552±0,001	1,03	0,594±0,005	1,08	0,627±0,001	1,06
18	0,391±0,002	0,447±0,007	1,14	0,480±0,001	1,07	0,524±0,002	1,09	0,573±0,005	1,09
K	0,361±0,003	0,361±0,002	1	0,361±0,001	1	0,361±0,002	1	0,361±0,001	1

REFERENCES

- [1] Lopes M., Serrano L., Ribeiro I., Cascão P., Pires N., Rafael S., Tarelho L., Monteiro A., Nunes T., Evtuygina M., Nielsen O.J., Gameiro S.M., Miranda A.I., Borrego C. (2014) Emissions characterization from EURO 5 diesel / biodiesel passenger car operating under the new European driving cycle, *Atmos Environ*, 84:339-348. DOI:10.1016/j.atmosenv.2013.11.071.
- [2] Ajanovic A., Haas R. (2014) On the future prospects and limits of biofuels in Brazil, the US and EU, *Appl Energ*, 135:730-737. DOI: 10.1016/j.apenergy.2014.07.001.
- [3] Feofilova E.P., Sergeeva Ja.Je., Ivashechkin A.A. (2010) Applied biochemistry and microbiology [Прикладная биохимия и микробиология] 46: 405-415. (In Russian)
- [4] Sato A.G., Silva C.D., Paganin V.A., Biancolli L.G., Ticianelli A.E. (2015) New, efficient and viable system for ethanol fuel utilization on combined electric/internal combustion engine vehicles, *J Power Sources*, 294:569-573. DOI: 10.1016/j.jpowsour.2015.06.086.
- [5] Baeyens J., Kang Q., Appels L., Dewil R., Lv Y., Tan T. (2015) Challenges and opportunities in improving the production of bio-ethanol, *Prog Energ Combust*, 47:60-88. DOI: 10.1016/j.pecs.2014.10.003.
- [6] Kopsahelis N., Bosnea L., Bekatorou A., Tzia C., Kanellaki M. (2012) Alcohol production from sterilized and non-sterilized molasses by *Saccharomyces cerevisiae* immobilized on brewer's spent grains in two types of continuous bioreactor systems, *Biomass Bioenerg*, 45:87-94. DOI: 10.1016/j.biombioe.2012.05.015.
- [7] Wu H., He A., Kong X., Jiang M., Chen X., Zhu D., Liu G., Jin W. (2015) Acetone-butanol-ethanol production using pH control strategy and immobilized cells in an integrated fermentation-pervaporation process, *Process Biochem*, 50:614-622. DOI: 10.1016/j.procbio.2014.12.006.
- [8] Tran T.H., Neil Nosworthy N.T., Bilek M.M., McKenzie D.R. (2015) Covalent immobilization of enzymes and yeast: Towards a continuous simultaneous saccharification and fermentation process for cellulosic ethanol, *Biomass Bioenerg*, 81:234-241. DOI: 10.1016/j.biombioe.2015.07.009.
- [9] Ariyajaroenwong P., Laopaiboon P., Laopaiboon L. (2015) Capability of sweet sorghum stalks as supporting materials for yeast immobilization to produce ethanol under various fermentation processes, *Journal of the Taiwan Institute of chemical engineers*, 49:79-84. DOI:10.1016/j.jtice.2014.11.016.
- [10] El-Dalatony M.M., Kurade M.B., R.A.I. Abou-Shanab, Hoo Kim, El-Sayed Salama, B.-H. Jeon. (2016) Long-term production of bioethanol in repeated-batch fermentation of microalgal biomass using immobilized *Saccharomyces cerevisiae*, *Bioresour Technol*, 219:98-105. DOI:10.1016/j.biortech.2016.07.113.

- [11] Mulko L., Rivarola C.R., Barbero C.A., Acevedo D.F. (2016) Bioethanol production by reusable *Saccharomyces cerevisiae* immobilized in a macroporous monolithic hydrogel matrices, *J Biotechnol*, 233:56-65. DOI:10.1016/j.jbiotec.2016.07.004.
- [12] Davydenko S.G., Ustinova A.S., Meledina T.V., Barakova N.V. (2012) Scientific Journal ITMO. Series. Processes and devices of food manufactures [Nauchnyj zhurnal NIU ITMO. Ser. Processy i apparaty pishhevyh proizvodstv]. N 2: 42.
- [13] Mitsumasu K., Liu Ze-Shen, Tang Yue-Qin, Akamatsu T., Taguchi H., Kida K. (2014) Development of industrial yeast strain with improved acid- and thermo-tolerance through evolution under continuous fermentation conditions followed by haploidization and mating, *J Biosci Bioeng*, 118:689-695. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2014.05.012.
- [14] Gao L., Liu Y., Sun H., Li C., Zhao Z., Liu G. (2016) Advances in mechanisms and modifications for rendering yeast thermotolerance, *J Biosci Bioeng*, 121:599-606. DOI:10.1016/j.jbiosc.2015.11.002.
- [15] Zhao X.Q., Bai F.W. (2009) Mechanisms of yeast stress tolerance and its manipulation for efficient fuel ethanol production, *J Biotechnol*. 144:23-28. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2009.05.001.
- [16] Zheng D.Q., Wu X.C., Tao X.L., Wang P.M., Li P., Chi X.Q., Li Y.D., Yan Q.F., Zhao Y.H. (2011) Screening and construction of *Saccharomyces cerevisiae* strains with improved multi-tolerance and bioethanol fermentation performance, *Bioresource Technol*, 102:3020-3027. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.09.122.
- [17] Zhang Min, Zhu R, Zhang Minfeng, Wang S. (2014) Creation of an ethanol-tolerant *Saccharomyces cerevisiae* strain by 266 nm laser radiation and repetitive cultivation, *J Biosci Bioeng*, 118:508-513. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2014.04.016.
- [18] Dong S.-J., Yi C.-F., Li H. (2015) Changes of *Saccharomyces cerevisiae* cell membrane components and promotion to ethanol tolerance during the bioethanol fermentation, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 69:196-203. DOI: 10.1016/j.biocel.2015.10.025.
- [19] Ohta E., Nakayama Y., Mukai Y., Bamba T., Fukusaki E. (2016) Metabolomic approach for improving ethanol stress tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*, *J Biosci Bioeng*, 121:399-405. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2015.08.006.
- [20] Ryabova O.B., Chmil O.M., Sibirny A.A. (2003) Xylose and cellobiose fermentation to ethanol by the thermotolerant methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*, *FEMS Yeast Res*, 4:157-164. DOI: 10.1016/S1567-1356(03)00146-6.
- [21] Suriyachai N., Weerasaia K., Laosiripojana N., Champreda V., Unrean P. (2013) Optimized simultaneous saccharification and co-fermentation of rice straw for ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* and *Scheffersomyces stipitidis* co-culture using design of experiments, *Bioresource Technol*, 142:171-178. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.05.003.
- [22] Gutiérrez-Rivera B., Ortiz-Muñiz B., Gómez-Rodríguez J., Cárdenas-Cágal A., Domínguez González J.M., Aguilar-Uscanga M.G. (2015) Bioethanol production from hydrolyzed sugarcane bagasse supplemented with molasses "B" in a mixed yeast culture, *Renew Energ*, 74:399-405. DOI: 10.1016/j.renene.2014.08.030.
- [23] Deesuth O., Laopaiboon P., Laopaiboon L. (2016) High ethanol production under optimal aeration conditions and yeast composition in a very high gravity fermentation from sweet sorghum juice by *Saccharomyces cerevisiae*, *Ind Crop Prod*, 92:263-270. DOI: 10.1016/j.indcrop.2016.07.042.
- [24] Hohmann S. (2002) Osmotic Stress Signaling and Osmoadaptation in Yeasts, *Microbiol Mol Biol R*, 66: 300-372. DOI:10.1128/MMBR.66.2.300-372.2002.
- [25] Los D.A., Murata N. (2004) Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals, *BBA-Biomembranes*, 1666: 142-157. DOI: 10.1016/j.bbamem.2004.08.002.
- [26] Le Gall H., Philippe F., Domon J-M., Gillet F., Pelloux J., Rayon C. (2015) Cell Wall Metabolism in Response to Abiotic Stress, *Plants (Basel)*. 4: 112-166. DOI:10.3390/plants4010112.

Е. А. Олейникова, Т. В. Кузнецова, М. Г. Саубенова, А. А. Айтжанова, М. М. Шорманова

РМК «Микробиология және вирусология институты» ҒК БҒМ ҚР, Алматы, Қазақстан

ЭТАНОЛ ӨНДІРУШІ АШЫТҚЫЛАРДЫ ЖОҒАРЫ ОСМОСТЫҚ ҚЫСЫМДЫ ҚОРЕКТІК ОРТАҒА БЕЙІМДЕУ

Аннотация. Жұмыстың мақсаты *Saccharomyces cerevisiae* ашытқысын, жасушалардың жоғары концентрациялы этанолға тұрақтылығын арттыру үшін, қоректік ортаның үдеуші осмостық қысымына бейімделуі болды. Бейімделу 5-тен 15% -ға дейінгі NaCl бар қоректік орталарда біртіндеп өсіру бойынша жүргізілді. Ашытқылардың өсу белсенділігін 96 сағат ішінде суспензияның оптикалық тығыздығына байланысты талдадық. Қоректік ортада натри хлоридінің концентрациясы жоғарылауынан, белсенді өсіп жатқан нұсқалар төмендеп, лаг фазасы созылғаны анықталды. Жасуша өткізгіштігінің өзгерістерімен сипатталатын, қоректік ортаның осмостық қысымына жоғары көрсеткіштік тұрақтылыққа ие болған, 18 бейімделген культуралардың ішінен екі нұсқасы іріктеліп алынды. Алынған нұсқалар қалыпты жағдайда алдыңғы культураларда CO₂-нің бөлінуі болмаған кезде сыра ашытқысында 10% (көлемі бойынша) этил спиртімен өсіргенде жоғары ашыту белсенділігіне ие болды. Осылайша, спиртті ашытқылардың қоректік ортадағы натрий хлориді концентрациясына бейімделуі, олардың клеткалық қабырғаларының орнықтылығын жоғарылатып және соңғы өнімге этанолдың ашуына ықпал етеді. Іріктелген нұсқаларды пайдалану, биоэтанол өнімінің жүйесін қарқынды және оның бірдей өндірістік шығынында, соңғы өнімін жоғарылатып, оның экономикалық тиімділігін арттырады.

Түйін сөздер: ашытқылар, биоэтанол, осмостық қысым, бейімделу, этанолға толеранттылық, ашыту белсенділігі.