УДК/UDC 637.146.33:579.864. DOI: 10.21323/978-5-6041190-3-7-2018-2-25-28

Борисенко О.А., н.с.
ВНИИПБиВП – филиал ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем им. В.М. Горбатова» РАН
(Россия, Москва)

ХРАНЕНИЕ ПРОМЫШЛЕННЫХ РАС ДРОЖЖЕЙ В КОЛЛЕКЦИЯХ

Аннотация. Представлен обзор основных методов длительного хранения микроорганизмов, применяемых в международных, национальных, региональных коллекциях живых культур. Приведены примеры, описанные в литературе методов длительного хранения живых культур микроорганизмов: субкультивирование, хранение под минеральным маслом, лиофилизация и криоконсервация. Приведено описания методов сохранения в жизнеспособном состоянии Центральной коллекции Минсельхоза России «Чистые культуры дрожжей, применяемые при производстве пива, безалкогольных напитков и вина», которая хранится во ВНИИПБиВП. Изложены основные методы расширения коллекционного фонда микроорганизмов в различных депозитариях живых культур: производственная селекция, гибридизация, мутагенез, сотрудничество с другими коллекциями. Представлены методы, которые используются в коллекции ВНИИПБиВП для получения новых, более продуктивных промышленных рас дрожжей. Так же описаны среды, применяемые для длительного хранения чистых культур дрожжей, хранящихся в коллекции ВНИИПБиВП. Показано, что для длительного хранения различных культур дрожжей используют среды различные по своему составу.

Ключевые слова: коллекция, хранение, раса, чистые культуры, дрожжи.

O.A. Borisenko, Researcher
All-Russian Scientific Research Institute of the Brewing, Non-Alcoholic and Wine Industry - Branch of the V.M. Gorbatov Federal Research Center of Food Systems of RAS, Moscow, Russia

STORAGE OF INDUSTRIAL YEAST RACES IN COLLECTIONS

Annotation. Presented an overview of the main methods of long-term storage microorganisms, used in international, national, regional collections of living cultures. Given the examples, described in the literature of methods for the long-term storage of living cultures of microorganisms: subculturing, storage under mineral oil, lyophilization and cryopreservation. Given a description of methods for maintaining the Central Collection of the Ministry of Agriculture of Russia "Pure yeast cultures used in the production of beer, soft drinks and wine", which is stored in the All-Russian Scientific Research Institute of the Brewing, Non-Alcoholic and Wine Industry. Described the basic methods of expanding the collection of microorganisms in various depositories of living cultures: production selection, hybridization, mutagenesis, cooperation with other collections. The methods used in the collection of All-Russian Scientific Research Institute of the Brewing, Non-Alcoholic and Wine Industry for obtaining new, more productive industrial yeast races are presented. Also, described the medium used for long-term storage of pure yeast cultures, stored in the All-Russian Scientific Research Institute of the Brewing, Non-Alcoholic and Wine Industry collection. It is shown that for a long-term storage of different yeast cultures, medium of different composition are used.

Key words: collection, storage, race, pure cultures, yeast.

Задолго до открытия микроорганизмов человек пользовался спиртовым брожением для своих практических целей. Изобретение микроскопа голландцем Антонием Левенгуком позволило проникнуть в новый неизвестный человеку мир. Первые зарисовки клеток дрожжей Левенгук сделал в 1680 году, увидев их в капле бродящего пива под микроскопом.

Значение факта обнаружения Левенгуком дрожжей не было понято ни его современниками, ни учеными последующих поколений в течение 150 лет. Научно-ботанические описания дрожжей, их строения и размножения были сделаны только в 30-х годах XIX века. В 1857 году Луи Пастер опубликовал первое исследование о брожении. Он сформулировал тезис “La fermentation est la vie sans l’oxygene” (Брожение - жизнь без кислорода), и именно ему мы обязаны не устаревающими знаниями о брожении [1]. В 1881 году немецкий врач Роберт Кох разработал методику выделения чистых культур микробов, для чего предложил пользоваться плотными питательными средами, на которых можно легко выращивать изолированно каждый вид микробов [2]. Методику Р.Коха использует Эмиль Христиан Гансен и создаёт безукоризненный метод выделения чистых культур микроорганизмов.

Для морфологических, физиологических, биохимических и генетических исследований, которые являются основой фундаментальных и прикладных разработок, создаются коллекции. Коллекции микроорганизмов различаются по своему профилю работы и объему фондов. Существуют национальные и межнациональные коллекции культур, насчитывающие десятки тысяч штаммов, например Европейская коллекция ECCO или Американская коллекция типовых культур ATCC, Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов. Такие коллекции создаются для хранения генетического материала, сохранения индикаторных культур и культур, обладающих определенными ценными свойствами, а также новых форм микроорганизмов, полученных генетическими методами и производственной селекцией. Существуют коллекции культур при научно-исследовательских центрах, частные коммерческие коллекции корпораций и фирм [3].

ВНИИПБиВП сохраняет в жизнеспособном состоянии Центральную коллекцию Минсельхоза России «Чистые культуры дрожжей, применяемые при производстве пива, безалкогольных напитков и вина». Коллекция содержит более 300 штаммов промышленных микроорганизмов. Основной составляющей коллекции являются чистые культуры пивоваренных (верховые и низовые), винодельческих (виноградные и плодово-ягодные) и квасных дрожжей. Началом создания коллекции считают 1934 году, когда Трехгорный завод передал в Центральную научно-исследовательскую лабораторию бродильной промышленности восемь рас пивных дрожжей из лаборатории завода. В коллекции хранятся уникальные культуры дрожжей, такие как винодельческая раса дрожжей Штейнберг, полученная в 1892 году и старейшая раса пивоваренных дрожжей 776, описанная ещё Глаубицем в «Атласе микроорганизмов брожения». Основными требованиями к поддержанию культур в коллекции являются сохранение их жизнеспособности, аутентичности, чистоты. В ведущих депозитариях мира для этого применяется несколько методов, которые можно разделить на две группы: поддержание штаммов в метаболически активном состоянии — субкультивирование, хранение под слоем минерального масла и в метаболически неактивном состоянии – лиофилизация, криоконсервация.

Субкультивирование - традиционный метод хранения культур и заключается он в пересевах культур на свежие питательные среды. При использовании этого метода хранения культур должны быть соблюдены три условия: подходящая поддерживающая среда; идеальная температура хранения; необходимая частота пересевов.

Хранение под минеральным маслом заключается в следующем: культуру микроорганизмов выращивают на благоприятной агаризованной питательной среде и, заливают стерильным вазелиновым маслом. Слой масла замедляет скорость обменных процессов микроорганизмов, масло не является абсолютным изолятором для воздуха, поэтому культуры под ним продолжают развиваться, но развитие замедляется. Также масло предохраняет среду от высыхания [4].

Лиофилизацией называется процесс высушивания, из замороженного состояния, под вакуумом, при этом свободная вода и вода, непрочно связанная с гидрофильными веществами клеток, подвергается замораживанию и затем происходит сублимация льда, т.е. переход его из твердого состояния в парообразное, минуя жидкую фазу. После этого остается

сухая пористая масса, которая при добавлении к ней воды легко превращается в суспензию [4].

Криоконсервация - сохранение в замороженном состоянии микроорганизмов при ультранизких температурах (криогенных). Такую температуру могут обеспечивать сжиженные газы – воздух, азот, неон, водород, гелий. Наибольшее практическое применение при криоконсервации из-за доступности и безопасности получил азот. Замороженные культуры хранят, используя рефрижераторы с жидко-фазовый азотом при температуре минус 196°С. Чтобы оживить замороженные культуры, их быстро оттаивают при температуре 37ºС.

Все эти методы хранения имеют как положительные, так и отрицательные свойства. Даже при хорошей общей оценки пригодности какого-либо метода хранения бывают случаи неожиданной гибели некоторых культур данной систематической группы. Сохранность культур в процессе хранения зависит не только от метода хранения, но и от подготовки к процессу консервации. К основным факторам, влияющим на результаты консервации культур перед сохранением, относят метод культивирования (глубинный или поверхностный), температурный режим, состав и pH питательной среды, аэрацию. Также большое значение имеют возраст, физиологическое состояние и концентрация клеток культуры [5].

Длительный опыт поддержания и хранения чистых культур дрожжей пивоваренного, винодельческого и безалкогольных производств во ВНИИПБиВП показал, что культуры дрожжей, хранящиеся в нашей коллекции, следует сохранять в условиях максимально приближенных к производственным и обеспечивающих чистоту культуры. Несоблюдение этих условий может привести к частичной утрате присущих дрожжам производственно-ценных свойств [3]. Для сохранения культур в коллекции ВНИИПБиВП применяют метод субкультивирования. Пивоваренные и квасные дрожжи хранятся на солодовом сусло-агаре при температуре 4-6ºС с периодическими пересевами с интервалом шесть месяцев. Винодельческие культуры пересевают раз в четыре месяца в пробирки с виноградным или яблочным суслом в зависимости от расы дрожжей, и хранят при температуре 10-12ºС. Расы дрожжей для шампанского производства хранят в вине (на тиражной смеси) под давлением CO_2 при пониженной температуре 4-6ºС.

Расширение коллекционного фонда новыми штамма осуществляется в рамках сотрудничества с другими коллекциями, а также в результате активных разработок научных коллективов, сохраняющих коллекции. В коллекции ВНИИПБиВП хранятся как отечественные расы дрожжей, так и расы дрожжей, поступившие к нам в разное время из Германии, Чехии, Бельгии, Испании, Китая и некоторых других стран.

С целью улучшения производственных показателей уже использующихся промышленных рас дрожжей и созданию новых, более продуктивных, применяются методы производственной селекции, гибридизации и мутагенеза.

Селекция из производства служит эффективным методом получения дрожжей с хорошими технологическими качествами. Основой этого метода является повторное выделение в производственных условиях ряда культур, сравнение их и отбор лучшей для дальнейшего применения. Этот метод предложен В.И.Кудрявцевым и основан на изменениях культур дрожжей, возникающих в результате условий производства [6]. Метод производственной селекции успешно применен во ВНИИПБиВП: в результате получены пивоваренные расы 11, 41, 44, 8аМ, 7г², винодельческие Горьковская и Ленинградская.

Перспективным направлением селекции является гибридизация, позволяющая создавать штаммы с полезными промышленными признаками, полученными от исходных родительских форм. Гибридизация может быть как внутривидовой, так и межвидовой. Методом гибридизации получены дрожжи Ф-2, в результате скрещивания *Saccharomices carlsbergensis* и *Saccharomices diastaticus*.

Мутаганез - стойкое изменение наследственных признаков в результате воздействия внутренних или внешних естественных (спонтанных) или искусственных (индуцированных)

факторов. Изучение возможности селекции пивных дрожжей с применением мутагенов проводились в нашем институте. Медленно сбраживающие дрожжи подвергали ультрафиолетовому облучению или воздействию на них мутагенным препаратом нитрозогуанидином. Дрожжи после мутагенной обработки стали быстрее сбраживать пивное сусло, однако потеряли некоторые полезные технологические качества. Поэтому полученные мутанты представляют пока только теоретический интерес [7].

Коллекция «Чистых культуры дрожжей, применяемые для производства пива, безалкогольных напитков и вина» снабжает отраслевые предприятия необходимыми в производстве закваскими. Чистая культура находится на поверхности сусло-агара в стерильной стеклянной пробирке с ватной пробкой. По заявкам организаций чистые культуры выдаются из коллекции или высылаются почтой.

Получить информацию о коллекции можно на сайте «Центры коллективного пользования научным оборудованием и уникальные научные установки» (реестровый номер УНУ - 468513), ссылка:http://ckp-rf.ru/usu/468513.

Список литературы

1. Кунце В. Технология солода и пива / В.Кунце, Г.Мит - пер. с нем., М., «Профессия», 2001 – 27с.
2. Богданов В.М. Техническая микробиология пищевых продуктов / В.М.Богданов, Р.С.Баширова, К.А.Кирова и др. – М., изд-во «Пищевая промышленность», 1968 –7- 9с.
3. Саришвили Н.Г. Микробиологические основы технологии шампанизации вина/ Н.Г.Саришвили, Б.Б. Рейтблат –М., «Пищепромиздат», 2000 - 316-318с.
4. Фатеева М.В. Методы хранения коллекционных культур дрожжей/ М.В.Фатеева // Методы хранения коллекционных культур микроорганизмов. М., «Наука» - 1967- 55-90с.
5. Похиленко В.Д. Методы длительного хранения коллекционных культур микроорганизмов и тенденции развития/ В.Д.Похиленко, А.М.Баранов, К.В.Детушев //Известия высших учебных заведений. Приволжский регион. Медицинские науки. -2009-№1(12)-99-121с.
6. Бурьян Н.И. Микробиология виноделия / Н.И.Бурьян, Л.В.Тюрина -М.,»Пищевая промышленность», 1979 – 97с.
7. Филимонова Т.И. Роль чистых культур дрожжей в пивоварении / Т.И.Филимонова, О.А.Борисенко, Е.И.Несс и др. // Пиво и напитки – 1999-№1-30-32с.