

УДК 663.5

Т. А. Ямашев, Н. Р. Сяляхов, О. А. Решетник

МЕРЫ, ПРЕДОТВРАЩАЮЩИЕ РАЗВИТИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ-КОНТАМИНАНТОВ В ТЕХНОЛОГИИ БРОДИЛЬНЫХ ПРОИЗВОДСТВ

Ключевые слова: микроорганизмы-контаминанты, бродильные производства.

В статье освещаются проблемы связанные с микробной контаминацией сырья и полупродуктов бродильных производств, оценивается влияние микроорганизмов-контаминантов на технологические и физико-химические показатели спиртового производства, и рассматриваются меры, предотвращающие их развитие

Key words: microorganisms-contaminants, fermentation technology.

Abstract: The article reviews the problems associated with microbial contamination of raw materials and semi product fermentation industries, assessing the impact of microbial contaminants on the technological and physical-chemical characteristics of the alcohol production, and considers measures that prevent their development.

Жизнедеятельность микроорганизмов контаминантов на предприятиях бродильной промышленности наносит значительный ущерб: нарушается нормальный ход технологических процессов, уменьшается выход готовой продукции, ухудшается ее качество. Поэтому, прежде всего, необходимо предупредить возможность их развития. На предприятиях бродильной промышленности должна соблюдаться чистота – это одно из условий профилактики микробной контаминации производства.

Наиболее эффективными средствами борьбы с нежелательными для спиртового брожения микроорганизмами являются стерилизация и дезинфекция. В спиртовом производстве применяется тепловая стерилизация оборудования и сырья паром, обработка химическими соединениями, применение биологически активных веществ, физико-химическая обработка сырья.

Существенное снижение микробной контаминации полупродуктов происходит в процессе разваривания зернового замеса, однако к концу брожения количество бактерий увеличивается в 50 раз [1].

Для поддержания микробиологической чистоты в спиртовом производстве при переработке зернового сырья в условиях пониженных температур проводят стерилизацию разваренной массы, основная цель которой заключается в инактивации микроорганизмов. Кроме того, наличие стерилизатора в аппаратурно-технологической схеме, позволяет получать максимально прогидролизованное сусло благодаря возможности изменять температурный режим обработки (прежде всего в сторону его снижения) в зависимости от используемого зернового сырья и ферментного препарата. В настоящее время на спиртовых заводах, как правило, применяются два режима стерилизации разваренной массы: кратковременная (5-10 мин) при температуре 115-120°C в трубчатом стерилизаторе и длительная (30-40 мин) при 105-110°C в емкостном [2, 3].

Чем меньше длительность стерилизации, тем выше должна быть температура среды. Некоторые споры даже при высокой температуре не поги-

бают, лишь ослабевает их способность к быстрому прорастанию. Отмирание микроорганизмов под действием высокой температуры происходит неравномерно. Среди массы клеток встречаются более устойчивые и менее устойчивые к действию температуры. Режим стерилизации зависит от количественного содержания микроорганизмов в среде, и от ее объема. Чем больше микроорганизмов в среде, и больше ее объем, тем дольше необходимо ее нагревать для полного их уничтожения. Действие температуры в кислых средах сказывается сильнее, чем в нейтральных.

Необходимо подчеркнуть, что в промышленных ферментерах имеются труднопрогреваемые зоны (запорно-регулирующая арматура, открытые трубные окончания, тупиковые полости), температура в которых может отличаться от заданной на 10-15°C, а иногда даже на 50°C.

Многие химические вещества угнетают развитие микроорганизмов и при определенных концентрациях убивают их. Этим широко пользуются для борьбы с микроорганизмами. Эффект дезинфекции в значительной степени зависит от концентрации химического вещества и времени контакта его с микроорганизмами. В малых дозах многие ядовитые вещества не только не подавляют и не убивают микроорганизмы, но, напротив, стимулируют их биохимическую активность. С повышением концентрации дезинфектантов проявляется их бактерицидное действие вначале в отношении вегетативных форм микроорганизмов, а затем и в отношении спор. Продолжительность контакта находится в обратной зависимости от концентрации антисептика: с повышением концентрации необходимая длительность воздействия уменьшается. Чем больше микроорганизмов в среде, тем большая концентрация антисептика должна быть применена для их уничтожения.

В качестве антисептиков применяют хлорную известь, негашеную известь, формалин, антиформин, сернистый газ, серную кислоту, четвертичные аммонийные соединения, надуксусную кислоту, пероксид водорода, глутаровый альдегид и

др. [4]. Некоторые из этих антисептиков прибавляют в небольших количествах в продукты, предназначенные для брожения, другие используют для мойки трубопроводов и аппаратуры. Часто для борьбы с вредными микроорганизмами сочетают оба способа: стерилизацию и дезинфекцию.

В пивоварении применяют кислоты и щелочи, обеспечивающие одновременно и мойку и дезинфекцию оборудования. К дезинфектантам, используемым в пивоварении относятся: неорганические и органические хлорсодержащие вещества, используемые для обработки воды (гипохлорит натрия, хлорированный фосфат натрия, трихлоризоциануровая кислота), йодофоры (комплексные соединения йода и поверхностно активных веществ), надуксусная кислота, пероксид водорода для распыскивания из моющих головок при асептическом розливе, четвертичные аммонийные соединения, биогуанидины, изотиазолины и т.д., большинство из них применяются при мойке оборудования и помещений [5].

Сернистую кислоту в виде слабого водного раствора сернистого ангидрида применяют для дезинфекции зеленого солода, солодового молока и, в редких случаях, осахаренной массы, а также для дезинфекции помещений.

Хлорную и обыкновенную известь, формалин, каустическую соду применяют для дезинфекции аппаратов, посуды и помещений.

Формалин и сернистая кислота являются более сильными средствами дезинфекции, чем известь, но они дороже и вызывают коррозию стенок аппаратов и посуды.

При дезинфекции, независимо от использования того или иного антисептика, положительный результат достигается лишь в том случае, когда со стен, полов, аппаратов и из трубопроводов будет удалена грязь, остатки солода, сусла, бражки и т.д. Поэтому сначала необходимо очистить и промыть поверхность водой, а затем дезинфицировать ее [5].

Для обеззараживания солода, применяют гашеную известь, хлорную известь, сернистый ангидрид, марганцевокислый калий, или двуххромовокислый калий, формальдегид, пероксид водорода. Формальдегид вносят в количестве 1,0-1,5 кг на 1 т ячменя, перманганат калия добавляют в количестве 10-15 г на 1 м³ воды, 30 % раствор пероксида водорода вносят в количестве 3 л на 1 м³ замочной воды. Добавление пероксида водорода способствует также лучшему проращению водочувствительных ячменей [6].

С целью повышения микробиологической чистоты зернового сырья, предлагается использовать мойку и пропаривание, ИК-обработку. При этом ИК обработку используют не только для снижения содержания микроорганизмов, но и для изменения биохимических и технологических свойств зерна [7].

Очень часто для контроля уровня микробной контаминации в спиртовом производстве сусло подкисляют до pH 4,0. Однако согласно последним данным это сопровождается также снижением продуктивности дрожжей по этанолу. При низких зна-

чениях pH большая часть органических кислот в сусле находится в недиссоциированной форме наиболее токсичной для дрожжей [8].

С увеличением концентрации растворенных веществ в сусле наблюдается линейное снижение скорости роста молочнокислых бактерий вероятно вследствие осмотического стресса, следовательно, альтернативным решением проблемы микробной контаминации может быть предложенное Narendranath N.V. et Power P. сбраживание высококонцентрированного сусла (содержание сухих веществ > 30 %) при pH 5,0-5,5 [8].

Для уменьшения содержания посторонней микробиоты воду, поступающую в технологический процесс, желательно подвергать какой-либо дополнительной обработке: хлорированию, ионизации, обработке УФ или ИК лучами и т.д. это особенно важно в схемах переработки зерна при низких температурах [9].

Alcarde et all. [10] предлагают использовать гамма излучение для снижения микробной обсемененности сока сахарного тростника, используемого для производства спирта. Показано, что данная обработка снижает микробную обсемененность сока, в результате чего снижается конечная кислотность сброженного сока и повышается выход спирта.

На ряде спиртовых заводов в Бразилии для предотвращения развития диких дрожжей контаминирующих производство топливного этанола используется фунгицид – полигексаметил бигуанидин [11].

Эффективным средством, снижающим уровень бактериальной контаминации спиртового производства является 3,4,4-трихлоркарбанилид [12].

При производстве топливного этанола для предотвращения микробной контаминации используют метабисульфит натрия в концентрации 0,25 % [13].

Использование химических антисептиков, таких как формалин и хлорная известь в технологии этилового спирта ограничивается, их предполагаемым отрицательным влиянием на качество готового продукта. В связи с этим проводится активная работа по разработке новых высокоэффективных и безопасных препаратов антимикробного действия.

Одним из направлений в исследованиях по снижению инфекции в спиртовом производстве является применение биологически активных веществ: антибиотиков и ферментов, а также их продуцентов.

В работе [14] предлагается использовать в качестве продуцентов этанола лактаттолерантные дрожжи *Candida glabrata*, и добавлять в среду культивирования молочную кислоту до концентрации 2 %. Данная концентрация эффективно угнетает рост молочнокислых бактерий, но не оказывает влияния на образование этилового спирта дрожжами *C. glabrata*.

В результате скрининга дрожжей с выраженной антибактериальной активностью и малой склонностью к флокуляции позволил выделить штамм *Saccharomyces* sp. M26, ингибирующий рост *Lactobacillus fermentum*, использование которо-

го позволит лучше контролировать уровень микробной контаминации процесса брожения [15].

Штаммы дрожжей, характеризующиеся повышенным образованием янтарной и винной кислот, способны замедлять развитие молочнокислых бактерий [16].

Хитозан в концентрациях 3-6 г/л увеличивал продолжительность лаг фазы диких дрожжей р. *Brettanomyces* и не оказывал влияния на скорость роста дрожжей *S. cerevisiae* при их смешанном культивировании [17].

Для подавления роста бактерий и удаления присутствующей в бражке микробиоты предложено применение фермента лизоцима. Лизоцим обладает мурамидазной активностью, он расщепляет β -1,4-связи между N-ацетилмурамовой кислотой и остатком 2-ацетида-2-дезоксиглюкозила в мукополисахаридах или мукопептидах, образующих клеточную стенку бактерий, что приводит к ее разрушению [18]. Лизоцим в концентрации 700 ppm был эффективен против *L. plantarum* [19].

В настоящее время на отечественном рынке биологических продуктов представлено несколько антимикробных препаратов широкого спектра действия Каморан [7], Лактозид 247 (смесь антибиотиков, подавляющих развитие таких микроорганизмов, как *Lactobacillus*, *Acetobacter*, *Streptomyces*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*), [8] рекомендуемых для применения в спиртовой промышленности.

В спиртовой промышленности применяются различные антибиотики: вирджинамицин [20], пенициллин G [21], низин [19], пеницилловая кислота V, монензин [22] т.д. Антибиотик вирджинамицин, выделенный из микроорганизма, известного как *Streptomyces virginiae*, относится к классу стрептограмминов. Механизм его действия основан на связывании двух активных центров на рибосомальной субъединице 50S, что влечет за собой необратимые нарушения синтеза пептидов в клеточной стенке бактерий. Благодаря тонкой природной организации рибосом, их кардинальной перестройки путем мутаций довольно трудно достигнуть. Именно этот факт обеспечивает замедленный механизм развития резистентности у чувствительных микроорганизмов и позволяет применять препарат даже в отношении штаммов, резистентных к другим бактериальным ингибиторам [23].

В 1994 г на основе вирджинамицина был создан продукт, получивший название Лактрол, в настоящее время производимый фирмой PhibroChem [23]. Действующий компонент Лактрола придает препарату высокую активность против широкого спектра бактерий, относящихся к родам *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Sarcina*, *Clostridium*, *Bacillus*. Особенно эффективен Лактрол в отношении представителей рода *Lactobacillus* - основных контаминантов спиртового брожения [23]. При применении препарата наблюдается значительное подавление роста грамположительной микробиоты и существенное увеличение скорости утилизации дрожжами глюкозы. Использование препарата Лактрол на спиртовых заводах США и Бразилии существенно снижало потери произведенного про-

дукта до 11 % от количества произведенного этанола [23].

Пеницилловая кислота V (0,1-0,2 мкг/мл), клиндамицин (0,05-0,40 мкг/мл) эффективно подавляли рост бактерий *L. fermentum* и *Leuc. mesenteroides* [4].

Низин (8,6 ppm) в сочетании с эмульгатором Tween 20 (0,1 %) задерживали лаг-фазу *L. fermentum* на 12 ч не влияя при этом на дрожжи [19].

Антибиотики могут добавляться в сусло непрерывно или периодически. При добавлении пенициллина G в среду культивирования до концентрации 2,475 Е/л количество бактерий *Lactobacillus paracasei* снижалось: с $8 \cdot 10^9$ КОЕ/мл до $1,02 \cdot 10^5$ КОЕ/мл при непрерывной подаче антибиотика, и до $2,77 \cdot 10^5$ КОЕ/мл при пульсирующей подаче с интервалом 6 ч. При этом жизнеспособность дрожжей увеличивалась вдвое, а потери спирта сокращались на 40 % [21].

Некоторые короткие синтетические пептиды, производные лактоферрина В, проявляют фунгицидное действие в микромолярных концентрациях и могут быть использованы для подавления жизнедеятельности диких дрожжей *Dekkera bruxellensis*, *Zygosaccharomyces bailii* и *Zygosaccharomyces bisporus* в виноделии и спиртовом производстве [24].

Следует отметить, что у антибиотиков есть ряд недостатков: высокая стоимость и возникновение антибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов [25], в связи с чем в последние годы активно ведутся поиски новых эффективных и недорогих химических дезинфектантов, безопасных для производства.

В тестировании ряда соединений на предмет возможности их использования для снижения микробной контаминации в производстве этилового спирта наибольшую эффективность показали сульфит натрия (10-40 мкг/мл), нитрит натрия (<117 мкг/мл), сульфат меди (75-300 мкг/мл) [4].

В работе [26] показано влияние совместного действия мета-бисульфита натрия и пероксида водорода на жизнеспособность дрожжей и молочнокислых бактерий *Lactobacillus fermentum* 7-1 и *Lb. casei* 4-3. Установлено, что метабисульфит натрия в концентрации 100-400 мг/л снижал жизнеспособность бактерий, но не влиял на дрожжи. На основании данных о том, что метабисульфит натрия проявлял свое антимикробное действие только в присутствии кислорода, и был более эффективным против *Lb. casei* 4-3 с высокой активностью пероксидазы, чем против *Lactobacillus fermentum* 7-1 с низкой активностью данного фермента, авторы статьи выдвинули гипотезу, согласно которой бактериальная пероксидаза катализирует окисление сульфита в свободные радикалы трехоксида серы $SO_3^{\cdot -}$, $HSO_3^{\cdot -}$. Данные радикалы очень реакционноспособны и обладают сильным бактерицидным действием. Клетки дрожжей не подвержены действию метабисульфита натрия, так как содержат каталазу, разлагающую пероксид водорода. Исследование спиртового брожения с рециркуляцией клеток и искусственной контаминацией молочнокислыми бактериями

Lactobacillus fermentum 7-1 (концентрация клеток бактерий в ферментере $3,1 \cdot 10^8$ КОЕ/мл) показало, что после обработки концентрата клеток смесью мета-бисульфита натрия и пероксида водорода, количество жизнеспособных клеток *Lb. fermentum* 7-1, снижалось до $1,9 \cdot 10^7$ КОЕ/мл, а концентрация спирта возрастала с 57,2 (контроль без обработки) до 78,1 г/л [26].

Добавление пероксида карбамида до концентрации 30-32 мМоль/л снижало количество жизнеспособных клеток пяти видов молочнокислых бактерий (*Lactobacillus plantarum*, *Lb. paracasei*, *Lb. sp. штамм 3*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. fermentum*) с $\approx 10^7$ КОЕ/мл до $\approx 10^2$ КОЕ/мл в течение 2 ч обработки пшеничного сусла при 30 °С перед внесением дрожжей. При сбраживании необработанного сусла содержащего *Lb. paracasei* в количестве $\approx 10^7$ КОЕ/мл выход спирта снижался на 5,84 % по сравнению с суслом, в которое был добавлен пероксид карбамида. Антимикробная активность пероксида карбамида зависела от содержания твердых частиц в сусле, для дезинфекции фильтрата сусла, не содержащего твердых частиц, действующая концентрация пероксида карбамида составила 2 мМоль/л. По мнению авторов статьи, применение пероксида карбамида позволит эффективно снижать микробную контаминацию в при производстве спирта, и дополнительно будет являться азотистым питанием для дрожжей [27].

В аналогичных исследованиях было показано, что пероксид водорода добавляемый на стадии разваривания до концентрации 0,03-0,3 масс. % в водной фазе снижает уровень микробной контаминации зернового замеса. В процессе брожения в сусле, полученном из зернового замеса обработанного пероксидом водорода, образовывалось меньше органических кислот и высших спиртов, более полно утилизировалась глюкоза по сравнению с контролем. Содержание этилового спирта в опытных бражках было выше, чем в контроле на 0,3-0,9 об. % [28].

В заключение обзора отметим, что вопросы микробной контаминации бродительных производств продолжают оставаться актуальными, о чем свидетельствует большое количество отечественных и зарубежных публикаций на эту тему, и представляют интерес для будущих исследований.

Литература

1. Z. Czarniecki, W. Grajek, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **7**, 3, 355-358 (1991)
2. И. Гусева, О.А. Калинина, Э.Н. Колдин, *Производство спирта и ликероводочных изделий*, **2**, 12-15, (2004)
3. В.А. Сотников, В.В. Марченко, В.С. Гамаюрова, *Вестник Казанского технологического университета*, **2**, 180-187 (2003)
4. P. de Oliva-Neto, F. Yokoya, *Brazilian Journal of Microbiology*, **32**, 1, 10-14, (2001)
5. Т. Меледина, *Индустрия напитков*, **2**, 28-32, (2008)
6. Б.Н. Федоренко, *Инженерия пивоваренного солода*, Профессия, СПб, 2004. 248 с.
7. О.С. Журба, Е.М. Максимова, *Производство спирта и ликероводочных изделий*, **4**, 17-19 (2004)
8. N.V. Narendranath, R. Power, *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 5, 2239-2243, (2005)
9. В.С. Чередниченко, *Ликероводочное производство и виноделие*, **6**, 10-11, (2004)
10. A.R. Alcarde, J.M.M. Walder, J. Horii *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **18**, 1, 41-47, (2002)
11. C. Elsztein, J.A.S. de Menezes, Jr. M.A. de Moraes, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **35**, 9, 967-973, (2008)
12. P. de Oliva-Neto, F. Yokoya, *Bioresource technology*, **63**, 1, 17-21, (1998)
13. W.R. Gibbons, C.A. Westby, *Biomass*, **11**, 2, 99-113, (1992)
14. I. Watanabe, T. Nakamura, J. Shima, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **35**, 10, 1117-1122, (2008)
15. P. de Oliva-Neto, M.A. Ferreira, F. Yokoya, *Bioresour Technol.*, **92**, 1, 1-6, (2004)
16. C. Dorta, P. Oliva-Neto, M.S. de -Abreu-Neto, N. Nicolau-Junior, A.I. Nagashima, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **22**, 2, 177-182, (2006)
17. L. Gómez-Rivas, B.I. Escudero-Abarca, M.G. Aguilar-Uscanga, P.M. Hayward-Jones, P. Mendoza, M. Ramírez, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **31**, 1, 16-22, (2004)
18. Г. Хассельбек, А.Ю. Плохов, Ю.В. Сахаров, *Производство спирта и ликероводочных изделий*, **3**, 22-23, (2002)
19. M.A. Franchi, G.E. Serra, M. Cristianini, *Journal of Food Science*, **68**, 7, 2310-2315, (2003)
20. K.M. Bischoff, K.A. Skinner-Nemec, T.D. Leathers, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **34**, 11, 739-744, (2007)
21. D.P. Bayrock, K.C. Thomas, W.M. Ingledew, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **62**, 5-6, 498-502, (2003)
22. C. T. Stroppa, M. G. S. Andrietta, S. R. Andrietta, C. Steckelberg, G. E. Serra, *Int. Sugar J.*, **102**, 1214, 78-82, (2000)
23. С.В. Пыхова, А.Н. Титков, Р.И. Девяткина, Т.Е. Попова, *Производство спирта и ликероводочных изделий*, **2**, 16-17, (2003)
24. M. Enrique, J.F. Marcos, M. Yuste, M. Martínez, S. Vallés, P. Manzanares., *Int. J. Food Microbiol.*, **127**, 3, 229-234, (2008)
25. G.G. Khachatourians, *Can. Med. Assoc. J.*, **159**, 9, 1129-1136, (1999)
26. I.S. Chang, B.H. Kim, P.K. Shin, *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 1, 1-6, (1997)
27. N.V. Narendranath, K.S. Thomas, W.M. Ingledew, *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**, 10, 4187-4192, (2000)
28. Т.А. Ямашев, Н.К. Романова, Н.Н. Симонова, О.А. Решетник *Вестник Казанского технологического университета*, **4**, 169-175 (2006)

© Т. А. Ямашев – к.т.н. доц. каф. технологии пищевых производств КНИТУ, yamashev555@mail.ru; Н. Р. Салыхов – магистрант каф. технологии пищевых производств КНИТУ; О. А. Решетник – д.т.н., проф. каф. технологии пищевых производств КНИТУ, reshetnik@kstu.ru.