

УДК 663.128+630*181.342

И. В. Новикова, И. А. Юрицын, А. С. Муравьев

Условия продуцирования уксусной кислоты дрожжами *Brettanomyces*

Дрожжи рода *Brettanomyces* нашли применение в пивоварении (стили Ламбик и Гёз). Уксусная кислота, полученная в ходе ферментации дрожжей *Brettanomyces*, участвует в синтезе эфиров, отвечающих за вкусоароматическую составляющую напитка. В ходе исследования определяли способность четырех штаммов дрожжей *Brettanomyces* (*intermedius*, *bruxellensis*, *custersianus* и *clausenii*) к выработке уксусной кислоты на среде, содержащей глюкозу. *B. bruxellensis* признан наиболее эффективным для биологического подкисления среды, в том числе в пивоварении. Определен оптимальный режим расхода воздуха при полном потреблении глюкозы и достижении максимальных значений объемного – 0,06 г/(дм³×ч) и удельного выхода уксусной кислоты – 0,43 г/(г×ч), равный 300 дм³/ч. Статистическими методами исследовано влияние температуры и перемешивания среды на выработку уксусной кислоты *B. bruxellensis* в среде, содержащей глюкозу, при температуре 26, 30, 34 °С и скорости вращения мешалки 250, 350, 450 об./мин. Оптимальными условиями для максимального объемного выхода уксусной кислоты – 0,114 г/(дм³×ч) – выбраны температура среды 28 °С и скорость вращения мешалки 250 об./мин.

Ключевые слова: *Brettanomyces*, уксусная кислота, пивоварение, аэрация, температура.

Введение

Дрожжи, принадлежащие к роду *Brettanomyces*, признаны контаминантами для вина [1; 2]. В виноделии микроорганизмы появляются после окончания процесса сбраживания сусле, они ответственны за неприятные оттенки в аромате [3; 4]. В промышленном производстве этанола *Brettanomyces* известны из-за их способности к ферментации сбраживаемых углеводов с образованием уксусной кислоты [5]. Увеличение концентрации уксусной кислоты в среде может оказывать отрицательное влияние на жизнедеятельность *Saccharomyces cerevisiae*, таким образом уменьшая способность производственной микрофлоры к продуцированию этанола [6], и следовательно, приводит к снижению выхода спирта.

С другой стороны, в пивоварении дрожжи рода *Brettanomyces* нашли свое применение в производстве таких стилей, как Ламбик и Гёз, синтезируя ароматические компоненты 4-винилгваякол (аромат гвоздики), 4-винилфенол (лекарственные, пластиковые оттенки) и 4-винилкатехол (аромат дыма) [7–9].

Уксусная кислота, полученная в ходе ферментации дрожжей *Brettanomyces*, участвует в синтезе эфиров, таких, например, как этиловый эфир уксусной кислоты. Показано, что при анаэробной ферментации *Brettanomyces* производит достаточное количество жирных кислот для снижения pH среды до значения 4,0, которые также участвуют в реакциях этерификации [10]. Некоторые штаммы *Brettanomyces* могут синтезировать янтарную кислоту в качестве побочного продукта брожения при относительно небольшом количестве кислорода в среде [11].

Применение *Brettanomyces* в производстве алкогольных напитков широко освещено в литературе, в частности изучалось влияние таких параметров, как pH среды [12], воздействие кислорода [13], влияние концентрации этанола [14]. Влияние температуры на жизнедеятельность дрожжевой клетки наиболее значительно, поскольку температура является одним из важнейших параметров процесса спиртового брожения, который оказывает влияние на кинетику биохимического процесса с изменением метаболизма дрожжевой клетки [6].

Цель работы – оценка количества уксусной кислоты при продуцировании четырьмя различными штаммами *Brettanomyces*, выбор штамма с точки зрения применения в пивоварении и изучение влияния условий культивирования дрожжей (температура, аэрация и перемешивание) на выход уксусной кислоты.

Материалы и методы

Дрожжи *Brettanomyces bruxellensis*, *Brettanomyces intermedius*, *Brettanomyces custersianus* и *Brettanomyces clausenii* хранили при температуре 4 °С на среде следующего состава (г/дм³): глюкоза, 20; агар, 20; дрожжевой экстракт, 10.

Для засева культуры состав среды был следующим (г/дм³): глюкоза, 50; КН₂РО₄, 5; (NH₄)₂SO₄, 2; дрожжевой экстракт, 1 и MgSO₄ 7H₂O, 0,4. Начальный pH был скорректирован до 4 с использованием 85 % раствора ортофосфорной кислоты. Затем питательную среду стерилизовали при 120 °С в течение 15 мин.

Засев культуры проводили в колбе вместимостью 500 см³ с 300 см³ среды, оборудованной магнитной мешалкой (скорость вращения 250 об./мин). После инокулирования каждую колбу выдерживали при 30 °С в течение 72 ч.

Эксперименты проводились в ферментере вместимостью 15 дм³, подключенном к контроллеру для регистрации значений pH и калиброванному ротаметру расхода воздуха. Питательную среду объемом

10 дм³ стерилизовали в течение 60 мин при 120 °С, добавляли инокулят до достижения 3×10^6 клеток/см³. Процесс ферментации проводили при следующих параметрах: температура – 26, 30, 34 °С; скорость вращения мешалки – 250, 350, 450 об./мин; расход воздуха для аэрации среды – 100, 200, 300, 350 дм³/ч.

Концентрацию биомассы контролировали с помощью измерений оптической плотности дрожжевой суспензии при 620 нм на спектрофотометре с определением массы клеток после высушивания. Количество мертвых клеток в среде контролировали по стандартной методике¹, концентрацию глюкозы – глюкозооксидазным методом. Концентрацию этанола и содержание уксусной кислоты определяли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с рефрактометрическим детектированием². Экспериментальная погрешность не превышала 3 % для всех анализируемых соединений.

Для статистической оценки влияния параметров культивирования на количество уксусной кислоты в среде (ПО Design Expert, v. 11.1.0, Stat-Ease Inc.) применяли полный факторный эксперимент 3² [15].

Результаты и обсуждение

Выработка уксусной кислоты дрожжами *Brettanomyces*

В процессе исследований в среде, содержащей глюкозу, контролировали эффективность продуцирования уксусной кислоты дрожжами *Brettanomyces*. Процесс проводили в аэробных условиях: расход воздуха 150 дм³/ч, температура 30 °С, скорость вращения мешалки 250 об./мин (рис. 1). Конечная концентрация уксусной кислоты была различной в зависимости от применяемого вида: от 1,41 г/дм³ для *B. clausenii* до 8,4 г/дм³ для *B. intermedius*. В случае участия *B. intermedius* и *B. bruxellensis* количество уксусной кислоты увеличилось – концентрация в среде оказалась в четыре раза выше, чем в экспериментах, проводимых с участием *B. clausenii* и *B. custersianus*.

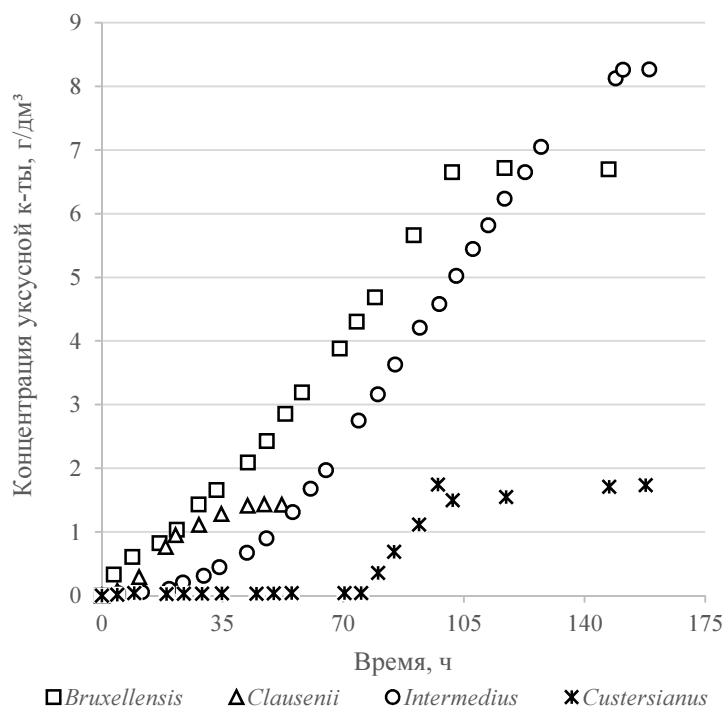


Рис. 1. Динамика изменения содержания уксусной кислоты в среде
Fig. 1. Dynamics of acetic acid content changes in the medium

В табл. 1 приведены кинетические параметры процесса культивирования для каждого штамма дрожжей. Так, *B. custersianus* и *B. clausenii* показали самую высокую удельную скорость роста (0,18 и 0,33 ч⁻¹ соответственно), но при этом наблюдали более низкое накопление уксусной кислоты (0,06 г/г) по сравнению с двумя другими штаммами (0,16 и 0,14 г/г).

Результаты для *B. bruxellensis* и *B. intermedius* показали, что эти штаммы имели самый высокий удельный (0,21 и 0,43 г/(г×ч)) и объемный выход уксусной кислоты (0,05 и 0,06 г/(дм³×ч)). На основании этого *B. bruxellensis* можно рассматривать как наиболее эффективный штамм для биологического подкисления среды.

¹ ГОСТ Р 57221-2016. Дрожжи кормовые. Методы испытаний. М., 2017. 54 с.

² ГОСТ Р 51822-2001. Вина и виноматериалы. Газохроматографический метод определения объемной доли этилового спирта, массовой концентрации уксусной и пропионовой кислот. М., 2003. 15 с.

Таблица 1. Значения параметров культивирования уксусной кислоты, полученных для различных штаммов дрожжей *Brettanomyces*
Table 1. Values of acetic acid cultivation parameters obtained for different yeast *Brettanomyces* strains

Штамм	Окончание культивирования, ч	Удельная скорость роста, $\mu, \text{ч}^{-1}$	Выход уксусной к-ты, $Y, \text{г/г}$	Удельный выход уксусной к-ты, $Y_p, \text{г/(г}\times\text{ч)}$	Объемный выход уксусной к-ты, $V, \text{г/(дм}^3\times\text{ч)}$
<i>B. intermedius</i>	151	0,12	0,16	0,21	0,05
<i>B. bruxellensis</i>	102	0,16	0,14	0,43	0,06
<i>B. custersianus</i>	152	0,18	0,06	0,005	0,01
<i>B. clausenii</i>	42	0,33	0,06	0,03	0,03

Влияние расхода воздуха на выход уксусной кислоты и потребление глюкозы

Для исследования влияния концентрации кислорода на выход уксусной кислоты и потребление субстрата дрожжами *B. bruxellensis* проводили культивирование на среде, содержащей глюкозу, в аэробных условиях (расход воздуха от 100 до 350 $\text{дм}^3/\text{ч}$). Было выявлено, что повышенное содержание кислорода в среде приводит к значительному увеличению выхода уксусной кислоты (табл. 2).

Таблица 2. Значения параметров культивирования, полученных при разных режимах аэрирования для дрожжей *Brettanomyces bruxellensis*
Table 2. Values of cultivation parameters obtained at different aeration regimes for *Brettanomyces bruxellensis* yeast

Расход воздуха, $\text{дм}^3/\text{ч}$	Выход уксусной к-ты, $Y, \text{г/г}$	Объемный выход уксусной к-ты, $V, \text{г/(дм}^3\times\text{ч)}$	Выход этанола, %	Потребление глюкозы, %
100	0,030	0,018	3,87	100
200	0,139	0,082	2,50	100
300	0,230	0,134	2,25	100
350	0,284	0,128	2,00	82

Увеличение расхода воздуха отрицательно сказалось на выходе этанола – его содержание снизилось примерно на 45 % при максимальном режиме подачи воздуха. Такой результат характерен для культивирования дрожжей в аэробном режиме (т. н. эффект Кастера) [16].

Субстрат был полностью утилизирован дрожжами при режимах с диапазоном аэрации от 100 до 300 $\text{дм}^3/\text{ч}$. При расходе воздуха 350 $\text{дм}^3/\text{ч}$ остаточное количество глюкозы составляло до 18 %. Данный факт можно объяснить тем, что присутствие уксусной кислоты, образующейся при брожении, оказывает ингибирующее действие на процесс ферментации глюкозы дрожжами (в этом случае максимальная концентрация уксусной кислоты составляла 11,2 г/дм^3).

Полученные результаты показывают, что оптимальный расход воздуха составляет 300 $\text{дм}^3/\text{ч}$. Выход уксусной кислоты в этом режиме сопоставим с режимом 350 $\text{дм}^3/\text{ч}$ (0,23 и 0,28 г/г соответственно), однако при 300 $\text{дм}^3/\text{ч}$ наблюдали максимальный объемный выход уксусной кислоты (0,134 $\text{г/(дм}^3\times\text{ч)}$) и полное потребление субстрата.

*Влияние температуры и перемешивания на продуцирование уксусной кислоты дрожжами *B. bruxellensis**

Математические методы планирования эксперимента (центральное композиционное ротатабельное униформпланирование и полный факторный эксперимент 3^2) применяли для поиска оптимальных режимов, влияющих на процесс культивирования дрожжей в среде, содержащей глюкозу, при аэрации 300 $\text{дм}^3/\text{ч}$ в течение 90 ч.

В качестве основных факторов, влияющих на процесс культивирования, выбраны (табл. 3): x_1 – температура среды, $t, \text{°C}$; x_2 – скорость вращения мешалки, об./мин . Выходными параметрами являлись: y_1 – выход уксусной к-ты, $Y, \text{г/г}$; y_2 – удельный выход уксусной к-ты, $Y_p, \text{г/(г}\times\text{ч)}$; y_3 – объемный выход уксусной к-ты, $V, \text{г/(дм}^3\times\text{ч)}$. Матрица планирования эксперимента представлена в табл. 3.

Получены уравнения регрессии в кодированных значениях:

$$Y_1 = 0,194 - 0,009X_1 - 0,008X_2 - 0,003X_1X_2 - 0,013X_1^2 + 0,002X_2^2;$$

$$Y_2 = 0,061 - 0,004X_1 - 0,033X_2 + 0,002X_1X_2 - 0,031X_1^2 + 0,018X_2^2;$$

$$Y_3 = 0,104 - 0,003X_1 - 0,009X_2 - 0,001X_1X_2 - 0,013X_1^2 + 0,003X_2^2.$$

Таблица 3. Матрица планирования эксперимента
Table 3. Experiment planning matrix

Номер эксперимента	$x_1, ^\circ\text{C}$	$x_2, \text{об./мин}$	$y_1, \text{г/г}$	$y_2, \text{г/(г}\times\text{ч)}$	$y_3, \text{г/(дм}^3\times\text{ч)}$
1	26	250	0,198	0,072	0,106
2	26	350	0,190	0,041	0,093
3	26	450	0,186	0,024	0,088
4	30	250	0,203	0,143	0,114
5	30	350	0,193	0,046	0,103
6	30	450	0,191	0,030	0,100
7	34	250	0,187	0,060	0,100
8	34	350	0,173	0,032	0,090
9	34	450	0,162	0,021	0,080

Установлено, что оба входных фактора оказывают равностепенное влияние как на выход уксусной кислоты (y_1), так и на объемный выход уксусной кислоты (y_3) ($p < 0,01$). В обоих случаях наблюдали обратную зависимость – более высокие значения выходных параметров достигались при более низких значениях температур и скорости вращения мешалки. В случае удельного выхода уксусной кислоты (y_2) существенное влияние оказывала только скорость вращения мешалки ($p < 0,01$).

Графическая интерпретация уравнений в виде поверхностей отклика приведена на рис. 2. Оптимальные значения выходных параметров были достигнуты при 28 $^\circ\text{C}$ и 250 об./мин.

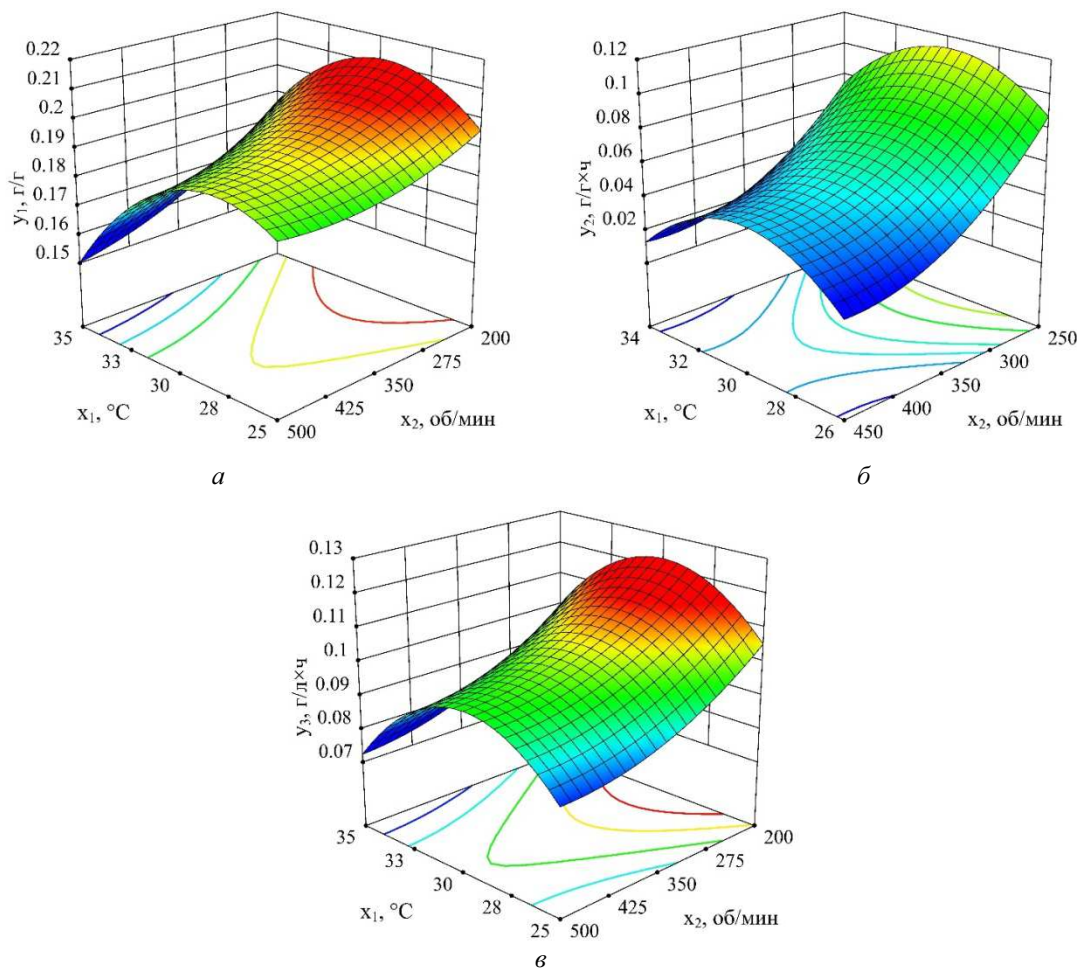


Рис. 2. Поверхности отклика зависимостей температуры среды, $x_1, ^\circ\text{C}$ и скорости вращения мешалки, $x_2, \text{об./мин}$ от: а – выхода уксусной кислоты, $y_1, \text{г/г}$; б – удельного выхода уксусной кислоты, $y_2, \text{г/(г}\times\text{ч)}$; в – объемного выхода уксусной кислоты, $y_3, \text{г/(дм}^3\times\text{ч)}$

Fig. 2. Surface response of medium temperature, $x_1, ^\circ\text{C}$ and agitator rotation speed, x_2, rpm from: а – acetic acid yield, $y_1, \text{g/g}$; б – the specific yield of acetic acid, $y_2, \text{g/(g}\times\text{h)}$, and в – the volumetric yield of acetic acid, $y_3, \text{g/(дм}^3\times\text{h)}$

Закключение

В ходе исследования определен оптимальный режим расхода воздуха при полном потреблении глюкозы и достижении максимальных значений объемного – 0,06 г/(дм³×ч) и удельного выхода уксусной кислоты – 0,43 г/(г×ч), равный 300 дм³/ч. С помощью статистических методов исследовано влияние температуры и перемешивания среды на выработку уксусной кислоты *B. bruxellensis* в среде, содержащей глюкозу, при температурных режимах 26, 30, 34 °С и скоростях вращения мешалки 250, 350, 450 об./мин. Оптимальными условиями для максимального объемного выхода уксусной кислоты – 0,114 г/(дм³×ч) выбраны температура среды 28 °С и скорость вращения мешалки 250 об./мин.

В результате анализа определена способность четырех штаммов дрожжей *Brettanomyces (intermedius, bruxellensis, custersianus и clausenii)* к выработке уксусной кислоты в среде, содержащей глюкозу. Штамм *B. bruxellensis* признан наиболее эффективным для биологического подкисления среды, в том числе в пивоварении.

Библиографический список

1. Загоруйко В. А., Ткачев И. Ф., Скорикова Т. К., Черноусова И. В., Гержикова В. Г. [и др.]. Обнаружение и идентификация штаммов дрожжей *Brettanomyces* // Магарач. Виноградарство и виноделие. 2007. № 3. С. 20–23.
2. von Cosmos N. H., Edwards C. G. Use of nutritional requirements for *Brettanomyces bruxellensis* to limit infections in wine // Fermentation. 2016. V. 2, Iss. 3, 17. [P. 1–9]. DOI: <https://doi.org/10.3390/fermentation2030017>.
3. Schifferdecker A. J., Dashko S., Ishchuk O. P., Piškur J. The wine and beer yeast *Dekkera bruxellensis* // Yeast. 2014. V. 31, Iss. 9. P. 323–332. DOI: <https://doi.org/10.1002/yea.3023>.
4. Harris V., Ford C. M., Jiranek V., Grbin P. R. Survey of enzyme activity responsible for phenolic off-flavour production by *Dekkera* and *Brettanomyces* yeast // Applied Microbiology and Biotechnology. 2009. V. 81, Iss. 6. P. 1117–1127. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1708-7>.
5. Пономарева О. И., Иванова В. А., Прохорчик И. П., Меледина Т. В. Дрожжи рода *Brettanomyces*. Характеристики и особенности метаболизма // Пиво и напитки. 2017. № 1. С. 38–42.
6. Микробиология пива = Brewing microbiology / Прист Ф. Дж., Й. Кэмпбелл (ред.); пер. с англ. под общ. ред. Т. В. Мелединой, Тыну Сойдла. СПб. : Профессия, 2005. 368 с.
7. Данина М. М., Иванченко О. Б. Использование дрожжей р. *Brettanomyces* в технологии пива // Вестник международной академии холода. 2015. № 4. С. 27–31.
8. Vanbeneden N., Gils F., Delvaux F., Delvaux F. R. Formation of 4-vinyl and 4-ethyl derivatives from hydroxycinnamic acids: Occurrence of volatile phenolic flavour compounds in beer and distribution of Pad1-activity among brewing yeasts // Food Chemistry. 2008. V. 107, Iss. 1. P. 221–230. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.008>.
9. Юрицын И. А., Новикова И. В., Мальцева О. Ю. Перспективы применения высокосбраживающих рас пивных дрожжей с пропагацией чистой культуры // Актуальные вопросы нутрициологии, биотехнологии и безопасности пищи : материалы Всерос. конф. молодых ученых с междунар. участием, Москва, 12–13 октября 2017 г. М. : Изд-во ФИЦ питания и биотехнологии, 2017. С. 237–240.
10. Nixson J. L., Sleep N. R., Capone D. L., Elsey G. M., Curtin C. D. [et al.]. Hydroxycinnamic acid ethyl esters as precursors to ethylphenols in wine // Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2012. V. 60, Iss. 9. P. 2293–2298.
11. Curtin C. D., Langhans G., Henschke P. A., Grbin P. R. Impact of Australian *Dekkera bruxellensis* strains grown under oxygen-limited conditions on model wine composition and aroma // Food Microbiology. 2013. V. 36, Iss. 2. P. 241–247. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.06.008>.
12. Sturm M. E., Arroyo-López F. N., Garrido-Fernández A., Querol A., Mercado L. A. [et al.]. Probabilistic model for the spoilage wine yeast *Dekkera bruxellensis* as a function of pH, ethanol and free SO₂ using time as a dummy variable // International Journal of Food Microbiology. 2014. V. 170. P. 83–90. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.10.019>.
13. Reis A. L. S., Rodrigues de Souza R. F., Baptista Torres R. R. N., Bezerra Leite F. C., Guedes Paiva P. M. [et al.]. Oxygen-limited cellobiose fermentation and the characterization of the cellobiase of an industrial *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* strain // SpringerPlus. 2014. Iss. 3. P. 38. DOI: <https://doi.org/10.1186/2193-1801-3-38>.
14. Conterno L., Aprea E., Franceschi P., Viola R., Vrhovsek U. Overview of *Dekkera bruxellensis* behaviour in an ethanol-rich environment using untargeted and targeted metabolic approaches // Food Research International. 2013. V. 51, Iss. 2. P. 670–678. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.01.049>.
15. Грачев Ю. П., Плаксин Ю. М. Математические методы планирования экспериментов. М. : ДеЛи принт, 2005. 293 с.

16. Carrascosa J. M., Viguera M. D., Núñez de Castro I., Scheffers W. A. Metabolism of acetaldehyde and Custers effect in the yeast // Antonie van Leeuwenhoek. Journal of Microbiology. 1981. V. 47, Iss. 3. P. 209–215. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00403392>.

References

1. Zagoruyko V. A., Tkachev I. F., Skorikova T. K., Chernousova I. V., Gerzhikova V. G. [i dr.]. Obnaruzhenie i identifikatsiya shtammov drozhzhey *Brettanomyces* [Identification of the yeast species *Brettanomyces bruxellensis*] // Magarach. Vinogradarstvo i vinodelie. 2007. N 3. P. 20–23.
2. von Cosmos N. H., Edwards C. G. Use of nutritional requirements for *Brettanomyces bruxellensis* to limit infections in wine // Fermentation. 2016. V. 2, Iss. 3, 17. [P. 1–9]. DOI: <https://doi.org/10.3390/fermentation2030017>.
3. Schifferdecker A. J., Dashko S., Ishchuk O. P., Piškur J. The wine and beer yeast *Dekkera bruxellensis* // Yeast. 2014. V. 31, Iss. 9. P. 323–332. DOI: <https://doi.org/10.1002/yea.3023>.
4. Harris V., Ford C. M., Jiranek V., Grbin P. R. Survey of enzyme activity responsible for phenolic off-flavour production by *Dekkera* and *Brettanomyces* yeast // Applied Microbiology and Biotechnology. 2009. V. 81, Iss. 6. P. 1117–1127. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1708-7>.
5. Ponomareva O. I., Ivanova V. A., Prohorchik I. P., Meledina T. V. Drozhzhi roda *Brettanomyces*. Harakteristiki i osobennosti metabolizma [The yeast of genus *Brettanomyces*. Characteristics and features of metabolism] // Pivo i napitki. 2017. N 1. P. 38–42.
6. Mikrobiologiya piva [Brewing microbiology] / Prist F. Dzh., Y. Kempbell (red.); per. s angl. pod obsch. red. T. V. Meledinoy, Tyinu Soydl. SPb. : Professiya, 2005. 368 p.
7. Danina M. M., Ivanchenko O. B. Ispolzovanie drozhzhey r. *Brettanomyces* v tehnologii piva [*Brettanomyces* yeast in beer technology] // Vestnik mezhdunarodnoy akademii holoda. 2015. N 4. P. 27–31.
8. Vanbeneden N., Gils F., Delvaux F., Delvaux F. R. Formation of 4-vinyl and 4-ethyl derivatives from hydroxycinnamic acids: Occurrence of volatile phenolic flavour compounds in beer and distribution of Pad1-activity among brewing yeasts // Food Chemistry. 2008. V. 107, Iss. 1. P. 221–230. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.008>.
9. Yuritsyn I. A., Novikova I. V., Maltseva O. Yu. Perspektivy primeneniya vysokobrazhivayuschih ras pivnyh drozhzhey s propagatsiey chistoy kultury [Prospects for using highly-fermented races of brewer's yeast with propagation of pure culture] // Aktualnye voprosy nutritsiologii, biotehnologii i bezopasnosti pishchi : materialy Vseros. konf. molodyh uchenykh s mezhdunar. uchastiem, Moskva, 12–13 oktyabrya 2017 g. M. : Izd-vo FITs pitaniya i biotehnologii, 2017. P. 237–240.
10. Hixson J. L., Sleep N. R., Capone D. L., Elsey G. M., Curtin C. D. [et al.]. Hydroxycinnamic acid ethyl esters as precursors to ethylphenols in wine // Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2012. V. 60, Iss. 9. P. 2293–2298.
11. Curtin C. D., Langhans G., Henschke P. A., Grbin P. R. Impact of Australian *Dekkera bruxellensis* strains grown under oxygen-limited conditions on model wine composition and aroma // Food Microbiology. 2013. V. 36, Iss. 2. P. 241–247. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.06.008>.
12. Sturm M. E., Arroyo-López F. N., Garrido-Fernández A., Querol A., Mercado L. A. [et al.]. Probabilistic model for the spoilage wine yeast *Dekkera bruxellensis* as a function of pH, ethanol and free SO₂ using time as a dummy variable // International Journal of Food Microbiology. 2014. V. 170. P. 83–90. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.10.019>.
13. Reis A. L. S., Rodrigues de Souza R. F., Baptista Torres R. R. N., Bezerra Leite F. C., Guedes Paiva P. M. [et al.]. Oxygen-limited cellobiose fermentation and the characterization of the cellobiase of an industrial *Dekkera/Brettanomyces bruxellensis* strain // SpringerPlus. 2014. Iss. 3. P. 38. DOI: <https://doi.org/10.1186/2193-1801-3-38>.
14. Conterno L., Aprea E., Franceschi P., Viola R., Vrhovsek U. Overview of *Dekkera bruxellensis* behaviour in an ethanol-rich environment using untargeted and targeted metabolic approaches // Food Research International. 2013. V. 51, Iss. 2. P. 670–678. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.01.049>.
15. Grachev Yu. P., Plaksin Yu. M. Matematicheskie metody planirovaniya eksperimentov [Mathematical methods of planning experiments]. M. : DeLi print, 2005. 293 p.
16. Carrascosa J. M., Viguera M. D., Núñez de Castro I., Scheffers W. A. Metabolism of acetaldehyde and Custers effect in the yeast // Antonie van Leeuwenhoek. Journal of Microbiology. 1981. V. 47, Iss. 3. P. 209–215. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00403392>.

Сведения об авторах

Новикова Инна Владимировна – пр-т Революции, 19, г. Воронеж, Россия, 394036; Воронежский государственный университет инженерных технологий, д-р техн. наук, профессор; e-mail: noviv@list.ru

Novikova I. V. – 19, Revolution Av., Voronezh, Russia, 394036; Voronezh State University of Engineering Technologies, Dr of Tech. Sci., Professor; e-mail: noviv@list.ru

Юрицын Илья Александрович – пр-т Революции, 19, г. Воронеж, Россия, 394036; Воронежский государственный университет инженерных технологий, аспирант; e-mail: kafedra_tbsp@mail.ru

Yuritsyn I. A. – 19, Revolution Av., Voronezh, Russia, 394036; Voronezh State University of Engineering Technologies, Ph. D. Student; e-mail: kafedra_tbsp@mail.ru

Муравьев Александр Сергеевич – пр-т Революции, 19, г. Воронеж, Россия, 394036; Воронежский государственный университет инженерных технологий, канд. техн. наук, инженер; e-mail: hntrun@mail.ru

Murav'ev A. S. – 19, Revolution Av., Voronezh, Russia, 394036; Voronezh State University of Engineering Technologies, Cand. of Tech. Sci., Engineer; e-mail: hntrun@mail.ru

I. V. Novikova, I. A. Yuritsyn, A. S. Murav'ev

Conditions of acetic acid producing by *Brettanomyces* yeast

Brettanomyces yeast has found their application in brewing (Lambic and Gueuze style). Acetic acid obtained during fermentation by *Brettanomyces* yeast participates in the synthesis of ethers responsible for the taste and aroma component of the beverage. In this study the ability of four yeast strains *Brettanomyces* (*intermedius*, *bruxellensis*, *custersianus*, and *clausenii*) to produce acetic acid on a medium containing glucose has been determined. The strain *B. bruxellensis* has been found to be the most effective for the biological acidification of the medium including brewing. The optimum mode of air output at full consumption of glucose and achievement of maximal values of volumetric equal to 0.06 g/(l×h) and specific yield of acetic acid equal to 0.43 g/(g×h) has been determined, it is equal to 300 l/h. Influence of temperature and mixing of the medium on the production of acetic acid by *B. bruxellensis* in an environment containing glucose at the temperature of 26, 30, 34 °C and the speed of the mixer 250, 350, 450 rpm has been investigated by statistical methods. The optimal conditions for the maximum volumetric output of acetic acid – 0.114 g/(l×h) are the temperature 28 °C and the mixer speed 250 rpm.

Key words: *Brettanomyces*, acetic acid, brewing, aeration, temperature.