

УДК 663.533

В статье рассматривается интенсификация процессов дрожжегенерации, поддержание культуры спиртовых дрожжей в активном состоянии с высокой плотностью дрожжевой популяции, что позволяет повысить эффективность спиртового производства, ускорить процессы разбраживания и главного брожения сусла, сократить потери спирта и сырья.

В ходе проводимых исследований установлена высокая эффективность совмещенного протеолиз и доосахаривание сусла, позволяющая интенсифицировать процесс доосахаривания, обогатить сусло легкоусвояемым азотным питанием, интенсифицировать процесс дрожжегенерации до 12–14 часов, получить высокую плотность дрожжевой популяции. Дрожжевые клетки, выращенные на сусле с ферментным препаратом «Алфалазы FP2», отличаются повышенной биологической активностью и улучшенным физиологическим состоянием.

РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ ПО ИНТЕНСИФИКАЦИИ ПРОИЗВОДСТВА СПИРТА ПУТЕМ НАПРАВЛЕННОГО ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЭНДОГЕННЫХ КИСЛЫХ ПРОТЕАЗ

Т. М. Тананайко, кандидат технических наук, доцент, начальник отдела технологий ликеро-водочной, винодельческой и пиво-безалкогольной продукции, ведущий научный сотрудник РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по продовольствию»,

А. А. Пушкарь, аспирант, младший научный сотрудник отдела технологий ликеро-водочной, винодельческой и пиво-безалкогольной продукции РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по продовольствию»

Спиртовая промышленность Республики Беларусь насчитывает порядка 28 предприятий по производству этилового спирта из пищевого сырья. При этом 75% предприятий работают по схемам водно-тепловой обработки крахмалсодержащего сырья под давлением с рабочим диапазоном температур 120–155°C. По данным схемам на производство 1 дал спирта расходуется от 8 до 12 кг острого пара, что в себестоимости спирта составляет 20–30% от всех расходов на топливо-энергетические ресурсы. Значительная энергоемкость существующих отечественных высокотемпературных технологий является в финансовом отношении критической и ставит предприятия на грань выживания, требуя оперативных решений по переоснащению производства и переходу на более современные низкотемпературные схемы механико-ферментативной обработки сырья.

Низкотемпературный механико-ферментативный способ обработки сырья на сегодняшний день активно внедряется в нашей республике и странах СНГ. В Республике Беларусь 7 предприятий отрасли уже перешли на работу по низкотемпературным схемам. Максимальные температурные диапазоны по низкотемпературным схемам производства находятся на уровне 89–105°C, при этом на производство 1 дал спирта расходуется от 6,0 до 7,0 кг острого пара, что в себестоимости спирта составляет 14–17% от всех расходов на топливо-энергетические ресурсы. При этом экономится от 1,0 до 6,0 кг острого пара в сравнении с высокотемпературными схемами производства. В месте с тем специалисты спиртовой отрасли, работая по низкотемпературным схемам производства, испытывают ряд трудностей при переработке зернового сырья. Причинами этого в первую очередь являются:

- особенности отечественной сырьевой базы (сложная для переработки зерновая культура — рожь) из-за слизиобразующих веществ, повышающих вязкость перерабатываемых технологических сред, ухудшающих качество ферментативного гидролиза и последующей ферментации суслу дрожжевыми клетками;
- недостаточная микробиологическая чистота и культура ведения процесса производства;
- низкая плотность дрожжевой культуры (100 — 120 млн клеток/мл) засевных дрожжей;
- неправильно подобранные технологические режимы отдельных стадий технологического процесса.

Предприятиями отрасли совместно со специалистами РУП «Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по продовольствию» (далее — Центр) внедрили на отдельных стадиях технологического процесса новые современные ферментные препараты, действующие не только на крахмал, но и на другие биополимеры сырья (белки, некрахмалистые полисахариды) [1, 2]. Применение комплекса ферментов, действующих на весь комплекс биополимеров зерна позволило четырем из семи передовых предприятий отрасли повысить концентрации перерабатываемых сред с 15,0 — 17,0 до 18,0 — 20,0 %, тем самым увеличив производительность предприятий на 8 — 12% и снизив энергоемкость производства на 2,0 — 4,0 %.

Повышение концентраций перерабатываемых технологических сред еще больше усугубило вышеперечисленные проблемы положение для предприятий. Специалистами отрасли отмечаются регулярные отклонения нормируемых технологических показателей производства, увеличение продолжительности процессов сбраживания суслу с 72 часов до 75 — 80 часов, фиксируется значительное нарастание кислотности в процессе сбраживания суслу, ухудшается качество конечного продукта, увеличивается накопление токсичных микропримесей в спирте.

Интенсификация процессов дрожжегенерации, поддержание культуры спиртовых дрожжей в активном состоянии с высокой плотностью дрожжевой популяции позволяет повысить эффективность спиртового производства, ускорить процессы разбраживания и главного брожения суслу, сократить потери спирта и сырья. Разработка технологии направленного применения протеолитических ферментных препаратов позволяет максимально эффективно задействовать белковые полимеры зернового сырья, обогатить суслу легкоассимилируемыми источниками азота, нарастить высокую концентрацию засевных дрожжей и вследствие этого ускорить процесс спиртового брожения.

Понятия узкой и широкой специфичности для протеолитических ферментных препаратов относительны. Они гидролизуют пептидные связи, хотя ни один из них не гидролизует все пептидные связи белковой молекулы, поэтому глубина гидролиза каждого индивидуального белка различна [3]. Проведение исследований по использованию протеолитических препаратов в технологии этанола позволит разработать теоретическую базу для повышения эффективности их использования в конкретном контексте разрабатываемой или существующей технологии.

Целью проводимых исследований является изучение путей интенсификации процесса спиртового брожения с помощью направленного применения кислой эндогенной протеазы.

Объектами исследования послужили рожь урожая 2008 года как наиболее перерабатываемая зерновая культура в спиртовом производстве республики, протеолитический препарат грибного происхождения «Альфалаза FP2», сухие дрожжи «Фермиол» и «Этанол Рэд».

«Альфалаза FP2» — кислый протеолитический ферментный препарат (кислая эндопептидаза), полученная в результате ферментации штамма *Aspergillus niger*. Отличительная особенность «Альфалазы FP2» — способность легко и эффективно гидролизовать большинство белков различных зерновых субстратов (табл. 1).

Таблица 1

Характеристика ферментного препарата

Препарат	Фирма-производитель	Продуцент	Активность ед. ПС/мл исходного препарата	Оптимум	
				температуры	pH
Альфалаза FP2	Danisko A/S (подразделение Genenkor International B. V., Дания)	<i>Aspergillus niger</i>	1200	60	3,0

При традиционной характеристике ферментных препаратов, установление оптимума температуры, рН и других кинетических параметров проводится с использованием стандартного субстрата. Но в промышленных условиях и в условиях конкретной технологии спиртового производства в качестве субстрата выступает сложная гетерогенная система, которая приводит к изменению основных кинетических параметров ферментативной реакции. В частности, в технологии этанола — это многокомпонентная система, представляющая собой смесь зернового помола и воды. Состав данного субстрата оказывает влияние на характер протекания процесса протеолиза и изменяет оптимальные значения температуры и рН. Поэтому исследование гидролитической способности «Альфаказы FP2» с использованием в качестве растительного сырья зерна ржи представляет большой интерес для спиртовой промышленности.

Протеолитическая активность определялась модифицированным методом Ансона. В качестве субстрата использовалось — измельченное зерно ржи, характеризующееся 100% проходом через сито $d = 1$ мм, смешанное с водой в соотношении помол: вода — 1:4.

Результаты исследования изменения активности ферментного препарата «Альфулаза FP2» в зависимости от рН зернового субстрата представлены на рис. 1.

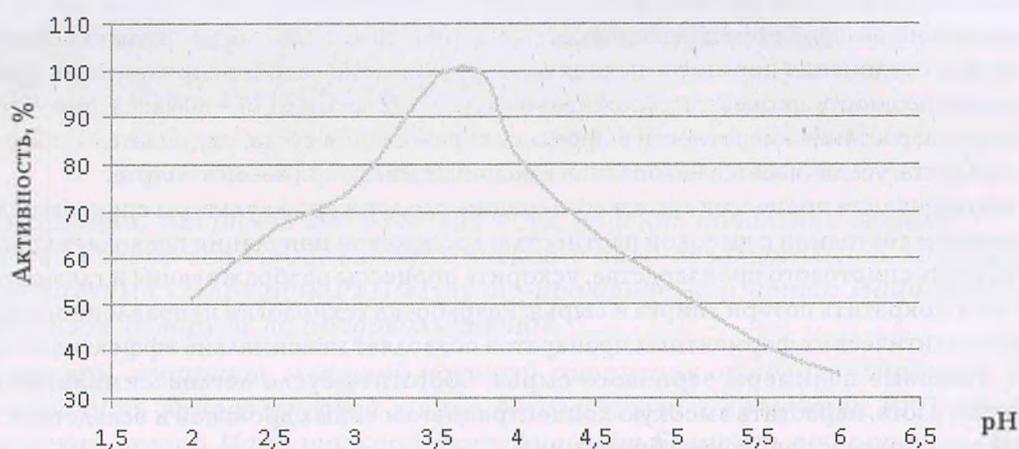


Рис. 1. Влияние кислотности среды на активность «Альфулазы FP2»

Так, при изучении влияния рН на активность исследуемых ферментных препаратов установлено, что оптимум рН при гидролизе белков зернового субстрата для препарата «Альфулаза FP2» сдвигается в область рН, равную 3,5 — 3,8. Причем при рН = 3,0, который по данным фирмы-изготовителя является оптимальным для действия «Альфулазы FP2» на стандартном субстрате, ферментный препарат, действующий на зерновой субстрат, сохранял около 75% своей активности. Необходимо также отметить, что в области рН, равной 4,0 — 4,3, протеаза проявляет 80 — 70% активности, и это является значительным результатом, который может быть использован в технологии направленного протеолитического гидролиза.

При исследовании влияния температуры на активность ферментного препарата было зафиксировано, что температурный оптимум для действия «Альфулазы FP2» на зерновом субстрате совпадает с данными заявленными производителем, и составляет 58 — 60°C. При этом контроль стабильности фермента с выдержкой при температуре 60°C в течение часа показал сохранение около 50 — 55% активности от первоначальной, в течение 2 часов — 35 — 40%. Выдержка фермента на зерновом субстрате при 52 — 53°C в течение часа показала сохранение активности на уровне 93 — 95%, в течение 2 часов — 87 — 90%.

Современные приемы и методы использования кислых протеаз в соответствии с рекомендациями фирмы-изготовителя и исследованиями, проведенными специалистами ГНУ ВНИИ пищевой биотехнологии РАСХН, предполагает внесение препаратов на стадию осахаривания и/или сбраживания сырья. Полученные результаты позволяют говорить о значительных перспективах данных способов использования протеаз, при этом отмечается сокращение

продолжительности сбраживания до 42–48 часов [4]. Однако использование протеолитических препаратов в дозировке 0,6–0,9 ед. ПС/г крахмала перерабатываемого производственного суслу и высокая дороговизна данных препаратов требует поиска путей их наиболее рационального использования.

Исследования по применению ферментных препаратов протеолитического действия на стадии приготовления замеса показали бесперспективность данного приема, так как приводит к прямым потерям сахара и свободных аминокислот, вследствие реакций меланоидинообразования, протекающих на последующей стадии гидроферментативной обработки сырья. Кроме этого следует отметить непродолжительное время экспозиции фермента в процессе приготовления и водно-тепловой обработки замеса в зоне оптимальных для действия протеазы температур [1, 5].

С целью интенсификации процесса производства спирта, увеличения плотности дрожжевой популяции высокой бродильной активности, увеличения аминокислотного пула дрожжевых клеток и удлинения времени экспозиции кислой протеазы интересным представляется вариант применения «Альфалазы FP2» на стадии доосахаривания. Данная стадия протеолиза является промежуточной с дальнейшим ее протеканием на самой стадии дрожжегенерации и последующей стадии сбраживания.

Известно, что рН-оптимум препаратов глюкоамилазы находится в интервале 4,5–5,0, при этом при рН = 4,2–4,3 препарат сохраняет значительную часть своей активности около 93–95%. [6]. На основании этих данных, а также результатов исследования по рН и температурной активности «Альфалаза FP2» на зерновом субстрате было предложено провести совмещенный протеолиз и доосахаривание при рН 4,2–4,3 и температуре суслу 52–53°С с целью его обогащения свободными аминокислотами, моно- и дисахаридами.

Для разжижения, декстринизации и осахаривания суслу по низкотемпературной схеме гидроферментативной обработки сырья использовались ферментные препараты бактериального и грибного происхождения «Амилекс 3Т» в дозировке 0,4 ед. АС/г условного крахмала, «Диазим Х4» – 7,4 ед. ГЛС/г условного крахмала, «Ламинекс ВГ2» – 0,2 дм³/г сухих веществ зерна. Полученное суслу охлаждали до 52–53°С, при необходимости корректировали активную кислотность внесением ортофосфорной кислоты, в образцы 2–6 вносили протеазу, образец 1 (без протеазы) использовали как контрольный.

Дозировку ферментного препарата «Альфалаза FP2» при постановке экспериментов осуществляли по общей протеолитической активности.

В полученных образцах контролировали изменение видимой концентрации сухих веществ суслу, изменение содержания редуцирующих веществ и аминного азота (метод формольного титрования) [7] (табл. 2).

Таблица 2

Результаты совмещенного протеолиза и доосахаривания суслу

Варианты образцов			Начальные параметры осахаренной массы				Продолжительность гидролиза (протеолиз и доосахаривание)								
№	дозировка Альфалазы FP2	Единицы измерения	рН	СВ, %	РВ, %	Аминный азот, г/100 см ³	1 ч			2 ч			3 ч		
							СВ, %	РВ, %	Аминный азот, г/100 см ³	СВ, %	РВ, %	Аминный азот, г/100 см ³	СВ, %	РВ, %	Аминный азот, г/100 см ³
1	-	ПС/г крахм	5,8	19,5	12,5	23	19,6	14,2	24	19,6	16,4	26	19,7	17,1	26
2	0,4	ПС/г крахм	5,8	19,5	12,6	23	19,8	14,6	45	19,8	16,8	55	19,8	17,4	62
3	0,1	ПС/г крахм	4,2	19,5	12,5	22	19,7	14,6	37	19,7	16,9	57	19,8	17,5	68
4	0,2	ПС/г крахм	4,2	19,5	12,5	22	19,8	14,7	55	19,8	17,0	95	19,9	17,6	112
5	0,3	ПС/г крахм	4,2	19,5	12,5	22	19,8	14,8	70	19,8	17,2	135	19,9	17,8	143
6	0,4	ПС/г крахм	4,2	19,5	12,6	23	19,8	14,8	80	19,9	17,3	148	19,9	17,8	152

На основании полученных данных можно сделать вывод о том, что во всех образцах с применением протеазы зафиксировано значительное увеличение содержания аминного азота, при этом в образцах 5 и 6 (дозировка протеазы — 0,3 и 0,4 ед. ПС/г крахмала соответственно) оно было максимальным. Применение совмещенного протеолиза и доосахаривания способствовало наиболее интенсивному накоплению редуцирующих веществ, а также незначительному увеличению видимой концентрации сухих веществ, причиной этого может быть определенный синергизм действия препаратов протеазы и глюкоамилазы. Для образцов 5 и 6 отмечается практически равное количество редуцирующих веществ на 2 и 3 часа совмещенного гидролиза, что может служить основанием для выбора продолжительности процесса гидролиза в пределах 2 часов во избежание возможного развития посторонних микроорганизмов спиртового брожения.

Для оценки эффективности накопления биомассы дрожжей был проведен засев суслу образцов 1, 5, 6 сухими дрожжами «Фермиол» и «Этанол Рэд». Сухие дрожжи после восстановления тургора задавали из расчета их начального содержания в сусле 10 млн кл./мл. и культивировали при температуре 28 — 30°C. Предварительно в сусло дополнительно вносили карбомид из расчета 0,6 г на литр (результаты роста числа клеток приведены на рис. 2).

Как видно, в образцах с применением «Алфалазы FP2» для обеих рас дрожжей зафиксировано значительное накопление уровня биомассы. Так, на 12 часов культивирования для дрожжей «Этанол Рэд» подсчет числа клеток показал превышение в сравнении с контрольным образцом 13 в 1,6 — 1,9 раза, для дрожжей «Фермиол» — 1,6 — 1,8. Количество мертвых клеток для «Этанол Рэд» с протеазой находилось на уровне 0,7 — 0,9%, в контроле — 1,5%, для дрожжей «Фермиол» с протеазой — 0,5 — 0,6%, в контрольном образце 1 — 1,0%. Клетки с протеазой находились в лучшем физиологическом состоянии, имели четкую округлую форму и хорошую упитанность по гликогену. Отброды на 12 — 14 часов для образцов с протеазой находились на уровне 1/2 от первоначальной концентрации сухих веществ суслу.

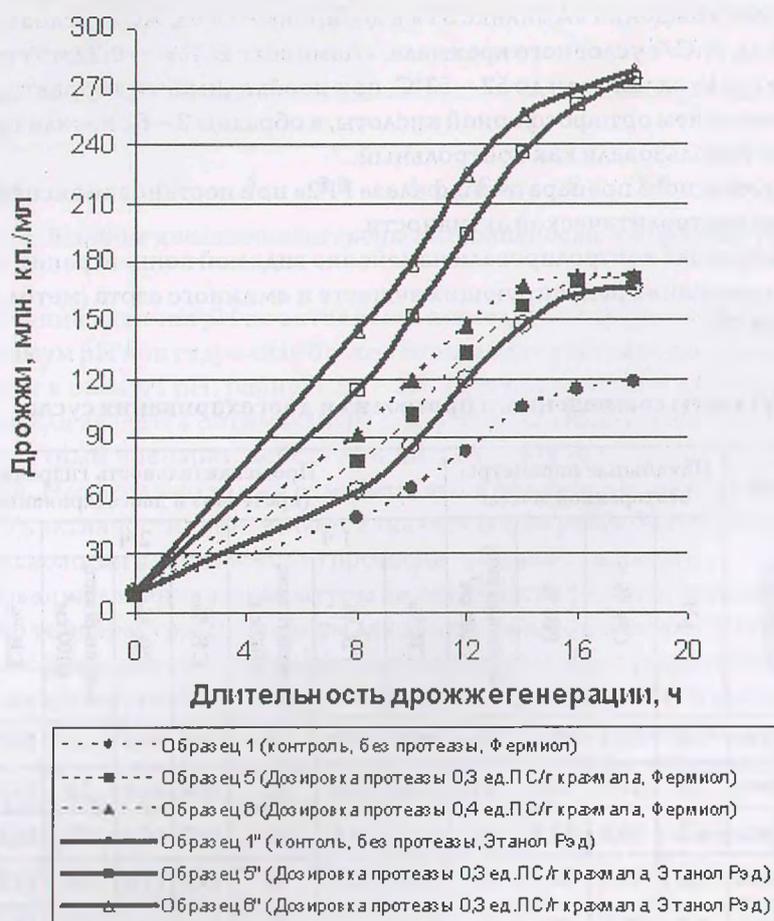


Рис. 2. Динамика накопления биодрожжевой массы

Для обеих рас дрожжей к 12–14 часам дрожжегенерации происходило выравнивание числа клеток при расходах протеазы в дозировке 0,3 и 0,4 ед. ПС/г крахмала. Данный факт говорит о достаточности насыщении сусла аминным азотом уже при дозировке «Алфалазы FP2» 0,3 ед. ПС/г крахмала.

Оценка бродильной активности дрожжей по зимазной и мальтазной активности в сравнение с контрольными вариантами без протеазы (образец 1 и 13) показала увеличение зимазной активности в образцах 5 и 53 в 1,5–1,7 раза, мальтазной – 1,2–1,4 раза соответственно.

Контроль протеолитической активности в образцах 5 и 53 ферментного препарата «Алфалазы FP2» показал сохранение около 70–78% активности от введенной в сусло.

Предложенный способ применения «Алфалаза FP2» на стадии совмещенного доосахаривания и протеолиза в дозировке 0,3–0,4 ед. ПС/г крахмала дрожжевого сусла при норме засева производственных дрожжей 8–10% позволяет установить общий расход протеазы на перерабатываемый объем крахмала производственного сусла на уровне 0,03–0,04 ед. ПС/г крахмала.

Таким образом, полученные экспериментальные данные позволяют сделать вывод о значительной эффективности предложенного способа применения источника кислой эндогенной протеаз.

Совмещенный протеолиз и доосахаривание сусла интенсифицируют процесс доосахаривания, обогащают сусло легкоусвояемым азотным питанием, интенсифицируют процесс дрожжегенерации до 12–14 часов, позволяют получить высокую плотность дрожжевой популяции. Дрожжевые клетки, выращенные на сусле с ферментным препаратом «Алфалазы FP2», отличаются повышенной бродильной активностью и улучшенным физиологическим состоянием. Сохранение ферментным препаратом «Алфалазы FP2» 70–78% от первоначальной протеолитической активности к концу процесса дрожжегенерации, позволяет говорить о перспективном пролонгированном протеолизе на последующей стадии сбраживания.

Полученные результаты станут основой интенсификации процесса спиртового брожения, увеличения съема спирта при использовании более качественных засевных дрожжей, снижения себестоимость спирта за счет экономии зерна при наращивании дрожжевой биомассы.

Литература

1. Тананайко, Т. М. Влияние технологических параметров на активность микробных протеаз в процессе получения ржаного сусла / Т. М. Тананайко [и др.] // Инновационные технологии в пищевой промышленности: сб. докл. VII Международ. науч.-практ. конф., Минск, 2–3 окт. 2008 г. Часть 1 / Науч.-практ. центр НАН Беларуси по продов.; редкол.: З. В. Ловкис [и др.]. – Минск, 2008. – С. 76–83.
2. Тананайко, Т. М. Изучение эффективности использования ферментных препаратов Сан Супер 360 Л, Вискоферм в спиртовой промышленности / Т. М. Тананайко [и др.] // Совершенствование технологий и оборудования пищевых производств: сб. докл. VI Международ. научн.-техн. конф., Минск, 2–3 окт. 2007 г. Часть 1 / Науч.-практ. центр НАН Беларуси по продов.; редкол.: З. В. Ловкис [и др.]. – Несвиж, 2007. – С. 277–281.
3. Риг, Дж. Ферменты в пищевой промышленности / Дж. Риг. – М.: Пищевая промышленность, 1971. – 416 с.
4. Римарева, Л. В. Роль протеаз в спиртовом брожении / Л. В. Римарева, М. Б. Оверченко // Микробные биокатализаторы для перерабатывающих отраслей АПК, сб. науч. трудов., Москва, 2006 г / ВНИИПБТ, редкол.: В. А. Поляков, Л. В. Римарева. – Москва, 2006. – С. 127–137.
5. Дячкина, А. Б. Роль эндогенных и микробных протеаз в процессе получения и сбраживания ржаного сусла: дис. ... канд. техн. наук: 03.00.04 / А. Б. Дячкина. – М., 2005. – 150 с.
6. Маринченко, В. А. Технология спирта / В. А. Маринченко, В. А. Смирнов, Б. А. Устинников. – М.: Легкая и пищевая промышленность, 1981. – 416 с.
7. Рухляева, А. П. Технохимический контроль спиртового производства / А. П. Рухляева. – М.: Пищевая промышленность, 1974. – 355 с.