

Поддержание культуры спиртовых дрожжей в активном состоянии с высокой плотностью дрожжевой популяции позволяет повысить эффективность спиртового производства, ускорить процессы разбраживания и главного брожения сусла, сократить потери спирта и сырья. Цель проводимых исследований – оптимизация процесса дрожжегенерации с целью интенсификации спиртового брожения концентрированного производственного сусла. Полученная математическая зависимость оптимизации процесса дрожжегенерации на концентрированном дрожжевом сусле позволила установить оптимальный расход кислой протеазы на уровне 0,20 – 0,25 ед. ПС/г условного крахмала, глюкоамилазы 3,0-3,5 – ед. ГЛС/г усл. крахмала. Оптимизация процесса дрожжегенерации с использованием направленного протеолиза обеспечивает глубокое выбраживание концентрированного сусла и сокращение процесса брожения с 72 до 60 часов.

ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОЦЕССА ДРОЖЖЕГЕНЕРАЦИИ С ЦЕЛЬЮ ИНТЕНСИФИКАЦИИ ПРОИЗВОДСТВА ЭТИЛОВОГО СПИРТА

Г. М. Тананайко, кандидат технических наук, доцент, начальник отдела ликероводочной, винодельческой и пивобезалкогольной промышленности РУП «Научно-практический центр Национальной академии Беларуси по продовольствию»

А. А. Пушкарь, младший научный сотрудник отдела ликероводочной, винодельческой и пивобезалкогольной промышленности РУП «Научно-практический центр Национальной академии Беларуси по продовольствию»

Перспективным направлением развития спиртовой отрасли Республики Беларусь является активное внедрение низкотемпературных механико-ферментативных схем обработки крахмалосодержащего сырья. Большое значение в контексте низкотемпературных схем производства приобретает повышение концентраций перерабатываемых технологических сред, позволяющее без существенных капитальных затрат увеличить производительность предприятий и снизить себестоимость конечного продукта – этилового спирта.

Эффективность биохимического процесса спиртового брожения, при переработке сусла повышенных концентраций, определяется как качеством ферментативного гидролиза сусла, так и физиологическим состоянием дрожжевых клеток. Высокая метаболическая активность дрожжей во многом определяется составом сбраживаемой среды, которая должна содержать достаточное количество сбраживаемых углеводов, ассимилируемых азотистых и минеральных веществ.

Потребность дрожжей в азотистом питании связана с синтезом белка в процессе их размножения и с синтезом ферментных систем, поддерживающих необходимый уровень энергетического метаболизма при утилизации сахаров. В частности, отмечено, что рост дрожжей в сусле повышенных концентраций лимитирует недостаток азотистого питания. С увеличением концентрации сусла возрастает степень влияния азотистого питания на размножение дрожжевых клеток и на процесс брожения. Использование зернового сусла, обогащенного аминокислотным азотом в результате протеолиза растительных белков сырья, способствует повышению бродильной активности дрожжей, их осмофильности и толерантности к спирту [1].

Для интенсификации спиртового производства актуальной является задача оптимизации получения посевного материала с высокой концентрацией дрожжевых клеток. Поддержание культуры спиртовых дрожжей в активном состоянии с высокой плотностью дрожжевой популяции позволит повысить эффективность спиртового производства, ускорить

процессы разбраживания и главного брожения сусла, сократить потери спирта и сырья. В связи с этим представляется перспективной и актуальной разработка технологии направленного применения протеолитических ферментных препаратов, позволяющей максимально эффективно задействовать белковые полимеры зернового сырья, обогатить сусло легкоассимилируемыми источниками азота, нарастить высокую концентрацию засевных дрожжей, и, как следствие, ускорить процесс спиртового брожения.

Цель работы — оптимизация процесса дрожжегенерации с целью интенсификации спиртового брожения концентрированного производственного сусла.

Для оптимизации процесса дрожжегенерации и достижения максимального эффекта накопления биомассы дрожжей было выполнено планирование эксперимента, которое позволяет варьировать все факторы и получать количественные оценки эффектов из взаимодействия. Для этого использовали метод центрального композиционного ротатбельного планирования полного факторного эксперимента ПФЭ-2³ со звездным плечом. Планирование и обработку результатов осуществляли с помощью компьютерной системы планирования эксперимента STATGRAPHICS Plus for Windows.

В качестве основных факторов, влияющих на оптимизацию процесса дрожжегенерации, были выбраны: X_1 — дозировка протеазы «Альфалаза FP2», используемой на доосахаривании, ед. ПС /г условного крахмала; X_2 — дозировка глюкоамилазы «Диазим Х4», используемой на доосахаривании, ед. ГлС /г условного крахмала; X_3 — видимая концентрация сухих веществ дрожжевого сусла, %.

Пределы варьирования факторов были определены на основании анализа литературных данных и ранее проведенных исследований по интенсификации спиртового брожения [2, 3, 4]. Условия проведения центрального композиционного ротатбельного планирования приведены в табл. 1.

Таблица 1

Характеристика планирования

Обозначение фактора	Уровень		«Звездные» точки		Центр эксперимента	Шаг варьирования
	нижний	верхний	нижняя	верхняя		
X_1 , ед. ПС /г	0,10	0,40	0	0,50	0,25	0,15
X_2 , ед. ГлС /г	1,0	4,0	0	5,0	2,5	1,5
X_3 , % СВ	17,0	22,0	15,3	23,7	19,5	2,5

Критерием оценки влияния выбранных факторов на качество процесса дрожжегенерации служил показатель концентрации дрожжевых клеток по окончании культивирования (Y , млн кл. /мл). Эксперименты проводили в соответствии с матрицей планирования приведенной в табл. 2. Каждый опыт дублировали два раза. Среднее значение функции отклика Y по результатам двух параллельных опытов использовали при математической обработке компьютерной системой планирования эксперимента STATGRAPHICS Plus for Windows.

В качестве крахмалосодержащего сырья в экспериментах использовали рожь (крахмалистостью 55,4 %), как наиболее перерабатываемую зерновую культуру в спиртовом производстве Республики Беларусь.

Подготовку осахаренного сусла осуществляли согласно общей процессуальной схеме эксперимента, приведенной на рис. 1.

Для разжижения, декстринизации и осахаривания сусла по низкотемпературной схеме гидроферментативной обработки сырья использовались ферментные препараты бактериального и грибного происхождения «Термамил СЦ» в дозировке 0,4 ед. АС/г условного крахмала, «Диазим Х4» — 7,4 ед. ГлС/г условного крахмала, «Вискоферм» — 0,2 дм³/г сухих веществ зерна.

Для протеолиза дрожжевого сусла использовали препарат грибного происхождения «Альфалаза FP2». «Альфалаза FP2» — кислый протеолитический ферментный препарат (кислая эндопептидаза), полученная в результате ферментации штамма *Aspergillus niger*. Отличительной особенностью «Альфалаза FP2» является свойство легко и эффективно гидролизовать большинство белков различных зерновых субстратов.

Матрица планирования

№ опыта	Фактор			Функция отклика, Y, млн. кл./мл
	X ₁ , ед. ПС /г	X ₂ , ед. ГЛС /г	X ₃ , % СВ	
1	0,10	1,0	17,0	135,0
2	0,40	1,0	17,0	170,0
3	0,10	4,0	17,0	139,0
4	0,40	4,0	17,0	176,0
5	0,10	1,0	22,0	126,0
6	0,40	1,0	22,0	159,0
7	0,10	4,0	22,0	129,0
8	0,40	4,0	22,0	165,0
9	0	2,5	19,5	103,0
10	0,50	2,5	19,5	169,0
11	0,25	0	19,5	147,0
12	0,25	5,0	19,5	168,0
13	0,25	2,5	15,3	173,0
14	0,25	2,5	23,7	153,0
15	0,25	2,5	19,5	167,0
16	0,25	2,5	19,5	166,0

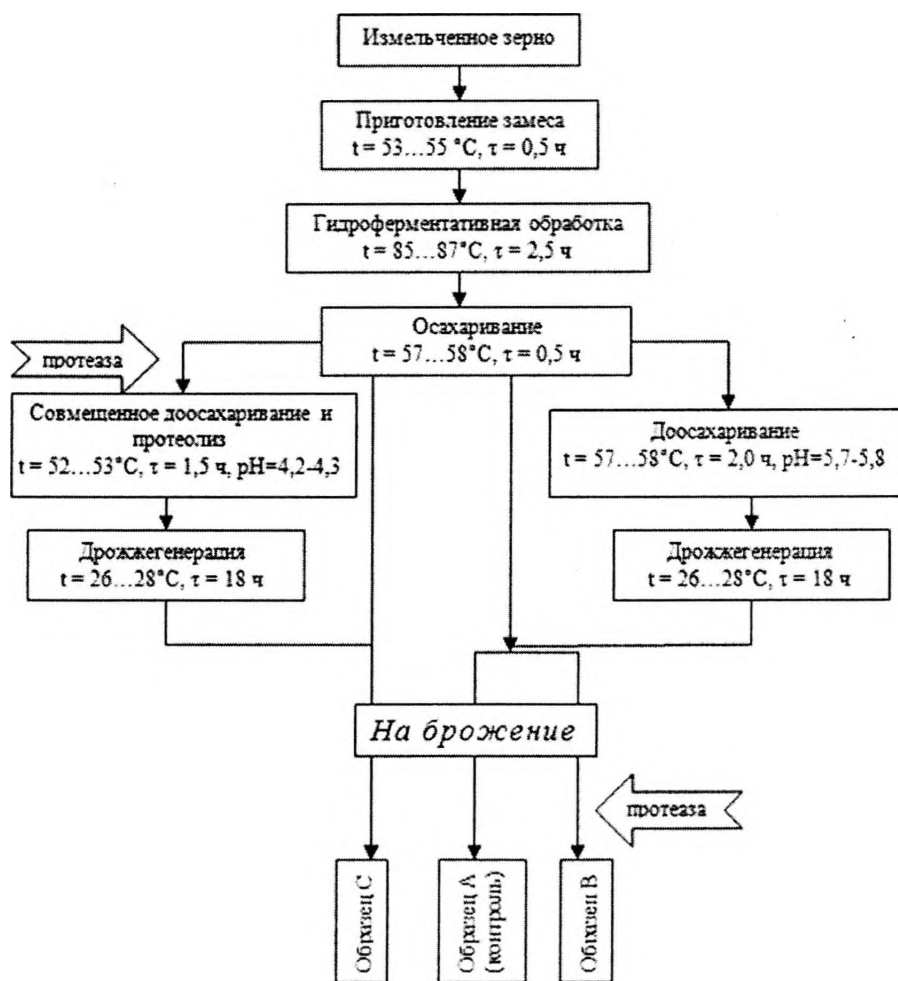


Рис. 1. Общая процессуальная схема эксперимента

На основании ранее полученных результатов исследования по рН и температурной активности «Альфааза FP2» на зерновом субстрате совмещенный протеолиз и доосахаривание дрожжевого сусла осуществляли при рН 4,2–4,3 и температуре сусла 52–53 °С в течение 1,5 часов, с целью его обогащения свободными аминокислотами, моно- и дисахаридами [5]. Корректирование активной кислотности осуществляли ортофосфорной и серной кислотой. На доосахаривании в качестве источника глюкоамилазы использовали «Диазим Х4». Дополнительно в сусло вносили карбомид из расчета 0,6 г/дм³.

Протеонизированное дрожжевое сусло охлаждали и засеивали дрожжами расы 985 Т из расчета их начального содержания в сусле 10 млн кл./мл. Культивировали при температуре 26–28 °С в течение 18 часов. В полученной культуре анализировали количество дрожжевых клеток методом подсчета в камере Горяева.

В результате статистической обработки экспериментальных данных получено уравнение регрессии, адекватно описывающее зависимость исследуемой функции отклика от выбранных факторов. Влияние каждого из варьируемых факторов графически отражали в виде стандартизированной карты Парето и графика главных эффектов отклика. Графически модель влияния факторов на параметр оптимизации представлена в виде поверхности отклика.

Стандартизированная карта Парето, изображенная на рис. 2, позволила установить значимые факторы и упростить первоначальный вид уравнения модели. Пересечение стандартизированных эффектов вертикальной линией, которая представляет собой 95 % доверительную вероятность, означает, что влияние факторов на функцию отклика статически значимо.

Влияние факторов по степени значимости распределилось в следующем порядке: наибольшее эффект на уровень накопления дрожжевой биомассы оказывает дозировка кислот протеазы, с ее повышением концентрация дрожжевых клеток увеличивается; второе по значимости влияние оказывает видимая концентрация сухих веществ дрожжевого сусла, причем знак «минус» на карте Парето указывает на снижении концентрации дрожжей при увеличении фактора; с увеличением дозировки глюкоамилазы накопление биомассы увеличивается. Анализ графика главных эффектов для показателя концентрации дрожжевых клеток также подтверждает выше упомянутый порядок значимости факторов – рис. 3.

После упрощения первоначального вида уравнения модели с учетом исключения незначимых коэффициентов получено уравнение регрессии:

$$Y = 31,04 + 382,56 X_1 + 10,41 X_2 + 7,94 X_3 + 2,78 X_1 X_2 - X_1 X_3 - 493,99 X_1^2 - 1,56 X_2^2 - 0,25 X_3^2 \quad (1)$$

Работоспособность модели подтверждается высоким коэффициентом детерминации $R\text{-squared} = 98,91\%$.

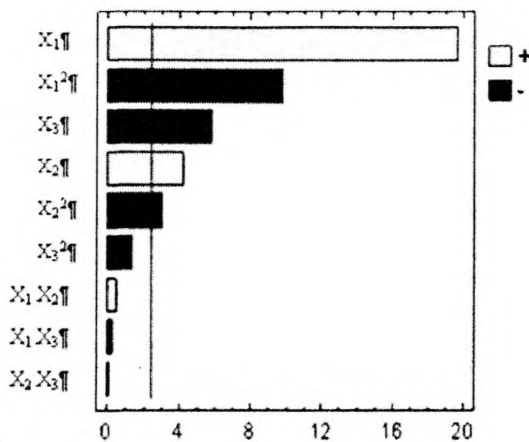


Рис. 2. Карта Парето для показателя концентрации дрожжевых клеток

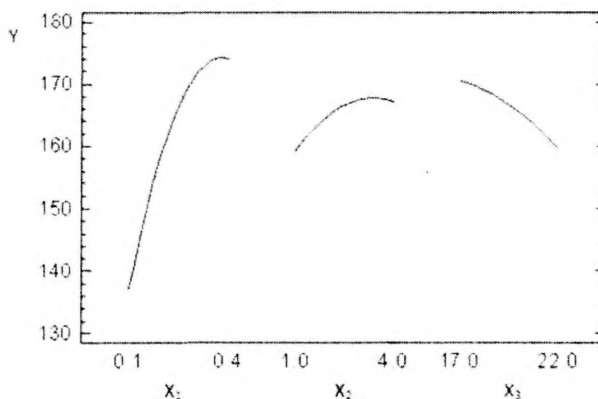


Рис. 3. Главные эффекты отклика для показателя концентрации дрожжевых клеток

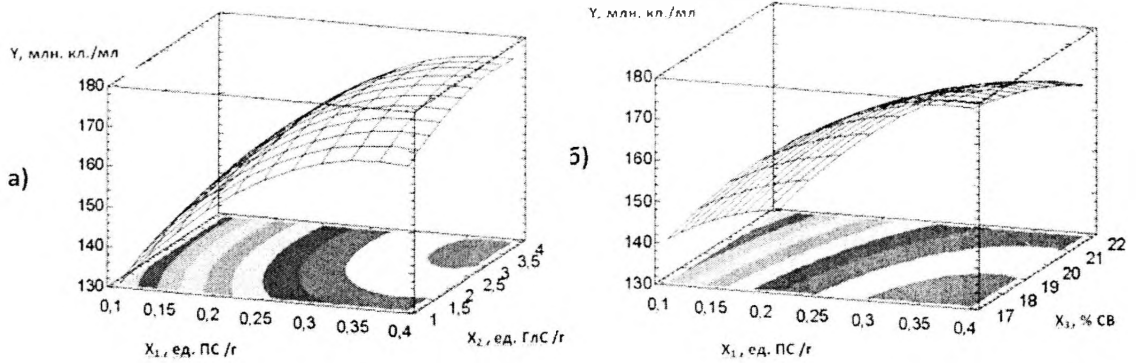


Рис. 4. График поверхностей отклика для показателя концентрации дрожжей: а – при $X_3 = 19,5\%$ СВ, б – при $X_2 = 2,5$ ед. ГЛС /г усл. крахм.

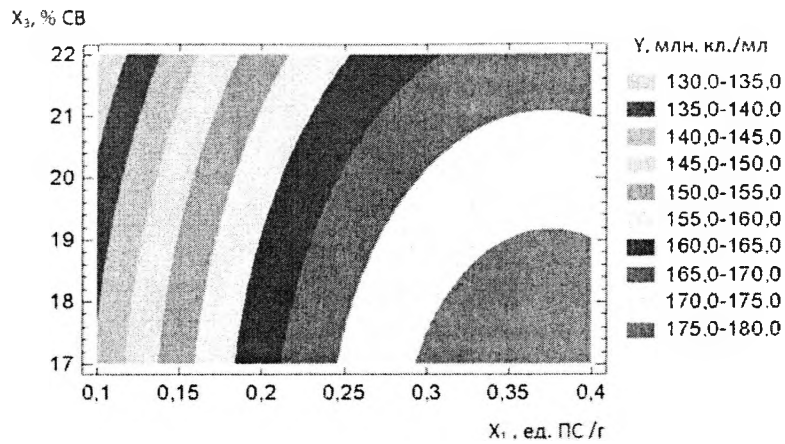


Рис. 5. Контурный график поверхностей отклика для показателя концентрации дрожжей при $X_2 = 2,5$ ед. ГЛС /г условного крахмала

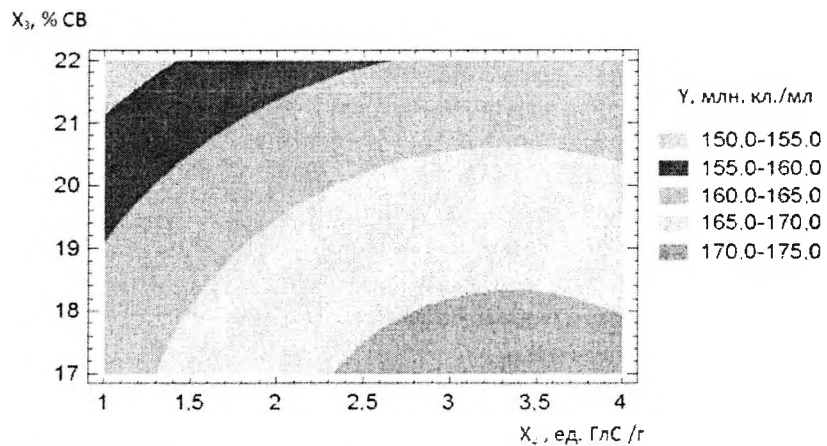


Рис. 6. Контурный график поверхностей отклика для показателя концентрации дрожжей при $X_1 = 0,25$ ед. ПС /г условного крахмала

Графическое влияние факторов на уровень накопления дрожжевой биомассы представлено в виде поверхностей отклика на рис. 4 (а, б).

Опыт работы спиртовых предприятий показывает, что при сбраживании производственного сусла повышенных концентраций рабочие интервалы концентрации дрожжевого сусла находятся в пределах 18,0–20,0 %. На основании этих данных, с целью более детального

рассмотрения графических зависимостей функции отклика от варьируемых факторов и установления оптимальных расходов протеазы и глюкоамилазы были изучены контурные графики поверхности отклика в разрезе концентраций дрожжевого сусла (рис. 5 и 6).

Анализ графических зависимостей (рис. 4а и рис. 5) показал, что при дозировке протеазы 0,20 – 0,25 ед. ПС /г условного крахмала поверхность отклика перегибается и выходит на ровное плато. Дальнейшее увеличение дозировки протеазы не приводит к значительному росту концентрации дрожжевых клеток. Учитывая высокую дороговизну препарата кислой протеазы дальнейшее увеличение его расхода экономически не целесообразно.

Оптимальный расход глюкоамилазы при дозировке протеазы 0,25 ед. ПС /г условного крахмала, согласно рисунку 6, находится на уровне 3,0 – 3,5 ед. ГлС /г условного крахмала. В данном интервале варьирования фактора глюкоамилазы функция отклика приобретает максимальные значения накопления дрожжевых клеток 160 – 175 млн кл. /мл.

С целью оценки интенсификации процесса спиртового брожения были приготовлены засевные дрожжи по традиционной технологии дрожжегенерации (дозировка глюкоамилазы 5,0 ед. ГлС /г условного крахмала) и по оптимизированной (дозировка глюкоамилазы 3,0 ед. ГлС /г условного крахмала, дозировка кислой протеазы 0,25 ед. ПС /г условного крахмала) согласно схеме, приведенной на рис. 1. Начальная концентрация сухих веществ дрожжевого сусла 19,5%. Результаты культивирования готовых засевных дрожжей представлены в табл. 3.

Таблица 3

Характеристика засевных дрожжей

Наименования показателя	Дрожжегенерация	
	традиционная	оптимизированная
Концентрация дрожжевых клеток, млн. кл./мл	110,0	167,0
Почкующихся клеток, %	18,0	20,0
Мертвых клеток, %	1,0	0,4
Внешний вид	клетки крупные, четкой округлой формы, цитоплазма зернистая	клетки крупные, четкой округлой формы, цитоплазма зернистая

Полученные данные свидетельствуют о высоком качестве посевного материала, полученного в оптимизированных условиях. При этом следует особо отметить низкое содержание мертвых клеток.

Для оценки влияния предложенного оптимизированного способа применения протеолитического ферментного препарата на процесс спиртового брожения, полученные засевные дрожжи использовали при сбраживании образцов концентрированного ржаного сусла. Подготовку проб осуществляли согласно общей процессуальной схеме, приведенной на рисунке 2. При этом:

1) в образцах А и В использовали дрожжи, приготовленные согласно регламентируемого способа. Засевные дрожжи вносили в осахаренное сусло в количестве 10% от объема сбраживаемого сусла, при этом в образец В задавали «Альфалазу FP2» из расчета 0,04 ед. ПС/г крахмала. Образец А (без протеазы) использовали как контрольный.

2) в образце С применяли засевные дрожжи, приготовленные в оптимизированных условиях, в количестве 10% от объема сбраживаемого осахаренного сусла.

Сбраживание образцов А, В, С осуществляли при температуре 33 – 35 °С.

В процессе исследования особый интерес представляла интенсивность развития посевного материала в период возбуждения и главного брожения (10,18 часов) и технологические показатели, характеризующие окончание процесса дображивания на 60 – 72 часа.

Экспериментально полученные данные (табл. 4) подтверждают, что применение протеазы на стадии дрожжегенерации в оптимизированных условиях (образец С) значительно интенсифицирует процесс брожения в сравнении с использованием протеазы непосредственно на стадии сбраживания (образец В) или контролем – без протеазы (образец А).

В опытном образце С, где протеазу использовали на стадии дрожжегенерации, отмечено ускорение размножения дрожжей: к 10 часам сбраживания количество дрожжевых клеток было в 1,6 раза больше в сравнении с образцом А (без протеазы) и в 1,3 раза – в сравнении

Влияние направленного применения кислой протеазы на процесс брожения

Образец	Концентрация СВ сусла, %	Показатели спиртового брожения										Выход спирта % к кон-тролю
		Количество дрожжевых клеток				Содержание углеводов, %						
		10 ч		18 ч		60 ч		66 ч		72 ч		
		млн./мл	% почк.	млн./мл	% почк.	ОРВ	РВ	ОРВ	РВ	ОРВ	РВ	
Ак	19,6	42	22	76	9	1,20	0,98	0,77	0,64	0,49	0,38	100,0
В	19,6	54	27	106	15	0,77	0,64	0,40	0,28	0,26	0,18	100,5
С	19,6	68	25	117	12	0,28	0,19	0,25	0,16	0,24	0,15	101,4

с образцом В (протеаза внесена на брожение), к 18 часам — в 1,5 и 1,1 раза соответственно. Интенсивное развитие и размножение дрожжевых клеток подтверждает их хорошее физиологическое состояние и высокую бродительную активность.

Отмечено также более высокое содержание почкующихся клеток. Все это отразилось на интенсивности всего процесса сбраживания, при этом предлагаемый оптимизированный способ применения кислой протеазы обеспечивал глубокое выбраживание сусла уже к 60 часам и соответствовал показателям достигнутым, при применении протеазы на стадии брожения, к 72 часам. Дальнейшее продления процесса способствовало глубокому сбраживанию углеводов среды с одновременным увеличением выхода конечного продукта.

Совмещенный протеолиз и доосахаривание сусла позволяют интенсифицировать процесс доосахаривания, обогатить сусло легкоусвояемым азотным питанием, получить высокую плотность дрожжевой популяции. Дрожжевые клетки, выращенные на протеинизированном сусле, в оптимизированных условиях процесса дрожжегенерации, отличаются повышенной бродительной активностью и улучшенным физиологическим состоянием.

Полученная математическая зависимость оптимизации процесса дрожжегенерации для концентраций дрожжевого сусла 18,0 — 20,0 % позволила установить оптимальный расход кислой протеазы на уровне 0,20 — 0,25 ед. ПС/г условного крахмала, глюкоамилазы 3,0 — 3,5 — ед. ГЛС /г усл. крахмала.

Оптимизация процесса дрожжегенерации с использованием направленного протеолиза позволила обеспечить глубокое выбраживание концентрированного сусла и сокращение процесса брожения с 72 до 60 часов.

Литература

- Кадиева, А. Т. Влияние экстремальных температур и осмоса на свойства новых рас *Sacharomyces cerevisiae* 985-Т и 985-О / Кадиева А. Т. Оверченко М. Б., Игнатова Н. И., Римарева Л. В. // Производство спирта и ликеро-водочных изделий — 2003. — № 4. — С. 38—40.
- 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 / ВНИИПБТ, редкол.: В. А. Поляков, Л. В. Римарева. — Москва, 2006. — С. 127—137.
- 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.
- Тананайко, Т. М. Результаты экспериментальных исследований по интенсификации производства спирта путем направленного использования эндогенных кислых протеаз / Т. М. Тананайко, Пушкарь А. А. // Пищевая промышленность: наука и технология — 2009. — № 3(5). — С. 66 —71.
- Тананайко, Т. М. Направленный протеолиз дрожжевого сусла как основа интенсивного способа производства спирта / Т. М. Тананайко, А. А. Пушкарь // Инновационные технологии в пищевой промышленности: Материалы VIII Международ. науч. — практ. конф., Минск, 8-9 октября 2009 г. / науч. — практ. центр НАН Беларуси по продов., редкол.: З. В. Ловкис [и др.]. Минск, 2009. — С 150—159.