

ПЕРАПРАЦОЎКА І ЗАХАВАННЕ СЕЛЬСКАГАСПАДАРЧАЙ ПРАДУКЦЫІ

УДК 663.531

*Д. В. ХЛИМАНКОВ, Т. М. ТАНАНАЙКО, А. А. ПУШКАРЬ***ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОЦЕССА ДРОЖЖЕГЕНЕРАЦИИ
ПРИ ДИФФЕРЕНЦИРОВАННОМ РАЗДЕЛЕНИИ И ПЕРЕРАБОТКЕ
БИОПОЛИМЕРОВ РЖИ В СПИРТОВОМ ПРОИЗВОДСТВЕ***Научно-практический центр НАН Беларуси по продовольствию, Минск, Беларусь,
e-mail: info@belproduct.com*

В статье приведены результаты исследований по оптимизации процесса дрожжегенерации при дифференцированном разделении и переработке биополимеров ржи путем применения ферментных препаратов протеолитического и целлюлолитического спектра действия. Установлено влияние вносимых ферментных препаратов на концентрацию дрожжевых клеток, исследована динамика выделения диоксида углерода в процессе дрожжегенерации при использовании спиртовых сухих дрожжей Оеноферм С2.

Ключевые слова: ферменты, дрожжи, оптимизация, рожь, факторы, сусло, дрожжегенерация, углеводы.

*D. V. KHLIMANKOV, T. M. TANANAICA, A. A. PUSHKAR***OPTIMIZATION OF THE PROCESS OF YEAST GENERATION AT DIFFERENTIATED DIVISION
AND PROCESSING OF RYE BIOPOLYMERS IN ALCOHOL PRODUCTION***The Research and Practical Center of the National Academy of Sciences of Belarus for Foodstuffs,
Minsk, Belarus, e-mail: info@belproduct.com*

The article presets the results of the research on optimization of the process of yeast generation at differentiated division and processing of rye biopolymers by applying proteolytic and cellulolytic enzyme preparations. The influence of the applied enzyme preparations on yeast cells concentration has been established; the dynamics of getting carbon dioxide in the process of yeast generation with the use of alcohol dry yeast Oenoferm C2. has been conducted.

Keywords: optimization, factors, enzymes, carbohydrates, yeast, rye, malt, yeast generation.

Введение. Эффективность процесса спиртового брожения при переработке сусла повышенных концентраций определяется как качеством ферментативного гидролиза зернового сырья при подготовке сусла, так и физиологическим состоянием производственных дрожжей. Приготовление активного посевного материала с высокой концентрацией дрожжевой биомассы имеет решающее значение для интенсификации и совершенствования процесса брожения высококонцентрированного сусла, особенно в первые часы жесткого конкурентирования сахаромикетов с посторонней микрофлорой, когда скорость процесса лимитируется количеством дрожжей и их физиологическим состоянием.

Метаболическая активность дрожжей во многом определяется составом культивируемой среды, которая должна содержать достаточное количество сбраживаемых углеводов, ассимилируемых азотистых и минеральных веществ.

Применение амилолитических ферментов способствует интенсивному гидролизу крахмала, но не обеспечивает дрожжи в полной мере азотистым питанием, которое необходимо для их развития. В то же время отсутствие целлюлолитического комплекса при переработке высококонцентрированного сусла не позволяет снизить вязкость технологической среды, что негативно отражается на жизнедеятельности дрожжевых клеток.

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, поэтому наличие легко ассимилируемого аминного азота в производственном сусле имеет решающее значение для интенсификации процесса дрожжегенерации. Использование комплекса протеаз грибного происхождения для гидролиза белков сусла способствует накоплению в среде свободных аминокислот, что приводит к росту скорости размножения производственных дрожжей, при этом повышается плотность дрожжевой популяции, увеличивается бродильная активность, а также продуктивность клеток [1]. Использование целлюлолитических ферментов способствует снижению вязкости дрожжевого сусла, повышается доступность крахмала к действию амилолитических ферментов [2]. Использование ферментных препаратов селективного действия способствует увеличению биоконверсии всех составляющих зерновых культур [3]. Учитывая одно из ключевых направлений ресурсосбережения разрабатываемой технологии производства этилового спирта с дифференцированным разделением биополимеров зерна – повышение концентраций перерабатываемого сусла спиртового производства и, как следствие, рост концентрации спирта в зрелой бражке – проведение экспериментальных работ по оптимизации процесса дрожжегенерации является, несомненно, важным и актуальным. Совершенствование качества подготовки производственных дрожжей будет способствовать улучшению глубины протекания процесса спиртового брожения, тем самым повысив его эффективность.

Материалы и методы исследования. С целью оптимизации процесса дрожжегенерации при дифференцированном разделении и переработке биополимеров зернового сырья и достижения максимального эффекта накопления биомассы дрожжей в лаборатории алкогольной и безалкогольной продукции РУП «Научно-практический центр НАН Беларуси» в 2015 г. было выполнено планирование эксперимента, которое позволяет варьировать различные факторы и получать количественные оценки эффектов их взаимодействия. Для этого использовали метод центрального композиционного рототабельного планирования полного факторного эксперимента ПФЭ-2³ со звездными точками.

При проведении исследований и оптимизации процесса дрожжегенерации при дифференцированной переработке биополимеров зернового сырья на данном этапе экспериментальных работ использовали зерно ржи с глубиной шелушения 5,06 %.

В ходе проведения экспериментальных исследований процесс подготовки декстринизированного сусла осуществляли по следующим технологическим режимам: приготовление замеса при гидромодуле 1:2,8 и рН 6,0–6,2; механико-ферментативную обработку замеса проводили при температуре 67–69 °С в течение 40 мин, далее при температуре 85–86 °С в течение 2,5 ч. Степень помола зерна (проход через сито, диаметр отверстий – 1 мм) составляла 94–95 %.

Механико-ферментативную обработку сырья проводили в лабораторном ферментере ЛР-1, при этом для гидролиза некрахмалистых полисахаридов использовали ферментный препарат Талзим ХЛ 75 (дозировка – 0,20 дм³/т сухих веществ зерна), крахмала – ферментный препарат термостабильной α -амилазы Ликвафло (дозировка – 0,27 ед. АС/г усл. крахмала). При подготовке дрожжевого сусла его осахаривание и доосахаривание осуществляли в течение 1,5 ч при рН 5,7 и температуре сусла 57–59 °С при дозировке глюкоамилазы 13,0 ед. ГлС/г усл. крахмала (ферментный препарат Saczyme Plus 2X) и протеолитического фермента ПротоМакс, дозировка 0,1–0,3 ед. ПС/г усл. крахмала [4]. Корректирование активной кислотности осуществляли серной кислотой. Дополнительно в сусло в качестве основного источника фосфорного и азотного питания вносили диаммоний-фосфат из расчета 0,6 г/дм³. Полученное дрожжевое сусло охлаждали и засевали дрожжами *Saccharomyces cerevisiae* LW 200-76 (спиртовые сухие дрожжи Oenoferm C2 (Оеноферм С2) (ERBSLOH Geisenheim AG, Германия) из расчета их начального содержания в сусле 20 млн кл/см³. Культивировали дрожжи при температуре 26–28 °С в течение 18 ч. В полученной культуре анализировали количество дрожжевых клеток методом подсчета в камере Горяева [5].

В качестве основных факторов, влияющих на оптимизацию процесса дрожжегенерации при дифференцированном разделении и переработке биополимеров ржи, были выбраны: X_1 – видимая концентрация сухих веществ дрожжевого сусла, %; X_2 – дозировка протеолитического ферментного препарата ПротоМакс, используемого на стадии дрожжегенерации, ед. ПС /г усл. крах-

мала; X_3 – дозировка целлюлолитического ферментного препарата Талзим ХЛ-75, используемого на стадии дрожжегенерации, $\text{дм}^3/\text{т}$ сухих веществ зерна.

Пределы варьирования факторов были выбраны на основании ранее проведенных исследований и анализа литературных данных по переработке высококонцентрированного суслу в спиртовом производстве и особенностям совершенствования процесса дрожжегенерации [1, 6–12]. При проведении центрального композиционного ротатабельного планирования (табл. 1) критерием оценки влияния выбранных факторов являлась концентрация дрожжевых клеток (Y , млн кл/см³) на момент окончания процесса дрожжегенерации.

Эксперименты проводили в соответствии с матрицей планирования, приведенной в табл. 2.

Т а б л и ц а 1. Характеристика планирования

Фактор	Уровень		«Звездные» точки		Центр эксперимента	Шаг варьирования
	нижний	верхний	нижняя	верхняя		
X_1 , % СВ	15,0	18,0	13,9	19,0	16,5	1,5
X_2 , ед. ПС/г усл.кр.	0,100	0,300	0,032	0,370	0,200	0,100
X_3 , $\text{дм}^3/\text{т}$ СВ	0,030	0,100	0	0,120	0,065	0,035

Т а б л и ц а 2. Матрица планирования

№ опыта	Фактор			Функция отклика, Y , млн кл/см ³
	X_1 , % СВ	X_2 , ед. ПС/г	X_3 , $\text{дм}^3/\text{т}$ СВ	
1	16,50	0,200	0,120	250,0 ± 1,5
2	18,00	0,100	0,100	262,0 ± 1,5
3	15,00	0,300	0,030	320,0 ± 3,0
4	19,00	0,200	0,065	324,0 ± 3,0
5	16,50	0,200	0,065	338,0 ± 3,5
6	18,00	0,300	0,100	316,0 ± 3,0
7	15,00	0,100	0,030	330,0 ± 3,5
8	18,00	0,300	0,030	346,0 ± 4,0
9	15,00	0,300	0,100	282,0 ± 2,0
10	16,50	0,370	0,065	334,0 ± 3,5
11	14,00	0,200	0,065	294,0 ± 2,5
12	16,50	0,200	0	348,0 ± 4,0
13	16,50	0,200	0,065	338,0 ± 3,5
14	16,50	0,032	0,065	294,0 ± 2,5
15	18,00	0,100	0,030	312,0 ± 3,0
16	15,00	0,100	0,100	262,0 ± 1,5

Каждый опыт с целью повышения достоверности проводили в 3-кратной повторности. Среднее значение функции отклика Y по результатам трех параллельных опытов использовали при математической обработке компьютерной системой планирования эксперимента STATGRAPHICS Plus for Windows.

Результаты и их обсуждение. 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.

Стандартизированная карта Парето, изображенная на рис. 1, а, позволила установить значимые факторы. Пересечение стандартизированных эффектов вертикальной линией, которая представляет собой 95%-ную доверительную вероятность, означает, что влияние факторов на функцию отклика статически значимо.

Влияние факторов по степени значимости распределилось в следующем порядке: наибольший эффект на уровень накопления дрожжевой биомассы оказывает дозировка целлюлолитического фермента (X_3), причем знак «минус» на карте Парето указывает на снижение концентрации дрожжей при увеличении фактора; второе по значимости влияние оказывает дозировка кислот

протеазы (X_2) – с ее повышением концентрация дрожжевых клеток увеличивается; в рассматриваемом интервале варьирования фактора с увеличением видимой концентрации сухих веществ накопление биомассы увеличивается, достигая определенного максимума, после чего под влиянием квадратичного члена со знаком «минус» (X_1^2) резко снижается.

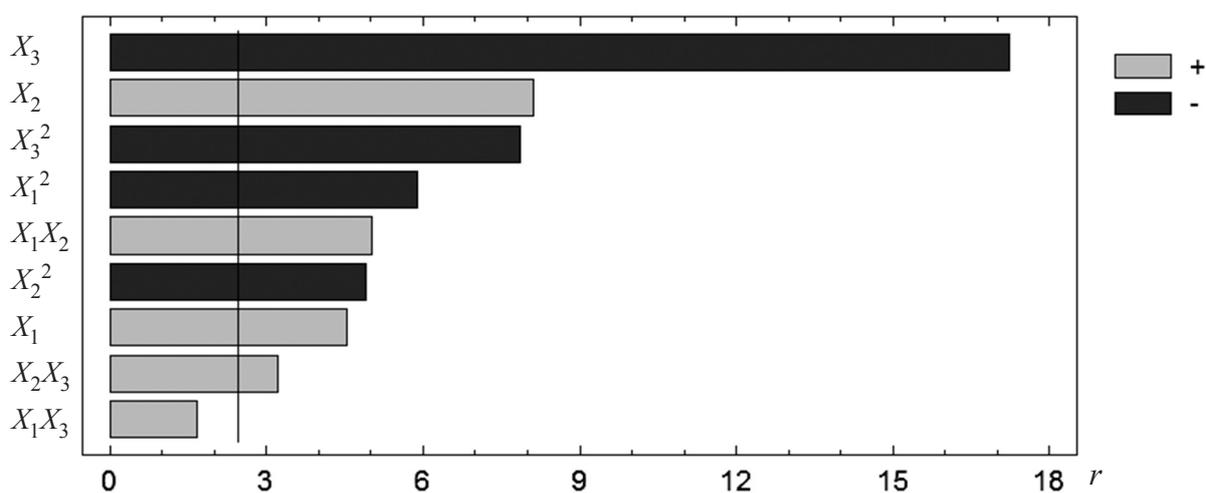
Анализ графика главных эффектов для показателя концентрации дрожжевых клеток (рис. 1, б) также подтверждает вышеупомянутый порядок значимости факторов.

В результате статистической обработки экспериментальных данных получено следующее уравнение регрессии:

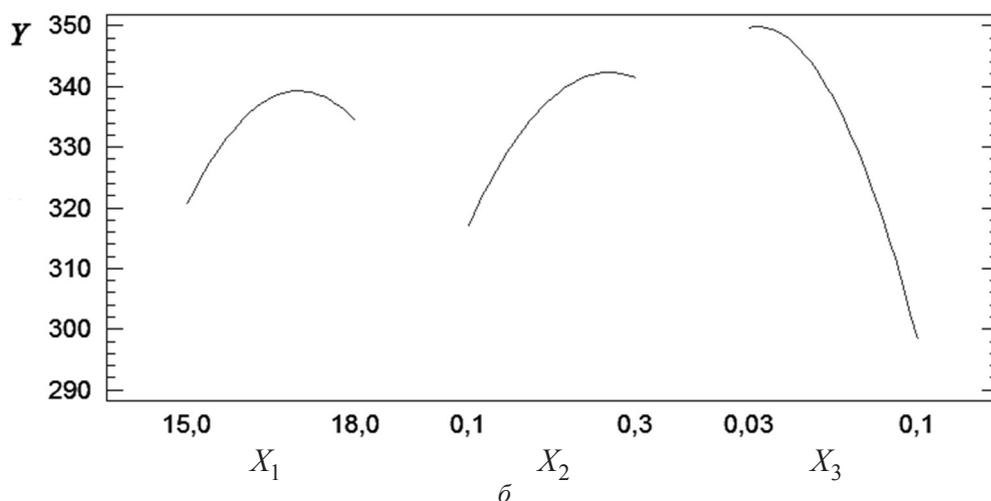
$$Y = -782,36 + 143,75X_1 - 712,09X_2 - 606,64X_3 + 65,00X_1X_2 + 61,90X_1X_3 + 1785,71X_2X_3 - 4,74X_1^2 - 888,67X_2^2 - 11583,60X_3^2. \quad (1)$$

Работоспособность модели подтверждается высоким коэффициентом детерминации R^2 , равным 98,79 %.

Практика предприятий спиртовой отрасли показывает, что рабочие интервалы колеблются в достаточно широких пределах – 15,0–19,0 % и более. На основании этих данных, с целью более детального рассмотрения графических зависимостей функции отклика от варьлируемых факторов и установления оптимальных расходов протеолитического и целлюлолитического фермент-



а



б

Рис. 1. Графики влияния варьируемых факторов на концентрацию дрожжевых клеток:
а – Карта Парето для показателя концентрации дрожжевых клеток;
б – главные эффекты отклика для показателя концентрации дрожжевых клеток

ных препаратов, были изучены контурные графики поверхности отклика в зависимости от концентраций дрожжевого сусла.

На основании анализа графических зависимостей установлено, что при расходе протеолитического ферментного препарата протеазы 0,20–0,24 ед. ПС/г усл. крахмала поверхность отклика перегибается и выходит на ровное плато, что свидетельствует о нецелесообразности дальнейшего увеличения дозировки протеазы. Таким образом, рациональный расход фермента составляет 0,2 ед. ПС /г усл. крахмала.

Оптимальный расход целлюлолитического ферментного препарата при дозировке протеолитического фермента 0,2 ед. ПС/г усл. крахмала, согласно рис. 2, находится на уровне 0,03–0,04 дм³/т СВ. В данном интервале варьирования фактора дозировки целлюлолитического фермента функция отклика при концентрации сусла 16,6–16,9 % приобретает максимальные значения накопления дрожжевых клеток – 350–355 млн кл/мл. Дальнейшее увеличение дозировки целлюлолитического фермента приводит к резкому ухудшению развития дрожжей.

Таким образом, экспериментальные исследования показали целесообразность снижения дозировки целлюлолитического ферментного препарата с 0,05 дм³/т СВ, полученной в раннее проведенных исследованиях, до 0,04 дм³/т СВ.

На рис. 2 также видно, что в интервале концентраций сусла 15,3–16,9 % отмечается рост накопления дрожжевых клеток, достигающий максимума при видимой концентрации сухих веществ дрожжевого сусла – 16,6–16,9 %, дальнейшее повышение концентрации сусла подавляет размножение дрожжей.

На основании анализа графических зависимостей были установлены области значения факторов, где наблюдаются наилучшие результаты по оптимизации накопления дрожжей в процессе дрожжегенерации.

Изучение математической зависимости и графического материала биосинтеза дрожжей позволяет установить рациональные нормы расхода целлюлолитического фермента (не более 0,04 дм³/т СВ) и кислой протеазы (не более 0,2 ед. ПС/г условного крахмала) для видимых концентраций дрожжевого сусла 15,3–16,9 %, которые обеспечивают получение стабильно высокой концентрации засевных дрожжей – 340–355 млн кл/см³.

В процессе проведения экспериментальных работ по оптимизации процесса дрожжегенерации с применением комплексного ферментативного воздействия препаратами протеолитического и целлюлолитического спектра была исследована динамика выделения диоксида углерода при развитии посевного материала дрожжей.

Исследование динамики выделения диоксида углерода в процессе дрожжегенерации проводили на дрожжевом сусле, которое находилось в конических колбах (емкость – 500 см³) и было закрыто резиновой пробкой с гидрозатвором (концентрированная серная кислота). Для оценки

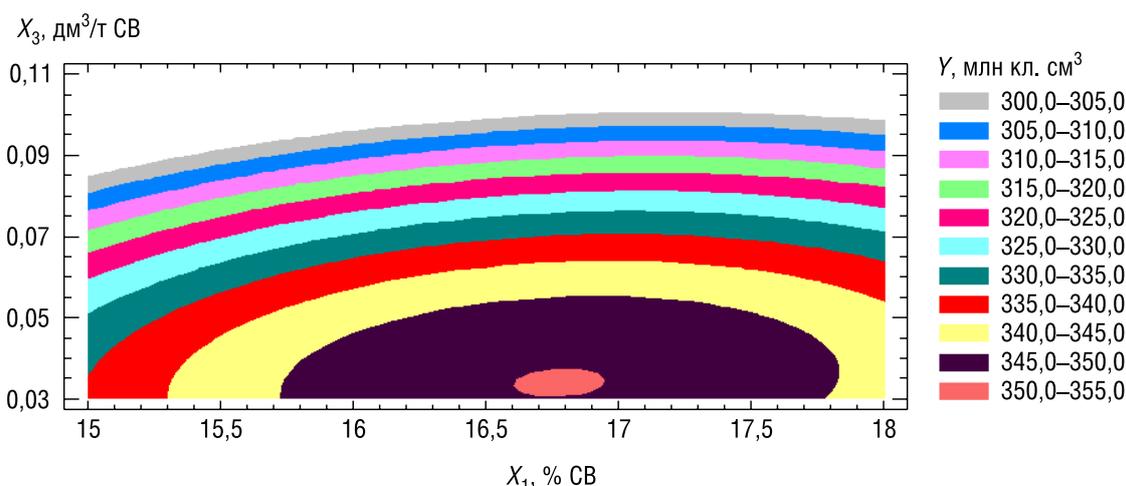


Рис. 2. Контурный график поверхностей отклика для показателя концентрации дрожжей при $X_1 = 0,2$ ед. ПС/г усл. крахмала

скорости спиртового брожения в подготовленное дрожжевое сусло вносили инокулят дрожжей из расчета их начального содержания 20 млн кл/см³, после чего вставляли резиновую пробку с гидрозатвором и взвешивали на технических весах с точностью до 0,01 г. Взвешивание в процессе дрожжегенерации проводили через 4 ч, в дальнейшем – через каждые 2 ч. Постановка экспериментальных образцов была осуществлена в соответствии с исходными данными матрицы планирования, приведенной в табл. 2.

Полученные результаты по динамике выделения диоксида углерода в процессе дрожжегенерации (рис. 3) позволяют сделать вывод о высокой эффективности применения кислой протеазы. Накопление диоксида углерода через 18 ч культивирования коррелировало с уровнем накопления дрожжевой биомассы и достигало наибольших значений в образцах № 5, № 8, № 10, № 12, № 13 – 11,0–12,2 г на 200 см³ сусла. В данных образцах дозировка протеазы колебалась от 0,20 до 0,37 ед. ПС/г усл. крахмала, дозировка целлюлолитического фермента – от 0 до 0,065 дм³/т СВ, при этом начальная концентрация сухих веществ дрожжевого сусла в образцах № 5, № 10, № 12, № 13 составляла 16,5 %, и только в образце № 8 – 18,0 % (при дозировке протеазы 0,30 ед. ПС/г усл. крахмала).

Уже через 8 ч дрожжегенерации в образцах № 5, № 8, № 10, № 12, № 13 количество выделившегося углекислого газа превышало остальные образцы в 1,02–2,25 раза, что свидетельствует об энергичном размножении и разбраживании посевного материала дрожжей. Данная динамика превалирования пяти отмеченных образцов сохранялась вплоть до окончания процесса культивирования засевных дрожжей. Полученный результат подтверждает высокую жизнедеятельность дрожжей в сусле с пониженной концентрацией сухих веществ (16,5 %), подвергшемся ферментативному гидролизу протеазой при минимальном расходе целлюлолитического ферментного препарата.

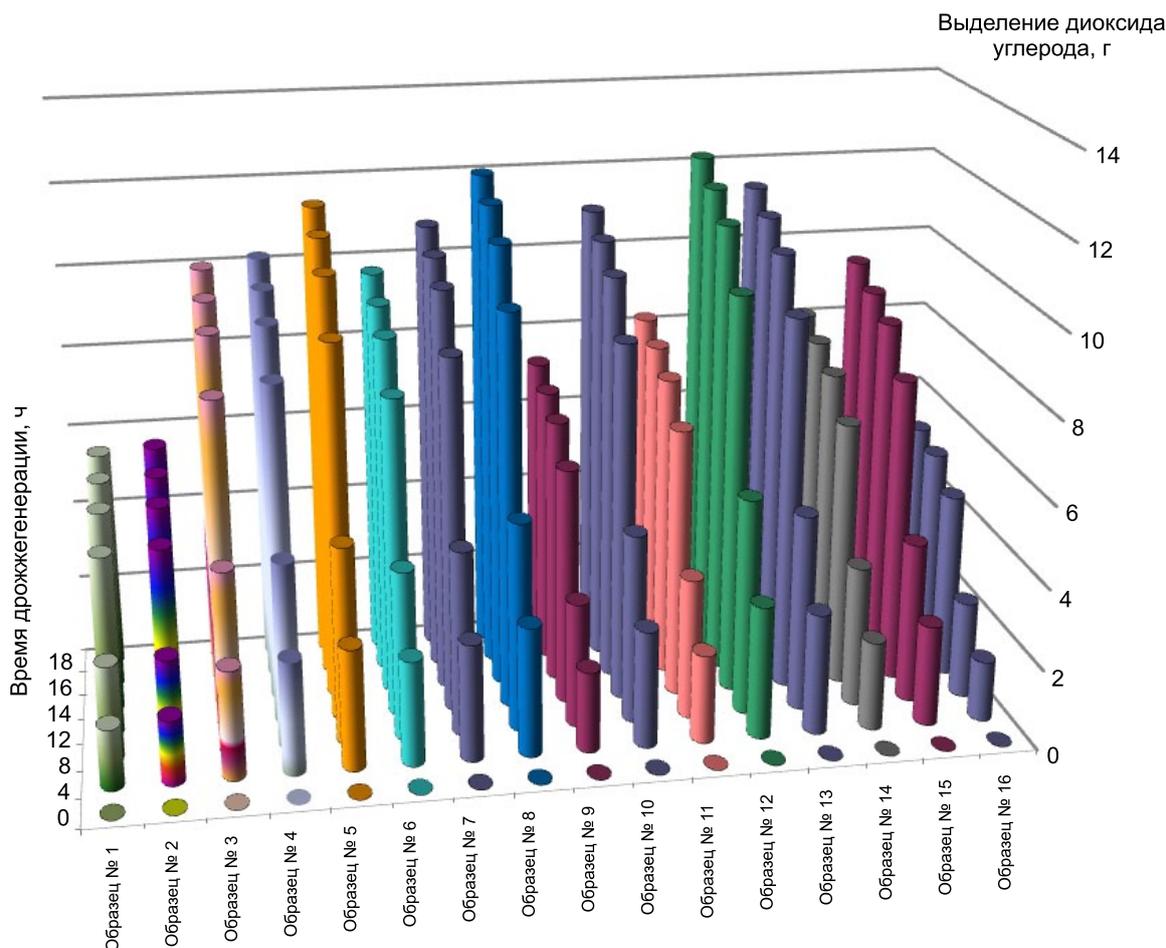


Рис. 3. Интенсивность выделения диоксида углерода при дрожжегенерации

Заключение. На основании проведенной работы по оптимизации процесса дрожжегенерации при дифференцированном разделении и переработке биополимеров зерна ржи целесообразно для получения стабильно высокой концентрации засевных дрожжей 340–355 млн кл/см³ рекомендовать для внедрения на спиртовых предприятиях Республики Беларусь при освоении технологии производства этилового спирта с дифференцированным разделением биополимеров зерна следующие условия оптимизации:

- 1) культивирование производственных дрожжей осуществлять на сусле с видимой концентрацией сухих веществ 15,3–16,9 %;
- 2) применять при подготовке дрожжевого суслу протеолитический ферментный препарат (кислую протеазу) при норме расхода не более 0,20 ед. ПС/г усл. крахмала;
- 3) применять при подготовке дрожжевого суслу целлюлолитический ферментный препарат (источник ксиланазы) при норме расхода не более 0,04 дм³/т сухих веществ зерна.

Список использованных источников

1. Римарева, Л. В. Роль протеаз в спиртовом брожении / Л. В. Римарева, М. Б. Оверченко // Микробные биокатализаторы для перерабатывающих отраслей АПК: сб. науч. тр. / ВНИИПБТ, редкол.: В. А. Поляков, Л. В. Римарева. – М., 2006. – С. 127–137.
2. Тананайко, Т. М. Производственная проверка возможности использования ферментных препаратов глюковаморин Г20Х и целловиридин–В Г20Х в спиртовой отрасли Республики Беларусь / Т. М. Тананайко, Д. В. Хлиманков, А. А. Пушкарь // Микробные биокатализаторы для перерабатывающих отраслей АПК: сб. науч. тр. / ВНИИПБТ, редкол.: В. А. Поляков, Л. В. Римарева. – М., 2006. – С. 153–156.
3. Паляныця, Л. Я. Применение ферментных препаратов для переработки зерна ржи / Л. Я. Паляныця, Н. И. Косив, О. С. Ворожбыт // Микробные биокатализаторы для перерабатывающих отраслей АПК: сб. науч. тр. / ВНИИПБТ, редкол.: В. А. Поляков, Л. В. Римарева. – М., 2006. – С. 149–152.
4. Технологическая инструкция по применению комплексных ферментных препаратов АмилоМакс Т, ГлюкоМакс, ВискоМакс, ПротоМакс производства Республиканского производственного дочернего унитарного предприятия «Мариз» Республиканского унитарного предприятия «Науч.-практ. центр Нац. акад. наук Беларуси по продовольствию» в спиртовой промышленности: ТИ ВУ 190239501.5.803–2011 / Т. М. Тананайко: утв. Науч.-практ. центр НАН Беларуси по продовольствию. 26.01.2011. Введ. 26.01.2011. – Минск, 2013. – 25 с.
5. Дячкина, А. Б. Роль эндогенных и микробных протеаз в процессе получения и сбраживания ржаного суслу: дис. ... канд. техн. наук: 03.00.04 / А. Б. Дячкина. – М., 2005. – 150 л.
6. Слюсаренко, Т. П. Лабораторный практикум по микробиологии пищевых производств / Т. П. Слюсаренко. – М.: Легкая и пищевая промышленность, 1984. – 207 с.
7. Римарева, Л. В. Роль протеолитических ферментов в интенсификации процессов дрожжегенерации и спиртового брожения: дис. ... канд. техн. наук / Л. В. Римарева. – М.: 1980. – 196 л.
8. Типовой технологический регламент производства спирта из крахмалистого сырья / ВНИИПБТ: утв. Департаментом пищевой промышленности Минсельхозпрода России 04.04.1998. – М., 1998. – 79 с.
9. Технологическая инструкция по применению ферментного препарата ферментного препарата Талзим ХЛ75 (Talzyme XL75) производства Sunson industry group. Co. LTD. (Китай) в спиртовой промышленности: ТИ ВУ 190239501.5.988–2013 / Т. М. Тананайко: утв. Науч.-практ. центр НАН Беларуси по продовольствию. 08.02.2013. – Введ. 08.02.2013. – Минск, 2013. – 13 с.
10. Технологическая инструкция по применению ферментного препарата Ликвафло (Liquoflow) производства компании Novozymes A/S (Дания) в спиртовой промышленности: ТИ ВУ 190239501.5.890–2012 / Т. М. Тананайко: утв. Науч.-практ. центр НАН Беларуси по продовольствию. 01.02.2012. – Введ. 01.02.2012. – Минск, 2012. – 11 с.
11. Технологическая инструкция по применению ферментного препарата Saczyme Plus 2X производства компании Novozymes A/S (Дания) в спиртовой промышленности: ТИ ВУ 190239501.5.999–2013 / Т. М. Тананайко: утв. Науч.-практ. центр НАН Беларуси по продовольствию. 16.04.2013. – Введ. 16.04.2013. – Минск, 2012. – 13 с.
12. Технологическая инструкция по применению ферментного препарата ферментного препарата Талзим ГЛ 60 (Talzyme GL60) производства Sunson industry group. Co. LTD. (Китай) в спиртовой промышленности: ТИ ВУ 190239501.5.987–2013 / Т. М. Тананайко: утв. Науч.-практ. центр НАН Беларуси по продовольствию. 08.02.2013. – Введ. 08.02.2013. – Минск, 2013. – 13 с.

Поступила в редакцию 03.08.2015