

доц., к.т.н. Макаров Сергей Юрьевич
ФГБОУ ВО «Московский государственный
университет технологий и управления»
им. К.Г. Разумовского
(Первый казачий университет)

Изучение возможности приготовления зернового
сусла без теплового разваривания сырья

Москва 2014

Оглавление

Введение.....	5
1 Литературный обзор	10
1.1 Амилолитические препараты	10
1.2 Зависимость активности микробиологических амилаз от температуры.....	27
1.3 Низкотемпературные способы подготовки спиртового сусла.....	33
1.4 Технология производства спирта без разваривания зерна.....	41
1.5 Выход спирта из различных источников углеводов	56
2 Цели и задачи исследований.....	60
3 Экспериментальная часть.....	61
3.1 Методы и анализы	61
3.2 Описание экспериментальной установки	70
3.3 Результаты и обсуждение	73
Выводы.....	80
Список использованной литературы	81

Введение

Пищевая и перерабатывающая промышленность, являющаяся одним из главных звеньев народного хозяйства России, призвана выпускать высококачественную, конкурентноспособную продукцию на основе достижений биотехнологии и комплексной малоотходной технологии переработки сырья. [1]

Спиртовая промышленность в настоящее время является быстро развивающейся отраслью народного хозяйства.

Ректификованный спирт, производимый отечественными предприятиями, используется в ликероводочной промышленности, в медицине, производстве пищевых кислот, концентратов для безалкогольных напитков, пищевых добавок и других целей.

Потребность в нем постоянно увеличивается, причем возрастает спрос на спирт более высокой степени очистки, производство которого организуется на передовых предприятиях (спирт Люкс, Альфа).

Снижение объемов выпуска спирта в 80-е годы отрицательно сказалась и на уровне производства, на состоянии спиртовых предприятий, на уровне технологии. Долгие годы не велось новое строительство, не проводилась разработка и внедрение усовершенствованных технологических схем. [2]

В настоящее время работа отрасли стабилизировалась, ведутся научные исследования в области создания новых технологий с использованием последних достижений биотехнологии и других областей науки.

Большое значение в спиртовом производстве имеет биохимическая деятельность дрожжей. Наряду с составом суслу, дрожжам принадлежит существенная роль в проведении процессов брожения и качестве спирта. Применение новых рас дрожжей, оптимизация параметров их культивирования позволяет с минимальными затратами повысить выход спирта, улучшить его качество. Активные исследования в этом направлении проводятся рядом оте-

чественных исследователей: Поляковым В.А., Римаревой Л.В., Оверченко М.Б. [2]

Перспективным является применение ферментных препаратов взамен солода, причем разрабатываются технологии применения на стадии осахаривания, наряду с амилазой и глюкоамилазой, протеолитических и цитолитических ферментных препаратов, позволяющих перерабатывать большие объемы ржи, доля которой в последние годы возросла в ассортименте используемых зернопродуктов до 70 %. [3]

Совершенствование технологического процесса переработки крахмалистого сырья имеет большое народнохозяйственное значение, так как позволяет сократить потери и тем самым улучшить использование ценного пищевого сырья.

На большинстве спиртовых заводов, перерабатывающих крахмалистое сырье, основные стадии технологического процесса осуществляются непрерывно, что обеспечивает значительное сокращение технологических потерь на стадии разваривания, осахаривания и сбраживания и позволяет за счет смягчения режима разваривания получать из некоторых видов сырья спирт лучшего качества.

Однако потери крахмала за счет неполного его осахаривания довольно значительны и составляют до 6-7 % от введенного с сырьем. [4]

Работы, которые велись в этой области, были направлены на расширение комплекса амилолитических ферментов, применяемых для осахаривания крахмала. Для этого вместо солода или в смеси с ним использовались культуры микроорганизмов-продуцентов амилолитических ферментов.

В практике отечественных и зарубежных спиртовых заводов в качестве источников амилолитических ферментов получили распространение плесневые грибы, культивируемые на твердых средах поверхностным способом и на жидких - глубинным.

Использование недефицитного сырья для питательных сред, сокращение ручного труда, возможность механизации и автоматизации процесса глу-

бинного культивирования микроорганизмов делают применение плесневых грибов взамен солода весьма прогрессивным.

В настоящее время проблеме применения микробных ферментов в перерабатывающих отраслях пищевой промышленности продолжают уделять все большее внимание ученые и производственники во многих странах мира. По прогнозам специалистов, использование ферментных препаратов микробного происхождения в промышленности имеет устойчивую тенденцию к увеличению, при этом $2/3$ текущего объема составляют ферменты для пищевой промышленности, а их основная доля приходится на спиртовую промышленность. [5]

В спиртовой промышленности, перерабатывающей крахмалистое сырье, широко применяются ферменты гидролитического расщепления крахмала. Для этой цели используют зерновой солод и ферментные препараты микробного происхождения. Применяемый в спиртовом производстве зерновой солод осуществляет гидролиз крахмала до сбраживаемых углеводов, является источником азотистого питания дрожжей и при осахаривании крахмалистого сырья производит частичную деструкцию его клеточных стенок и белковых веществ.

Однако при применении солода из-за ограниченной возможности создания достаточно высокой концентрации ферментов скорость осахаривания и протеолиза сырья остается низкой, что затрудняет интенсификацию процесса брожения. Эффективная замена солода ферментами микробного происхождения является важной задачей. Опыт работы спиртовых заводов в последние 20 лет показано, что применение ферментных препаратов экономически оправдано: интенсифицируется процесс осахаривания крахмала, повышается степень использования сырья, стабилизируются технологические процессы. [5]

Потребность спиртовой отрасли России в комплексных ферментных препаратах составляет около 7 тыс. тонн, доля отечественных препаратов - менее 15%. При этом их ассортимент, готовая форма и упаковка не удовле-

творяют в полной мере запросам промышленности. Достаточно интенсивно в настоящее время работают цеха глубинного культивирования при спиртзаводах, обеспечивая потребности собственные и ближайших спиртзаводов в осахаривающих ферментах. Однако их явно недостаточно, и для увеличения объема производства ферментов необходимо дооснащение цехов оборудованием по концентрированию препаратов. [5]

Ферментные препараты компании «Новозаймс» применяемые в спиртовой промышленности представляют собой высокоэффективные белковые катализаторы, полученные из различных бактериальных или грибковых культур микроорганизмов. Компания производит и предлагает для применения в спиртовой промышленности, весь спектр препаратов необходимых для полного гидролиза зернового и другого крахмалсодержащего сырья. [4]

Одной из главных проблем, стоящих перед заводами спиртовой отрасли, является разработка ресурсосберегающей технологии. В Российской Федерации действует более 200 спиртовых предприятий, основная доля которых производит этиловый спирт из крахмалсодержащего сырья, представленного широким ассортиментом зерновых культур. В настоящее время зерно перерабатывается под действием высоких температур, что сопровождается большими теплоэнергозатратами для заводов. В последние годы из-за постоянного увеличения цен на теплоэнергоносители эти показатели в структуре себестоимости спирта составляют все более значимую величину, поэтому решение указанной задачи отвечает современным требованиям отрасли. [6]

Принятая на современных спиртовых заводах технология предусматривает переработку фуражного зерна различного качества, в том числе и непригодного для переработки в других отраслях пищевой промышленности. В отдельные периоды допускается переработка дефектного зерна. [7] При этом часть токсичных веществ зерна не разрушается в процессе водно-тепловой обработки, а переходит в сусло, что приводит к подавлению роста и развития дрожжей, замедлению процесса брожения, чрезмерному накоплению в бражке побочных продуктов, которые плохо отделяются при ректификации и

ухудшают органолептические показатели спирта. Кроме того, разваривание сырья под давлением при высоких температурах, под действием которых активизируются процессы меланоидинообразования и окисления, неизбежно приводящие к потере сбраживаемых сахаров и накоплению токсичных для дрожжей веществ. [8]

Одним из первых направлений для снижения температур осахаривания стало повсеместное внедрение механико-ферментативной обработки замеса [9], позволившей отказаться от разваривания под давлением и совместившее растворение крахмала суслу в воде и его ферментолиз ферментными препаратами. По данным работ [6, 10] применение механо-кавитационной обработки зерна перед МФО позволяет снизить пребывание замеса в ГДФО-1 снижается с 3-4 часов до 30-40 мин.

Ведутся также работы по замене разваривания коллоидным измельчением крахмала зерна [11], применение ферментных препаратов при комнатной температуре [12, 13, 14], изучение процессов осахаривания риса японской грибной закваской коджи [15].

В связи с этим, представляется актуальным изучить возможность холодного осахаривания крахмала зерна ферментными препаратами компании «Новозаймс».

1 Литературный обзор

1.1 Амилолитические препараты

Амилолитические препараты широко выпускаются в нашей стране и за рубежом. В основном это крупнотоннажное производство. Амилазы находят применение почти во всех областях, где перерабатывается крахмалосодержащее сырье. Амилазы используют для осахаривания зернового и картофельного крахмала. Самым большим потребителем амилолитических ферментов является спиртовая и пивоваренная промышленности, где в настоящее время солод (пророщенное зерно) успешно заменяется амилолитическими ферментными препаратами.

1.1.1 Источники получения амилаз

Амилазы очень широко распространены в природе. Они синтезируются многими микроорганизмами (бактерии, грибы, актиномицеты, дрожжи), животными и растениями. До развития ферментной промышленности главным промышленным источником получения амилаз в европейских странах было проросшее зерно (солод). Для медицинских целей амилазы получали из животного сырья. В настоящее время главным источником амилаз являются микроорганизмы, особенно бактерии, грибы и реже дрожжи.

1.1.2 Структура зернового крахмала

Субстратами для действия амилаз являются крахмал, состоящий из амилозы и амилопектина, продукты частичного гидролиза крахмала. [17]

Крахмал, как запасное питание зерна сосредоточен в эндосперме.

Зерно пшеницы и ржи состоит из нескольких анатомических частей – оболочек, эндосперма и зародыша и др., которые характеризуются различными физиологическими функциями и в связи с этим имеют разное строение и химический состав (рис. 1).

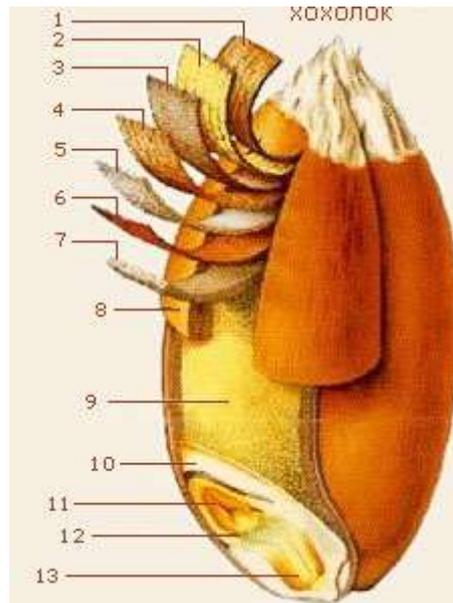


Рисунок 1 - Продольный разрез зерна пшеницы [16]:

1, 2, 3 – плодовые оболочки; 4, 5, 6 – семенные оболочки; 7 – алейроновый слой; 8 – слои клеток плодовой оболочки пшеницы с поверхности; 9 – эндосперм; 10 – щиток; 11 – почечка; 12 – осевая часть зародыша; 13 – корешок

Таблица 1

Соотношение анатомических частей зерновки пшеницы и ржи, в % [16]

Часть зерновки	Пшеница	Рожь
Оболочки	5,5 - 8,0	6,5 - 12,2
в том числе:		
плодовые	3,3 - 6,0	6,3 - 6,6
семенные	1,1 - 2,0	5,3 - 5,5
алеяроновый слой	6,8 - 8,8	8,4 - 12,0
эндосперм	77,0 - 82,0	72,8 - 78,0
зародыш	1,5 - 3,0	2,5 - 5,6

Около 4/5 массы зерновки составляет эндосперм. Это характерно для большинства злаков – пшеницы, ржи, овса, ячменя и др. Соотношение других

частей колеблется в зависимости от ряда факторов. Например, содержание оболочек зерновки ржи выше, чем у пшеницы, а у твердой пшеницы выше, чем у мягкой.

Зерно пшеницы и ржи имеет сложный химический состав. При оценке технологических свойств зерна немаловажное значение имеет количественное соотношение анатомических частей - зародыша, оболочек и эндосперма.

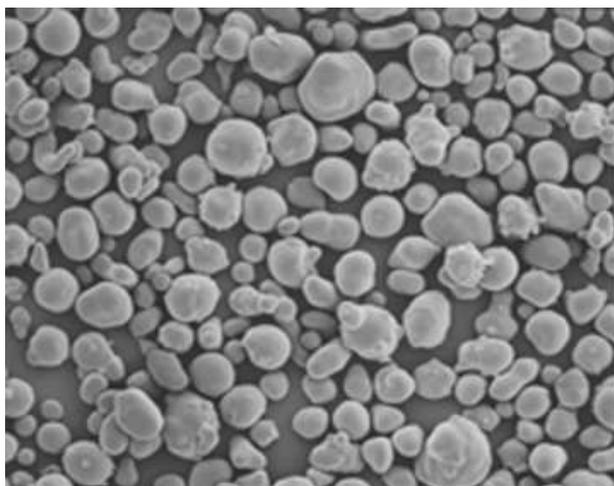
Оболочки, состоящие в основном из неусвояемых дрожжами веществ. Зародыш содержит много полноценных белковых веществ, жиров, углеводов, а также витаминов.

Наибольшее значение как источник легкоусвояемых питательных веществ имеет эндосперм, поэтому содержание эндосперма в зерновке и возможность отделения его от оболочек и зародыша представляет практический интерес. Эндосперм состоит из белков, углеводов, содержит также ферменты, витамины, минеральные вещества и др. Из злаковых культур наиболее богато белками зерно пшеницы 11-18%, ржи 9-14%. Белковые вещества в зерне пшеницы образуют клейковину.

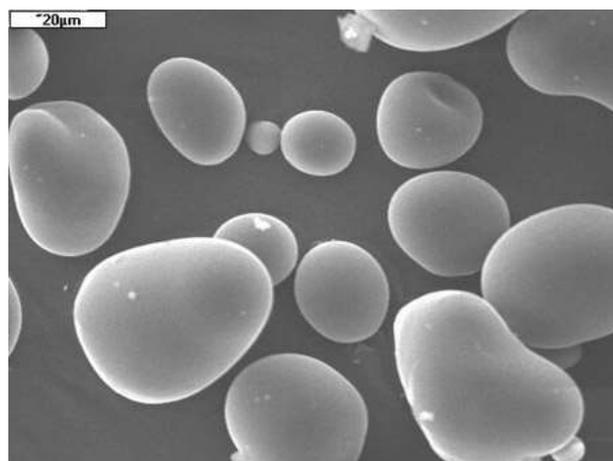
Из простейших сахаров в составе зерна наибольшее значение имеют глюкоза и фруктоза.

Жиры – важный энергетический материал для организма человека и носитель растворимых в жирах витаминов А, D, E, K. Кроме этих витаминов зерно являются источником водорастворимых витаминов В₁, В₂, РР.

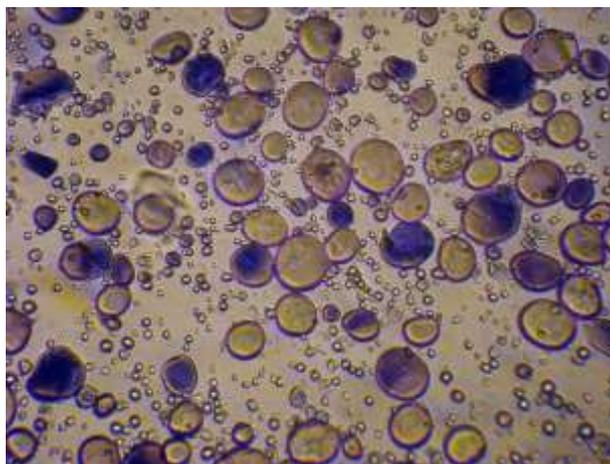
Крахмал - растительный полисахарид с очень сложным строением. Это двухкомпонентное соединение, состоящее из 13-30% амилозы и 70-85% амилопектина. Оба компонента неоднородны, их молекулярная масса (М. м.) колеблется в широких пределах и зависит от природы крахмала (рис. 2). [17]



а.



б.



в.

Рисунок 2 - Внешний вид гранул крахмала различных зерновых культур:
а - кукурузного; б - картофельного; в - пшеничного

Амилоза - это неветвящийся полимер, в котором остатки глюкозы соединены α -1, 4-гликозидной связью; степень полимеризации около 2000. В «аномальных» амилозах с одной-двумя α -1,6-связями полимеризация может возрасти до 6000 (рис. 3 - 7).

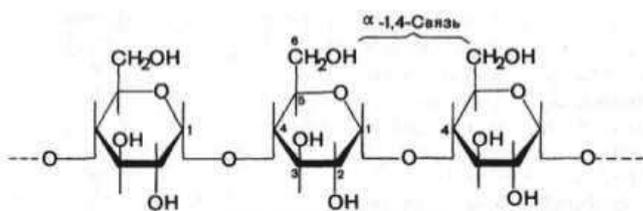


Рисунок 3 - Участок молекулы амилозы

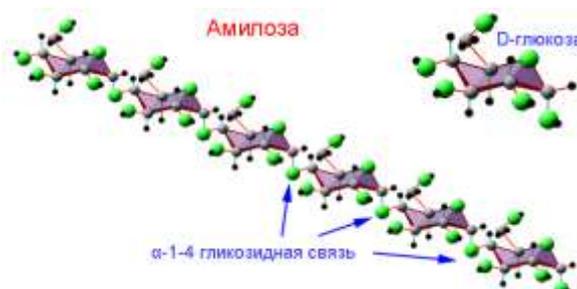


Рисунок 4 - Структурная формула амилозы

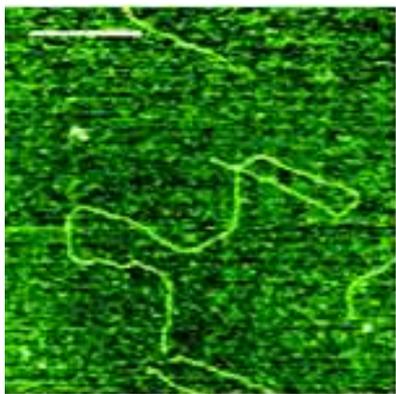


Рисунок 5 - Внешний вид амилозы под электронным микроскопом

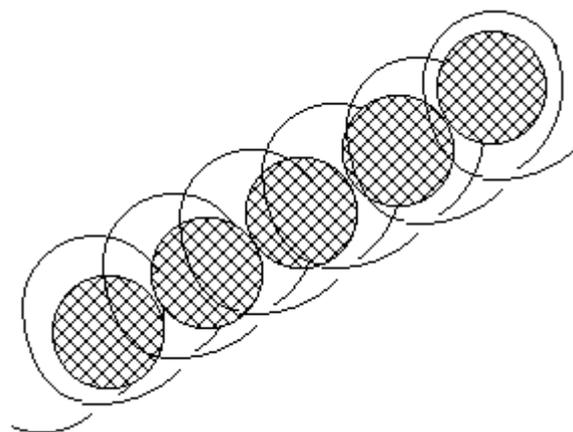


Рисунок 6 - Спираль амилозы в растворе с заключенными в ее полость молекулами йода

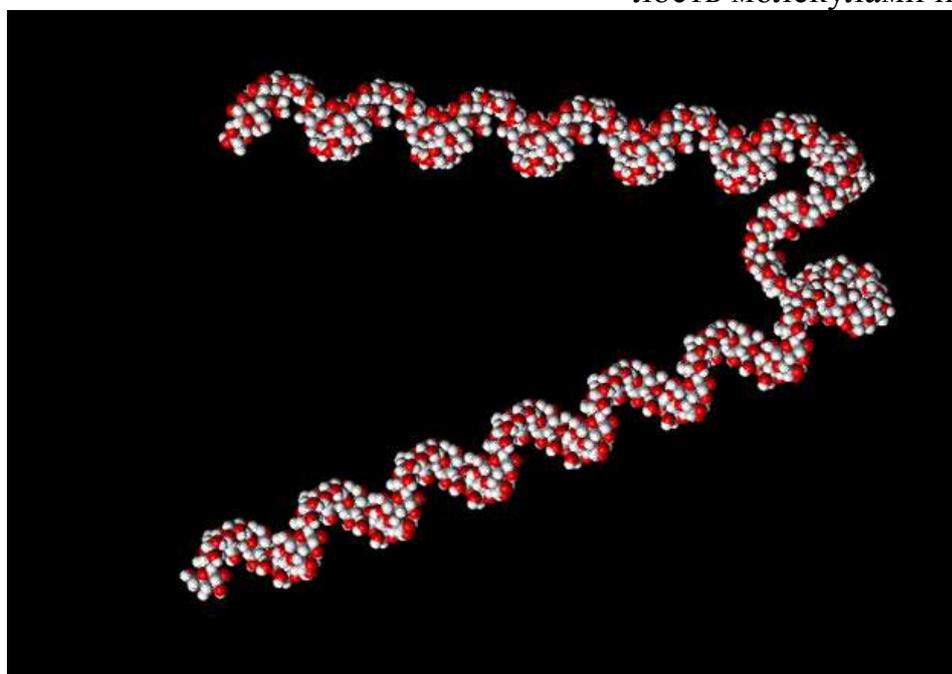


Рисунок 7 - Внешний вид спирали амилозы

Максимальная длина молекулы амилозы достигает 7000 \AA (молекулярная масса ок. $80\,000$). В растворе спираль сжимается за счет увеличения витка, в котором уже участвует 6 остатков глюкозы. При вхождении молекул йода в спираль амилозы возникает характерный синий цвет. Строго говорить о величине молекулы амилозы нельзя, т. е. даже из одного образца крахмала извлекается амилоза, с величиной молекулы от 500 до 2000 остатков глюкозы.

Амилопектин имеет большую молекулярную массу, чем амилоза, и более сложное строение. Это ветвящийся полисахарид. Предполагается, амило-

пектин ветвится дихотомически, т. е. число концевых звеньев всегда на единицу больше числа звеньев, дающих ветвление, а сумма этих чисел дает общее число звеньев по всей цепи (см. рис. 8 - 12).

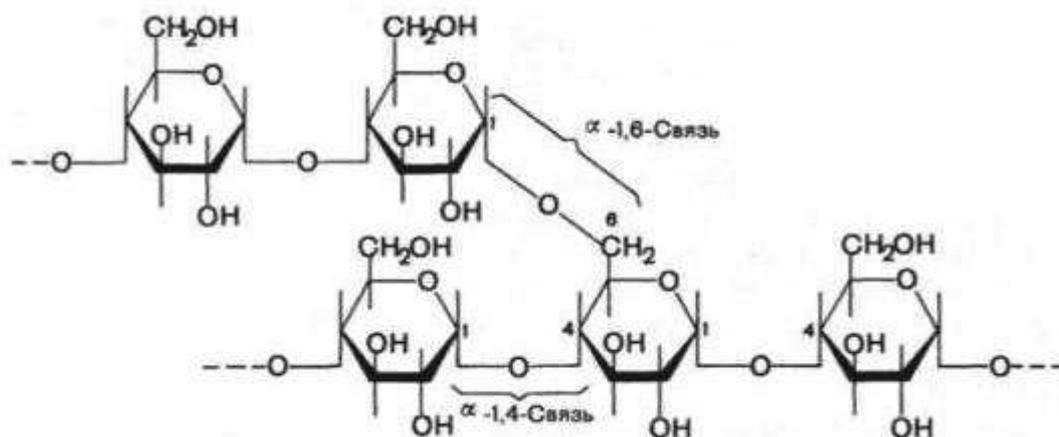


Рисунок 8 - Структурная формула амилопектина

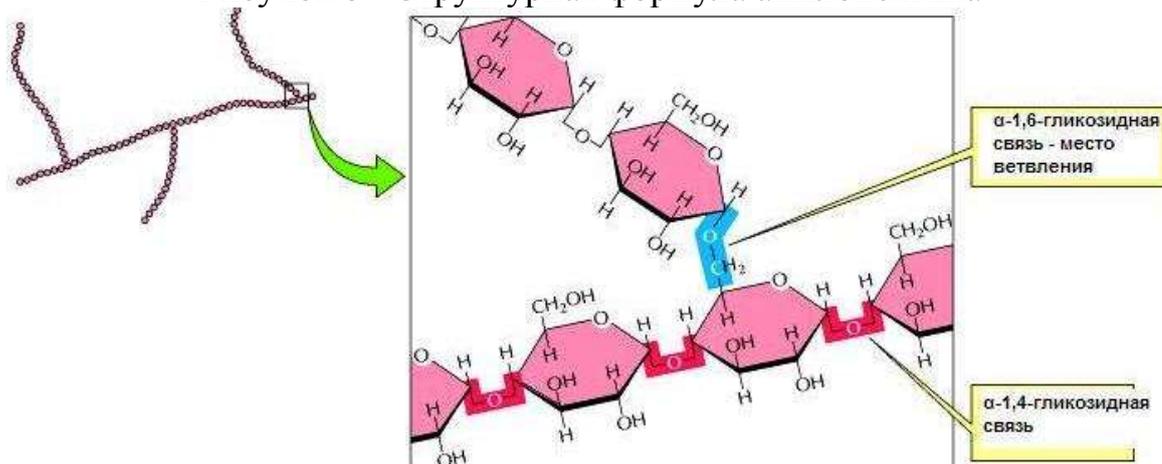


Рисунок 9 - Внешний вид молекулы амилопектина

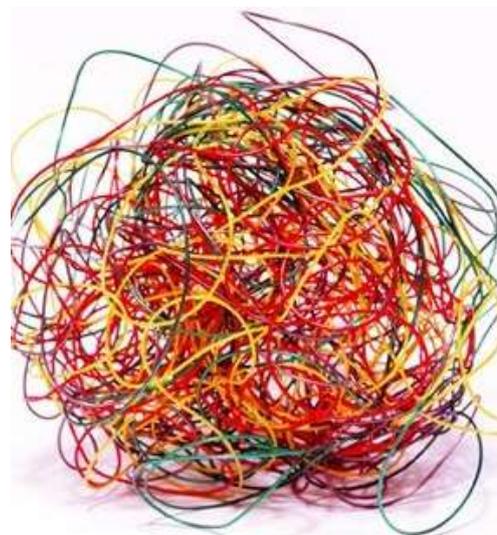
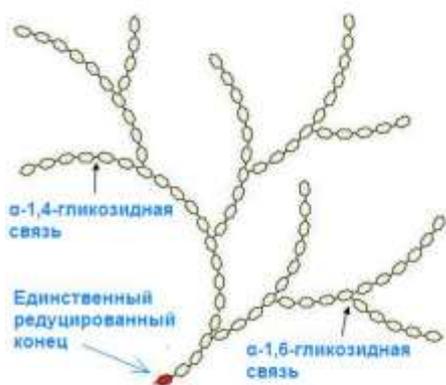


Рисунок 10 - Внешний вид молекулы амилопектина с единственным редуцированным концом цепи

Рисунок 11 - Модель шаровидной молекулы амилопектина

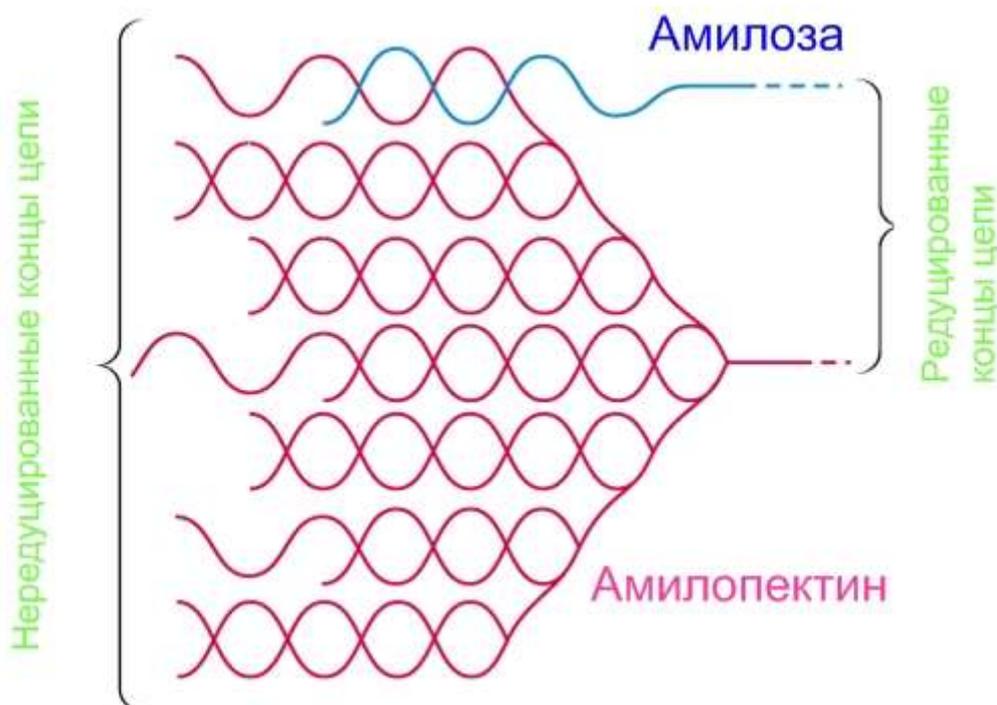


Рисунок 12 - Амилоза и амилопектин

1.1.3 Механизм действия и свойства амилаз

1.1.3.1 Механизм действия амилаз

К группе амилазических ферментов относятся α - и β -амилазы, глюкоамилаза, пуллуланаза, изоамилаза и некоторые другие ферменты. Амилазы бывают двух типов: эндо- и экзоамилазы. Четко выраженной эндоамилазой является α -амилаза, способная к разрыву внутримолекулярных связей в высокополимерных цепях субстрата. [17]

Глюкоамилаза и β -амилаза являются экзоамилазами, т. е. ферментами, атакующими субстрат с нередуцирующего конца.

При изучении механизма действия амилаз имеются определенные сложности, и прежде всего они заключаются в том, что субстрат - крахмал неоднороден и имеет различные характеристики по степени полимеризации гликозидной цепи и количеству ветвлений.

Реакции, катализируемые амилазами, имеют две стадии: короткую - предстационарную и длительную - стационарную. Во время первой стадии эндоамилаза быстро уменьшает молекулярную массу субстрата, образуя смесь линейных и разветвленных олигосахаридов. Второй этап реакции продолжается, пока продукты гидролиза не перестанут окрашиваться йодом; он протекает значительно медленнее и зависит от индивидуальных свойств фермента и его природы. Поэтому конечные продукты гидролиза α -амилазами могут быть различными. Первая стадия воздействия фермента на субстрат хотя и носит неупорядоченный характер, имеет для всех видов α -амилаз схожий механизм.

Существует две гипотезы о механизме действия экзоамилаз на субстрат. Первая гипотеза предполагает, что, воздействуя на субстрат по одноцепочечному или «молниеобразному» механизму, экзоамилаза образует фермент-субстратный комплекс с захватом нередуцирующего конца цепи.

Дальнейшее продвижение фермента по этой цепи происходит до полного ее гидролиза. По второй гипотезе β - и глюкоамилаза действуют на суб-

страт путем механизма множественной атаки, т. е. фермент образует комплекс с молекулой субстрата, затем через несколько этапов этот комплекс распадается и фермент связывается с новой молекулой субстрата. Иными словами, при множественной атаке происходит нечто среднее между неупорядоченным механизмом и одноцепочечной, «молниеобразной» атакой. Для полного гидролиза по этому механизму одна молекула субстрата должна образовывать много раз фермент-субстратные комплексы. При этом возможен гидролиз нескольких связей в одном каталитическом акте.

СХЕМА ГИДРОЛИЗА
КРАХМАЛА



Рисунок 13

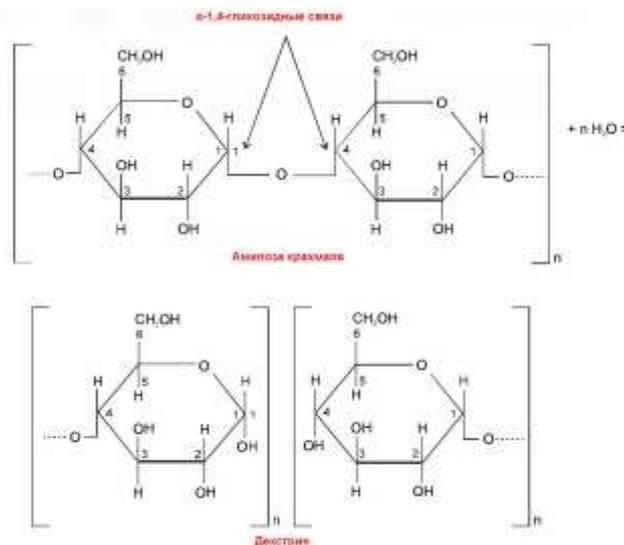


Рисунок 14 - Гидролиз амилозы α -амилазой с образованием декстринов

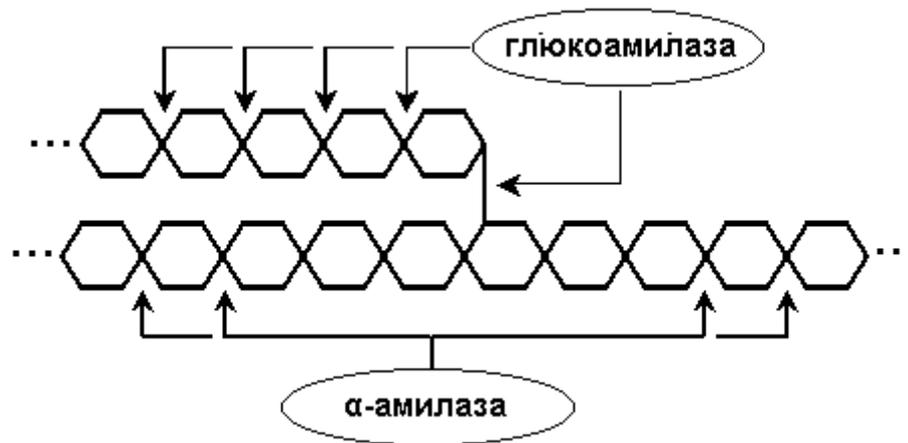


Рисунок 15 - Совместный гидролиз α -амилазой и глюкоамилазой амилопектина

Механизм воздействия амилаз на субстрат может быть рассмотрен с нескольких позиций: [19]

- вид разрываемой связи (α -1,4 или α -1,6);
- тип воздействия на субстрат (эндо- или экзо-);
- влияние на скорость гидролиза степени полимеризации субстрата;
- возможность гидролиза олигосахаридов;
- способность фермента к множественной атаке субстрата.

Наличие признаков амилаз, отраженных в 3 и 4 позициях, при действии на линейные субстраты может свидетельствовать о существовании у этих ферментов подцентровой структуры. Вероятно, активный центр амилазы может состоять из нескольких подцентров, каждый из которых может вступать в контакты с глюкозным остатком. Энергия взаимодействия (A), выраженная в единицах свободной энергии (кДж/моль), определяет подцентровое сродство фермента к субстрату. Это сродство индивидуально и может быть как положительным, так и отрицательным. Вероятность существования подцентровых структур амилаз помогает установить строение активного центра амилаз, дает более четкое объяснение субстратной специфичности, но не дает объяснений механизма гидролиза разветвленных субстратов.

1.1.3.2 α -амилазы

α -амилаза (α -1,4-глюкан-4-глюканогидролаза, КФ 3.2.1.1.) является эндоамилазой, вызывающей гидролитическое расщепление α -1,4-гликозидных связей внутри высокополимеризованного субстрата. Фермент назван α -амилазой потому, что он высвобождает глюкозу в α -мутамерной форме.

α -амилаза - водорастворимый белок, обладающий свойствами глобулина и имеющий М. м. 45 000-60 000. Своего рода исключением является α -амилаза *V. magerans*, которая имеет М. м. 130 000. Есть указания, что некоторые термостабильные α -амилазы имеют М. м. 14 000-15 000, но в их молекулах содержится в 2-3 раза больше атомов кальция.

Все α -амилазы относятся к металлоэнзимам, содержание в них Са колеблется от 1 до 30 г атом на 1 г моль фермента. Полное удаление кальция приводит к инактивации фермента. Повторное введение кальция в среду может частично восстановить его активность. [18]

α -Амилаза *V. subtilis* с помощью иона цинка способна образовывать димерную форму, чего лишены другие α -амилазы. Все α -амилазы устойчивы к воздействию протеаз. Они богаты тирозином и триптофаном. Глютаминовая и аспарагиновая кислоты составляют 25% массы белка. Наличие этих кислот в α -амилазе связывают с их осаживающей способностью. Так, разжижающие α -амилазы не имеют сульфгидрильных групп, а осаживающие содержат один остаток цистеина. Сравнительно мало или совсем отсутствуют в α -амилазах содержащие серу аминокислоты. Некоторые α -амилазы грибного происхождения имеют углеводный фрагмент, в состав которого могут входить манноза, ксилоза, гексозоамин, но функции его не установлены.

В зависимости от вида микроорганизма свойства α -амилаз могут сильно отличаться не только по механизму воздействия на субстрат и конечным продуктам, но и по оптимальным условиям для проявления максимальной активности.

Действуя на целое крахмальное зерно, α -амилаза атакует его, разрушая поверхность и образуя каналы и бороздки, т.е. как бы раскалывает зерно на части. Клейстеризованный крахмал гидролизуется ею с образованием на окрашиваемые йодом продукты - в основном состоящие из низкомолекулярных декстринов. Процесс гидролиза крахмала многостадийный. В результате воздействия α -амилазы на первых стадиях процесса в гидролизате накапливаются декстрины, затем появляются неокрашивающиеся йодом тетра- и тримальтоза, которые очень медленно гидролизуются α -амилазой до ди- и моносахаридов.

Все α -амилазы проявляют наименьшее сродство к гидролизу концевых связей в субстрате. Некоторые же α -амилазы, особенно грибного происхождения, на второй стадии процесса гидролизуют субстрат более глубоко с образованием небольшого количества мальтозы и глюкозы. Схему гидролиза под действием α -амилазы можно записать следующим образом:

α -амилаза

Крахмал-----> α -Декстрины + Мальтоза + Глюкоза
гликоген (много) (мало) (мало)

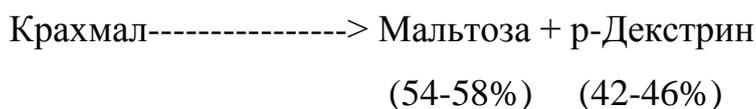
1.1.3.3 β -амилаза

β -амилаза (α -1,4-глюкан мальтогидролаза, КФ 3.2.1.2) - активный белок, обладающий свойствами альбумина. Каталитический центр фермента содержит сульфгидрильные и карбоксильные группы и имидозольный цикл остатков гистидина. β -Амилаза -экзофермент концевое действие, проявляющий сродство к предпоследней β -1,4-связи с нередуцирующего конца линейного участка амилозы и амилопектина. [19]

В отличие от α -амилазы β -амилаза практически не гидролизует нативный крахмал, тогда как клейстеризованный крахмал гидролизуетея ею с образованием мальтозы β -конфигурации, поэтому данная амилаза по аналогии с α -амилазой называется β -амилазой. Если гидролизу подвергается амилоза, то гидролиз идет полностью до мальтозы. Незначительное количество декстринов может образовываться при гидролизе «аномальных» амилоз, так как гидролиз β -амилазой идет только по линейной цепи до α -1,6-связей.

Если субстратом для β -амилазы служит амилопектин, то гидролиз идет в значительно меньшей степени. β -Амилаза отщепляет фрагмент с нередуцирующего конца участка от внешних линейных ветвей, имеющих по 20-26 глюкозных остатков, с образованием 10-12 молекул мальтозы. Гидролиз приостанавливается на предпоследней α -1,4-связи, граничащей с α -1,6-связью. В гидролизате накапливается 54-58% мальтозы, остальное составляют высокомолекулярные декстрины, содержащие значительное количество α -1,6-связей - так называемые β -декстрины. Действие β -амилазы на крахмал можно записать в виде следующей схемы:

β -Амилаза



β -Амилазы проявляют большую стабильность в отсутствие ионов Ca^{2+} . Молекулярная масса β -амилазы растений достаточно высока, она составляет от 50 000 до 200 000. Фермент может состоять из одной или четырех субъединиц до 50 000 каждая. Фермент содержит SH-группы и чувствителен к действию тяжелых металлов. Считается, что β -амилаза обладает высокой способностью к множественной атаке субстрата. Для амилозы средней молекулярной массы в одном присоединении фермента к субстрату возможно от-

щепление до четырех остатков мальтозы. При увеличении молекулярной массы субстрата возможно и большее количество мест атаки.

1.1.3.4 Глюкоамилаза

Глюкоамилаза (α -1,4-глюкан глюкогидролаза, КФ 3.2.1.3.) широко распространена в природе. Она синтезируется многими микроорганизмами и образуется в животных тканях, особенно в печени, почках, плаценте кишечника и т. д. Фермент в литературе известен под различными названиями: амилоглюкозидаза, γ -амилаза, лизосомальная α -глюкозидаза, кислая мальтаза, матулаза и экзо-1,4- α -глюкозидаза. Глюкоамилаза катализирует последовательное отщепление концевых остатков α -D-глюкозы с нередуцирующих концов субстрата. Это фермент с экзогенным механизмом воздействия на субстрат. Многие глюкоамилазы обладают способностью так же быстро, как и α -1,4-связь, гидролизовать α -1,6-глюкозидные связи. Но это происходит только в том случае, когда за α -1,6-связью следует α -1,4-связь, поэтому декстран ими не гидролизуется. Отличительной особенностью глюкоамилаз является способность в десятки раз быстрее гидролизовать высокополимеризованный субстрат, чем олиго-и дисахариды. [20]

В литературе высказывается мнение, что механизм атаки субстрата глюкоамилазой может быть двух типов: либо одноцепочечный, либо множественной атаки, и что активный центр имеет подцентровую структуру.

Почти все глюкоамилазы являются гликопротеидами, содержащими от 5 до 35% углеводов, которые состоят из олиго-, ди- и моносахаридов. Углеводный компонент может быть целостным фрагментом или же разбитым на индивидуальные соединения, которые прикрепляются к белку через треонин и серин. Например, у глюкоамилазы *A. niger* их 20. Большинство известных

глюкоамилаз имеет оптимум рН при 4,5-5,2, реже - при 5,7-6,0, в основном для дрожжевых глюкоамилаз.

рН-стабильность микробных глюкоамилаз лежит в широком диапазоне – от 2,5 до 9. Термостабильность глюкоамилаз лежит в интервале от 30 до 45°C и редко повышается до 55-60°C. Глюкоамилазы различного происхождения заметно отличаются по молекулярной массе, которая, по данным различных авторов, имеет значения от 48 000 до 210 000. Следует заметить, что далеко не все микробные глюкоамилазы способны полностью гидролизовать крахмал до глюкозы. Еще в 60-х годах И. Фукумото предложил все микробные глюкоамилазы разделить на два типа: [21]

- полностью гидролизующие крахмал до глюкозы и
- гидролизующие крахмал до глюкозы на 80-85%.

В то время предполагалось, что степень гидролиза зависит только от свойств глюкоамилаз и их происхождения. Позже было показано, что при росте культуры параллельно накапливаются и другие амилолитические ферменты, обладающие не только гидролитическим, но и трансферазным действием. Это гликозилтрансфераза и α -амилаза. Даже в случае, если система открытая и продукт гидролиза (глюкоза) постоянно удаляется из системы, процесс может дойти до полного гидролиза крахмала до глюкозы. Если же система закрытая и концентрация субстрата велика, то при достижении определенной концентрации глюкозы в реакционной среде в результате переноса гликозильных остатков на глюкозу, ди- и олигосахариды начинают накапливаться изомальтоза, паноза, нигероза, изомальтотриоза и другие сахара, которые имеют горький вкус. В результате процесс не может дойти до полного превращения крахмала в глюкозу и возникает ошибочное представление, что глюкоамилаза не полностью гидролизует крахмал. Сама же глюкоамилаза может проявлять небольшую трансферазную активность, но только при концентрации глюкозы свыше 60-70%. Поэтому ранее принятое деление глюкоамилаз на два типа следует считать необоснованным. [20]

1.1.3.5 Международная классификация ферментов

Ферменты - органические или биологические катализаторы белковой природы, с помощью которых ускоряют течение реакций. Способ воздействия ферментов характеризуется большой специфичностью, это означает, что один фермент катализирует в каждом данном случае определенную реакцию. Ферменты играют важную роль при проращивании ячменя, в процессах брожения и дображивания. [22]

Ферменты подразделяются на группы в зависимости от типа катализируемой реакции и на подгруппы, более точно характеризующие главные катализируемые реакции. В соответствии с номенклатурой ферменты делятся на шесть основных классов: оксидоредуктазы, трансферазы, гидролазы, лиазы, изомеразы, лигазы, или синтетазы. Вышеназванные классы ферментов подразделяются на подклассы, а последние – на более мелкие группы.

Согласно данной классификации каждый фермент имеет систематическое (рациональное) и тривиальное (рабочее) название и шифр, содержащий четыре числа, разделенных точками.

Первое число указывает, к какому из шести классов принадлежит данный фермент.

Второе число обозначает подкласс, четвертая цифра обозначает порядковый номер фермента в данном подклассе. Рассмотрим основные классы ферментов.

1-й класс. Оксидоредуктазы – ферменты, катализирующие окислительно-восстановительные реакции, т.е. перенос электронов от одного вещества (донора) к другому веществу (акцептору). Донор окисляется, а акцептор восстанавливается. Следовательно, эти ферменты участвуют в процессах дыхания и брожения. В этот класс входят различные дегидрогеназы, оксидазы, пероксидазы, гидроксилазы.

2-й класс. Трансферазы – ферменты, катализирующие реакцию перенос с одной молекулы на другую различных химических групп. Ферменты этого класса подразделяются по характеру переносимой группы. К этому классу относятся фосфотрансферазы, аминотрансферазы, метилтрансферазы, гликозилтрансферазы. Ферменты этого класса имеют большое значение в обмене веществ в живом организме.

3-й класс. Это гидролазы - ферменты, катализирующие реакцию расщепления сложных соединений на более простые с присоединением воды. К этому классу относятся многие ферменты, входящие в состав ферментных препаратов, выпускаемых в нашей стране и используемых при производстве пива и безалкогольных напитков. К этому классу ферментов относятся эстеразы, гликозидазы, фосфатазы, пептидазы, целлобиогидролазы. Биохимические реакции, протекающие в процессе солодоращения, катализируются ферментами класса гидролаз.

4-й класс. Лиазы – ферменты, катализирующие отщепление от субстрата определенных групп с образованием двойных связей или присоединение по месту этих связей. К этому классу ферментов принадлежат карбоксилазы, альдегидлиазы и другие. Эти ферменты участвуют в процессе брожения.

5-й класс. Изомеразы – ферменты, катализирующие изомеризацию органических соединений. К этому классу ферментов относятся рацемазы, эпимеразы, цистрансизомеразы и другие.

6-й класс. Лигаза – ферменты, катализирующие соединение, синтез сложных соединений из более простых путем распада пирофосфатной связи в молекуле аденозинтрифосфата (АТФ). Ферменты этого класса играют важную роль в биосинтезе белков, нуклеиновых кислот, жирных кислот.

Комплекс ферментов, содержащихся в дрожжах, осуществляет реакцию спиртового брожения. В этот комплекс входят следующие ферменты: оксидоредуктазы, трансферазы, лиазы и изомеразы.

1.2 Зависимость активности микробиологических амилаз от температуры

Для выражения каталитической активности Комиссией по ферментам Международного биохимического союза (1961 г.) была рекомендована стандартная единица, обозначенная на русском языке - Е, а на английском - U.

Стандартная единица - это такое количество фермента, которое при заданных условиях катализирует превращение одного микромоля субстрата за одну минуту. В 1972 г. Комиссия по ферментам Международного биохимического союза предложила выражать активность ферментов в каталах. Кatal (кат) - это такое количество фермента, которое способно превращать один моль субстрата за одну секунду (при оптимальных условиях).

К производным величинам, характеризующим активность ферментов, относят удельную каталитическую активность ферментов, концентрацию фермента в растворе и другие. Удельную каталитическую активность фермента или ферментативного препарата выражают в каталах на 1 кг белка ($\text{кат} \cdot \text{кг}^{-1}$) или чаще в мккат на 1 мг белка. Концентрацию фермента в растворе выражают в каталах на 1 литр ($\text{кат} \cdot \text{л}^{-1}$) или в других, кратных этому значению величинах. [23]

В отечественной спиртовой промышленности активность измеряется в несистемных единицах. [49, 24]

Амилолитическая способность (АС) препарата показывает, сколько граммов крахмала может быть гидролизовано до мальтозы и не окрашиваемых йодом декстринов 1 г или 1 мл препарата за 1 час при 30°C и оптимальной pH.

α -Глюкозидазная (мальтазная) способность (ГС) характеризует способность ферментных препаратов катализировать расщепление дисахарида мальтозы до глюкозы. За единицу α -глюкозидазной активности принято такое количество фермента, которое за 1 ч при 30° С катализирует расщепление 1 г мальтозы (безводной) до глюкозы в оптимальной для данного препа-

рата рН при степени гидролиза 30%. α -Глюкозидазная способность выражается числом указанных единиц в 1 г поверхностной или в 1 мл глубинной культуры. При таком способе выражения символ ГС непосредственно показывает, сколько граммов мальтозы может быть расщеплено до глюкозы 1 г или 1 мл культуры за 1 ч при 30° С.

1.2.1 Оптимальные температуры действия ферментов

Скорость ферментативной реакции зависит от температуры. Оптимальным считается то значение ее, при котором реакция протекает с максимальной скоростью. Для большинства ферментов, выделенных из организма теплокровных и многих микроорганизмов оптимальная температура составляет 37-40°С, для ферментов растительного происхождения – 40-50°С.

Повышение температуры сверх оптимальной приводит к уменьшению, а затем прекращению действия фермента, что связано с денатурацией. При переходе от оптимальной к низким температурам скорость ферментативной реакции падает в 2-2,5 раза на каждые 10 °С, достигая минимальной величины при 0 °С и приостанавливается при отрицательных её значениях (минус 18 °С). Причиной является снижение скорости движения молекул субстратов и ферментов, что замедляет образование фермент-субстратного комплекса и проведения реакции. [25]

При повышении температуры от отрицательных значений действие ферментов восстанавливается, скорость катализируемых реакций возрастает в 2-2,5 раза на каждые 10 °С, до оптимальной температуры. Принцип снижения активности ферментов при понижении температуры используется при консервировании сырья и готовой продукции низкими температурами. Инактивация ферментов высокой температурой необратима, используется в пищевой промышленности для консервирования многих продуктов растительного и животного происхождения.

Поскольку целью настоящей работы было исследовать возможность осахаривания крахмала при комнатных температурах приведем зависимость активности некоторых ферментов различных производителей от температуры и pH.

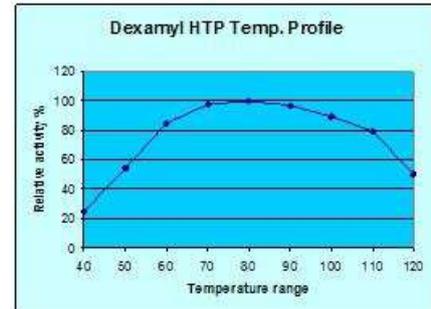
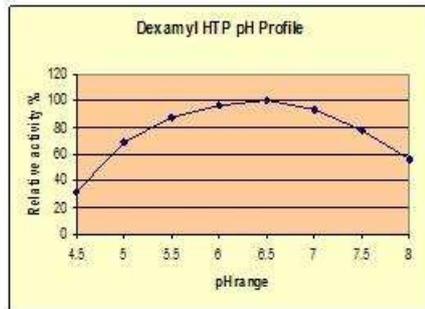


Рисунок 16 – Дехамул – термостойкая α -амилаза [26]

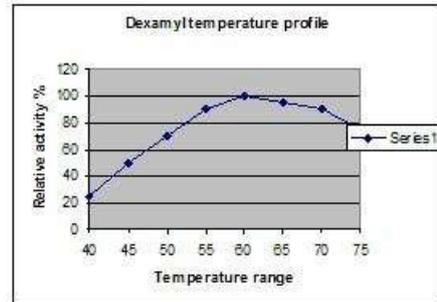
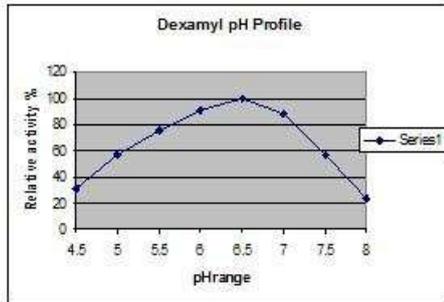


Рисунок 17 – Дехамул – термостойкая α -амилаза [26]

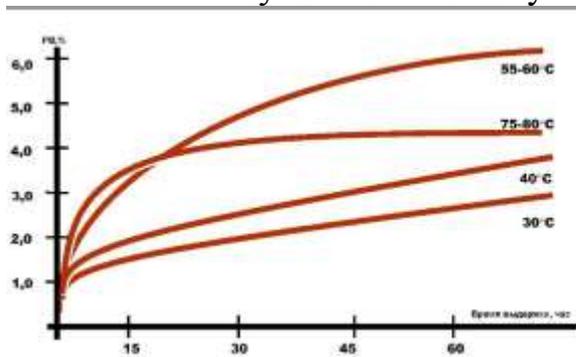


Рисунок 18 – Кривые гидролиза Амилоубтилином замесов зернового сырья при различных температурах (1 ед/г крахмала) [27]

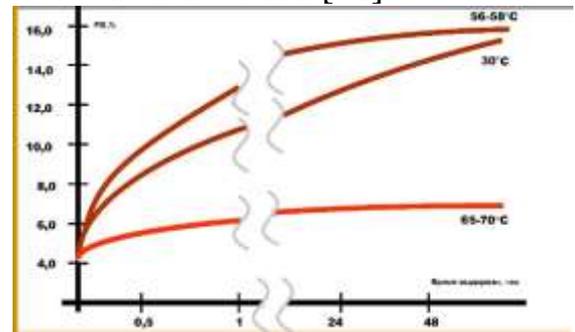


Рисунок 19 – Кривые гидролиза Глюкавамоорином при различных температурах (5 ед/г крахмала) [27]

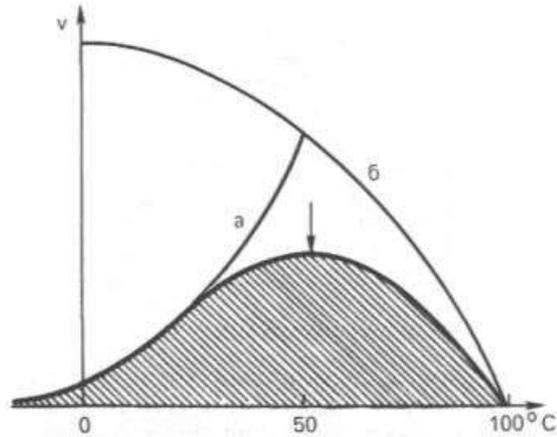


Рисунок 20 - Зависимость скорости катализируемой ферментом реакции от температуры: а - повышение скорости реакции как функция температуры; б - снижение скорости реакции как функция денатурации белка-фермента; стрелка указывает оптимум температуры. [28]

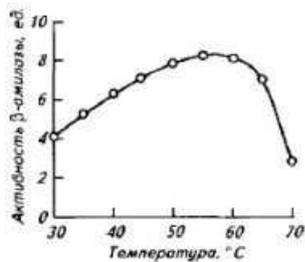
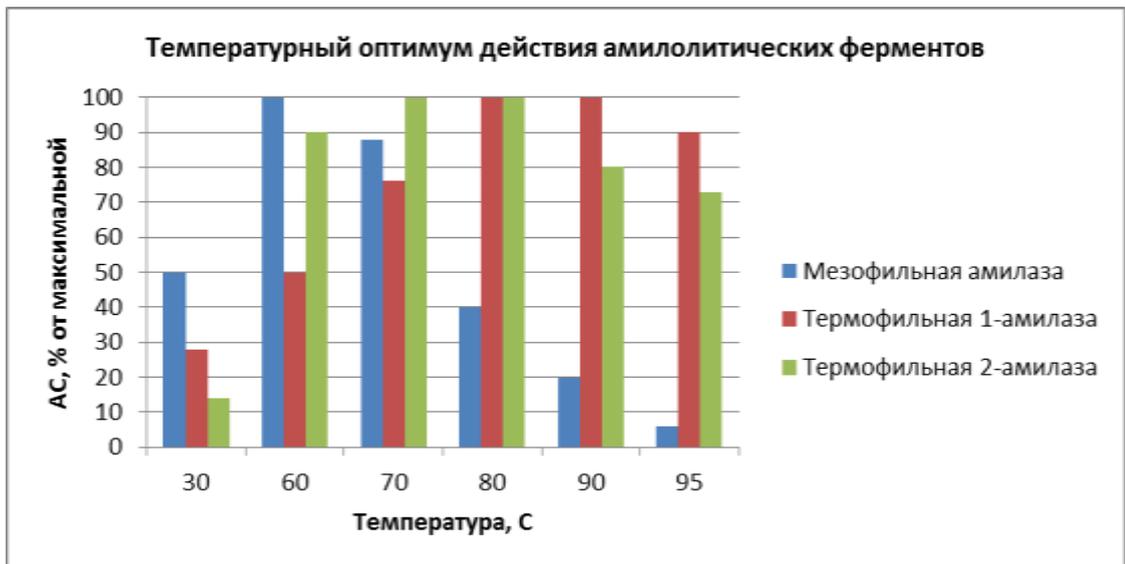


Рисунок 21 – Зависимость активности β-амилазы от температуры [29]



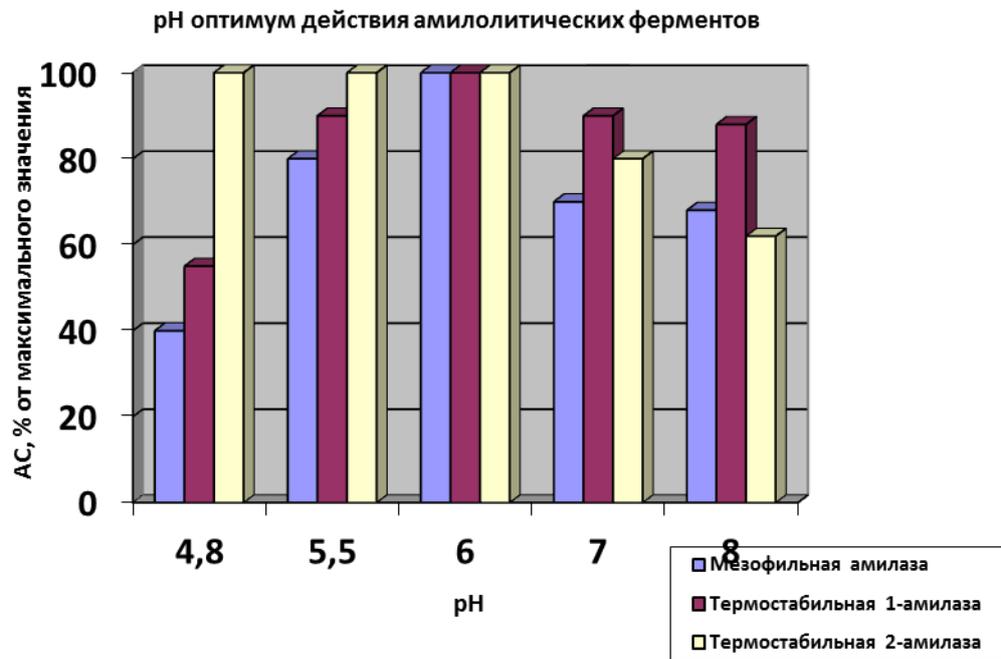


Рисунок 22 – Зависимость активности ферментных препаратов от температуры и pH [1]

1.2.2 Распад углеводов при температурах разваривания

При разваривании низкомолекулярные сахара разлагаются и теряются для дальнейшего питания дрожжей. Разложение протекает по трем основным реакциям, по интенсивности расположенным в следующий убывающий ряд [17]:

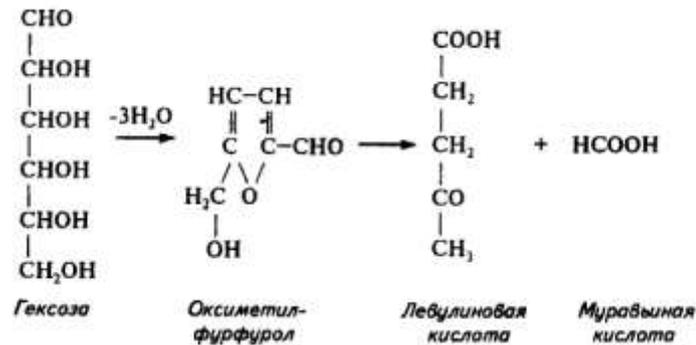
образование меланоидинов > оксиметилфурфурольное разложение > реверсия > карамелизация.

Реверсия - реакция обратная гидролизу (инверсии), когда образующиеся мономеры уплотняются то ди- три- и более высокомолекулярных моносахаридов. Ревертоз обычно образуется небольшое количество: 0,5% от количества сахара.

Карамелизация - реакция, характерная для расплавов сахара, и обычно протекает при значительно более высоких температурах: 185-186°. При этом образуется оксиметилфурфурол и окрашенные вещества. Однако при разва-

ривании роль карамелизации также невелика, поскольку температуры разваривания все же не достигают таких величин.

Оксиметилфурфуrolное разложение – основная реакция распада гексоз в процессе разваривания, происходит в результате дегидратации – отнятии трех молекул воды. Оксиметилфурфуrol неустоек и распадается в последующем до муравьиной и леволиновой кислот.



Количество сахаров, разлагающихся по оксиметилфурфуrolной реакции сильно зависит от рН среды (рис. 23)

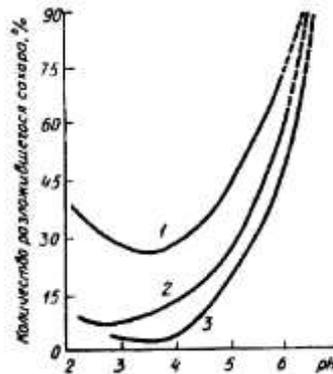


Рис. 23. Зависимость разложения моносахаридов от рН среды при жестком режиме варки:

1 – фруктозы; 2 – арабинозы; 3 – глюкозы.

Гидролиз резко тормозится при рН $\approx 4,2$. При рН 6,5 разлагается около 27 % мальтозы. Таким образом, с точки зрения сохранения сахаров оптимальным является рН $\approx 3,5$. Однако на практике способ подкисления пока не

нашел применения в связи с тем, что требуется дополнительный расход минеральных кислот и защита варочного оборудования от коррозии.

Вторая по интенсивности реакция разложения сахаров в процессе разваривания – **реакция образования меланоидинов** (сахароаминная реакция, реакция Майяра), протекающая сложным путем (механизм ее до конца не выяснен). Среди продуктов меланоидиновой реакции найдены алифатические альдегиды, фурфурол и его производные, формальдегид, диацетил, метилглиоксаль, ацетоин и др. С образованием меланинов связано потемнение очищенных яблок и картофеля при непродолжительном хранении на воздухе.

Скорость меланоидиновой реакции можно снизить тем же путем, что и скорость оксиметилфурфурольного разложения сахаров, – смягчением режима разваривания и подкислением среды до рН 3,5, так как при таком рН скорость этой реакции в 3÷5 раз меньше, чем при рН \approx 6,5.

Ни меланоиды, ни карамели дрожжами не расщепляются и не потребляются, т.е. теряются в технологическом плане.

Таким образом, основной путь снижения потерь сахара – смягчение режима разваривания в результате тонкого измельчения сырья.

1.3 Низкотемпературные способы подготовки спиртового сусла

Основная цель данной группы методов – максимально снизить отрицательные эффекты высокотемпературного разваривания, что достигается использованием микробиологических ферментных препаратов, начиная со стадии замеса. В первую очередь вносится источник α -амилазы, разжижающего фермента, что позволяет уже в процессе прогрева сусла до оптимальной температуры действия фермента (65-75°C в зависимости от природы фермента) предотвратить клейстеризацию крахмала и избежать скачкообразного роста вязкости.

Внесение осахаривающих ферментов на этой стадии не предусматривается, поскольку после разжижения следует стадия пастеризации (90°C), а при низком качестве зерна – стерилизации (105-110°C), для обеспечения микробиологической чистоты суслу. Присутствие при подобных температурах низкомолекулярных сахаров неизбежно приведет к их полному или частичному распаду до не потребляемых дрожжами веществ и, как следствие, снижению выхода спирта. Исключается возможность использования комплексных ферментов типа амилоглюкаваморина, отсутствует синергическое¹ действие α - и глюкоамилазы, в большой степени остаются известные недостатки температурного разваривания: высокий расход энергоресурсов, длительность процесса, распад сахаров, меланоидинообразование и пр.

На следующем этапе в разжиженное (декстринированное) сусло добавляется источник глюкоамилазы (иногда и α -амилазы) для окончательного осахаривания при оптимуме действия ферментов (55-60°C). Завершается процесс охлаждение готового суслу до температуры складки дрожжей (25-30°C).

Наиболее характерным примером данного типа подготовки суслу является МФО. Все другие модификации метода направлены в основном на устранение стадии пастеризации (стерилизации) суслу для достижения его микробиологической чистоты, иногда – сокращение времени процесса изготовления суслу.

1.3.1 Механико-ферментативная обработка замеса

Механико-ферментативная обработка (МФО) сырья, при которой разваривание и осахаривание производится на одной установке, в более щадящих режимах. [9, 7]

¹ Синергизм - усиление действия 2-х или нескольких ферментов применяемых совместно, продукты гидролиза первого фермента дают возможность для их гидролиза вторым.

Вместо разваривания производится двухступенчатая биоконверсия сырья с промежуточной стерилизацией. Биоконверсия осуществляется с раздельным использованием гидролитических ферментов: бактериальной α -амилазой на предварительной стадии гидролиза при температуре $68\div 75^\circ\text{C}$ и глюкоамилазой на основной стадии гидролиза при $56\div 58^\circ\text{C}$.

Процесс МФМО осуществляется при температуре ниже полной клейстеризации, при интенсивном механическом перемешивании (перемешивающими устройствами и циркуляционными насосами).

На предварительной стадии в смесителе равномерно смешивают муку тонкого помола (проход зерна через сито 1 мм $80\div 85\%$) с водой и суспензий α -амилазы с подогревом до $50\div 55^\circ\text{C}$ и выдержкой 12-15 мин.

Смесь поступает в аппарат ферментативной обработки 1 ступени (АФО, в ряде источников АФО-I, обычно 2 штуки – 1 рабочий, 2 - резервный), снабженный рубашкой, лопастной мешалкой и циркуляционным насосом, которым жидкость забирается снизу и возвращается обратно сверху. В АФО проходит частичная клейстеризация крахмала, разжижение замеса α -амилазой, усиливаемого интенсивным перемешиванием мешалкой и циркуляционным насосом, декстринизация и частичный гидролиз под действием как введенного ФП, так и собственных ферментов сырья при температуре $68\div 75^\circ\text{C}$, атмосферном давлении и выдержке 2-5 часов (в зависимости от вида сырья).

Затем смесь самотеком поступает в аппарат ферментативно-тепловой обработки (АФТО или в ряде источников - АФО-II) горизонтального типа, основная цель: дополнительная клейстеризация и пастеризация. Аппарат разделен на три секции перегородками с переливными устройствами и мешалками лопастного типа. При поступлении массы в первую секцию АФТО масса вторичным паром нагревается до $70\div 80^\circ\text{C}$, происходит интенсивная клейстеризация с одновременным разжижающим действием α -амилазы при выдержке 15 мин. Во второй секции производится нагрев острым паром до

85÷87°C, степень клейстеризации возрастает. В третьей секции масса нагревается до 90÷95°C. Клейстеризуются труднодоступные комочки, действие α -амилазы, хотя и значительно снижается, но еще сохраняется. При затруднении перекачивания массы насосом на дальнейшую обработку в аппарат дополнительно разово вводится α -амилаза.

В аппаратах АФО и АФТО происходит практически полный гидролиз сырья и его пастеризация. Однако при переработке загрязненного и дефектного сырья предусмотрена дополнительная стерилизация в трубчатом выдерживателе полного вытеснения с дополнительным нагревом острым паром до температуры 100÷105°C и выдержкой 5÷6 мин.

Введенной α -амилазы достаточно для полного растворения крахмала и его полного гидролиза до декстринов, поэтому в испарителе-осахаривателе, куда масса поступает после АФТО через паросепаратор-накопитель (использование вторичного пара), α -амилазу не добавляют. Испаритель-осахариватель обычной конструкции работает под разрежением для охлаждения массы до 56÷58°C испарением, затем производят дозированную подачу глюкоамилазы для окончательного осахаривания (глюкоамилаза – осахаривающий фермент) (и для предотвращения нарастания кислотности – 0,002÷0,025% формалина) и выдержку 25÷30 мин для гидролиза декстринов до полного осахаривания по йодной пробе.

Сусло передавливают непосредственно в дрожжевой аппарат, либо захлаживают до температуры складки в теплообменнике труба в трубе.

Ориентировочные расходы ФП на 1 г условного крахмала [30, 31]:

1,5÷2 ед. α -амилазы;

6÷6,5 ед. глюкоамилазы.

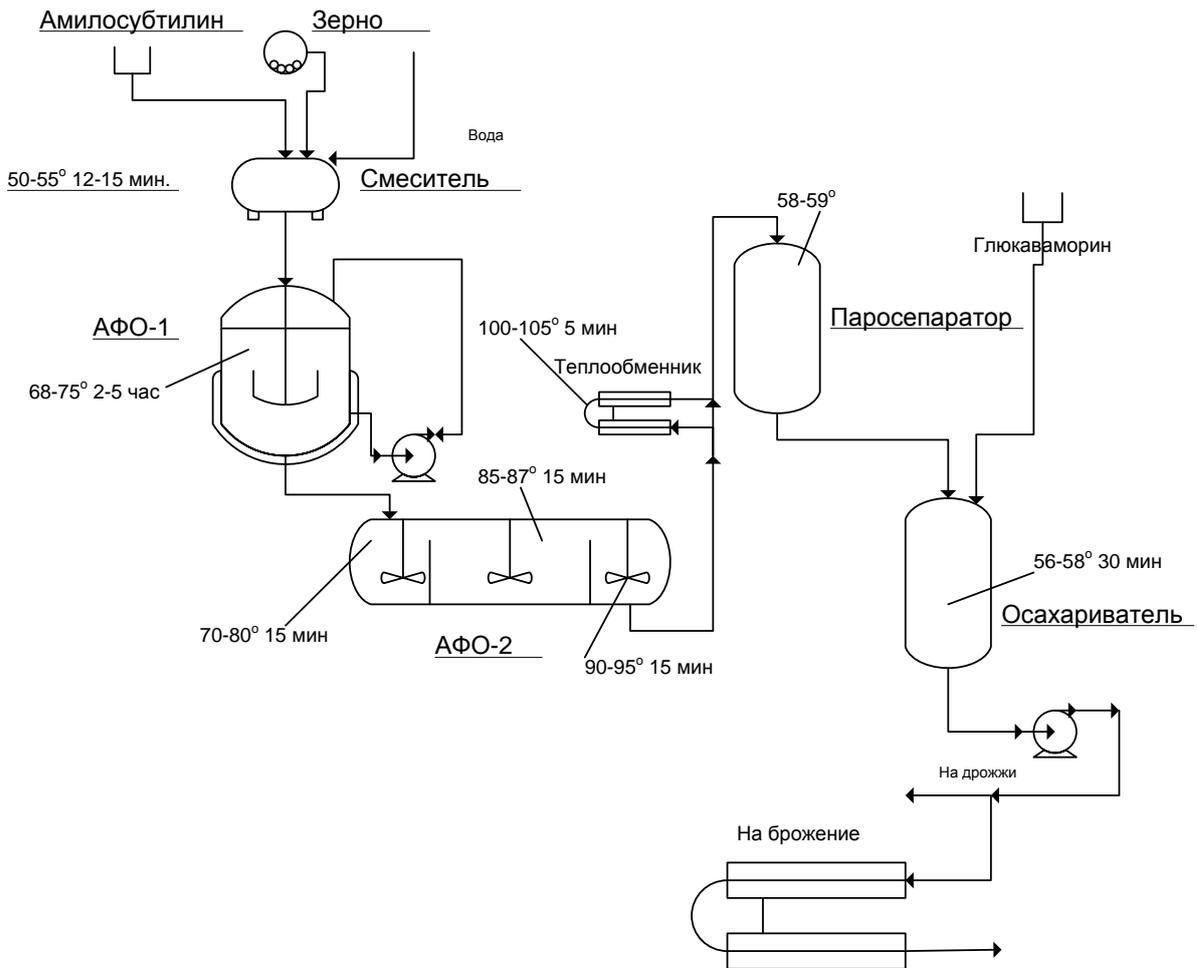


Рисунок 24 - Схема механико-ферментативной подготовки крахмалистого сырья

Преимущества способа:

1. За счет снижения температуры разваривания с $140\div 145^{\circ}\text{C}$ до $100\div 105^{\circ}$ уменьшается расход пара на разваривание на $30\div 40\%$.
2. Потери сбраживаемых веществ уменьшаются в результате снижения температуры разваривания до 100°C на $2\div 3\%$, расход зерна – на $1\div 2\%$ - увеличение выхода спирта на $0,4$ дал с 1 т условного крахмала.
3. Отпадает необходимость использования варочных аппаратов под давлением, контролируемых органами Госкотлонадзора – повышается безопасность производства.
4. Уменьшаются затраты на производство осахаривающих материалов – исключается солодовенный и ферментный цеха, т.к. используются покуп-

ные препараты – Глюкаваморин ГЗх и Амилосубтилиин ГЗх.

Недостатки:

1. Несколько увеличивается расход электроэнергии: на 3,1 кВт/ч.
2. Исследование МФО В промышленных масштабах [32] на содержание микропримесей в спирте и его органолептические показатели показало, что по мере снижения температуры разваривания сырья в ряду 145, 135, 110 и 70°C происходит уменьшение количества микропримесей в спирте, причем наименьшее их число обнаружено в конечном продукте при 70 °С. Однако практика работы предприятий по "мягкой" схеме наглядно продемонстрировала и существенные недостатки способа.

Во-первых, на этих предприятиях зарегистрированы низкие значения выхода спирта с 1 т условного крахмала, который, как правило, не превышает нормативных показателей, а в некоторых случаях оказывается даже ниже таковых. Это связано с тем, что "мягкая" схема чрезвычайно чувствительна к качеству и стабильности помола: снижение регламентированной величины прохода измельченного зерна через сито с диаметром отверстий 1 мм (должна быть не менее 75-80 %) даже на 5 % приводит к значительному снижению выхода спирта. Поэтому по этим схемам не удастся результативно разваривать сырье при температурах ниже 100 °С, в связи с чем приходится проводить заключительный процесс «доразваривания» - тепловую обработку затора в трубчатом стерилизаторе-нормализаторе при температурах выше 105-120 °С.

Во-вторых, перерабатывать на этих предприятиях рожь очень тяжело, так как высоковязкие заторы и сусло с трудом подвергаются гидроферментативной обработке и сбраживанию. В большинстве случаев зрелую ржаную бражку характеризуют сверхнормативным содержанием несброженных сахаров, увеличенными значениями величин отброда и нерастворенного крахмала, причем длительность сбраживания сусла после переработки ржи увеличивается. Для повышения функциональной стабильности работы этих технологических схем предприятия вынуждены на 15-20 % увеличивать норматив-

ный расход как разжижающих, так и осаживающих ферментов, особенно при переработке ржи.

Причина этих недостатков - несоблюдение принципиальных и важнейших факторов, определяющих эффективность процесса разваривания крахмалистого сырья при температурах ниже 100 °С, таких, как недостаточное измельчение зерна и отсутствие причины его растворения.

1.3.2 ИК-обработка зерна перед развариванием

В работах [33, 34] описан способ ИК обработки зерна, что позволяет отказаться от пастеризации замеса при МФО перед осаживанием. Метод ИК-обработки позволяет целенаправленно изменять исходные технологические свойства сырья. Глубина и характер данных изменений зависят от режимных параметров нагрева, характеристик обрабатываемого материала и в целом оптимизируются с учетом достижения необходимого результата в каждой конкретной отрасли.

Зерно с влажностью 12,0-16,0% подвергают ИК-обработке при плотности лучистого потока $E=16-18$ кВт/м² в течение 40-50 с. Затем обработанное зерно измельчают по одноступенчатой схеме дробления с использованием молотковой дробилки или вальцевого станка. Степень измельчения характеризуется 95-100%-ным проходом через сито с $d=1$ мм. Далее помол смешивают с водой при гидромодуле 1:3,5-1:4,0.

Температура используемой воды выбирается с таким расчетом, чтобы конечная температура замеса после ввода комплекса ферментных препаратов составляла 56-58°С. Ферментные препараты разжижающего действия используют в количестве 1,5-2,0 ед. АС на 1 г условного крахмала сырья, осаживающего действия - 5,5-6,5 ед. ГЛА на 1 г условного крахмала сырья и протеолитического действия - 0,01-0,02 ед. ПС на 1 г белка сырья.

Продолжительность обработки замеса при температуре 56-58°С составляет 3-4 ч. Полученное осаживанное сусло охлаждают, вводят дрожжи и

сбраживают в течение 40-48 ч, бражку перегоняют с получением этилового спирта. Изобретение позволяет упростить технологический процесс, повысить выход спирта и снизить его себестоимость.

К недостаткам данного способа относятся дополнительные энергозатраты на ИК-обработку зерна, высокий расход ферментных препаратов, в том числе дополнительных - протеолитического действия. [10]

1.3.3 Роторно-пульсационная обработка зерна

Способ получения этилового спирта [10] предусматривает шелушение зерна с получением фракции шелухи в количестве 2-5% масс. от общей массы зерна и фракции, содержащей эндосперм, смешивание фракции, содержащей эндосперм, с водой при гидромодуле 1:(3,5-4,0), внесение амилолитических ферментных препаратов разжижающего и осахаривающего действия в количестве 0,5-1,0 ед. АС и 2,0-3,0 ед. ГлС/г условного крахмала, диспергирование смеси в роторно-пульсационном аппарате при скорости обработки $1,5-3,0 \cdot 10^3$ об/мин в течение 5-10 минут при температуре 56-58°C с получением замеса, обработку замеса при 56-58°C в течение 2-2,5 часов с получением осахаренного сусла, его охлаждение, сбраживание и перегонку бражки с получением этилового спирта.

По данным авторов, данный способ, по сравнению с обычным МФО, позволяет значительно снизить энергозатраты за счет исключения стадии, предусматривающей ИК-обработку зерна, и совмещения стадий дробления и получения замеса, уменьшить расход основных ферментных препаратов амилолитического действия в среднем 2-3 раза, полностью отказаться от применения дополнительных ферментных препаратов протеолитического действия, сократить длительность водно-тепловой и ферментативной обработки на стадии получения сусла на 0,5-1,5 часа.

Применяются также другие способы измельчения: мельница кавитационного измельчения [35], шаровая коллоидная [39].

1.3.4 Озонирование зерна

Для исключения стадии пастеризации замеса при МФО авторами [36] предложено проводить его озонирование. Мойку зерна осуществляют холодной водой, причем зерно после мойки подают в емкость для озонирования, туда же направляют озонированную воду в соотношении 1:1, и ведут обработку 10-15 мин при температуре не выше 15-20°C, далее обеззараженное зерно подают в аппарат гидротермической обработки, причем одновременно в него через расходомер направляют воду с температурой 60°C и гидротермическую обработку замеса проводят в течение 1 ч.

1.4 Технология производства спирта без разваривания зерна

1.4.1 Технология Genencor's STARGENTM

До недавнего времени заводы по производству спирта обрабатывали зерно и другое крахмалосодержащее сырье в присутствии термостабильных ферментов для превращения крахмала в сбраживаемый сахар. Этот традиционный подход вскоре будет заменен на технологию, использующую новую платформу ферментов, разработанных компанией Genencor International. Genencor's STARGENTM - линия ферментов для гидролиза гранул крахмала, которая превращает необработанный крахмал в сбраживаемый сахар непрерывно в процессе одновременного осахаривания и ферментации. [37] Есть несколько потенциальных преимуществ этой новой технологии, в том числе увеличение производительности, снижение расходов энергии, более высокие показатели производства спирта и снижение расходов путем сокращения операций в различных подразделениях.

Для поддержки развивающегося рынка производства этанола компания Genencor разработала линию ферментных продуктов STARGEN™. Это новые ферменты для гидролиза гранул крахмала, используемые в энергосберегающих процессах и эффективно гидролизующие крахмал, который не подвергается развариванию. Благодаря новой технологии сократится потребность в разваривании крахмала с использованием большого количества энергии и появится возможность более эффективного и экономного производства глюкозы для превращения в спирт и других биопродуктов и биоматериалов.

Линия продуктов STARGEN™ включает в себя смеси ферментов, которые оказывают синергичное влияние на гранулированный крахмал. Смесь состоит из α -амилазы и глюкоамилазы, которые «просверливают» отверстия в гранулах крахмала. Примеры организмов, производящих глюкоамилазы в природе – это *Aspergillus niger*, *Hemicola grisea* и *Rhizopus oryzae*. Примеры организмов, производящих α -амилазы в природе – *A. niger*, *A. kawachi*, *R. niveus* и *B. polymyxa*. Ферментные продукты STARGEN™ способны гидролизировать нерастворимые (неразваренные) гранулы крахмала в сбраживаемый сахар, позволяя деполимеризировать крахмал в глюкозу в процессе одновременного осахаривания и ферментации (SSF) для производства этанола. Компания Genencor достигла высокого уровня выделения этих ферментов в промышленном производстве, при этом предложив разумные цены для их широкого использования.

Преимущества ферментов STARGEN™ по сведениям разработчиков:

Экономия энергии – отсутствие обработки острым паром. Использование энергии в традиционном процессе – основной расход при производстве. Тепло, которое используется при приготовлении зерна для катализации ферментативного разваривания, расходует огромное количество энергии. Процесс без разваривания с помощью ферментов STARGEN™ позволяет значительно экономить энергию и затраты.

Снижение капиталоемкости – отсутствие оборудования для разваривания и охлаждения. В традиционном процессе в результате приготовления зерно гидратирует или превращает крахмал в гель, что приводит к высокой вязкости суспензий зерна. Для этих процессов необходимо специальное оборудование для разваривания и последующего охлаждения. Для эффективного действия ферментов STARGEN™ не требуется разваривание, поэтому нет необходимости в оборудовании. Это позволяет значительно сократить расходы для строительства новых заводов и расширении существующих.

Сокращение эксплуатационных затрат – сокращение рабочей силы и снижение использования химических веществ. В процессе без приготовления необходима одна ступень регулирования уровня pH. Это упрощает процесс и сокращает расход по сравнению с традиционным процессом, который требует приготовления и двойного регулирования уровня pH, так как сжижение (pH 5-6) и осахаривание/ферментация (pH 3- 4,8) проходят на разных уровнях pH. К тому же при традиционном способе производства спирта может потребоваться добавление кальциевых солей, чтобы стабилизировать α -амилазы при высокой температуре, в результате этого могут образоваться нерастворимые соли (пивные камни).

Увеличение объемов производства – высоко-продуктивная ферментация. Вязкость ограничивает концентрацию сбраживаемых сухих веществ в процессе приготовления при традиционном производстве этанола. Способность использовать более высокие твердые вещества с помощью ферментов STARGEN™ может привести к увеличению продуктивности заводов без дополнительных вложений капитала.

Более высокая эффективность процесса – максимальное количество спирта на единицу сахара. В процессе приготовления при традиционном способе производства спирта наблюдаются некоторые потери сбраживаемого сахара, который можно было бы использовать для производства этанола. В процессе без разваривания используется механизм непрерывного под-

питки глюкозой (SSF), в результате которого улучшается эффективность превращения крахмала в этанола.

Надежный процесс – здоровые дрожжи. При использовании ферментов STARGEN™ низкая концентрация сбраживаемого сахара в бродильном аппарате увеличивает количество активных дрожжей и ограничивает рост нежелательных микроорганизмов. В результате происходит более эффективное превращение крахмала в этанол.

Ферментация высокой плотности – улучшение пропускной способности дистилляции. Прямая конверсия гранулированного крахмала с использованием ферментов STARGEN™ обеспечивает ферментацию при высокой плотности нерастворимых сухих веществ. Этот процесс сокращает осмотическое давление на дрожжи, в результате получается более высокая концентрация этанола и улучшенная пропускная способность на последней ступени дистилляции.

Сокращение побочных продуктов – снижение уровня глицерина и органических кислот. Так как при использовании ферментов STARGEN™ не получается высокой концентрации растворимых твердых веществ в бродильном аппарате, продукт брожения подвергается более низкому осмотическому давлению по сравнению с традиционным производством этанола. В результате этого процесса дрожжи производят меньше побочных продуктов, например глицерина. Благодаря сокращению производства глицерина, больше глюкозы превращается в этанол.

Улучшение сухой послеспиртовой барды (DDGS) – высокопротеиновый корм животных. Путем устранения разваривания минимизируется реакция Майярда во время производства этанола. В результате образуется больше крахмала для ферментации и протеинов для DDGS.

Увеличение эффективности конверсии углерода (увеличение пропускной способности) при использовании ферментов STARGEN™ также может привести к высокому содержанию протеинов в DDGS. К тому же использование ферментов STARGEN™ обеспечивает снижение уровня глицерина.

Это улучшает процесс сушки DDGS, так как высокая влагоудерживающая способность глицерина влияет на высокие затраты энергии во время сушки дробины.

Экономия воды – минимальное количество отходов и сокращение затрат. Относительно низкие сбрасываемые твердые вещества в большинстве традиционных процессов производства спирта приводят к более высокому растворению и большему расходу воды. С помощью ферментов STARGEN™ в бродильный аппарат можно добавить больше сухих веществ, тем самым снизив расход воды.

1.4.2 Коллоидное измельчение зерна

Первые систематические исследования в области механохимии крахмала были начаты нами под руководством действительного члена Академии наук БССР проф. С. М. Липатова на основе совместно проведенных работ по изучению структуры крахмала и механизма его клейстеризации.

Было установлено, что диспергирование крахмалсодержащего сырья позволяет осахаривать его без предварительного разваривания, причем выход спирта из такого сырья на 5-7 %, выше, чем из разваренного сырья, вследствие отсутствия потерь, неизбежных при разваривании, а также благодаря тому, что в результате диспергирования необрушенных злаков из диспергированной гемицеллюлозы оболочек злаков образуется некоторое количество сбрасываемых веществ. [38]

При переработке диспергированного крахмалсодержащего сырья (толстоленчатого зерна) увеличивается выход спирта за счет исключения потерь сбрасываемых веществ, неизбежных при разваривании крахмалсодержащего сырья, а также за счет сбрасывания некоторой части диспергированных оболочек злаков. [39]

Технико-экономическое обоснование диспергирования крахмалсодержащего сырья взамен разваривания под давлением было сделано еще в 1960 году. [40]

Следует отметить, что, несмотря на то, что молекулярный вес диспергированного крахмала примерно вдвое меньше нативного, медные числа крахмалов одинаковы, т. е. можно предположить практически полную сохранность кислородных мостиков макромолекулы крахмала. Это дало возможность разработать новый метод получения спирта без разваривания крахмала. [38]

Было установлено, что диспергирование крахмалсодержащего сырья позволяет осахаривать его без предварительного разваривания, причем выход спирта из такого сырья на 5-7 %, выше, чем из разваренного сырья, вследствие отсутствия потерь, неизбежных при разваривании, а также благодаря тому, что в результате диспергирования необрушенных злаков из диспергированной гемицеллюлозы оболочек злаков образуется некоторое количество сбраживающих веществ. [38]

Применение диспергирования крахмалсодержащего сырья исключает необходимость разваривания его под давлением, вследствие чего на спиртовом заводе исключается расход пара давлением 4 - 5 ати и уменьшается расход механической энергии до 20 кВт на подработку овса или ячменя.

Существующее оборудование для подработки зерна, его разваривания и выдерживания разваренной массы заменяется установками для диспергирования (шаровыми или вибрационными мельницами). Для подогревания смеси диспергированного крахмалсодержащего сырья с водой для осахаривания при 58° используется теплая вода (70°), отходящая из дефлегматора.

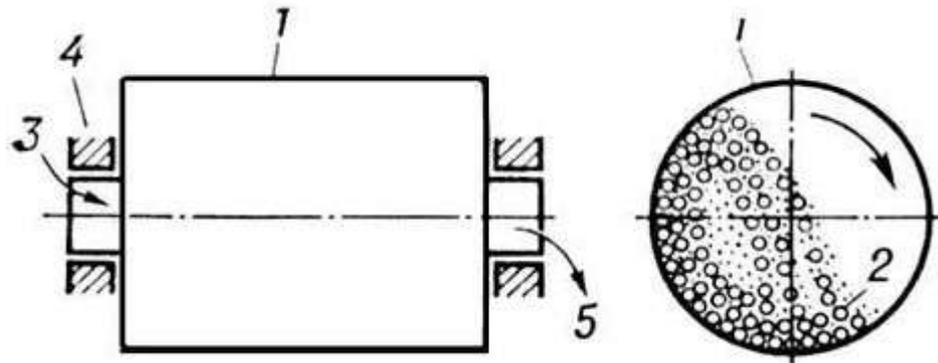
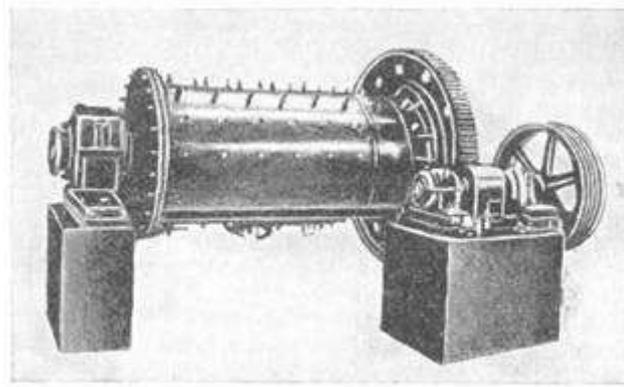


Рисунок 25 - Шаровая мельница СМ-15:

1 - барабан; 2 - дробящие тела (шары); 3 - загрузка исходного материала; 4 - подшипники; 5 - разгрузка измельченного материала.

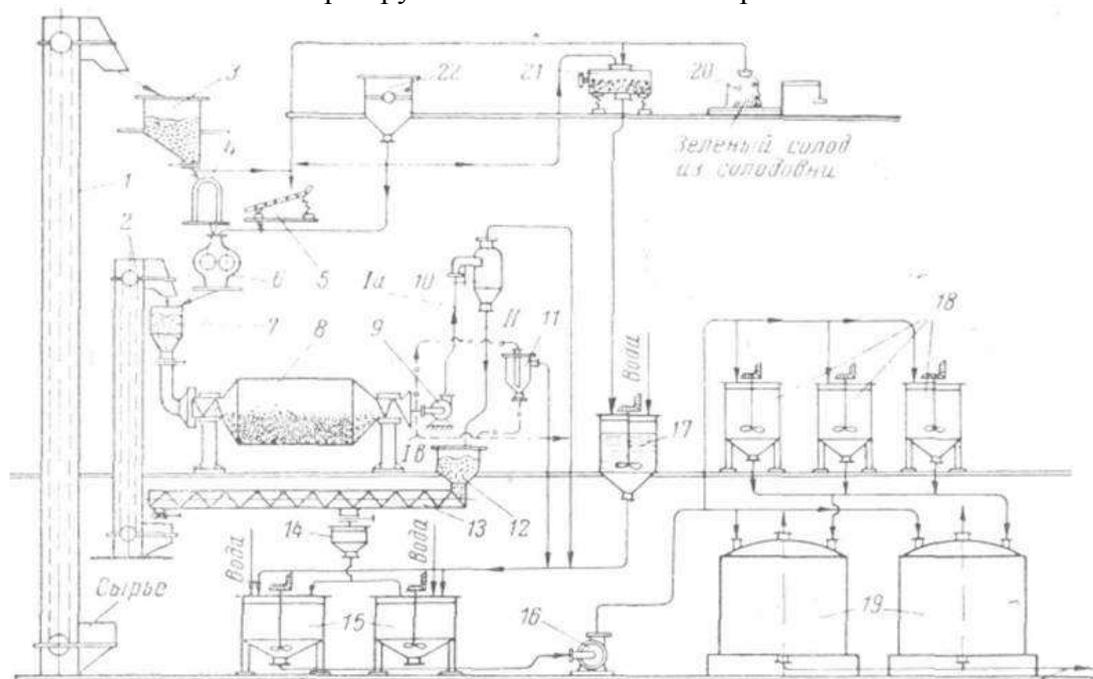


Рисунок 26 - Принципиальная схема получения спирта без разваривания сырья:

1, 2- транспортеры; 3 - бункер; 4 - автоматические весы; 5 - дозатор сырья; 6 - молотковая или вальцовая дробилка; 7- бункер-дозатор; 8-вибрационная или коллоидная мельница; 9 - устройство для нагнетания измельченного сырья в циклон; 10 - циклон; 11 - гидрокласификатор; 12 - промежуточный сборник; 13 - шнек; 14 - сборник-дозатор; 15 - осаживатели; 16 - центробежный насос; 17 - чан для зеленого солода; 18 - дрожжанки; 19 - бродильные чаны; 20 - весы для зеленого солода; 21 - вибромельница (для солода); 22 - дозатор воды.

Разработанный способ получения спирта без разваривания сырья на заводе с суточной производительностью 1000 дал спирта вызовет следующие изменения:

- 1) ликвидируется цех подработки зерна и его оборудование; моторы общей мощностью 20 кВт демонтируются;
- 2) оборудуется цех диспергирования, в котором устанавливаются шаровые или вибрационные мельницы с электромоторами общей мощностью 500 кВт.

Внедрение новой схемы технологического процесса получения спирта позволит увеличить выход спирта в среднем на 5%, что дает снижение стоимости сырья (овса и ячменя) на 1 дал спирта в среднем на 2,5 рубля (здесь и дальше расчеты даны по ценам 1960 г.).

Для определения экономии при внедрении диспергирования взамен разваривания необходимо установить расходы на разваривание и диспергирование и сопоставить их с получаемым снижением стоимости переработки сырья при диспергировании.

Расходы на разваривание

На периодическое разваривание зерна расходуется до 60% пара по весу сырья, т. е. до 600 кг на 1 т сырья, а на полунепрерывное, с использованием экстрапара, - 400 кг на 1 т зерна. Так как 1 кг условного топлива может дать 6,5 кг пара, то для получения 400 кг пара необходимо 61,5 кг условного топлива.

При стоимости 1 кг условного топлива 0,25 руб. 61,5 кг его будет стоить 15,4 рубля, что составляет 0,5 руб. на 1 дал спирта.

Расходы на диспергирование

Средний расход электроэнергии на диспергирование составляет 250 квт-ч на 1 т зерна, или 8 квт-ч на 1 дал спирта.

При стоимости электроэнергии 18 коп. за 1 квт-ч расходы на диспергирование составят 1,44 рубля на 1 дал спирта. Использование электроэнергии новых электростанций позволит уменьшить ее стоимость до 6 коп. за 1 квт-ч, что снизит расходы на диспергирование до 0,48 рубля.

Таким образом, стоимость диспергирования в первом случае (18 коп. за 1 квт-ч) превышает стоимость разваривания на $1,44 - 0,4 = 1,04$ руб. на каждый дал спирта.

Во втором случае (при использовании электроэнергии новых электростанций) стоимость диспергирования равна стоимости разваривания ($0,48 - 0,4 = 0,08$ руб.).

Эффективность диспергирования зернового сырья

Диспергирование овса и ячменя уменьшает себестоимость переработки сырья в среднем на 2,5 рубля на 1 дал спирта. Так как стоимость диспергирования превышает стоимость разваривания на 1,04 руб. (при использовании существующего тарифа) и на 0,08 руб. (при использовании электроэнергии, получаемой от новых тепловых электростанций), то эффективность диспергирования составит:

в первом случае $2,5 - 1 = 1,5$ руб.,

во втором случае $2,5 - 0 = 2,5$ руб. на 1 дал спирта.

При суточной производительности завода 1000 дал спирта экономия составит:

1500 руб. при среднем существующем тарифе на электроэнергию и

2500 руб. - при новом тарифе.

При работе завода на толстоульчатом зерне в течение 200 дней годовая экономия составит:

в первом случае $1500 \times 200 = 300$ тыс. руб.

во втором случае $2500 \times 200 = 500$ тыс. руб.

Капиталовложения, необходимые для реконструкции спиртового завода производительностью 1000 дал спирта в сутки, составят (в рублях):

стоимость и монтаж шаровых мельниц $5 \times 40\,000 = 200\,000$

монтаж вспомогательного оборудования 100 000

В с е г о ... 300 000

Таким образом, затраты, связанные с изменением технологического процесса, т.е. переходом от разваривания зернового сырья под давлением на систему диспергирования крахмалсодержащего сырья, окупятся в первом случае через год, а во втором - за 7 месяцев.

1.4.3 Совмещение процесса гидролиза крахмала с брожением

В работе [41] было исследовано брожение пивного сусла в присутствии микробиологической α -амилазы. Авторы отмечают, что при обычном процессе сбраживания дрожжи испытывают стресс из-за высокого осмоса и готовое пиво содержит высокие концентрации уксусной кислоты и эфиров, что создает проблемы с качеством пива при использовании высоких концентраций сусла (плотное пивоварение). Источник α -глюкозидазы был добавлен в пивное сусло плотностью 20% в количестве 800 мг/л, сбраживание проводили при 10°C с дрожжами низового брожения W 34/70. Выход спирта составил 77% от теоретического, что на 16% выше, чем в контрольной брожения, а концентрация уксусной кислоты составила 200 мг/л, что было на 85 мг/л ниже, чем в контроле. Когда α -глюкозидаза была добавлен в концентрации 400 мг/л в 20%-ное сусло, содержащее 6,2% декстрина, их концентрация снизилась до 3,7% к концу брожения, выход спирта составляет 75%, что на 19% выше, чем в контроле. Таким образом, добавка микробиологических

ферментов позволяет использовать солод с низкой диастатической силой, получив пиво с более низким содержанием уксусной кислоты и эфиров.

В этом же направлении японскими учеными проведены исследования сбраживания сула из неразваренного батата с применением смеси ферментных препаратов [12].

Сущность способа заключается в следующем: неразваренное сырье со средним содержанием крахмала 26,5 % промывали и погружали на 12 ч в 0,2% -ный раствор H_2SO_4 , дробили на частицы размером 2×4 мм, выдерживали при 12-26 °С и рН 4,5, осахаривали с применением глюкоамилазы и пектиновой деполимеразы, полученных культивированием *Rhizopus niveus* и *Asp. niger* на пшеничных отрубях, и сбраживали дрожжами *Saccharomyces cerevisiae*. При 5-суточном брожении образовалось 220 г глюкозы из 1 кг неразваренного батата и соответственно 100 г спирта, а за 9 суток брожения выход спирта увеличился до 119 г. При использовании только одного из ферментных препаратов выход спирта значительно снижался.

Учитывая опыт работ японских ученых, в Бразилии были проведены исследования осахаривания и сбраживания без разваривания кассавы, картофеля, багассу и зерна [12]. В качестве источника амилоглюкозидазы для осахаривания крахмала использовали поверхностную культуру *Asp. awamori* NRRL 3112 и *Asp. niger*, выращенные на пшеничных отрубях в течение 3 суток.

Часть сырой массы разжижали α -амилазой с нагревом ее до 85°С и выдерживали в течение 20 мин при рН 6-6,5, другую часть не разжижали и не нагревали, а сразу осахаривали. Для разжижения и осахаривания амилоглюкозидазой при 30°С и рН 3,5 использовали штамм *Bacillus subtilis* NRRL В-94, сбраживали пекарскими дрожжами фирмы «Fleischmann Co.» (Бразилия).

Выход спирта из крахмала, разваренного и разжиженного бактериальной α -амилазой, составил (в процентах от теоретического) 93,9 для зерна, 92 для кассавы, 90,6 для картофеля и 73 для багассу, а выход спирта из сырого

крахмала составил для зерна , 89 для кассавы, 48,9 для багассу и 11,4 для картофеля.

Исследователи делают вывод, что нет существенной разницы в выходе спирта из разваренного и неразваренного зернового крахмала и крахмала кассавы. Следовательно, зерновой крахмал и крахмал из кассавы могут быть использованы для спиртового брожения без разваривания.

Японские ученые университета Косю Дайгаку изучали в университете Кампинаса (Бразилия) безварочную технологию спирта клубней кассавы, Уже ранее авторами было установлено, что амилаза из *Asp. koja* может легче осахаривать сырой крахмал, чем амилаза из *Asp. oryzae-flavus*, солод и т. д. Это и легло в основу их способа производства спирта из крахмала кассавы, способа, эффективного с точки зрения экономии энергии и других ресурсов. Безварочное спиртовое сбраживание сырого крахмала кассавы происходит при осахаривании с использованием амилаз из *Asp. koja*. Хорошие результаты получены при полунепрерывном спиртовом брожении. Предусматривалось также осуществлять вакуумную перегонку сброженного сусла.

Способ безварочной спиртовой технологии с осахариванием амилазой из *Asp. koja* проверяли и на сырье других видов (батате, клубнях кассавы), являющемся в Японии одним из основных источников крахмала.

По предлагаемому японскими исследователями способу сырой крахмал осахаривали амилазой из *Asp. koja* при 30°C и pH 3,5, сбраживали хлебопекарными прессованными дрожжами [12]. Через каждые 24 ч отгоняли спирт вакуумной перегонкой, добавляя новое сырье, и вновь сбраживали.

В течение 3 суток выход спирта составлял около 10%, затем резко уменьшался. Снижение выхода спирта объясняется скоплением низкомолекулярных веществ и низших жирных кислот, тормозящих брожение, что устраняли диализом или введением плесневых грибов. В этом случае при проведении одного промежуточного диализа непрерывно в течение 18 суток образовалось 9-9,5 % об. спирта.

Добавки органического азота при брожении, особенно мочевины, повышали выход спирта и степень сбраживания до 94%.

Кроме того, обнаружено, что перемешивание среды стимулирует образование спирта, так как контакт амилазы с сырым крахмалом усиливается при перемешивании, что способствует его осахариванию. Однако при слишком высокой концентрации крахмала выход спирта, снижается в связи с трудностью перемешивания.

Таким образом, безварочная ферментация сырого крахмала позволяет экономить тепловую энергию, необходимую для клейстеризации сырого крахмала.

В описанных экспериментах использовали прессованные хлебопекарные дрожжи (*Saccharomyces cerevisiae*), получаемые аэробным культивированием. Однако было установлено, что дрожжевые клетки, выращенные в анаэробных условиях, более выносливы при действии ингибирующих веществ, и поэтому они увеличивают выход спирта на 10 %, в течение 14 суток без диализа среды или добавления плесневого мицелия. Ежедневное потребление крахмала составило около 6 г на 50 мл среды в течение 20 суток. Когда после 20 суток полунепрерывного брожения прекращали добавлять крахмал и брожение переводили на периодический режим, теоретический выход спирта, базирующийся на общем количестве используемого крахмала, составлял 90-93%.

Интересные исследования проведены фирмой «Suntory Ltd.» (Япония). Если в конце 70-х годов фирма ставила перед собой задачу разваривания сырья при «мягком режиме» (75- 80 °С) [42], то в начале 80-х годов появились рекламные сообщения фирмы о внедрении способа производства спирта без разваривания. В настоящее время фирма опубликовала подробное описание новой технологии, запатентовав ее во Франции [43] и ФРГ [44].

В отличие от традиционного способ фирмы «Suntory Ltd.» полностью исключает фазу разваривания [12]. Молотый крахмалсодержащий материал: зерновые (кукуруза, сорго, ячмень, рожь, рис, просо), корнеплоды (батат, ма-

ниока) или выделенный из них крахмал, смешивают с водой, смесью воды и барды или только барды в весовом соотношении от 1:1,8 до 1:3,4. Образуется суспензия, которую не разваривают, а вносят в нее специальный ферментный препарат. Источником его является микроорганизм рода *Rhizopus* Sp. № 204, 202, 213. Этот препарат более активен для осахаривания нативного крахмала, чем выделенные из *Aspergillus* Sp. № 107, 171, 186 или их смеси. Препараты эти имеются в продаже: Sumzyme, Glutase, O-Cellulasa, Clutase-N Amilo-Glucosidasa 650. Можно использовать и солод или смесь ферментного препарата с солодом. Затем вносят спиртовые дрожжи (начальная концентрация $2 \cdot 10^5$ клеток в 1 мл затвора) и суспензию сбраживают.

Результаты анализа ферментных препаратов, выделенных из микроорганизмов, приведены в табл. 2.

Таблица 2

Препараты, выделенные из микроорганизмов (последние указаны в скобках в скобках)

Показатели	Sumzyme (<i>Rhiz.</i> Sp. № 204)	Glutase (<i>Rhiz.</i> Sp. Nr. 202)	O. Cellulasa (<i>Rhis.</i> Sp. Nr. 212 + <i>Asp.</i> Sp. Nr. 107)	Glutase N. (<i>Asp.</i> Sp. Nr. 186)	Amilo. Glucosidasa 650 (<i>Asp.</i> Sp. Nr. 171)
Способность, ед./г					
разжижения	105	1850	103	45	118
декстриинзации	4000	5285	286	5347	588
осахаривания	2503	2236	1764	745	3 763
Активность, ед./г					
протеазы:					
кислой	985	3761	555	1236	13 694
средней	269	1262	1074	Не установлено	1 969
щелочной	Следы	1080	Следы	Не установлено	1050
целлюлазы	8,9	563	2,6	3,2	3,2
пектиназы	62	93	48	21	64

Таблица 3

Сравнение результатов культивирования новым и традиционным методами

Сырье	Предлагаемый способ				Традицион- ный способ
	рН среды	общая кис- лотность, град	содержание спирта, %	эффектив- ность фер- ментации, %	эффектив- ность фер- ментации, %
Кукуруза жел- тая	4,8	3,1	14,5	88,3	87,2 1
Сорго	4,7	3,5	14,5	88,1	87,3
Ячмень	4,8	3,5	13,7	88,0	86,8
Пшеница	4,8	3,6	13,7	87,5	87,0
Рожь	4,6	4,0	13,8	88,7	87,3
Рис	4,9	3,0	16,2	91,2	90,8
Щетинник	4,8	3,2	12,5	85,0	84,3
Просо куриное	4,6	4,1	10,3	82,9	82,0
Просо посевное	4,9	3,0	12,1	85,9	84,2

В патенте приводится 15 примеров выполнения способа. В колбе Эрленмейера объемом 1 л перемешивают 185 г молотого продукта, 370 мл воды, 1,15 г ферментного препарата Sumuzyme, выделенного из *Rhiz. Sp.* и 45 мл задаточных дрожжей (*Saccharomyces Sp.*, $1,2 \cdot 10^8$ клеток/мл). Ферментацию проводят в течение 120 ч при 25 °С. Результаты опыта представлены в табл. 3.

Степень размельчения в эксперименте составляла от 149 до 840 мкм. Остальные примеры отличались лишь составом и дозировкой осаживающих веществ, количеством сырья, вводимых компонентов и режимом ферментации, однако сущность процесса без разваривания не меняется. Сравнение проводили с традиционным способом разваривания при 150°С. В отличие от традиционного, данный способ способствует экономии тепла. Его преимущество также в том, что твердые вещества затвора после ферментации легко отделяются простой фильтрацией. Способ позволяет интенсифицировать спиртовое брожение. Производство спирта из сырого зернового крахмала и крахмала кассавы в присутствии амилазы из *Asp. koja* без предваритель-

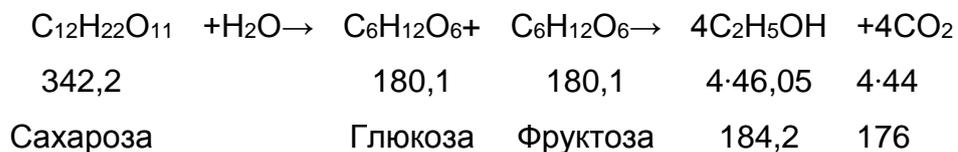
ного разваривания очень эффективно. Более того, после удаления спирта вакуумной перегонкой и добавления сырого крахмала в отработавшую жидкость можно вновь осуществить спиртовое брожение.

Описанный способ позволяет ввести в промышленность новую технологию спирта из сельскохозяйственного сырья. Фирма «Suntory» внедрила описанную технологию на спиртовом заводе в Японии в г. Усуки (Usuki Oita Prefecture) [12].

1.5 Выход спирта из различных источников углеводов

Различают теоретический и практический (фактический) выходы спирта. [17]

Под теоретическим понимают максимально возможный выход спирта, рассчитанный по стехиометрическому уравнению реакции

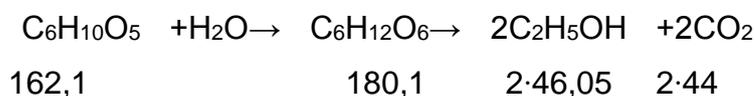


Из 432,2 г сахарозы должно получиться 184,2 г спирта. Из 100 г сахарозы - $(184,2 \cdot 100) / 342,2 = 53,8$ г спирта. Для пересчета массовых единиц этилового спирта в объемные необходимо массу спирта разделить на его относительную плотность:

$$\frac{53,8}{d_{20}^{20}} = \frac{53,8}{0,78927} = 68,2 \text{ см}^3.$$

Из 1 т сахарозы теоретически должно получиться 68,2 дал спирта.

Аналогично для крахмала:



Крахмал	Глюкоза	92,1	176
---------	---------	------	-----

$$\frac{92,1}{d_{20}^{20}} = \frac{92,1}{0,78927} = 71,98 \text{ см}^3.$$

Еще Луи Пастер экспериментально установил, что при благоприятных условиях брожения из 100 г сброженного сахара только 94,0-95,5 г превращается в спирт и углекислый. Из остального количества сахара

3,2-3,6 г образуют глицерин;

1,0- 1,6 г расходуется на синтез биомассы дрожжей;

0,6-0,7 г превращается в янтарную кислоту;

0,6-0,7 г идет на образование избыточного количества углекислого газа (вероятно, вследствие частичного аэробного дыхания в начале сбраживания).

Янтарная кислота и высшие спирты появляются в среде в результате переаминирования аминокислот, т. е. синтеза белков в дрожжах, поэтому независимо от образования биомассы не должны учитываться в балансе сахара.

Расход сахара, не приводящий к образованию спирта, при сбраживании ячменного затора в условиях, близких к производственным колеблется в пределах 3,85-5,59% и в среднем равен 4,72%.

Содержание глицерина в зерновых бражках колеблется от 0,3 до 0,45%, в картофельных - от 0,36 до 0,58%. При минимальном содержании глицерина траты сахара будут равны 2,00%, при максимальном - 3,86%.

Таким образом, при сбраживании заторов из крахмалистого сырья траты сахара на синтез биомассы дрожжей и образование глицерина колеблются в пределах 3,61-5,47%, составляя в среднем 4,54%.

Фактический выход спирта из 1 т крахмала с учетом сказанного составляет 62-67 дал.

Практический выход спирта является основным технико-экономическим показателем спиртового завода. По нему судят о качестве работы завода, поскольку он зависит от принятой схемы технологического

процесса производства и технической оснащенности завода.

Практический выход спирта колеблется в пределах 59,1-66,5 дал из 1 т условного крахмала сырья, что составляет 82,1-92,8 % теоретического выхода спирта.

Нормативные величины выхода спирта обязательны для всех спиртовых заводов. При внедрении технических усовершенствований к нормативным величинам выхода спирта установлены следующие надбавки (дал) на 1 т условного крахмала:

- удлиненный срок брожения до 72 ч - 0,8, в том числе на каждые 6 ч сверх 48 ч - 0,2;
- непрерывнопоточный и циклический способы брожения при сроке 6 ч - 0,8;
- осахаривание с вакуум-охлаждением - 0,1;

Таблица 4

Нормативный выход спирта из различного сырья

Вид сырья	Схема производства спирта		
	периодическая	полунепрерывная	непрерывная
Картофель	64,7	65,0	65,7
Рожь	62,9	63,2	63,9
Пшеница	63,7	64,0	64,8
Ячмень	62,4	62,7	63,4
Овес и чумиза	61,8	62,1	62,8
Просо и гаолян	63,5	63,8	64,5
Сорго	63,5	63,3	64,5
Гречиха	61,1	61,4	62,1
Кукуруза	64,0	64,3	65,0
Вика, горох, чечевица	59,1	59,4	60,1
Рис (зерно нешелушеное)	61,8	62,1	62,8
Рис (крупа)	64,7	65,0	65,7
Меласса	65,9	-	66,5
Сахарная свекла	61,4	61,7	62,4

- полная замена солода поверхностной культурой плесневых грибов-

0,3;

- частичная замена солода поверхностной культурой плесневых грибов

- 0,2;

- полная замена солода глубоинной культурой плесневых грибов - 0,7.

Надбавки к нормативным выходам распространяются также на крахмал солода и углеводы поверхностной культурой плесневых грибов, вводимых в сусло.

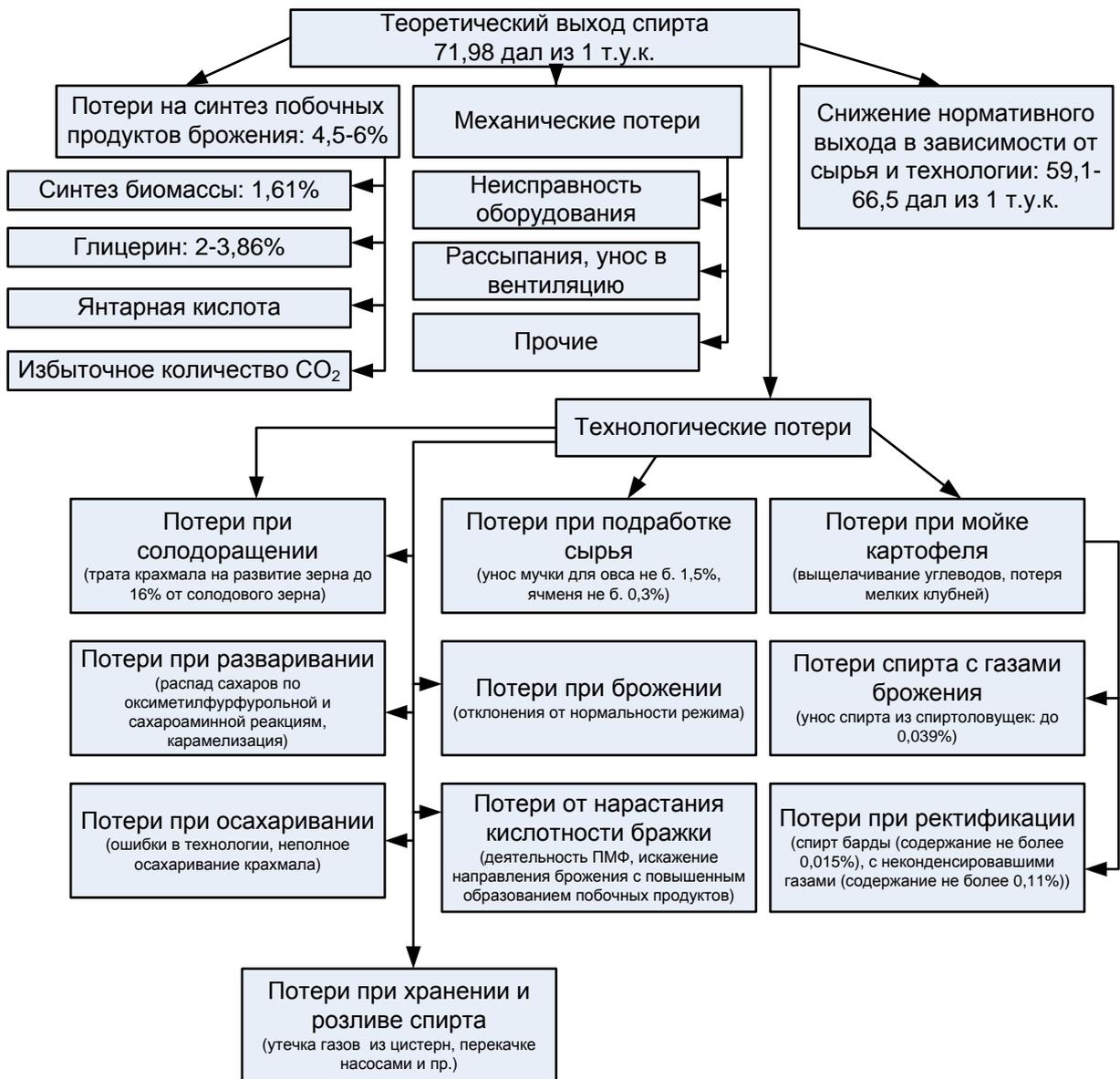


Рисунок 27 – Классификация потерь крахмала

2 Цели и задачи исследований

Целью настоящей работы является изучение возможности применения для осахаривания зерновых заторов ферментных препаратов при комнатных температурах.

Для достижения этой цели решали следующие основные задачи:

- изучение активности ферментных препаратов фирмы Novozymes A/S (Дания) при различных температурах осахаривания крахмала;
- сравнение бродильной активности хлебопекарных дрожжей в заторах, осахаренных по схеме МФО и «холодном» способе;
- определение выхода спирта из крахмалистого сырья при различных схемах разваривания.

3 Экспериментальная часть

3.1 Методы и анализы

3.1.1 Характеристика ферментных препаратов, используемых в работе

В экспериментах использовались ферментные препараты Фунгамил 800Л (источник α -амилазы) и AMG 300 L (источник глюкоамилазы).

3.1.1.1 Характеристика ферментного препарата Фунгамил 800Л

Фунгамил 800 Л (Fungamyl™ 800 L) это грибная α -амилаза полученная из селекционированного штамма *Aspergillus oryzae*. Систематическое наименование - 1,4- α -D-глюкан глюкано-гидролаза (ЕС 3.2.1.1). Производитель - компания Novozymes A/S (Дания). [45]

Прозрачная коричневая жидкость с плотностью около 1,25 г/мл, активность 800 ед АС/г².

Фермент гидролизует 1,4- α -глюкозидные связи в амилозе и амилопектине; увеличение времени реакции приводит к образованию больших количеств мальтозы. В спиртовой промышленности фермент можно использовать для разжижения крахмала в заторе, если оборудование благоприятствует низкотемпературному разжижению (55-60°C).

Другие характеристики ферментного препарата представлены на рис. 28-31.

² Одна Грибная α -амилазная единица активность (FAU) это количество фермента расщепляющего 5,26 г крахмала за один час при использовании стандартного метода компании Новозаймс А/С для определения α -амилазной активности. Таким образом, в единицах, принятых в России (см. раздел 1.2), эта активность будет: $800 \cdot 5,26 = 4208$ ед. АС.

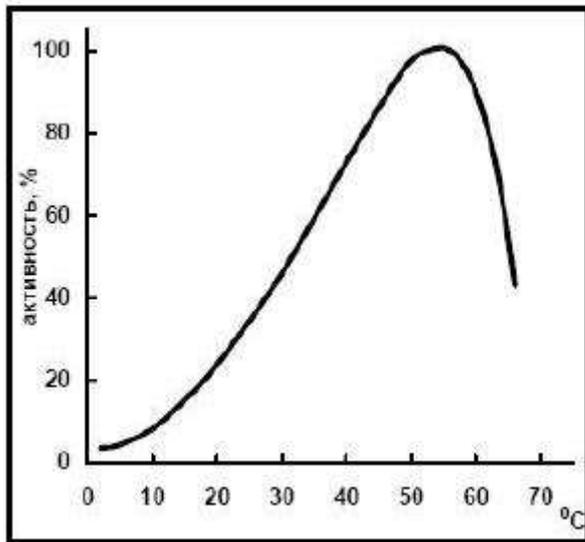


Рисунок 28 – Влияние температуры на активность Фунгамила 800 Л при оптимальном pH 4,7

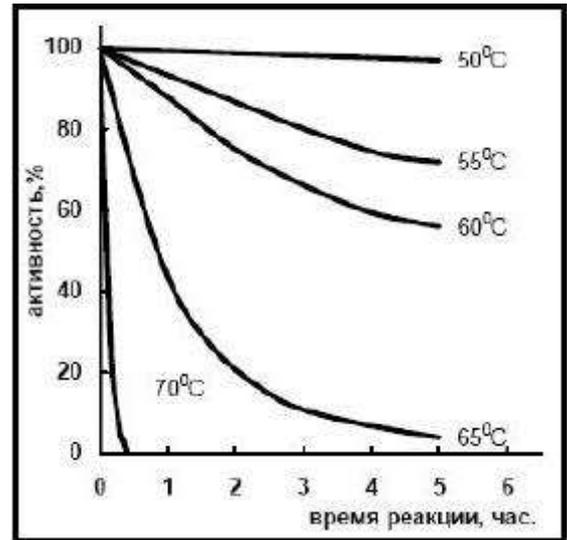


Рисунок 29 – Влияние температуры на стабильность Фунгамила 800 Л, субстрат 30% высокомальтозная патока

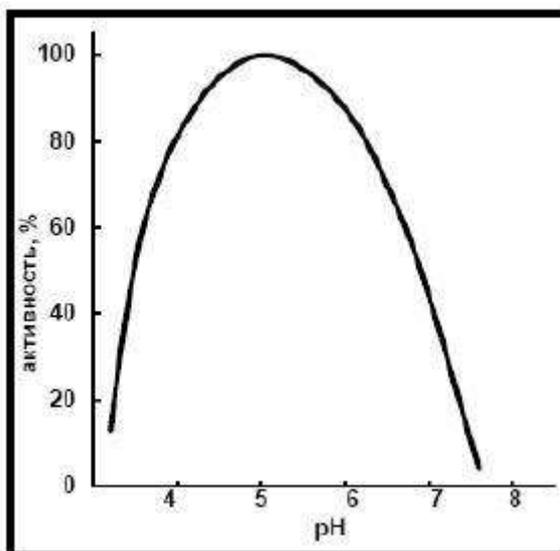


Рисунок 30 – Влияние pH на активность Фунгамила 800 Л

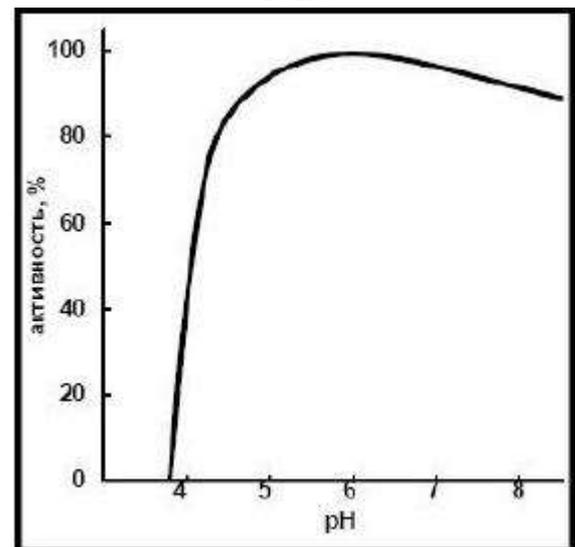


Рисунок 31 - Влияние pH на стабильность Фунгамила 800 Л, субстрат 30% высокомальтозная патока

3.1.1.1 Характеристика ферментного препарата AMG 300 L

Фермент AMG 300 L фирмы Novo Nordisk A/S (Дания) AMG. Амилоглюкозидаза (глюкоамилаза), полученная из отобранного штамма плесени *Aspergillus niger*. [46] Фермент способен расщеплять как α -1,4, так и α -1,6

глюкозные связи в крахмале, декстринах и олигосахаридах; обеспечивает практически полное осахаривание крахмала до глюкозы, если раньше произошла правильная, полная декстринизация (разжижение). Оптимум действия: 55-60°C, pH=4,5-5,5. Активность в стандартных условиях (25°C, pH=4,3) – 300 ед. ГС/мл. Фермент удовлетворительно активен даже при pH 3 и при относительно низких температурах, активно действует в течение всего периода брожения. Рекомендуемая доза ферментного препарата 0,8-1,2 л на 1 тонну крахмала. Другие характеристики представлены на рис. 32-35. [46]

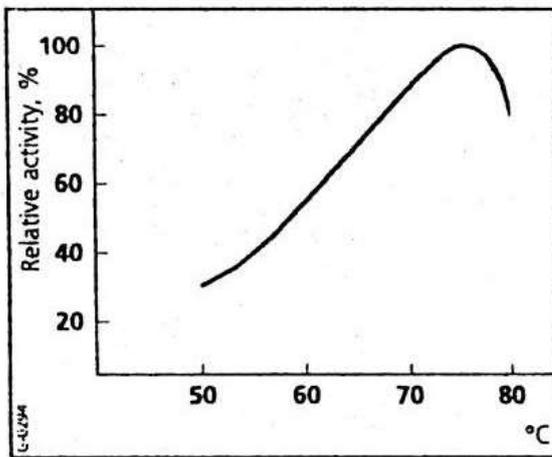


Рисунок 32 – Действие температуры на активность AMG 300 L (субстрат – 30% раствор мальтозы в 0,1 М ацетатном буфере, pH=4,5)

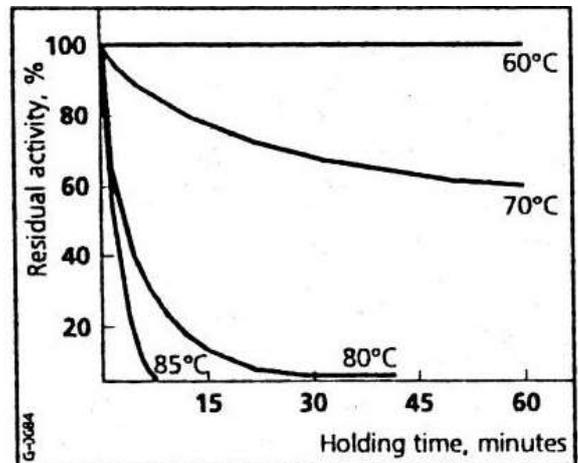


Рисунок 33 - Действие температуры на стабильность AMG 300 L (субстрат 35% раствор предельных декстринов, pH=4,5)

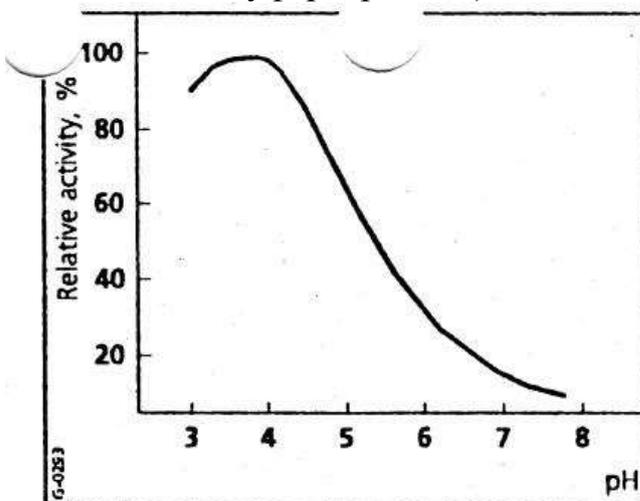


Рисунок 34 – Действие pH на активность AMG 300 L (субстрат – 30% раствор мальтозы в 0,1 М ацетатном буфере, 55°C)

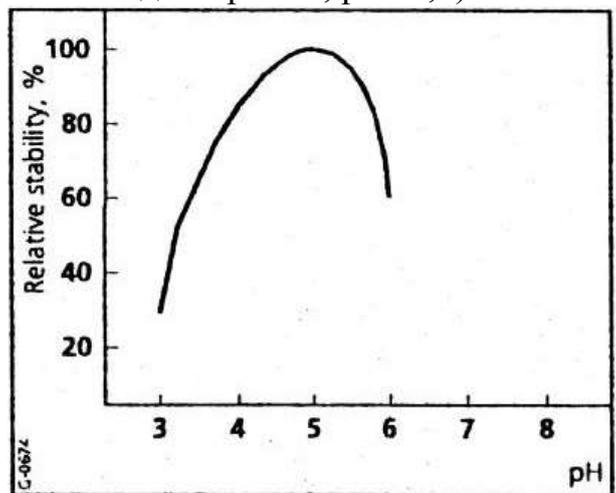


Рисунок 35 - Действие pH на стабильность AMG 300 L (субстрат 35% раствор предельных декстринов, 60°C)

3.1.2 Дрожжи

Для сбраживания использовали сухие быстродействующие хлебопекарные дрожжи «Саф-Момент» (компания Lesaffre, Франция).



Рисунок 36 – Дрожжи Саф-Момент

3.1.3 Субстрат для сбраживания

Для сбраживания использовали муку пшеничную высшего сорта по ГОСТ Р 52189-2003 [47], фирма ОАО Макфа (Курган), состав по данным производителя:

массовое содержание влаги,

не более 15%;

белки 10,3%;

жиры 1,1%;

углеводы 70,6%.



Рисунок 37 – Мука пшеничная компании ОАО «Макфа»

Исходя из углеводного состава теоретический выход спирта с 1 т условного крахмала³ составит:

$$71,98 \cdot 94,0 / 100 = 67,66 \text{ дал АС} = 676,6 \text{ л АС}^4,$$

где: 71,98 – выход спирта, рассчитанный по стехиометрическому уравнению брожения;

94,0 – траты крахмала, не связанные с образованием спирта.

С 1 кг условного крахмала теоретический выход составляет 0,677 л АС, с 1 кг муки с содержанием у.к. 70,6%: $0,677 \cdot 70,6 / 100 = \mathbf{0,478 \text{ л АС/кг}}$.

Гидромодуль при приготовлении замеса 1:3,5, удельный вес муки насыпью – 1,56 л/кг, тогда общий объем замеса: $3,5 \text{ л} + 1 \cdot 1,56 \text{ л} = 5,06 \text{ л}$.

При рассчитанном выше теоретическом выходе в этом объеме получится 0,478 л АС или в пересчете на крепость: $0,478 \cdot 1000 / 5,06 = 94 \text{ мл/л}$ или 9,4 мл АС в 100 мл раствора, теоретическая крепость - 9,4% об.

³ Условный крахмал (у.к.) – количество сбраживаемых углеводов, исходя из предположения, что всё образовавшееся при гидролизе крахмала HCl (метод Бертрона) количество глюкозы входило в состав крахмала.

⁴ АС – концентрация спирта в пересчете на абсолютный (100% об.).

3.1.4 Приготовление модельных образцов бражки

3.1.4.1 Подготовка дрожжей (разбраживание)

Навеску сухих дрожжей (5 г) из пакета высыпали в широкую емкость с чайной ложкой сахара, некоторое время выдерживалось для регидратации, а затем перемешивалось для аэрации суслу. Процесс разбраживания (примерно 30 мин) продолжали до появления пены, после чего количественно вносили в подготовленное сусло.

3.1.4.2 Подготовка контрольного образца суслу

Для сравнения использовали муку, осахаренную ферментными препаратами при их оптимальной температуре и pH (имитация схемы МФО без пастеризации).

Мука разводилась в холодной воде (гидромодуль 1:3) с добавленным разжижающим ферментом (Fungamyl™ 800 L). pH суслу доводили до оптимальной (4,5) раствором ортофосфорной кислоты. При непрерывном перемешивании замес подогревался до температуры разжижения (55°C), выдерживалась 30 минут, затем добавлялся осахаривающий фермент (AMG 300 L) и прогревали до 70°C, при этой температуре выдерживали до полного осахаривания крахмала муки по йодной пробе (около 1,5 часов). Готовое сусло охлаждалось до температуры складки дрожжей (30°C) и вносилась посевная доза разброженных дрожжей.

Засеянное сусло в бродильной емкости с гидрозатвором устанавливалось на брожение в термостат на температуру 30°C.

3.1.4.3 Подготовка модельного образца

Мука разводилась в воде температурой 20°C (гидромодуль 1:3) с добавленным разжижающим (Fungamyl™ 800 L) и осахаривающим (AMG 300 L) ферментами. Учитывая не оптимальность температуры действия ферментов, их количество удваивалось по сравнению с контрольным образцом. Добавлялись необходимые по условиям опыта вещества, вносилась посевная доза разброженных дрожжей.

pH суслу доводили до оптимальной (4,5) раствором ортофосфорной кислоты.

Засеянное сусло в бродильной емкости с гидрозатвором устанавливалось на брожение в термостат на температуру 30°C.

3.1.5 Определение крепости созревшей бражки и оставшихся сухих веществ

По окончании брожения из бражки отбирался образец в объеме примерно 250 мл, который подвергался перегонке. Крепость определялась в дистилляте спиртомером при 20°C после его доведения дистиллированной водой до первоначального объема. В кубовом остатке после доведения его объема дистиллированной водой до первоначального объема определялись остаточные сухие вещества по показаниям сахаромера при 20°C.

3.1.6 Определение бродильной активности дрожжей

Принцип метода. Бродильная способность дрожжей, зависящая от физиологического состояния клеток, может быть оценена по объему двуокси углерода, выделяющегося в процессе брожения. Этим методом определяют зимазную активность - скорость сбраживания глюкозы или сахарозы, а мальтазную (α -глюкозидазную) активность - скорость сбраживания мальтозы.

Мальтазную и зимазную активность выражают количеством времени (в мин), необходимого для выделения 10 мл углекислого газа при сбраживании 5% раствора мальтозы или глюкозы (сахарозы) дрожжами, прибавленными в количестве 2,5% от объема сахарного раствора.

Аппаратура, материалы и реактивы.

При определении ферментативной активности пользуются газометром. Прибор состоит из колбы 6 с притертой пробкой, соединенной с отградуированной бюреткой 3, заполненной подкрашенным метиленовой синью насыщенным раствором поваренной соли (36% NaCl), т.к. в ней снижается растворимость CO₂. Бюретка соединена с делительной воронкой 1, заполненной подкрашенным насыщенным раствором поваренной соли.

Проведение анализа. Производился замес суслу (мука+водопроводная вода), вносилась соответствующая навеска ферментных препаратов. Полученный замес разливался в две 500 мл стеклянные колбы в количестве, равном по весу. Одна из колб проходила температурное разваривание (п. 3.1.4.2) и служила контрольным образцом. Затем в обе колбы вносилось равное (по весу) количеству сухих дрожжей.

Колбы оставлялись на брожение. С периодичностью 1 час колба соединялась с бюреткой и засекалось время набраживания примерно 5 мл CO₂.

Обработка результатов. Бродильная активность рассчитывали по формуле:

$$BA = \frac{V_{CO_2}}{\tau},$$

где: V_{CO₂} – объем наброженной углекислоты по показаниям бюретки;

τ – время набраживания углекислоты.

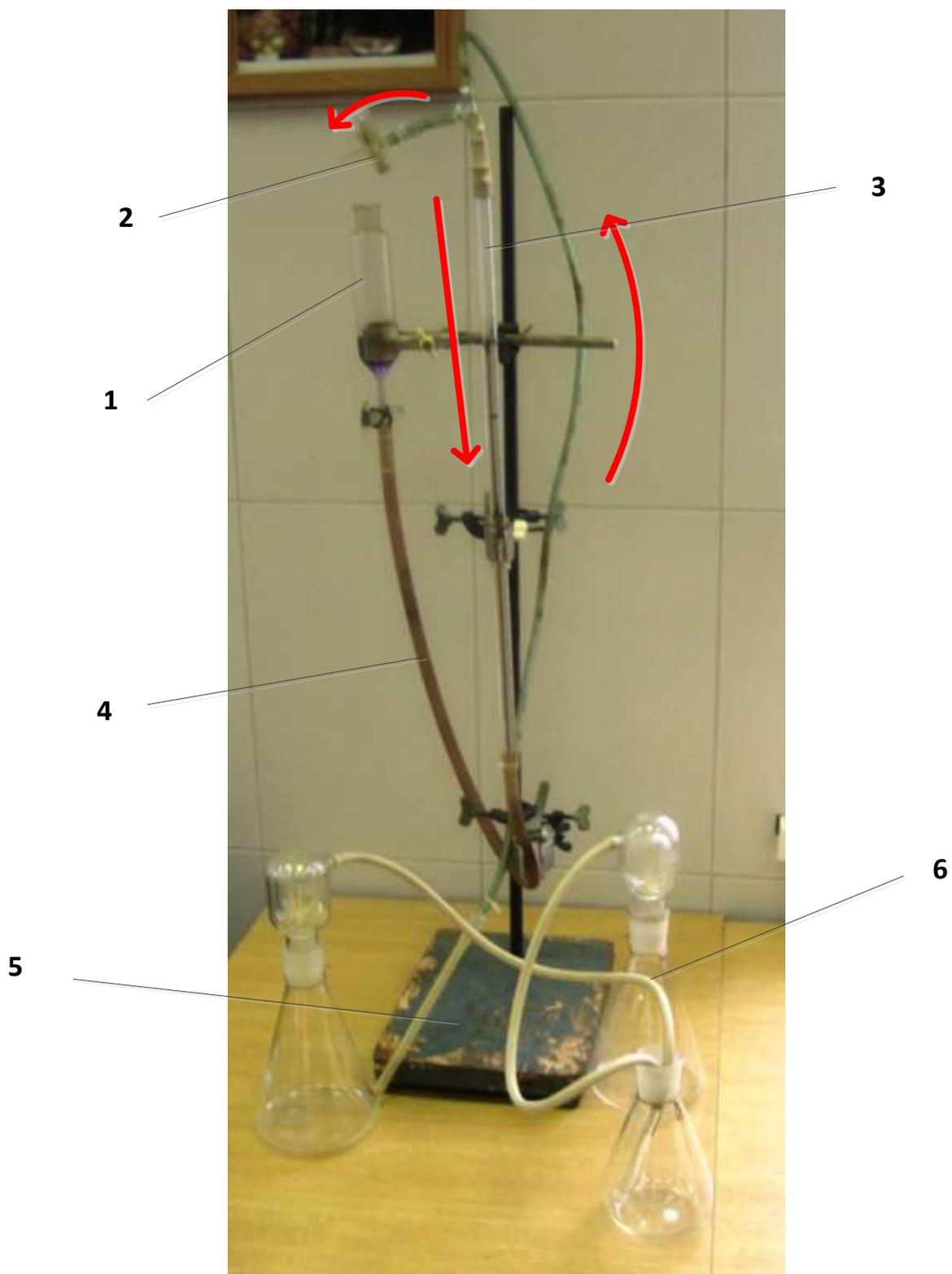


Рисунок 38 - Газометрическая установка:

1 - уравнительный сосуд; 2 - одноходовой кран; 3 - бюретка; 4 - бюретка; 5 - штатив; 6 – бродильные колбы с гидрозатвором

3.2 Описание экспериментальной установки

Цель работы. Определить скорость гидролиза крахмала при различных температурах. [48]

Амилолитическая способность (АС) культуры плесневых грибов (как и зеленого солода) показывает, сколько граммов крахмала может быть гидролизано до мальтозы и не окрашивающихся йодом декстринов 1 г препарата (или 1 мл раствора) за 1 ч при 30° С в строго определенных условиях концентрации крахмала и рН.

Амилолитическую способность микробиологических культур определяют визуальным методом (метод Д.Н. Климовского и В.И. Родзевича) [49]

Принцип метода. 1%-ный забуференный раствор крахмала гидролизуют раствором исследуемой культуры гриба, отмечая время гидролиза, до мальтозы и не окрашивающихся йодом декстринов; конец реакции определяют пробой на йод.

Реактивы:

1%-ный забуференный раствор крахмала. Навеску крахмала берут из такого расчета, чтобы в 100 мл раствора содержался 1 г абсолютно сухого крахмала. В небольшом химическом стакане взвешивают на технических весах навеску крахмала, добавляют немного дистиллированной воды и количественно переводят в большой стакан с кипящей дистиллированной водой, кипятят 2 мин и охлаждают, следя за тем, чтобы на поверхности не образовывалась пленка, для чего все время помешивают раствор стеклянной палочкой.

Остывший крахмальный раствор из стакана количественно переводят в мерную колбу такого объема, из расчета на который взята навеска крахмала, добавляют буферный ацетатный раствор (рН 4,7) — 10 мл на 100 мл раствора

крахмала, доливают до метки водой и перемешивают. Раствор крахмала готовят в день анализа.

Буферный ацетатный раствор (рН 4,7) — смешивают равные объемы нормальных растворов уксусной кислоты (58 мл ледяной-уксусной кислоты в 1 л дистиллированной воды) и ацетата натрия (82 г CH_3COONa или 136,1 г $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ в 1 л дистиллированной воды).

Основной раствор йода — 1,4 г кристаллического йода и 4,4 г йодида калия растворяют в небольшом объеме дистиллированной воды и доводят до 100 мл. Раствор хранят в темном месте.

Рабочий раствор йода — основной раствор йода разбавляют в 5 раз (20 мл основного раствора доводят водой до 100 мл) и на каждые 100 мл рабочего раствора прибавляют 4 г йодида калия. Рабочий раствор готовят в день анализа.

Ход определения. Для исследования берут ферментный препарат, который разбавляют дистиллированной водой в 10, 100 или 1000 раз в зависимости от активности препарата. Для чего 1 мл препарата доводят дистиллированной водой до 100 мл (*100), затем из этого раствора отбирают 1 мл и доводят дистиллированной водой до 10 мл (*1000).

В коническую колбу на 50—100 мл или широкую пробирку вводят пипеткой 20 мл 1%-ного забуференного раствора крахмала и погружают в водяную баню температурой 30°C ($\pm 0,2^\circ \text{C}$) на 10 мин; затем в колбу вводят пипеткой 10 мл ферментного раствора при тщательном перемешивании и точно по секундомеру отмечают время. За начало реакции принимают время, когда из пипетки выльется половина содержимого. Общий объем реакционной смеси всегда должен быть равен 30 мл, поэтому если для определения берут менее 10 мл ферментного раствора, то недостающий объем восполняют дистиллированной водой, которую вводят перед добавлением ферментного раствора.

Через каждую минуту после начала реакции стеклянной палочкой отбирают каплю жидкости и на белой фарфоровой пластинке соединяют ее с

заранее нанесенной каплей рабочего раствора йода. Реакцию расщепления крахмала считают законченной, когда йод перестанет изменять окраску при соединении с каплей исследуемого раствора (в течение первых 10 с). Время, за которое происходит расщепление крахмала до продуктов, не окрашивающихся йодом, может составлять от 3 до 20 мин; более точные результаты получаются при 5—15 мин. Если окраска исчезает менее чем за 3 мин, то определение повторяют с меньшим количеством ферментного раствора, например с 2 мл.

Стеклянную палочку после каждой пробы промывают дистиллированной водой и вытирают чистым ненакрахмаленным полотенцем. Все пипетки, используемые при анализе, должны иметь ватные тампоны (во избежание попадания следов слюны).

Расчет АС проводят по формуле

$$AC = \frac{0,2 \cdot 60}{nt} = \frac{12}{nt}$$

где 0,2 — содержание крахмала в 20 мл раствора, г;

60 — коэффициент для пересчета на 1 ч;

n — объем ферментного препарата, введенный в реакцию смесь с учетом разбавления, мл;

t — время, за которое произошло расщепление крахмала до не окрашивающихся йодом продуктов, мин.

Пример. К 20 мл 1%-ного раствора крахмала (0,2 г крахмала) прибавлено 10 мл ферментного раствора (объем 1 мл с доведением до 100 мл водой), что соответствует 0,01 мл препарата. Окраска с йодом исчезает через 11 мин.

$$AC = \frac{0,2 \cdot 60}{0,01 \cdot 11} = 109 \text{ ед АС/мл.}$$

Гидролиз крахмала идет постепенно. По мере гидролиза изменяется окраска индикаторных растворов при добавлении в них смеси крахмального

клейстера с вытяжкой. В первой пробе, куда добавлен еще негидролизованный крахмал, будет синяя окраска. При последующих пробах декстрины будут давать самое разнообразное окрашивание: сине-фиолетовое, розовое и т.д. Опыт заканчивают при отсутствии йодной реакции в индикаторном растворе. При этом у индикаторного раствора после внесения в него смеси не меняется окраска, оставаясь слабо-желтой. Это указывает на окончание гидролиза крахмала. После окончания опыта записывают время гидролиза крахмала при данной температуре и рассчитывают относительную активность амилазы. На основании полученных результатов строят график зависимости активности амилазы от температуры и делают выводы.

Результаты эксперимента приведены в таблице 5.

Таблица 5

Таблица экспериментальных данных

$t^{\circ}\text{C}$	22	30	34	37	40	45	58
τ_1							
τ_2							
τ_3							
$\tau_{\text{ср.}}$							
$t^{\circ}\text{C}$	22	30	34	37	40	45	58
АС							

3.3 Результаты и обсуждение

3.3.1 Опыт 1. Определение зависимости активности препарата Фунгамил 800Л от температуры

Результаты экспериментов представлены на рис. Из них видно примерное совпадение с данными производителя, при существенным падением ак-

тивности, что, очевидно, связано с длительным хранением препарата в лаборатории.

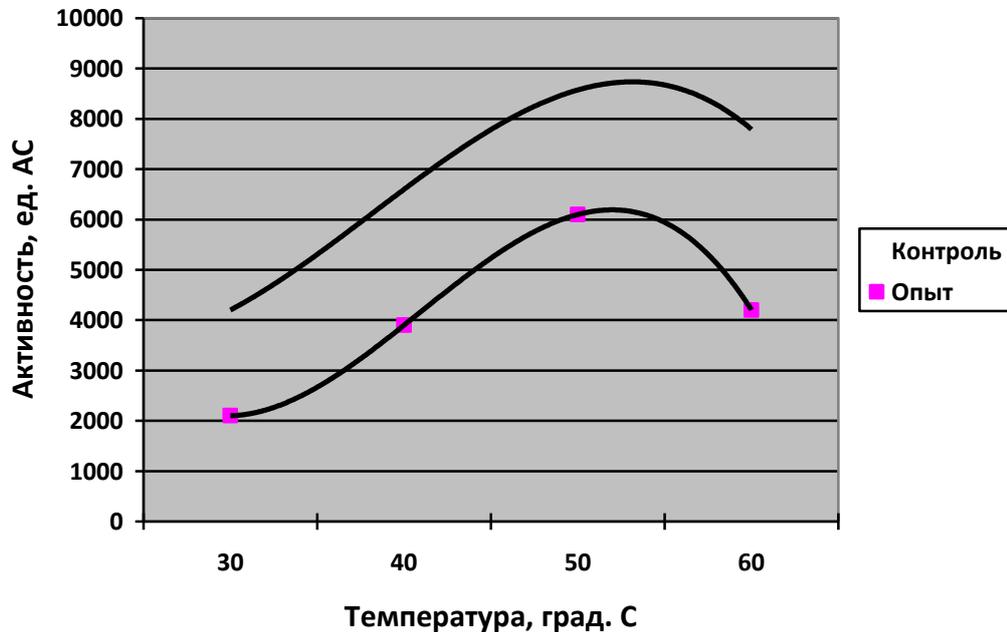


Рисунок 38 – Зависимость активности ферментного препарата Фунгамил 800 Л от температуры

3.3.2 Опыт 2. Определение возможности «холодного» разваривания

0,5 кг муки смешали с 2 л воды (углеводы 69%), внесено по столовой ложке AMG и Фунгамила + 10 г дрожжей. Замес разделен на две части, первая – была разварена по схеме МФО, вторая температурному воздействию не подвергалась. Результаты представлены в табл. 6.

Таблица 6

Результаты опыта 2

Показатель	Холодный способ	Горячий способ
До сбраживания		
рН	5,8	5,73
После сбраживания		
Крепость, % об.	7	12
Сухие вещества, % масс.	4	2
рН	3,2	3,8

При холодном способе явные признаки микробиологического загрязнения: нехарактерный запах, низкая крепость. В связи с чем, было принято решение в «холодный» затор внести дезинфицирующий раствор.

3.3.3 Опыт 3. Подбор дезинфицирующего агента

Была опробована перекись водорода. В работе [50] отмечено, что добавление H_2O_2 (0,1-1 г/л по 100% H_2O_2) не оказывает влияние на активность дрожжей.

В замес была добавлена аптечная перекись водорода (3%-ная) до концентрации 0,1%. Через некоторое время начался активный ее распад, вызвавший существенное и устойчивое увеличение объема, не прекращающееся в течение часа. В связи с чем, этот дезинфектант в дальнейшей работе не использовался.

Для дезинфекции суслу использовали антибиотик низин (пищевая добавка E234) - пептидный антибиотик, образуемый микроорганизмом *Streptococcus lactis*. Угнетающие свойства низина были описаны в 1944 году, хотя исследования в данной области начались гораздо раньше. Еще в 1928 году было обнаружено, что некоторые бактерии рода *Streptococcus* способствуют образованию веществ, которые угнетают другие молочнокислые бактерии. С 50-х годов 20 века началось промышленное производство низина, а чуть позже низин стал применяться в пищевой промышленности в качестве консерванта с маркировкой E234. Пищевая добавка E234 активно применяет-

ся в виноделии, сыроделии, при консервировании мясных и молочных продуктов, зеленого горошка, фасоли, грибов, в производстве масла, сгущенного молока, кондитерских изделий.

Концентрация антибиотика выдерживалась в количестве 0,1 г на 10 л сусла.

3.3.4 Опыт 4. Определение скорости осахаривания крахмала в заторе

100 г муки и 400 мл воды, ферментные препараты. Замес был разделен на две равные по весу части, в один из образцов были добавлены дрожжи. Периодически отбирались пробы и проверялась полнота осахаривания по йоду. В пробе без дрожжей проба перестала окрашивать йод через 24 часа, в пробе с дрожжами – через 8 часов.

Следовательно, присутствие бродящих дрожжей существенно ускоряет осахаривание, возможно дополнительный эффект придавало перемешивание бражки бродящими дрожжами.

3.3.5 Опыт 5. Определение бродильной активности дрожжей

100 г пшеничной муки + 400 мл воды + 10 мл α -амилазы + 10 мл глюкоамилазы + низин (0,1 г на 10 л сусла) + 1 г дрожжей. Замес разделен на две части и оставлен на брожение при комнатной температуре. Скорость сбраживания определяли по скорости выделения CO_2 в газометре (п. 3.1.6). Результаты эксперимента представлены в таблице 7 и на рис. 39.

Таблица 7

Бродильная активность дрожжей

Время брожения, ч	Скорость сбраживания, мл CO ₂ /мин	
	Горячее разваривание	Холодное разваривание
0	0	0
1	0,81	1,82
2	2,34	1,46
3	2,56	1,42
4	2,61	1,65
5	4,17	1,51
6	2,88	1,05
7	2,73	0,86
13	2,63	0,72
14	2,00	0,28
16	1,70	0,26
18	1,54	0,26
20	1,55	0,14
22	1,59	0,20
40	0,05	0,10
47	0,02	0,12
Крепость, % об.	7%	6%
Сухие вещества, % масс.	4%	4,5%

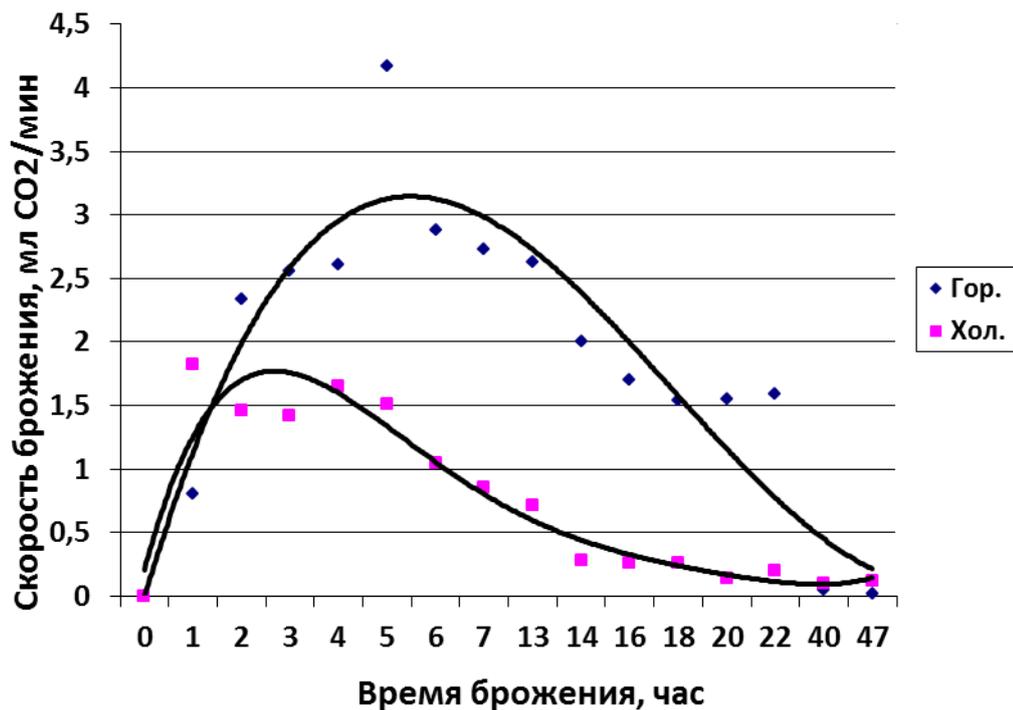


Рисунок 39 – Бродильная активность дрожжей

По результатам опыта видно, что при холодном осахаривании главное брожение не такое активное, как в контроле, но окончательное время брожения схожее. Этот эффект положителен, т.к. позволяет снизить тепловыделение при брожении в промышленных объемах, что особенно критично в летних условиях при высокой температуре охлаждающей воды, забранной из открытых источников водоснабжения.

3.3.6 Опыт 6. Определение выхода спирта

На 4 литра воды 700 г пшеничной муки ВС, + 10 г дрожжей Саф-Левюр + 0,1 г низина + по столовой ложке AMG (Г) и Фунгамила (А). К концу брожения на холодном заторе бражка осталась непрозрачной, белого цвета, сформировался довольно плотный осадок, очевидно, клейковины, на разваренной муке осадок легко взмучивался. Проба на йод показала полное осахаривание, надосадочная через фильтр-картон марки Т (грубый) жидкость не фильтровалась.



Рисунок 40 – Внешний вид сброженного сусла (виден слой белого осадка)

Запах готовой бражки приятный, характерный.

Конечная крепость бражки (истинная) - 6,5%. Расчеты выхода крахмала представлены в таблице 8.

Таблица 8

Результаты опыта 6

	Показатель	Способ осахаривания	
		Холодный	Горячий
1	Содержание муки в замесе, г/дм ³	149	149
2	Содержание крахмала в замесе при крахмалистости 70,6%, г/дм ³	105	105
3	Истинная крепость, % об.	6,5	6,8
4	Выход спирта, л АС/кг крахмала (стр. 3/стр. 2)	0,619	0,648
5	Выход спирта, л АС/ кг муки (стр. 3/стр. 1)	0,436	0,456
6	В % от теоретического*	91,2	95,4

*Теоретический выход спирта 0,478 л АС с 1 кг муки (п. 3.1.3).

Экспериментальные данные показали приемлемость холодного способа, соизмеримого по выходу со стандартным МФО.

Выводы

1. Проведенные эксперименты выявили следующие преимущества «холодного» способа:

- возможно холодное осахаривание более густых, чем обычно заторов;
- твердые вещества после брожения не претерпевают термической модификации и могут быть легко отделены простой фильтрацией или декантацией;
- способ осахаривания по изобретению не создает надлежащих условий для развития нежелательных микроорганизмов, таких как бактерии, которые могут вызвать изменения, в связи с отсутствием усвояемого источника углерода для развивающихся бактерий и, следовательно, практически не существует тенденция к загрязнению нежелательными микроорганизмами;
- энергосбережение.

2. Недостатками данного способа являются высокие требования к микробиологическим характеристикам зерна, не соответствующие зерну фуражного назначения, а также высокие энергозатраты на стадии получения помола требуемого состава (муки). Также требует дополнительного изучения консистенция образовавшегося осадка, который может создать проблемы при перекачивании затора на перегонку.

3. Для поддержания микробиологической чистоты суслу предложено добавлять в затор антибиотика низина (добавка E234).

Список использованной литературы

1 Поляков В.А. Научное обоснование и разработка технологии биоконверсии растительного сырья в производстве солода, пива, алкогольных и безалкогольных напитков: Дисс. в виде научн. докл. ... докт. техн. наук. – М.: 2003. – 104 с.

2 Федюшкина И.Л. Интенсификация процессов сбраживания суслу путем активации спиртовых дрожжей: Автореф. дисс... канд. техн. наук. – М.: 2005. – 16 с.

3 Чистякова Т.П., Ерошин В.К. Влияние лимитирования азотом, фосфором или органическим субстратом на выход и состав биомассы термотолерантных дрожжей //Прикладная биохимия и микробиология. - 1987. - Т. XXIII. - Вып. 1. - С. 29.

4 Ферменты Ново Нордикс для спиртовой промышленности / URL: http://www.sergey-osetrov.narod.ru/Projects/Enzym/NOVO_NORDISK.htm

5 Римарева Л.В. Концентрированные ферментные препараты для спиртовой промышленности / URL: <http://www.sergey-osetrov.narod.ru/Projects/Enzym/Ferments.htm>

6 Калинина О.А. Разработка ресурсосберегающей технологии получения этанола из зерна ржи: Автореф. дисс. ... канд. техн. наук. – М.: 2002. – 36 с.

7 Регламент производства спирта из крахмалистого сырья. - М.: ВНИИ ПрБр, 1979. - 270 с.

8 Туршатов М.В. Разработка энергосберегающей технологии этилового спирта на основе новых способов подготовки сырья: Дисс. ... канд. техн. наук. – М.: 2009.- 132 с.

9 Ресурсосберегающая технология в производстве спирта: Справочное пособие / Под ред. Н.С. Терновского. – М.: Пищевая пром-сть, 1994. – 168 с.

10 Журба О.С., Крикунова Л.Н., Карамзин А.В. Способ производства этилового спирта из зернового сырья. – Патент РФ № 2443780, 08.02.2011.

11 Шульман М. Принципиальная технологическая схема получения спирта без разваривания крахмалсодержащего сырья путем диспергирования сырья / URL: http://www.sergey-osetrov.narod.ru/Projects/Water_and_heat_processing/time_continue_non_coucing.htm

12 Шахтимир Э.Л. Перова Э.Я., Левит И.М. Технология производства спирта без разваривания сырья // Ферментная и спиртовая пром-сть . - 1983. - №7. - С. 44-46.

13 Шахтимир Э.Л. Перова Э.Я. Применение способов холодного зати- рания на спиртовых заводах ФРГ и ГДР // Ферментная и спиртовая промыш- ленность. – 1982. - № 7. - С. 44-46.

14 Шахтимир Э.Л. и др. Новое в спиртовой промышленности за рубе- жом // Ферментная и спиртовая промышленность. – 1984. - № 1. - С. 29-30.

15 Макаров С.Ю. Технология сакэ. Лекции для студентов по направле- нию подготовки 260100 Продукты питания из растительного сырья. - М., 2011. – 80 с. / URL: <http://www.twirpx.com/file/447111/>

16 Строение зерна / Сайт «Русская продовольственная компания». - URL: <http://www.russianfood.ru/item84/>

17 Яровенко В.Л., Маринченко В.А., Смирнов В.А. Технология спирта. - М.: Колос-Пресс, 2002. - 465 с.

18 Новый справочник химика и технолога / Под ред. А.В. Москвина. – СПб: НПО «Профессионал», 2006. – 1464 с.

19 Грачева И.М., Кривова А.Ю. Технология ферментных препаратов. - М.: Элевар, 2000. - 512 с.

20 Калунянц К. А., Голгер Л. И. Микробные ферментные препараты - М.: Пищевая промышленность, 1979. - 304 с.

-
- 21 Амилолитические ферменты и их применение в спиртовой промышленности / URL: <http://referats.5-ka.ru/93/28541/3.html>
- 22 Тихомиров В.Г. Технология пивоваренного и безалкогольного производств. - М.: Колос, 1998. - 448 с.
- 23 Единицы активности ферментов / Сайт «Биохимия». - URL: <http://biohimist.ru/osnovy-biokhimii/27-edinicy-aktivnosti-fermentov.html>
- 24 Инструкция по технохимическому и микробиологическому контролю спиртового производства // Под общ. ред. В.А. Полякова - М.: ДеЛи принт, 2007. - 480 с.
- 25 Шапкарин В.В., Королев А.П., Гридина С.Б. и др. Биохимия: сборник лабораторных работ.- Кемерово: Кемеровский технологический институт пищевой промышленности, 2005. - 84 с.
- 26 URL: <http://russian.alibaba.com>
- 27 Применение ферментных препаратов в спиртопроизводстве. – Бердск: ПО «Сиббиофарм», 2008. – 20 с.
- 28 Березов Т.Т., Коровкин Б.Ф. Биологическая химия: Учебник / Под ред. акад. АМН СССР Дебова С.С. - 2-е изд., перераб. и доп. - М.: Медицина, 1990. - 528 с.
- 29 Микробиологические и биохимические процессы (часть 1) / URL: <http://nitrohd.ru/hlebobulochnye-izdeliya/198-mikrobiologicheskie-i-biohimicheskie-processy-chast-1.html>
- 30 Ферментные препараты в пищевой промышленности / Под ред. В. Л. Кретовича, В. Л. Яровенко. - М.: Пищевая промышленность, 1975. - 535 с.
- 31 ТИ 10-00334587-2-2005. Технологическая инструкция по использованию ферментных препаратов ООО ПО «Сиббиофарм» при производстве спирта из зерна. – М.: ГНУ ВНИИПБТ, 2005. – 17 с.
- 32 Сотников В.А., Федоров А.Д., Гамаюрова В.С. и др. Способ низкотемпературного разваривания крахмалистого сырья в производстве спирта // Производство спирта и ликероводочных изделий. – 2002. - №1. – С. 13-15.

33 Крикунова Л.Н., Журба О.С., Омисова О.С. и др. Способ производства этилового спирта. – Патент РФ № 2265663, 25.11.2004.

34 Андриенко Т.В. Разработка комплексной технологии получения этилового спирта и сухого кормопродукта повышенной усвояемости из ИК-обработанного зерна ржи: Автореф. дисс. ... канд. техн. наук. – М.: 2008. – 25 с.

35 Кириллова Н.П., Кузнецов М.Г., Петрушенков П.А. и др. Механо-химическая обработка зерна в спиртовом производстве с использованием мельницы кавитационного измельчения / В кн.: II Всероссийская конференция: Химия и технология растительных веществ. – Казань, 2002. – С. 82-83.

36 Туршатов М.В., Поляков В.А., Леденев Владимир П. и др. Способ производства этилового спирта. – Заявка на изобретение РФ № 2009116110/13, 29.04.2009

37 Новая ферментативная технология STARGENTTM компании Genencor не требует разваривания, приводит к экономии энергии, росту производительности и продуктивности заводов / URL: <http://biosciences.dupont.com/>

38 Механическое диспергирование крахмала / URL: http://www.sergey-osetrov.narod.ru/Raw_material/Mechanical_dispergation_starch.doc

39 Принципиальная технологическая схема получения спирта без разваривания крахмалсодержащего сырья путем диспергирования сырья / URL: http://www.sergey-osetrov.narod.ru/Projects/Water_and_heat_processing/time_continue_non_cousing.htm

40 Технико-экономическое обоснование диспергирования крахмалсодержащего сырья взамен разваривания под давлением / URL: http://www.sergey-osetrov.narod.ru/Projects/Water_and_heat_processing/Economical_project_for_time_continue_non_cousing.htm

41 Mizuno A., Shinoda N., Nomura Y. High gravity brewing utilizing alpha-glucosidase. 4: Application of parallel fermentation utilizing alpha-glucosidase // Journal of the Brewing Society of Japan. – 2004. - V. 99 (12). - P. 873-877.

42 Witt P.R., Harvey R.D. Starch liquefaction process. – Патент США №4092434, 1979.

43 Fukuda O., Fukushi O., Matsumoto N., Yoshizumi H. Procède de production d`alcool par fermentation sans cuisson / Патент Франции № FR 2496121 (A1), 18.06.1982.

44 Yoshizumi H., Matsumoto N., Fukuda O., Fukushi O. Process for producing alcohol by fermentation without cooking / Патент ФРГ № DE3149931 (A1), 24.06.1982.

45 Фунгамил 800Л / URL: <http://m-zimgeo.ru/uslugi/fungamil/>

46 URL: <http://www.mountainmoonshine.com/images/Saccharification.pdf>

47 ГОСТ Р 52189-2003 Мука пшеничная. Общие технические условия. - Ввод. впервые; Ввод. 01.01.2005. - М.: ИПК Издательство стандартов, 2004. - 11 с.

48 Влияние температуры на гидролиз крахмала амилазой / URL: <http://neznaniya.net/agronomija/fiziologija-i-biohimija-rastenij/>

49 Фертман Г. И., Шойхет М. И. Химико-технологический контроль спиртового и ликерно-водочного производства. - М.: Пищевая промышленность, 1975. - 430 с.

50 Сорокодумов С.Н. Интенсификация процессов спиртообразования и утилизации отходов спиртового производства: Дисс. ... канд. техн. наук. – М.: 2005. – 182 с.