

На правах рукописи



КОВАЛЕВА ТАТЬЯНА СЕРГЕЕВНА

**БИОТЕХНОЛОГИЯ ЭТАНОЛА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ
ЯЧМЕНЯ И МУЛЬТИЭНЗИМНОЙ КОМПОЗИЦИИ:
ГИДРОЛИЗ БИОПОЛИМЕРОВ СЫРЬЯ, ОПТИМИЗАЦИЯ И
ИНТЕНСИФИКАЦИЯ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССОВ**

05.18.07 – «Биотехнология пищевых продуктов и биологических
активных веществ»

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата технических наук

Воронеж – 2020

Работа выполнена в федеральном государственном
бюджетном образовательном учреждении высшего образования
«Воронежский государственный университет инженерных технологий»

Научный руководитель: доктор технических наук, профессор
Агафонов Геннадий Вячеславович
(ФГБОУ ВО «Воронежский
государственный университет инженерных
технологий»)

Официальные оппоненты: доктор технических наук
Шелехова Наталия Викторовна
(ВНИИПБТ – филиал ФГБУН
«Федеральный исследовательский центр
питания, биотехнологии и безопасности
пищи», г. Москва)

кандидат технических наук, доцент
Баракова Надежда Васильевна
(ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский
национальный исследовательский
университет информационных технологий,
механики и оптики», г. Санкт-Петербург)

Ведущая организация: **Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования «Московский
государственный университет пищевых
производств», г. Москва**

Защита состоится «07» апреля 2020 года в 12 час. 30 мин. на заседании совета по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Д.212.035.04 при ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет инженерных технологий» (ФГБОУ ВО «ВГУИТ») по адресу: 394036, г. Воронеж, пр. Революции, 19, конференц-зал.

Отзывы на автореферат (в двух экземплярах), заверенные гербовой печатью учреждения, просим направлять ученому секретарю совета Д 212.035.04.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБОУ ВО «ВГУИТ». Полный текст диссертации размещен в сети «Интернет» на официальном сайте ФГБОУ ВО «ВГУИТ» www.vsuet.ru «18» декабря 2019 г.

Автореферат размещен в сети «Интернет» на официальном сайте Министерства науки и высшего образования РФ по адресу: www.vak2.minobrnauki.gov.ru и на официальном сайте ФГБОУ ВО «ВГУИТ» www.vsuet.ru «03» февраля 2020 г.

Автореферат разослан «28» февраля 2020 г.

Ученый секретарь совета по защите
диссертаций на соискание
ученой степени кандидата
наук, на соискание доктора
наук Д.212.035.04, к.т.н., доцент

Е.В. Белокурова

Общая характеристика работы

Актуальность темы исследования. На сегодняшний день производство зерновых культур в России резко увеличилось, возрос экспорт зерновых и зернобобовых культур из РФ. За 2018 год поставки выросли на 26,1 %.

Одним из видов зернового сырья, используемого для производства этилового спирта в России, является ячмень. Он возделывается повсеместно – от субтропиков до Заполярья. Однако, ячмень относится к проблемным видам сырья, что связано с высоким содержанием гемицеллюлоз, которые увеличивают вязкость развариваемой массы, потерю сбраживаемых углеводов на стадии водно-тепловой обработки сырья.

Высокое содержание гемицеллюлоз в сырье требует снижения концентрации сушла до 14,5 – 16,5 % СВ, что увеличивает себестоимость готового продукта. Опыт показывает, что переработка концентрированных ячменных замесов невозможна без применения ферментных препаратов, расщепляющих гемицеллюлозную фракцию зерна ячменя.

В настоящее время зерновое сырье перерабатывается под действием высоких температур, что сопровождается большими теплоэнергозатратами для заводов. В последние годы из-за постоянного увеличения цен на тепло- и энергоносители эти показатели в структуре себестоимости спирта составляют все более значимую величину.

Перспективным направлением в совершенствовании технологии спирта из ячменя является применение механико-ферментативной обработки сырья с использованием высокоэффективных ферментных препаратов, действующих на различные биополимеры зерна.

В связи с этим актуальной проблемой является усовершенствование технологии получения этанола, целью которой является сокращение расхода теплоэнергоресурсов, увеличение производительности технологического оборудования и выхода спирта.

Работа выполнена в рамках прикладных научных исследований и экспериментальных разработок приоритетного направления развития НОЦ «Живые системы» ФГБОУ ВО «ВГУИТ» «Живые системы в технологиях переработки сельскохозяйственного сырья и обеспечение здорового питания»; плана госбюджетной инициативной научно-исследовательской работы кафедры «Технология бродильных и сахаристых производств» по теме «Совершенствование технологических процессов бродильных и сахаристых производств с использованием физико-химических, ресурсосберегающих, биохимических методов воздействия и нетрадиционного сырья».

Степень разработанности темы. Исследованиям в области биотехнологии этанола, культивировании спиртовых дрожжей посвящены научные работы Б.А. Устинникова, С.В. Вострикова, В.А. Полякова, Л.В. Римаревой, Т.В. Мелединой, Л.Н. Крикуновой, Н.В. Шелеховой, А.И. Коновалова, С.Е. Харина, А.Л. Малченко, D.J. Manners, C.W. Bamforth, S.R. Couto, M.A. Sanromán.

Однако воздействие ферментов гемицеллюлазы на различные биополимеры зерна изучено недостаточно и поэтому требует дальнейшего и детального рассмотрения.

Цель диссертационной работы: научное обоснование и совершенствование биотехнологии этанола из ячменя путем применения мультиэнзимной композиции на стадии водно-тепловой обработки сырья.

В соответствии с поставленной целью решались задачи:

- обосновать выбор ферментных препаратов и спроектировать мультиэнзимную композицию для гидролиза биополимеров ячменного сырья;
- оптимизировать условия водно-тепловой обработки ячменного замеса при использовании разработанного мультиэнзимного комплекса;
- исследовать влияние ферментного комплекса на содержание глюкозы в процессе деструкции полисахаридов зернового сырья;
- обосновать условия культивирования спиртовых дрожжей при ферментативной обработке белковой и фитиновой комбинаций зернового сырья;
- изучить влияние мультиэнзимного комплекса на процесс спиртового брожения ячменного суслеа;
- усовершенствовать биотехнологию этанола из ячменя с использованием комплекса ферментов, выявить преимущества предлагаемых технических решений, провести апробацию в опытно-производственных условиях.

Научная новизна работы. Предложены эффективные ферментные препараты для гидролиза биополимеров ячменного сырья.

Установлены закономерности деструкции биополимеров ячменя под действием новой мультиэнзимной композиции, спроектированной на основе выбранных ферментных препаратов.

Обоснованы условия, параметры и режимы биотехнологии этанола с максимальным выходом конечного продукта при минимальном содержании примесей.

Изучено влияние протеазы и фитазы на процесс культивирования спиртовых дрожжей.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Усовершенствованная биотехнология этанола из ячменя апробирована в опытно-производственных условиях ООО «Аннинский спиртзавод» (Воронежская область, 2018 г.), подтвердившая реальные возможности внедрения предложенных технологических и технических решений (акт испытаний), новизна технических решений подтверждена патентом РФ «Способ получения этилового спирта» № 2653432 от 08 мая 2018 г.

Основные финансово-экономические показатели выполненных разработок доказывают экономическую целесообразность внедрения разработанных технологических и технических разработок в производство: расчетный экономический эффект от реализации предлагаемых технических

и технологических решений составляет 12774,7 тыс. рублей в год для завода производительностью 3000 дал. а. а. (абсолютного алкоголя) в сутки.

Даны рекомендации по снижению дозировки α -амилазы и глюкоамилазы при использовании мультиэнзимного комплекса на стадии водно-тепловой обработки, что позволило увеличить содержание глюкозы в сусле на 40,5 % по сравнению с контролем, повысить выход спирта на 1,5 дал/т усл. крахмала, сократить продолжительность процесса брожения до 48-50 ч и уменьшить общее содержание примесей в зрелой бражке на 12 %. Результаты экспериментальных исследований используются в образовательном процессе для подготовки бакалавров и магистров по направлениям 19.03.02, 19.04.02 «Продукты питания из растительного сырья» (дисциплины «Технология отрасли», «Биотехнология броидильных производств»), «Интенсификация технологических процессов броидильных производств»), 19.03.01, 19.04.01 «Биотехнология» (дисциплина «Теоретические основы биотехнологии»).

Методы исследования. Методология базируется на основе обобщения известных принципов естественнонаучных знаний и опыта современного производства этанола с использованием ферментов.

В работе применяли современные и инструментальные, в том числе химические, органолептические, биохимические, микробиологические методы исследования сырья, полуфабрикатов и готовой продукции. Экспериментальные результаты статистически обработаны ПО MAPLE на основании серии опытов.

Научные положения, выносимые на защиту:

- состав и свойства мультиэнзимной композиции для обработки ячменного сырья на стадиях производства процесса;
- физиолого-биохимические особенности дрожжей при культивировании на питательных средах после ферментативной обработки;
- параметры, режимы условия и преимущества предложенной мультиферментной технологии производства этанола из ячменя.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Диссертационное исследование соответствует п. п. 2, 3, 4 паспорта специальности 05.18.07 – «Биотехнология пищевых продуктов и биологических активных веществ».

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность результатов работы подтверждена сравнительной оценкой информационно-патентных и собственных результатов; применением современных объективных методов анализа, математической обработкой результатов исследования. Основные положения диссертационной работы опубликованы в научных изданиях, доложены и обсуждены на ежегодных научных сессиях в ФГБОУ ВО «ВГУИТ», на конференциях различного уровня и выставках: «Инновационные решения при производстве продуктов питания из растительного сырья» (Воронеж, 2014, 2016, 2017); «Производство и переработка сельскохозяйственной продукции: менеджмент качества и безопасности» (Воронеж, 2015, 2016); «Продовольственная безопасность:

научное, кадровое и информационное обеспечение» (Воронеж, 2015); «Инновационные технологии в пищевой промышленности: наука, образование и производство» (Воронеж, 2016); Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием, посвященная 120-летию со дня рождения С. Е. Харина «Физическая и коллоидная химия – основа новых технологий и современных методов анализа в химической и пищевой отраслях промышленности» (Воронеж, 2016); «Инновационные разработки молодых ученых Воронежской области на службу региона» (конкурс проектов по программе «У.М.Н.И.К.») (Воронеж, 2016); «Инновационные технологии сельского хозяйства, пищевого производства и продовольственного машиностроения» (Воронеж, 2017); «Tropical areas of fundamental and applied research XII: Proceeding so the Conference» (North Charleston, SC, USA, 2017); «Продовольственная безопасность: научное, кадровое и информационное обеспечение в рамках Евразийской технологической платформы «Технологии пищевой и перерабатывающей промышленности АПК – продукты здорового питания» (Воронеж, 2017, 2018); «Перспективы и проблемы инновационного развития социально-экономических систем» (Воронеж, 2018); «Актуальные проблемы в современной науке и пути их решения» (Москва, 2018); «Новое в технологии и технике функциональных продуктов питания на основе медико-биологических воззрений» (Воронеж, 2018, 2019).

За научные исследования в области совершенствования предложенной технологии постановлением правительства Воронежской области от 20.12.2018 г. № 1147 присуждена премия правительства Воронежской области в области науки и образования и присвоено звание «Лауреат премии правительства Воронежской области среди молодых ученых».

Публикации. По результатам исследований опубликованы 39 научных работ, в том числе 6 статей в журналах, рекомендованных ВАК Министерства науки и высшего образования РФ, 25 статей в изданиях РИНЦ, получен патент РФ.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, пяти глав, выводов по основным результатам работы, списка используемых источников из 148 наименований, в том числе 70 на иностранных языках, приложений, представлена на 155 страницах машинописного текста, содержит 20 таблиц, 49 рисунков.

Личное участие автора в получении результатов, изложенных в диссертации, состоит в анализе информации по изучаемой проблеме, выборе направления исследований, постановке и выполнении основной части экспериментов, исследовании реологических характеристик зерновых замесов, оптимизации процесса осахаривания. Автором предложена эффективная мультиэнзимная композиция для производства этанола из ячменя, исследовано влияние комплекса ферментов на физиологические свойства спиртового дрожжей в процессе культивирования и на процесс брожения ячменного сула, проведена промышленная апробация предлагаемых технических и технологических решений.

Основное содержание работы

Во введении обоснована актуальность диссертационной работы, приведены цель, задачи, научная новизна исследований, показана практическая значимость полученных результатов, представлены научные положения, выносимые на защиту.

В первой главе систематизированы результаты патентно-информационного поиска о перспективных направлениях в совершенствовании технологии спирта из проблемного сырья. Рассмотрена целесообразность применения мультиэнзимных комплексных препаратов, позволяющих эффективно гидролизовать биополимеры зернового сырья, повысить выход конечного продукта и уменьшить содержание примесей.

На основании проведенного анализа сформулированы цель и задачи диссертационной работы, определены методы и задачи их решения.

Во второй главе в соответствии с целью и задачами представлена структурная схема теоретических и экспериментальных исследований для их реализации (рис. 1).

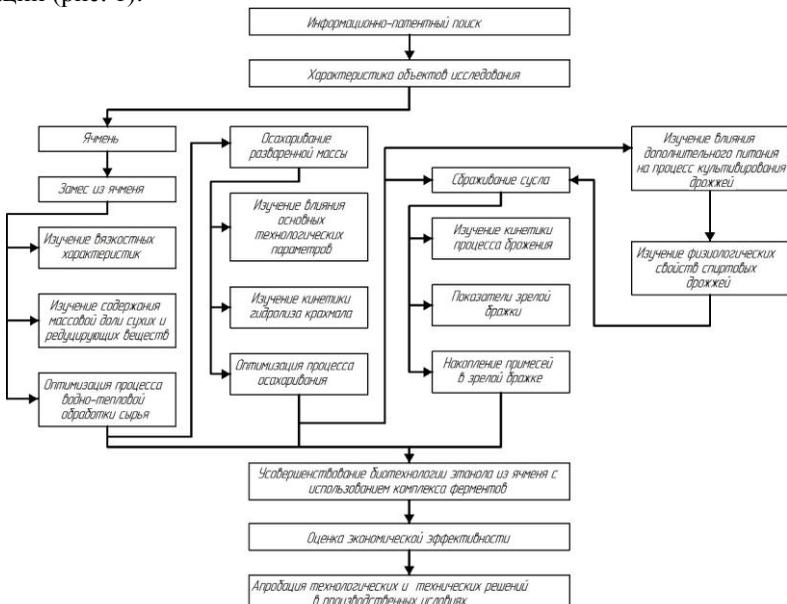


Рис. 1 Схема экспериментальных исследований

Экспериментальные исследования и обработка результатов проводились в лабораториях кафедры технологии бродильных и сахаристых производств, в лабораториях Центра коллективного пользования, отделе стандартизации и метрологии ФГБОУ ВО «ВГУИТ». Производственные испытания биотехнологии этанола из ячменя проводили в опытно-производственных условиях ООО «Аннинский спиртзавод».

Для приготовления образцов замесов использовали зерно ярового ячменя сорта «Вакула»; воду по СанПиН 2.1.4.1074–01; дрожжи

Saccharomyces cerevisiae расы XII. При водно-тепловой и ферментативной обработке замеса использовали ферментные препараты Alphaferm 3500L, ViscoStar 150L, BrewZyme BGX, Shearzyme 500L, Prolyve BS Liquide, Biozim 800L, Kingphos (производитель: Shandong Longda Bio-Products Co., Ltd., Китай).

Газохроматографическим методом по ГОСТ Р 55792-2013 определяли содержание летучих органических примесей в бражке.

Проводили математическую обработку экспериментальных данных. Для оценки адекватности математической модели был проведен дисперсионный анализ (ANOVA) эксперимента в программе Design Expert (Stat-Ease Inc.).

В третьей главе обосновано применение мультиэнзимной композиции на стадии водно-тепловой обработки при производстве этанола из проблемного сырья.

В производстве спирта вязкость зерновых замесов обусловлена химическим составом сырья и режимами его обработки, а именно: наличием в зерновом сырье крахмала, белка, гемицеллюлоз, слизей, β -глюкана, способом водно-тепловой обработки, выбором температурного режима, продолжительности, используемых ферментных препаратов разжижающего действия.

Изучено влияние температуры на вязкость замесов, получаемых из пшеницы, ржи и ячменя, со степенью помола 75-80 % и 95-100 %. Замес готовили смешиванием измельченного зерна с водой температурой 40 – 45 °С в соотношении 1:3.

Максимальная вязкость замеса со степенью измельчения 75–80 %: достигается для ржи при температуре 65 °С, для пшеницы 75 °С, для ячменя 85 °С. Максимальная вязкость замеса со степенью измельчения 95–100 %: достигается для ржи при температуре 60 °С, для пшеницы 70 °С, для ячменя 80 °С (рис. 2). Это соответствует температуре клейстеризации крахмала вышеперечисленных культур. Дальнейший нагрев приводит к некоторому снижению вязкости, что объясняется деструкцией трехмерной сетки клейстера под воздействием повышения температуры и перемешивания.

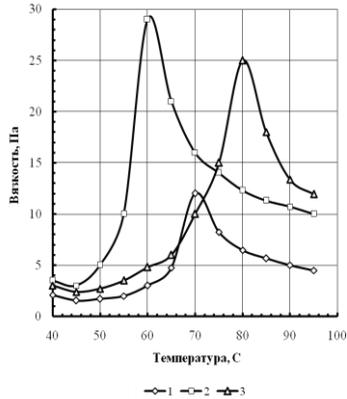


Рис. 2 Влияние температуры на вязкость замесов со степенью измельчения 95–100 %: 1 – пшеница; 2 – рожь; 3 – ячмень

На вязкость замесов оказывают влияние степень измельчения зерна, гидромодуль (m) и применяемые ферментные препараты. При увеличении гидромодуля вязкость замеса снижается. В замесах с гидромодулем 3,5 вязкость в 2–2,5 раза ниже, чем в замесах с гидромодулем 2,5. Вязкость ячменных замесов обусловлена не только крахмалом, но и различными гемицеллюлозами и белками, которые в ходе водно-тепловой обработки набухают, образуя комплекс, затрудняющий доступ ферментов к крахмальным гранулам. Это приводит к снижению степени ферментативного гидролиза полисахаридов до сбраживаемых сахаров. Изучали эффективность воздействия ферментов, действующих на некрахмалистые полисахариды, на вязкость ячменного замеса. Отмечено, что вязкость замеса зависит от применяемого ферментного препарата. Максимальное значение вязкости соответствует контрольному образцу (без ферментов) и составляет около 25 Па \cdot с ($t = 80$ °C). Минимальная вязкость (14 Па \cdot с) наблюдается в случае применения ферментного препарата ViscoStar 150L.

При ферментативном гидролизе препаратом ViscoStar 150L происходит изменение состава полисахаридов в сторону повышения низкомолекулярных фракций, повышается подвижность замесов. Ферментные препараты Shearzyme 500L и BrewZyme BGX менее эффективны для данного вида сырья, поэтому последующие исследования проводились с использованием препарата ViscoStar 150L (рис. 3).

Продолжительность обработки замеса ферментным препаратом ViscoStar 150L влияет на его вязкость. С увеличением продолжительности обработки вязкость замеса уменьшается. Ферментный препарат Alphaferm 3500L значительно снижает вязкость на 48 % и 68 % при дозировках 0,5 и 1,0 АС/г крахмала соответственно. Кроме того, при применении этого ферментного препарата пик максимальной вязкости сдвигается в сторону меньших температур и соответствует 60 °C. Снижение вязкости замеса происходит за счет деструкции цепей крахмала α -амилазой до декстринов и небольшого количества сахаров.

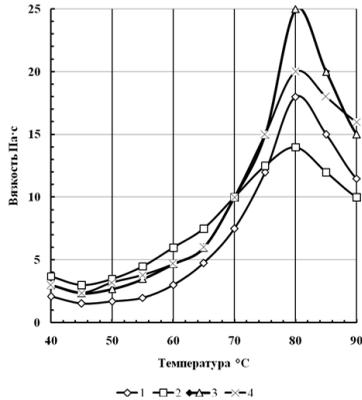


Рис. 3 Влияние температуры и ферментных препаратов, действующих на некрахмалистые полисахариды на вязкость замесов со степенью измельчения 95 – 100 %: 1 – BrewZyme BGX (0,1 см³/кг крахмала); 2 – ViscoStar 150L (0,1 см³/кг крахмала); 3 – контроль; 4 – Shearzyme 500L (0,1 см³/кг крахмала)

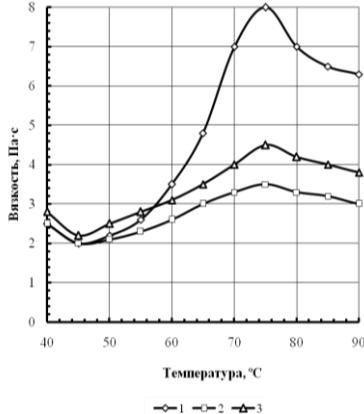


Рис. 4 Влияние температуры и комплекса ферментных препаратов на вязкость ячменных замесов со степенью измельчения 95 – 100 %: 1 – Alphaferm 3500L (1,0 ед. АС/г крахмала); 2 – Alphaferm 3500L (1,0 ед. АС/г крахмала), Prolyve BS Liquide (0,2 ед. ПС/г крахмала), ViscoStar 150L (0,02 ед. β-ГКС/г крахмала); 3 – Alphaferm 3500L (0,5 ед. АС/г крахмала), Prolyve BS Liquide (0,2 ед. ПС/г крахмала), ViscoStar 150L (0,02 ед. β-ГКС/г крахмала)

Комбинированное действие мультиферментативного комплекса снижает вязкость ячменного замеса на 82 % по сравнению с контролем, происходит незначительное увеличение вязкости, без резких скачков (рис. 4). Применение дополнительных ферментных препаратов ViscoStar 150L и Prolyve BS Liquide в ходе водно-тепловой обработки снижает расход α-амилазы с 1,0 до 0,5 единиц. АС/г крахмала. Это позволяет нагревать замес до высокой температуры и выдерживать его в течение времени, которое необходимо по технологическому режиму, перерабатывать высококонцентрированные замесы, снижать расход теплоэнергоресурсов, увеличить производительность предприятия.

Математическая модель изучаемого процесса представляется в виде полинома второй степени:

$$y = b_0 + \sum_{i=1}^n b_i x_i + \sum_{i=1}^n b_{ii} x_i^2 + \sum_{i < j}^n b_{ij} x_i x_j$$

С помощью математической обработки экспериментальных данных методом полного факторного эксперимента с применением центрального композиционного ротatableльного униформпланирования получено уравнение регрессии 2-го порядка, адекватно описывающее процесс механической и ферментативной обработки замеса, подтверждающее выбранные оптимальные условия:

$$y_1 = 15,12 + 0,41x_1 + 0,17x_2 + 0,16x_3 + 0,18x_4 + 0,06x_1x_2 + 0,01x_1x_3 - 0,03x_1x_4 + \\ + 0,04x_2x_3 - 0,02x_2x_4 + 0,05x_3x_4 - 0,01x_1^2 - 0,07x_2^2 - 0,05x_3^2 - 0,07x_4^2$$

Для определения оптимального режима водно-тепловой обработки был использован метод неопределенных множителей Лагранжа, который установил, что максимальное накопление твердых частиц в смеси составляет 16,4 % и достигается через 2,5 часа при следующих дозах ферментных препаратов: Alphaferm 3500L – 0,6 ед. АС/г крахмала, ViscoStar 150L – 0,025 ед β-ГКС/г крахмала, Proluve BS Liquide – 0,25 ед. ПС/г крахмала.

В четвертой главе исследовано влияние основных технологических факторов на процесс осахаривания разваренной массы. В процессе осахаривания изучали динамику накопления глюкозы в сусле в зависимости от температуры, рН и дозировки глюкоамилазы. Отмечено, что температура оказывает существенное влияние на процесс осахаривания. С повышением температуры увеличивается реакционная способность молекул субстрата, как следствие возрастания кинетической энергии. Максимальное накопление глюкозы наблюдается при температуре 60 °С и составляет 11,1 г/см³, что, очевидно, соответствует оптимуму действия применяемой глюкоамилазы (рис. 5).

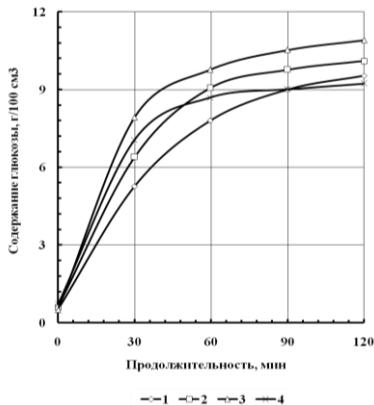


Рис. 5 Динамика образования глюкозы при осахаривании разваренной массы в зависимости от температуры, °С: 1 – 50; 2 – 55; 3 – 60; 4 – 65

Оптимизация процесса осахаривания разваренной массы была выполнена с применением метода полного факторного эксперимента 2^4 с использованием центрального композиционного ротатабельного униформпланирования эксперимента (ЦКРП).

В качестве контролируемых факторов были выбраны: X_1 – дозировка ферментного препарата Biozim 800L, X_2 – температура, X_3 – pH, X_4 – продолжительность гидролиза.

Было получено уравнение регрессии 2-го порядка, адекватно описывающее процесс осахаривания, подтверждающее достоверность выбора оптимальных условий:

$$U = 9,4 + 0,75X_1 + 0,12X_2 + 0,25X_3 + 0,86X_4 - 0,18X_2^2 - \\ - 0,14X_3^2 - 0,15X_1X_4 + 0,12X_2X_3 + 0,13X_1X_2X_3 - 0,12X_1X_3X_4$$

Установлено, что максимальное накопление глюкозы в сусле достигается при продолжительности осахаривания 2,05 ч, pH 4,55, температуре 60,2 °C и дозировке ферментного препарата Biozim 800L – $X_1 = 4,8$ ед ГЛС / г крахмала.

В пятой главе изучено влияние различных источников дополнительного питания на процесс дрожжегенерирования в спиртовом производстве.

Совокупность характеристик, отражающих потребности дрожжевых организмов в определенных физико-химических условиях среды, относят к физиологическим признакам. Одним из основных признаков является способность к сбраживанию сахаров до этанола и углекислого газа. Способность дрожжей сбраживать определенное количество сахара за единицу времени называют бродительной активностью, которая определяется по количеству выделившегося диоксида углерода в единицу времени. Одновременно определяют процесс размножения дрожжей и накопление в клетках гликогена.

Повышение бродительной активности дрожжей может быть достигнуто применением сбалансированного состава питательной среды.

Изучено влияние ферментных препаратов нейтральной протеазы Prolyve BS Liquide и фитазы Kingphos на бродительную активность спиртовых дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* расы XII. При приготовлении дрожжевого суслу в него вносили ферментный препарат Prolyve BS Liquide дозировкой 0,3 ед. ПС/г крахмала и ферментный препарат фитазы Kingphos дозировкой 0,5 ед. ФС/г. крахмала. В контроле дополнительные ферментные препараты при приготовлении дрожжевого суслу не вносили. Дрожжи вводились в сусло при температуре 30 °C из расчета 10 % от объема суслу.

Процесс дрожжегенерирования проводили 18–20 ч при температуре 28–30 °C в колбах на 750 см³. Количество выделенного углекислого газа определялось почасовым весовым методом.

Содержание аминного азота в дрожжевом сусле регулировали дозировкой ферментного препарата нейтральной протеазы Prolyve BS

Liquide, который частично гидролизует белок зернового сырья до свободных аминокислот.

Для изучения влияния ионов фосфора на эффективность биосинтеза биомассы дрожжевых клеток в сусле после осахаривания вносили ортофосфорную кислоту H_3PO_4 из расчета 1 кг/т сырья; в третьем и четвертом, соответственно, 3 и 5 кг/т сырья. Кроме того, изучено влияние фосфора, содержащего в сырье. Содержание фосфора в дрожжевом сусле регулировали дозировкой ферментного препарата фитазы Kingphos, который гидролизует фитин зернового сырья до остатков фосфорной кислоты. Фитазу вносили в дрожжевое сусло при температуре 45 – 50 °С из расчета 0,3 – 0,7 ед. ФС/г. крахмала и выдерживали в течение 50 - 60 мин.

В табл. 1 представлено влияние различных дозировок протеолитического ферментного препарата Proluve BS Liquide на рост дрожжевой биомассы в процессе дрожжегенерирования.

Таблица 1 – Влияние ферментного препарата Proluve BS Liquide на биосинтез спиртовых дрожжей

Дозировка ферментного препарата Proluve BS Liquid	Количество дрожжей на 20 ч		
	Клеток, $\cdot 10^6/\text{см}^3$	Почкующихся, %	Нежизнеспособных, %
Контроль	90	6,0	2,5
0,1 ед. ПС/г крахмала	120	5,0	1,5
0,2 ед. ПС/г крахмала	140	4,0	1,0
0,3 ед. ПС/г крахмала	150	4,0	1,0

Установлено, что максимальной бродильной активностью обладают дрожжи, культивируемые на сусле, полученном с использованием протеазы и фитазы. Кроме того, максимальная бродильная активность спиртовых дрожжей в контроле наблюдается к 12 часам роста, а в опытных образцах – к 10 часам роста.

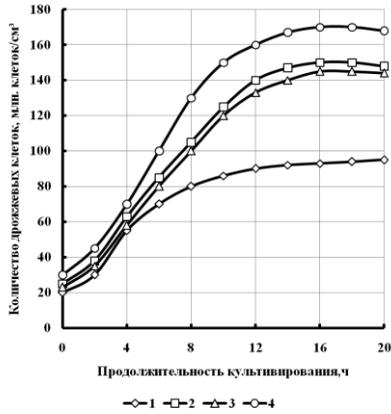


Рис. 6 Влияние ферментных препаратов на динамику накопление биомассы дрожжей: 1 – контроль; 2 – протеаза 0,2 ед. ПС/г крахмала; 3 – фитаза 0,5 ед. ФС/г. крахмала; 4 – протеаза 0,2 ед. ПС/г крахмала, фитаза 0,5 ед. ФС/г. крахмала

Установлено, что максимальное накопление дрожжевых клеток наблюдается при внесении в сусло ферментного препарата нейтральной протеазы Prolyve BS Liquide дозировкой 0,2 ед. ПС/г крахмала и ферментного фитазы Kingphos дозировкой 0,5 ед. ФС/г. крахмала, содержание дрожжевых клеток в зрелых дрожжах достигает 170 млн. клеток/см³ к 16 – 18 часам культивирования (рис. 6), дрожжи имеют высокую бродительную активность (рис. 7).

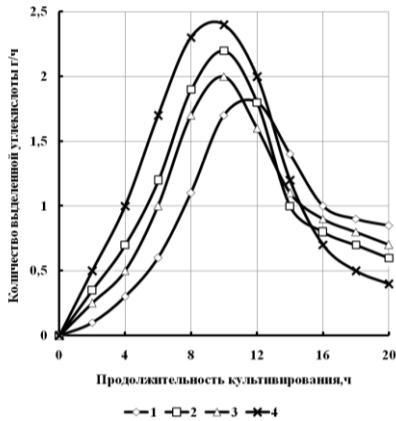


Рис. 7 Влияние ферментных препаратов на бродительную активность спиртовых дрожжей: 1 – контроль; 2 – протеаза 0,2 ед. ПС/г крахмала; 3 – фитаза 0,5 ед. ФС/г. крахмала; 4 – протеаза 0,2 ед. ПС/г крахмала, фитаза 0,5 ед. ФС/г. крахмала

Процесс спиртового брожения является самым длительным, инерционным и наименее управляемым в технологической цепи производства спирта. Эффективность процесса спиртового брожения зависит главным образом от состава питательной среды, физиологических и технологических свойств, применяемых для этой цели дрожжей, способов

сбраживания среды. Основным показателем интенсивности процесса брожения является количество выделяемого диоксида углерода в единицу времени. По оптимизированным параметрам на стадии осахаривания было получено сусло, на котором поставлены бродильные пробы с совместным применением дополнительных ферментов (ViscoStar 150L, Prolyve BS Liquide, Kingphos) и без них (контроль).

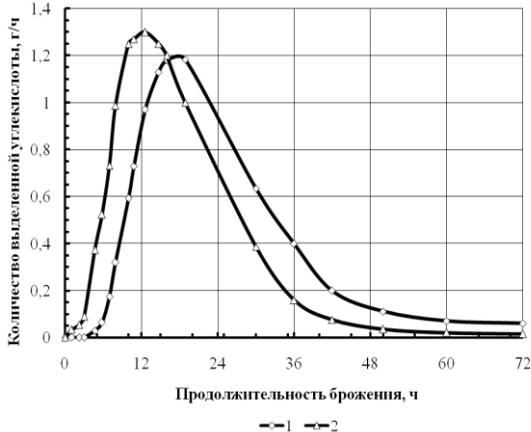


Рис. 8 Кинетика процесса сбраживания ячменного сусла: 1 – контроль, 2 – опыт

Общая продолжительность брожения в контрольной пробе составила 68 – 70 ч, в опытной – 48 – 50 ч (рис. 8). Брожение в опытной пробе протекает более интенсивно, чем в контрольной пробе. Это объясняется тем, что при использовании комплекса ферментов, содержащего кроме амилаз протеолитический фермент, который гидролизует белковый комплекс зерна ячменя до пептидов и аминокислот, сусло обогащается дополнительным азотистым питанием.

Применение фитазы приводит к разложению зернового фитина. В процессе гидролиза высвобождаются фосфор и ценные микроэлементы, такие как кальций, цинк, магний и др., которые стимулируют рост и развития дрожжевых клеток.

Дрожжевые клетки, выращенные на сусле, обогащенном аминным азотом, фосфором и микроэлементами, обладают большей физиологической и бродильной активностью, что подтверждают исследования.

В опытном образце степень гидролиза крахмала выше, чем в контрольном, тем самым сокращается продолжительность стадии дображивания, а в целом и весь процесс брожения.

По окончании срока брожения в полученной бражке определяли объемную долю спирта и рассчитывали его выход, а также определяли содержание растворимых несброженных углеводов и нерастворенного крахмала.

Таблица 2 – Показатели зрелой бражки

Показатели	Контроль	Опыт
Объемная доля спирта, % об.	7,8	8,5
Содержание растворимых несброженных углеводов, г/100см ³	0,45	0,25
Содержание нерастворенного крахмала, %	0,1	0,04
Наращение титруемой кислотности, °	0,19	0,15
Выход спирта, дал/т условного крахмала	65,9	67,4
Продолжительность брожения, ч	68,0	48,0

Установлено, что в опытном образце наблюдается увеличение выхода спирта по сравнению с контролем, на 1,5 дал /т условного крахмала (табл. 2). Это объясняется тем, что при использовании комплекса ферментов уменьшается количество вторичных продуктов, наиболее полно сбраживаются углеводы суслу за счет более полного и глубокого гидролиза крахмала и высокой бродительной активности дрожжей.

Обогащение суслу свободными аминокислотами за счет действия протеолитических ферментов на белки ячменя, способствует сокращению расхода сахара на построение биомассы дрожжей, и, соответственно, ведет к увеличению образования этилового спирта. Применение ферментных препаратов, действующих на некрахмалистые полисахариды, приводит к увеличению выхода спирта за счет гидролиза β -глюкана сырья до глюкозы.

Изучено влияние комплекса ферментов на накопление примесей в зрелой бражке.

Таблица 3 – Содержание летучих примесей в зрелой бражке

Летучие примеси	Контроль, % об.	Опыт, % об.
Ацетальдегид	0,0037	0,0018
Этилацетат	0,0072	0,0029
Метанол	0,0087	0,0079
Пропанол	0,0065	0,0028
Изопропанол	0,0012	0,0011
Изобутанол	0,014	0,015
Изоамилол	0,032	0,034
Общее количество примесей	0,0733	0,0655

Установлено, что экспериментальный образец содержит меньше ацетальдегида, этилацетата, метанола, пропанола и изопропанола, чем контрольный образец. Содержание изобутанола и изоамилола при этом несколько выше. Общее количество примесей в экспериментальном образце на 12 % ниже, чем в контрольном, что позволит облегчить последующую ректификацию и улучшить качество готовой продукции (табл. 3).

Основные выводы и результаты

1. Обоснован выбор комплексного ферментного препарата ViscoStar 150L и впервые показано его влияние на величину вязкости ячменного

замеса. Установлено, что применение мультиэнзимного комплекса позволяет уменьшить вязкость ячменного замеса на 82 % по отношению к контрольному образцу.

2. Оптимизированы условия водно-тепловой обработки сырья. Обработку следует проводить при следующих параметрах: максимальное накопление сухих веществ в замесе составляет 16,4 % и достигается при продолжительности 2,5 ч. и следующих дозировках ферментных препаратов: Alphaferm 3500L – 0,6 ед. АС/г крахмала, ViscoStar 150L – 0,025 ед. β-ГКС/г крахмала, Proluve BS Liquide – 0,25 ед. ПС/г крахмала.

3. Исследовано влияние ферментного комплекса на содержание глюкозы в процессе деструкции полисахаридов зернового сырья. Установлено, что максимальное накопление глюкозы в сусле достигается при продолжительности осахаривания 2,05 ч, рН 4,55, температуре 60,2°С и дозировке ферментного препарата Biozim 800L – $X_1 = 4,8$ ед ГЛС/г крахмала. Применение мультиэнзимного комплекса на стадии водно-тепловой обработки позволяет увеличить содержания глюкозы в сусле на 40,5 %, по сравнению с контролем.

4. Обоснованы условия культивирования спиртовых дрожжей при ферментативной обработке белковой и фитиновой комбинаций зернового сырья. Установлено, что максимальное накопление дрожжевых клеток наблюдается при внесении в сусле ферментного препарата нейтральной протеазы Proluve BS Liquide дозировкой 0,2 ед. ПС/г крахмала и ферментного фитазы Kingphos дозировкой 0,5 ед. ФС/г. крахмала, содержание дрожжевых клеток в зрелых дрожжах достигает 170 млн. клеток/см³ к 16 – 18 часам культивирования, дрожжи имеют высокую бродильную активность. Показано влияние комплекса ферментов на физиологические свойства спиртовых дрожжей в процессе культивирования.

5. Показано, что применение мультиэнзимного комплекса на стадии водно-тепловой обработки позволяет увеличить выход спирта на 1,5 дал / т условного крахмала, сократить продолжительность брожения до 48 – 50 ч и уменьшить общее содержание примесей в зрелой бражке на 12 %.

6. Усовершенствована биотехнология этанола из ячменя с применением комплекса ферментов, проведена апробация предлагаемой технологии в опытно-производственных условиях.

Основные публикации по диссертационной работе

Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК РФ

1. Яковлев, А. Н. Применение мультиэнзимного комплекса при получении этилового спирта из проблемного сырья [Текст] / А. Н. Яковлев, С. Ф. Яковлева, О. С. Корнеева, Т. С. Ковалева. – «Вестник Воронежского государственного университета инженерных технологий» // ВГУИТ. – 2012. – №3, С. 148-152. (0,6 п.л.; лично соискателем – 0,25 п.л.)

2. Яковлев, А. Н. Накопление побочных продуктов в процессе спиртового брожения [Текст] / А. Н. Яковлев, С. Ф. Яковлева, Т. С. Ковалева, А. А. Пешков. – «Вестник Воронежского государственного университета

инженерных технологий» // ВГУИТ. – 2013. – №3, С. 183-185. (0,4 п.л.; лично соискателем – 0,15 п.л.)

3. Яковлев, А. Н. Влияние мультиэнзимной композиции на процесс брожения ржаного суслу [Текст] / А. Н. Яковлев, Г. В. Агафонов, С. Ф. Яковлева, Н. И. Алексеева, Т. С. Ковалева. – «Производство спирта и ликероводочных изделий» // ВГУИТ. – № 3. – 2013. – С 26-28. (0,4 п.л.; лично соискателем – 0,15 п.л.)

4. Алексеева, Н. И. Исследование биосинтеза глюкоамилазы дрожжами *Saccharomyces cerevisiae* У-717 [Текст] / Н. И. Алексеева, А. Е. Чусова, А. Н. Яковлев, Т. С. Ковалева. – «Производство спирта и ликероводочных изделий» // ВГУИТ. – № 4. – 2013. – С 34-37. (0,5 п.л.; лично соискателем – 0,2 п.л.)

5. Агафонов, Г. В. Влияние технологических параметров на процесс осахаривания при производстве этанола из ячменя [Текст] / Г. В. Агафонов, А. Н. Яковлев, Т. С. Ковалева, С. Ф. Яковлева. – «Вестник Воронежского государственного университета инженерных технологий» // ВГУИТ. – 2016. – №1, С. 211-214. (0,5 п.л.; лично соискателем – 0,2 п.л.)

6. Ковалева, Т. С. Влияние протеазы и фитазы на физиологическое состояние спиртовых дрожжей при культивировании [Текст] / Г. В. Агафонов, А. Н. Яковлев, С. Ф. Яковлева. – «Вестник Воронежского государственного университета инженерных технологий» // ВГУИТ. – 2019. Т. 81 – №4, С. 98-102. (0,96 п.л.; лично соискателем – 0,3 п.л.)

Статьи и материалы конференций

7. Ковалева, Т. С. Влияние мультиэнзимного комплекса на реологические характеристики ячменных замесов [Текст] / Т. С. Ковалева, Г. В. Агафонов, А. Н. Яковлев. – «Актуальная биотехнология» // ВГУИТ. – Воронеж, 2016, №3 (18). – С. 179. (0,12 п.л.; лично соискателем – 0,07 п.л.)

8. Ковалева, Т. С. Влияние температуры и pH на процесс осахаривания разваренной массы [Текст] / Т. С. Ковалева, Г. В. Агафонов. – Материалы всероссийской научно-технической конференции «Инновационные технологии сельского хозяйства, пищевого производства и продовольственного машиностроения» // ВГУИТ. – Совет молодых ученых и специалистов Евразийской технологической платформы «Технологии пищевой и перерабатывающей промышленности АПК – продукты здорового питания». – Воронеж, 2017. – С. 50-54. (0,6 п.л.; лично соискателем – 0,4 п.л.)

9. Ковалева, Т. С. Исследование процесса осахаривания разваренной массы в технологии получения этанола из ячменя [Текст] / Т. С. Ковалева, Г. В. Агафонов, А. Н. Яковлев // Topical areas of fundamental and applied research XII: Proceedings of the Conference. North Charleston, 5-6.06.2017, Vol. 1. – North Charleston, SC, USA: CreateSpace, 2017, 123-126 p. (0,5 п.л.; лично соискателем – 0,3 п.л.)

10. Агафонов, Г. В. Влияние комплекса ферментных препаратов на показатели зрелой бражки [Текст] / Г. В. Агафонов, А. Н. Яковлев, Т. С. Ковалева, С. Ф. Яковлева // «Актуальная биотехнология». – 2017, №2 (21). – С. 221-222. (0,25 п.л.; лично соискателем – 0,15 п.л.)

11. Ковалева, Т. С. Влияние основных технологических факторов на процесс осахаривания разваренной ячменной массы [Текст] / Т. С. Ковалева, Г. В. Агафонов, А. Н. Яковлев // Евразийский союз ученых, Москва – 2018. № 11-2 (56). С. 10-13. (0,5 п.л.; лично соискателем – 0,3 п.л.)

12. Яковлев, А. Н. Влияние ферментного комплекса на процесс водно-тепловой обработки ячменя [Текст] / А. Н. Яковлев, Г. В. Агафонов, С. Ф. Яковлева, Т. С. Ковалева. – «Актуальная биотехнология». – Воронеж: 2015. – №3 (14), С. 93. (0,12 п.л.; лично соискателем – 0,05 п.л.)

13. Ковалева, Т. С. Разработка технологии получения этанола из ячменя с применением мультиэнзимного комплекса [Текст] / Т. С. Ковалева, Г. В. Агафонов. – Сборник докладов Региональной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Инновационные разработки молодых ученых Воронежской области на службу региона» (конкурс проектов по программе «У.М.Н.И.К.») // ВГУИТ. – Воронеж, 2016. – С. 147. (0,12 п.л.; лично соискателем – 0,08 п.л.)

14. Ковалева, Т. С. Проблема безопасности алкогольной продукции и этилового спирта [Текст] / Т. С. Ковалева // В сборнике: «Перспективы и проблемы инновационного развития социально-экономических систем». Материалы VI национальной научно-практической конференции научных сотрудников, специалистов, преподавателей, аспирантов. – 2018. – С. 39-40. (0,25 п.л.; лично соискателем – 0,25 п.л.)

15. Яковлев, А. Н. Влияние состава питательной среды на накопление биомассы спиртовых дрожжей [Текст] / А. Н. Яковлев, Г. В. Агафонов, Т. С. Ковалева, С. Ф. Яковлева // В сборнике: «Новое в технологии и технике функциональных продуктов питания на основе медико-биологических воззрений». Сборник статей VIII Международной научно-технической конференции, посвященной 90-летию технологического факультета ВГУИТ. – 2019. – С. 421-424. (0,5 п.л.; лично соискателем – 0,2 п.л.)

Изобретения

16. Патент на изобретение № 2653432 RU МПК C12P 7/06 (2006.01) Способ получения этилового спирта [Текст] / Г.В. Агафонов, А.Н. Яковлев, С.Ф. Яковлева, Т.С. Ковалева, заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО «ВГУИТ» – № 2017114134; заявл. 24.04.2017; опубл. 08.05.2018 – 5 с. (0,6 п.л.; лично соискателем – 0,25 п.л.)

Автор выражает особую благодарность д.т.н., профессору Агафонову Геннадью Вячеславовичу и к.т.н., доценту Яковлеву Алексею Николаевичу за консультации по отдельным разделам при подготовке диссертации.

Подписано в печать _____ 2020 г.

Формат 60x84 1/16

Усл. печ. л. 1,0. Тираж 100 экз. Заказ № _____