

ВЛИЯНИЕ СТЕПЕНИ ИЗМЕЛЬЧЕНИЯ ЗЕРНОВОГО СЫРЬЯ И ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЙ АКТИВАЦИИ ДРОЖЖЕЙ НА ВЫХОД СПИРТА

Показано, что при водно-тепловой обработке суслу из ультрадисперсных частиц зерна размером 250–600 нм увеличивается выход простых сахаров даже без предварительного ферментативного гидролиза. Исследована возможность использования более низких (не более 60 °С) температур ферментативного гидролиза по сравнению с классическими схемами предобработки зернового затора. Выявлено, что применение ультрадисперсного зернового сырья и предварительной активации спиртовых дрожжей позволяет увеличить накопление спирта в бражке до 8,6%.

Ключевые слова: ультрадисперсное зерновое сырье, минеральные соли, брожение, дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*.

Анализ ситуации, сложившейся в спиртовой промышленности России, и сравнение ее с ведущими зарубежными производителями пищевого спирта показывает, что без внедрения энерго- и ресурсосберегающих технологий и реконструкции под них существующих предприятий российская спиртовая отрасль неконкурентоспособна. Интенсификация и удешевление процесса производства спирта возможно за счет использования более тонкого измельчения зернового сырья, разработки новых способов подготовки сырья к сбраживанию, оптимизации параметров активации спиртовых дрожжей перед сбраживанием и т. д. [1, 2]. В настоящее время стремительно растет еще одно из прикладных применений дрожжей и спиртового брожения – производство топливного биоэтанола первого (из зернового сырья) [3–5] и второго поколения (из целлюлозы) [6–7].

Возможность снизить затраты на всех стадиях производства биоэтанола интенсивно исследуется в лабораториях как у нас в стране, так и за рубежом. Вместе с тем в производстве биоэтанола остаются нерешенными ряд задач:

- полнота гидролиза полисахаридов в сбраживаемых сахарах;
- обеспечение дрожжей питательными элементами, необходимыми для быстрого размножения и синтеза ферментов – гидролитических и цикла брожения;
- интенсификация процесса брожения;
- уменьшение энерго- и ресурсозатрат на производство биоэтанола.

Решить проблему снижения энерго- и ресурсопотребления можно измельчая сырье до наноразмерных частиц, доступных действию

ферментов без предварительной водно-тепловой обработки [8].

Проведенный анализ научных публикаций показал, что в литературе отсутствуют данные о возможном применении зернового сырья, измельченного «сухим способом» до наноразмеров и обработанного ферментами при температуре не выше 60 °С. В связи с этим целью работы являлось изучение влияния степени измельчения крахмалистого сырья и условий предварительной активации дрожжей на выход спирта.

Материалы и методы

В наших экспериментах в качестве крахмалистого сырья применяли зерновую смесь пшеницы и ржи (1:1) со средним содержанием влаги $11,3 \pm 0,3\%$ и условной крахмалистостью $57,5 \pm 0,5\%$. Для исследования брали смесь стандартного измельчения (с проходом через сито с диаметром пор 1 мм не менее 90% измельченного сырья) и образец, предварительно измельченный на варио-планетарной шаровой мельнице РМ 400 (Retsch, Германия) в течение 30 минут при 400 об^{-1} . Размер частиц определяли на автоматизированном интерференционном микроскопе на базе микроскопа МИИ-4М (Россия) по методу, описанному в [8]. Для сбраживания использовали спиртовые сухие дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* расы «АНГЕЛ», полученные путем селекции в исследовательском центре фирмы ANGEL YEAST (Китай) и расы «ХП», представленные руководством ОАО «МордовспиртЪ».

В качестве дополнительного источника минерального питания использовали KNO_3 «ч», NaNO_3 «ч».

Анализ водорастворимых углеводов осуществлялся методом высокоэффективной жидкостной хроматографии на приборе LC-20 Prominence (Shimadzu, Япония) с рефрактометрическим детектором с использованием колонок SupelcoGel PB со сдвоенной предколоной по методу, описанному в [9]. Катионный состав зерна определяли с помощью системы капиллярного электрофореза (Капель 105, Россия). Сусло для эксперимента готовили на основе ультрадисперсного зернового сырья и сырья стандартной степени измельчения из расчета: 1 часть зерна к 3 частям воды, проводили обработку замеса при температуре 60 °С в течение 30 минут, обработанную массу подвергали осахариванию ферментными препаратами в следующих дозах: Альфазим 2500L – 1,2 Е/г крахмала, Диазим Х5 – 5,8 Е/г, Ламинекс БГ – 0,04 Е/г, предоставленные ОАО «Мордовспирт», в течение 1 часа.

Полученное сусло охлаждали, рН доводили до требуемого 1 н раствором H_2SO_4 . Проводили фильтрацию и стерилизацию сусла. Далее осуществляли засев полученной среды сухими засевными дрожжами расы «АНГЕЛ» и расы «ХП» из расчета 0,1 г воздушно-сухих дрожжей на 100 мл сусла. Культивирование вели в биореакторе BIOSTAT Aplus (Sartorius, Германия) при различной аэрации. В ходе проведения опыта рост дрожжевой культуры контролировали гравиметрическим методом. Отбор проб для определения данных показателей проводили каждый час до 17 часов культивирования дрожжей.

После оптимизации условий культивирования данный вариант использовали для активации сухих дрожжей. Полученный инокулят (активированные дрожжи) добавляли в предварительно осахаренное зерновое сусло в концентрации 10%. Процесс брожения контрольных и опытных проб проводили стационарно при постоянной температуре в течение 72 часов в биореакторе BIOSTAT Aplus (Sartorius, Германия).

После завершения процесса брожения в бражке определяли содержание спирта. Полученное содержание спирта пересчитывали на содержание спирта в исходной бражке и рассчитывали теоретический выход абсолютно-безводного спирта.

Все результаты, полученные в ходе эксперимента, подвергли статистической обработке

с использованием стандартных программ. Находили среднее арифметическое и ошибку среднего.

Так как количество объектов в выборке мало ($n < 10$), нормальность распределения представляется сомнительной и для определения значимости различий полученных результатов целесообразно использовать непараметрические критерии. Для суждения о достоверности различий между выборками применялся непараметрический Т-критерий Манна-Уитни и критерий Крускала-Уоллеса [10]. Различия между выборками признавались статистически достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждения

Двухэтапное измельчение зернового сырья позволило получить наноразмерные частицы в диапазоне от 4 до 250 нм (рис. 1).

Известно, что средний размер крахмальных зерен составляет от 0,2 до 2–5 мкм [11]. Следовательно, можно предположить, что в полученных частицах крахмальные зерна разрушены и не требуют воздействия жестких температурных режимов для разваривания. Кроме того, происходит частичное высвобождение простых сахаров даже без добавления гидролитических ферментов (табл. 1).

Поэтому на 1 этапе мы подбирали более низкие температурные режимы для обработки и последующего ферментативного гидролиза сырья. Было выявлено, что температура 60 °С является достаточной для удовлетворительно-го гидролиза крахмала сырья (рис. 2).

На втором этапе мы анализировали прирост биомассы в зависимости от условий культивирования. Как видно из рисунка 3, прирост биомассы в основном наблюдался до 15–16 часов роста.

При этом наиболее интенсивный прирост биомассы происходит в варианте с активной кислотностью среды рН = 4 как в случае с зерном стандартной, так и ультрадисперсной степени измельчения (рис. 4 и 5).

Таблица 1. Влияние степени измельчения зерна на концентрацию сахаров в сусле

| Измельчение | С _{глюкозы} , мг/мл | С _{сахарозы} , мг/мл | С _{мальтозы} , мг/мл |
|------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Стандартное | 45,2±0,95 | 4,67±0,12 | 16,42±0,07 |
| Ультрадисперсное зерно | 72,11±0,84 | 3,21±0,09 | 29,53±0,57 |

Дрожжи, выращенные на сусле из ультрадисперсного зернового сырья, накапливали биомассу на 25% больше относительно стандартной степени измельчения. Вероятнее всего, это связано с тем, что не только значение активной кислотности среды влияет на размножение дрожжей, но и степень измельчения – а именно увеличение доступности других компонентов сырья для питания дрожжей (например, источников азотного питания) [1, 12].

Варьирование температурными условиями культивирования при установленном оптимальном значении активной кислотности среды (рН = 4,0) показало, что наибольший прирост биомассы для стандартной и ультрадисперсной степени измельчения наблюдается при температуре 30 °С (рис. 6).

Вероятно, эта температура является оптимальной для роста используемых в ходе опыта дрожжей расы «АНГЕЛ» и «ХИ». Полученные данные коррелируют с данными других авторов о тепловом шоке дрожжевых клеток при температуре выше 35 °С, сопровождающемся гибелью клеток [13].

Дрожжи проявляют высокую требовательность к уровню кислорода в среде. Его недостаток снижает выход активных клеток [14]. При исследо-

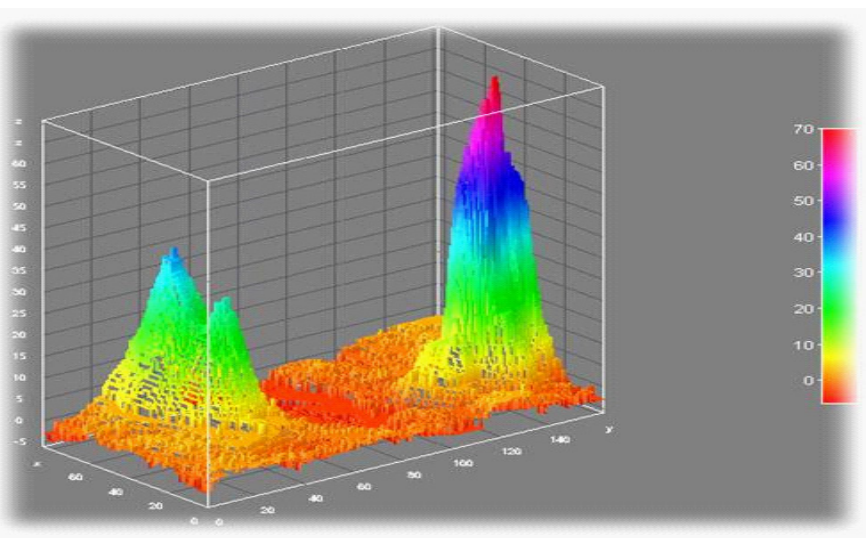


Рисунок 1. Трехмерное фазовое изображение частичек зерна (определено с помощью интерференционной микроскопии)

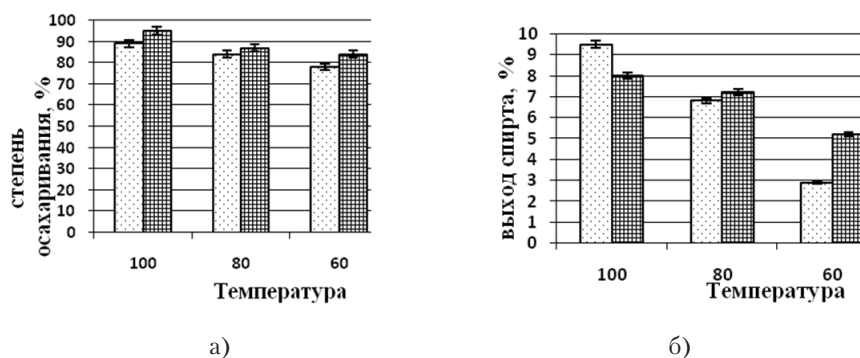


Рисунок 2. Влияние температуры на степень осахаривания (а) и выход спирта (б):

■ 1 – зерно стандартной степени измельчения
 □ 2 – зерно, измельченное на планетарной шаровой мельнице Retsch PM 100

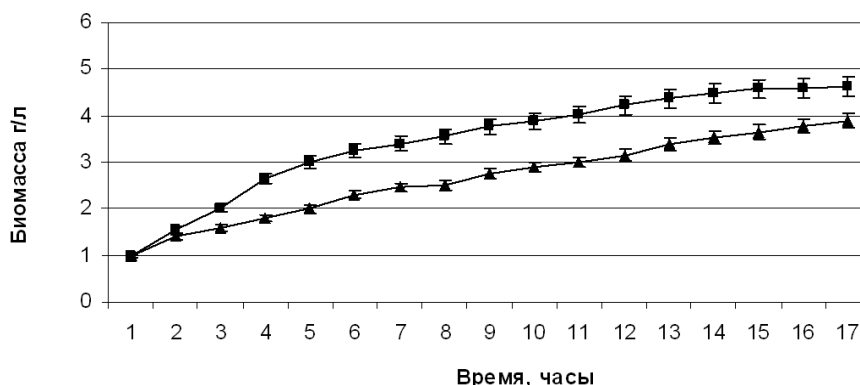


Рисунок 3. Накопление биомассы в процессе роста дрожжей расы «Ангел» на сусле из ультрадисперсного зернового сырья
 ■ – ультрадисперсное зерно; ▲ – стандартное зерно

вании влияния условий культивирования и степени аэрации сусле было установлено, что наибольший прирост биомассы мы наблюдали при полунепрерывном культивировании дрожжей и степени аэрации 1 литр воздуха/1 литр среды⁻¹ (рис. 7 и 8).

При анализе накопления биомассы дрожжей расы XII наибольший выход был достигнут на сусле из зерна ультрадисперсного измельчения с добавлением нитрата калия. Такая же закономерность наблюдается в накоплении биомассы дрожжей расы «АНГЕЛ» в бражке из ультрадисперсного зерна (рис. 9).

Это обусловлено тем, что нитрат калия является не только источником азота, но и содержит калий. Он необходим не только как питательный элемент, но и как стимулятор размножения дрожжей. Стимулирующее действие объясняется существенной ролью его в окислительном фосфорилировании и в процессах гликолиза. Калий активирует дрожжевую альдозу, необходим для действия фермента пируваткарбоксилазы и влияет, так же как и азот, на липидный обмен дрожжевых клеток [15–17].

При добавлении NaNO₃ в сусле из зерна

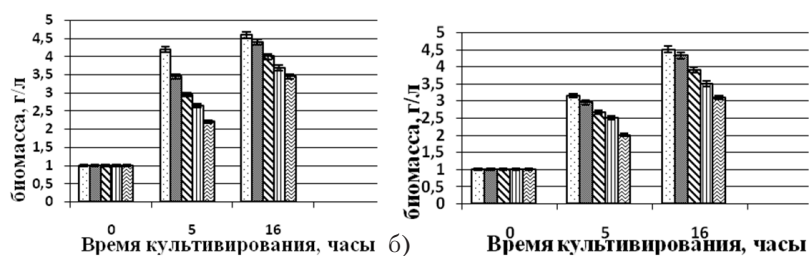


Рисунок 4. Влияние pH на прирост биомассы дрожжей расы «Ангел» (а) и XII (б) на сусле из ультрадисперсного зернового сырья, измельченного на планетарной шаровой мельнице РМ 100 30 мин. при 400 об/мин

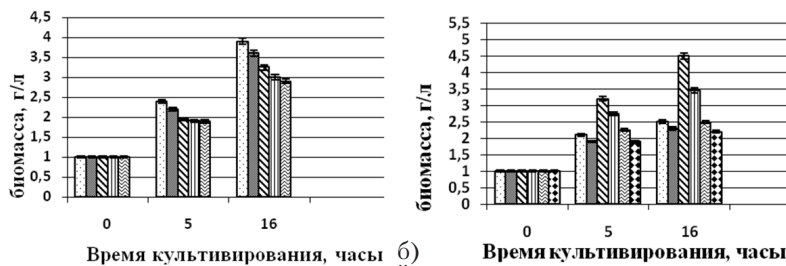


Рисунок 5. Влияние pH на прирост биомассы расы «Ангел» (а) и XII (б) на сусле из зерна стандартной степени измельчения

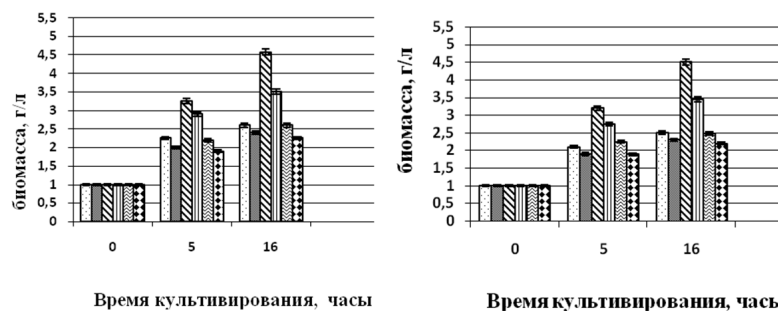


Рисунок 6. Влияние температуры на прирост биомассы дрожжей расы «Ангел» (а) и расы XII (б) в процессе культивирования на ультрадисперсном (уд) и стандартного измельчения (ст) сырье

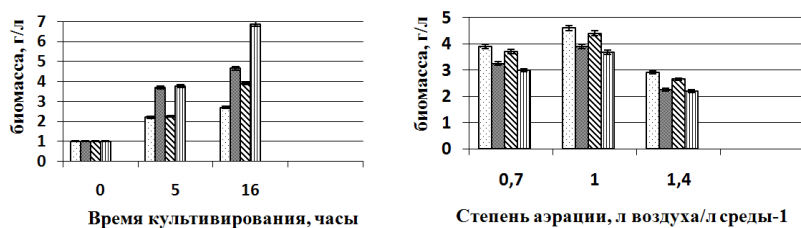


Рисунок 7. Влияние условий культивирования на прирост биомассы дрожжей расы «Ангел» в процессе культивирования на ультрадисперсном (уд) и стандартного измельчения (ст) сырье

Рисунок 8. Влияние режима аэрации сусле из ультрадисперсного (уд) зернового сырья и стандартной степени измельчения (ст) на прирост биомассы дрожжей расы «Ангел» и XII

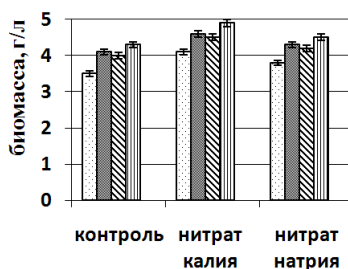


Рисунок 9. Влияние дополнительного минерального и азотного питания на накопление биомассы дрожжами рас XII и «Ангел» в сусле из ультрадисперсного (уд) зерна и зерна стандартной степени измельчения (ст)

□ - «Ангел» уд ▨ - «Ангел» ст
 ■ - XII уд ▮ - XII ст

как стандартного, так и ультрадисперсного измельчения прирост биомассы дрожжей был меньше, чем при внесении KNO_3 . Возможно, это связано с тем, что первоначальное содержание натрия в самом зерне велико. Это подтверждается результатами, полученными при определении концентрации ионов в сусле методом капиллярного электрофореза (содержание K^+ – 121 мг/л, Na 38,6 мг/л для стандартного измельчения и 194,4 мг/л, 259,9 мг/л для ультрадисперсного). Также из этих данных следует, что из зерна стандартного измельчения в процессе низкотемпературной обработки водно-зернового замеса происходит недостаточное выщелачивание ионов металлов, что вероятно и обуславливает более низкий прирост биомассы дрожжей.

На заключительном этапе анализировали выход спирта в зависимости от добавления до-

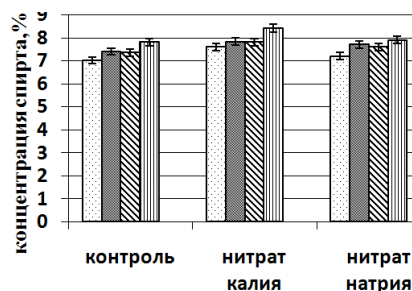


Рисунок 10. Влияние дополнительного минерального и азотного питания на накопление спирта в бражке дрожжами рас XII и «Ангел» при сбраживании сусла из ультрадисперсного (уд) зерна и зерна стандартного помола (ст)

□ - «Ангел» уд ▨ - «Ангел» ст
 ■ - XII уд ▮ - XII ст

полнительных источников азотного и минерального питания на сусле оптимизированного состава и при оптимальных условиях брожения (рис.10).

Было выявлено, что наиболее высокое накопление спирта происходит при использовании ультрадисперсного сырья и дрожжей расы «Ангел».

Таким образом, проведенные экспериментальные исследования выявили актуальность внедрения тонкого (до микро- и наноразмерных частиц) помола зерна, которое позволяет проводить водно-тепловую обработку сырья при более низких температурах (не более 60 °С), что сократит в дальнейшем потребление пара и электроэнергии на стадии подготовки крахмалистого сырья к переработке и увеличит выход спирта, в том числе за счет увеличения степени гидролиза сырья.

05.07.2012

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки РФ (АВЦП «Развитие научного потенциала высшей школы» Мероприятие 1. Тематический план), Министерства науки, информатизации и новых технологий Республики Мордовия (госконтракт № 2-ГК/02-06), а также Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере (программа У.М.Н.И.К. 2010)

Список литературы:

1. Кухаренко, А.А. Возможные пути интенсификации процесса брожения / А.А. Кухаренко, М.Н. Дадашев, В.М. Короткий, А.Ю. Винаров // Производство спирта и ликероводочных изделий. – 2008. – №2. – С. 16–18.
2. Лихтенберг, Л.А. Производство спирта из зерна / Л.А. Лихтенберг. – М.: Пищевая промышленность, 2006. – 324 с.
3. Yeast Biotechnology: Diversity and Applications / ed. T. Satyanarayana and G. Kunze. – Berlin: Springer Science + Business Media B.V., 2009. – 744 p.
4. Periyasamy, S. Production of bioethanol from sugar molasses using *Saccharomyces cerevisiae* / S. Periyasamy, S. Venkatachalam, S. Ramasamy [et al.] // Modern Appl. Science. – 2009. – V. 3, №8. – P. 32–36.
5. Norr, A.A. Bio-ethanol fermentation by the bioconversion of sugar from dates by *Saccharomyces cerevisiae* strain ASN-3 and HA-4 / A.A. Norr, A. Hameed, K.P. Bhatti [et al.] // Biotechnology. – 2003. – V. 2 (1). – P. 8–17.
6. van Maris, A.J. Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status / A.J. van Maris, D.A. Abbott, E. Bellissimi [et al.] // *Antonie Van Leeuwenhoek*. – 2006. – V. 90 (4). – P. 391–418.

7. Рабинович, М.Л. Производство этанола из целлюлозосодержащих материалов: потенциал российских разработок / М.Л. Рабинович // Прикладная биохимия и микробиология. – 2006. – Т. 42, №1. – С. 5–32
8. Патент РФ 2407798, МПК С12Р7/06. Способ получения спирта / В.В. Ревин, Н.А. Атыкян (Россия). Опубл. 27.12.2010, Бюл. №36, 3 с.
9. Yusipovich, A.I. Laser interference microscopy in erythrocyte study / A.I. Yusipovich, E.Yu. Parshina, N.Yu. Brysgalova [et al.] // Journal of Applied Physics. – 2009. – V. 105, №10.
10. Гото, М. Введение в микромасштабную высокоэффективную жидкостную хроматографию / М. Гото, К. Джинно, Д. Исси [и др.]; под ред. Д. Исси. – М.: Мир, 1999. – 240 с.
11. Рябухина, Е.А. Медицинская статистика и информатика: учеб. пособие / Е.А. Рябухина, О.А. Гущина. – Саранск: Изд-во Мордов. ун-та, 2005. – 120 с.
12. Revedin, A. Thirty thousand-year-old evidence of plant food processing / A. Revedin, B. Aranguren, R. Becattini [et al.] // Proc Natl Acad Sci USA. – 2010. – V. 107 (44). – P. 18815–18819.
13. Helena da Cruz, S. Effect of sugar catabolite repression in correlation with the structural complexity of nitrogen source on yeast growth and fermentation / S. Helena da Cruz, M. Batistote and J.R. Ernandes // Journal of Industrial and Brewing. – 2003. – V. 109 (4). – P. 349–355.
14. Jeffries, T.W. Ethanol and thermotolerance in the bioconversion of xylose by yeasts / T.W. Jeffries, Y.S. Jin // Adv. Appl. Microbiol. – 2000. – V. 47. – P. 221–268.
15. Verbelen, P.J. The role of oxygen in yeast metabolism during high cell density brewery fermentations / P.J. Verbelen, M.G. Saerens, S.E. Van Mulders // Microbiol and biotechnol. – 2009. – V. 82. – P. 1143–1156.
16. Munson, A.M. Yeast *ARL1* encodes a regulator of K⁺ influx / D.H. Haydon, S.L. Love, G.L. Fell [et al.] // Microbiol. Biotechnol. – 2004. – V. 117, №11. – P. 2309–23204.
17. Perez-Valle, J. Key role for intracellular K⁺ and protein kinases Sat4/Hal4 and Hal5 in the plasma membrane stabilization of yeast nutrient transporters / J. Perez-Valle, H. Jenkins, S. Merchan [et al.] // Microbiol. Biotechnol. – 2007. – V. 27, №16. – P. 5725–5736.
18. Nweke, C.O. Effects of metals on dehydrogenase activity and glucose utilization by *Saccharomyces cerevisiae* / C.O. Nweke // Nigerian Journal of Biochemistry and Molecular Biology. – 2010. – V. 25, №2. – P. 28–35.

Сведения об авторах:

Драгунова Юлия Евгеньевна, аспирант кафедры биотехнологии, e-mail: dragunovaJulya@yandex.ru
Ревин Виктор Васильевич, заведующий кафедрой биотехнологии, декан биологического факультета
Мордовского государственного университета им. Н.П. Огарева, доктор биологических наук,
профессор, e-mail: biotech@moris.ru

Атыкян Нелли Альбертовна, доцент кафедры биотехнологии биологического факультета
Мордовского государственного университета им. Н.П. Огарева, кандидат биологических наук,
e-mail: kistig2@zmail.ru

430000, г. Саранск, ул. Большевикская, 68, тел. (834) 324554, факс: (8342) 324554

UDC 602.3:663.531.4

Dragunova Yu.E., Atykyan N.A., Revin V.V.

EFFECT OF DEGREE OF GRINDING GRAIN RAW AND PRE-ACTIVATION OF YAST FOR ALCOHOL YIELDS

Ultrarefined particles of grain with size up to 250 nm were obtained. This refinement increases the output of simple sugars, even without prior enzymatic hydrolysis as was shown. The possibility of using a low (less than 60 °C) temperature of enzymatic hydrolysis compared to classical schemes for the temperature treatment of grain mash was investigated. Was revealed that the use of nanostructured grain raw material and pre-activation of *Saccharomyces cerevisiae* allows to intensify the process of obtaining of ethanol, as result in fermentation medium it accumulates to 8,6%.

Key words: ultrafine grain materials, mineral salts, fermentation, yeast *Saccharomyces cerevisiae*.