

**МИНИСТЕРСТВО ВЫСШЕГО И СРЕДНЕГО СПЕЦИАЛЬНОГО  
ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКСТАН  
ТАШКЕНТСКИЙ ХИМИКО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ**

**На правах рукописи  
УДК 643.52(075)**

**Жураев Жасурбек Нормуродович**

**РАЗРАБОТКА РАЦИОНАЛЬНОЙ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ  
БЕЛКОВ ПРИ ПЕРЕРАБОТКЕ ПШЕНИЦЫ НА СПИРТ**

**Специальность: 5А321001- Технология производства и переработки  
пищевых продуктов (технология вина и спирта)**

**ДИССЕРТАЦИЯ  
на соискании академической степени магистра**

**Научный руководитель  
к.б.н.Хасанов Х.Т.**

**Ташкент – 2017**

## О Г Л А В Л Е Н И Е

	Введение.....	3
Глава 1.	СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ФЕРМЕНТОВ ПРИ ПЕРЕРАБОТКЕ КРАХМАЛИСТОГО СЫРЬЯ.....	6
	Выводы по главе 1.....	39
Глава 2.	ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ СЫРЬЯ И ГОТОВОЙ ПРОДУКЦИИ .....	40
2.1.	Реагенты и препараты ферментов.....	40
2.2.	Определение концентрации белка.....	41
2.3.	Определение протеолитической активности.....	41
2.4.	Определение амилолитической активности.....	42
2.5.	Определение содержание спирта.....	43
	Выводы по главе 2.....	45
Глава 3.	РАЦИОНАЛЬНОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БЕЛКОВ ПРИ ПЕРЕРАБОТКЕ ПШЕНИЦЫ НА СПИРТ.....	46
	Выводы по главе 3.....	56
	ВЫВОДЫ.....	57
	Библиография.....	58
	ПРИЛОЖЕНИЯ.....	63

## В В Е Д Е Н И Е

**Актуальность и обоснованность выбранной темы.** Основными направлениями развития народного хозяйства Узбекистана предусматривается рациональное использование сельхозпродуктов и создание безотходных производств [1,2].

В отечественном спиртовом производстве только чуть больше трети зерна расходуется на спирт, тогда как остальная часть его переходит в отходы. Такое положение дел, хотя и соответствует общей картине переработки сырья в пищевой промышленности, характеризующейся на меньшим количеством вырабатываемой продукции из 1 т сырья, чем в развитых странах, но оно не может удовлетворять современное производство спирта.

Относительно низкая эффективность использования зернового сырья в традиционной технологии спирта предопределена особенностями "однопродуктовых" схем за счет неполного использования потенциальных возможностей главных компонентов зерна: углеводов и белка. Отсюда решение проблемы экономии материальных ресурсов должно осуществляться путем внедрения ресурсосберегающих технологий, предусматривающих комплексную переработку зерна с получением нескольких ценных конечных продуктов. Учитывая, например, что в структуре питания населения существует большой дефицит пищевого белка разработку новых технологий производства этилового спирта, предусматривающих более эффективное использование грубых, некрахмальных фракций полисахаридов с выделением белковых препаратов можно считать актуальной.

**Объект и предмет исследования.** Объектом исследования служила пшеница, полученные из завода «Буктемир-спирт». Предметом исследования служил содержание белков в полупродуктах переработки пшеницы на спирт.

**Цель и задачи исследований.** Целью настоящей работы являлась разработка ресурсосберегающей технологии переработки зерна пшеницы с выработкой высококачественного этилового спирта и белкового продукта.

**В задачу исследований входило:**

- гидролизуемость белков пшеницы с протеолитическими ферментами;
- оптимизация способа разваривания земеса;
- исследование влияния различных факторов на показатели качества продуктов и выбор оптимальных технологических параметров;

**Степень изученности проблемы.** Впервые изучены влияние технологических приемов при переработке пшеницы на содержание белков в полуфабрикатах и отходах. Разработаны ресурсосберегающая технология переработки пшеницы на спирт.

**Методы исследования.** В работе использовали фотоколориметрические методы определения активности ферментов, белков и пептидов

**Научная новизна исследований.** Впервые исследован химический состав, биологическая ценность и фракционный состав белков пшеницы. Установлено, что биологическая ценность периферийных фракций, оцениваемая по скору первых трех лимитирующих аминокислот, выше, чем у целого зерна.

Теоретически обоснованы технологические параметры получения спирта и выделения белкового продукта путем использования ферментов.

**Научная и практическая значимость результатов исследования.** Разработана новая технология переработки пшеницы с выработкой этилового спирта и пищевого белка с предварительным выделением из разваренного земеса нерастворимых фракций. Технология позволяет: интенсифицировать процесс брожения, сократив его на 10-15 часов;

**Апробация работы.** Основные результаты доложены и обсуждены на ТХТИ «Умидли кимёгар-2017».

**Объем и структура диссертации.** Диссертационная работа состоит из следующих глав: введения, обзор литературы, объекты, предметы и методы исследования, результатов и их обсуждения, выводы, список использованной литературы. Диссертационная работа изложена на 64 страницах компьютерного текста и иллюстрирована 4 таблицами и 2 рисунками. Количество использованной литературы составляет 44.

## **ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ**

### **Глава 1 Современное состояние использования ферментов при переработке пшеницы на спирт**

В настоящее время применение ферментных препаратов является неотъемлемой частью большинства технологических процессов промышленности и сельского хозяйства [3].

Одним из перспективных путей увеличения производства продукции в подотраслях пищевой промышленности, повышения качества, биологической ценности и вкусовых достоинств продукции питания, а также расширения их ассортимента является применение ферментов.

Известно, что человечество с древних времен интуитивно использовало биологические катализаторы в ряде бродильных процессов и только с появлением современных представлений о ферментах, принципы биологического катализа получили научное обоснование, что, в конце концов позволило значительно расширить диапазон использования ферментов. Использование их в ряде подотраслей пищевой промышленности позволяет не только интенсифицировать технологический процесс, снизить расход сырья, улучшить условия труда и повысить его производительность, но и создать условия для перевода технологических процессов на непрерывный поток. Использование ферментов возможно в производстве пива, безалкогольных напитков, спирта, вина, плодово-ягодных соков, хлеба, кондитерских изделий, парфюмерно-косметических средств, продуктов гидролиза жиров, крахмала, сахарозы, раффинозы и т.д. Однако в связи с большим разнообразием используемого сырья и особенностями технологии его переработки для каждого вида производства продукции требуется тщательный отбор конкретных ферментных препаратов.

Протеолитические ферменты - группа биологических катализаторов, которые интенсивно исследуются в связи с их значением в теоретическом аспекте - для понимания структуры белков и механизма ферментативного катализа, а также в практике - для медицины, сельского хозяйства и

некоторых отраслей промышленности [4]. Среди протеолитических ферментов важное практическое значение приобретают пепсин, папаин, а также микробные кислые, нейтральные и щелочные протеиназы [5].

Протеолитические ферменты, выделенные из растений: *папаин* (папайя - дынное дерево), *фицин* (фиговое дерево) и *бромелаин* (ананас) входят в группу структурно гомологичных ферментов.

Существенным стимулом для изучения свойств протеолитических ферментов явились растущие перспективы их использования при решении прикладных задач и разработки новых биотехнологических производств. Наряду с такой классической областью применения протеолитических ферментов, в частности таких как сыроделие, они успешно применяются в других областях легкой и пищевой промышленности [6]. Так, например, протеиназы из микроорганизмов используются в пивоварении для гидролиза растительных белков до крупных пептидов, придающих пиву пенистость [7], а также в виноделии для стабилизации вин от белковых помутнений [8]. Протеиназы грибов входят также в состав некоторых комплексных ферментных препаратов, употребляемых в кожевенной промышленности. В Японии и США кислые протеиназы грибов широко используются для приготовления различных соусов, размягчающих мясо и рыбу [9]. Использование протеолитических ферментов для мягчения мяса не только сильно уменьшает сроки послеубойного созревания, но и повышает качество конечного продукта. Широкие возможности открывает использование протеолитических ферментов в кожевенной промышленности для обезволащивания и мягчения кожевенного сырья.

Таким образом, сфера применения протеолитическим ферментов расширяется, и в научной литературе появляются все новые данные о перспективных возможностях и путях использования ферментов в биотехнологических процессах и в медицине. Однако низкая стабильность ферментов этого типа ограничивает их широкое применение в промышленности.

Растущая потребность применения ферментов в различных отраслях народного хозяйства и медицине требует детального изучения проблемы стабилизации ферментов, поскольку нестабильность ферментных систем является решающим барьером на пути их широкого внедрения. Таким образом, эффективное использование биологических катализаторов - ферментов, немыслимо без их стабилизации.

В реальных технологических средах имеются определенные компоненты, способные в значительной степени влиять на активность и степень лабильности ферментов. В роли таких компонентов чаще всего выступают природные ингибиторы, органические кислоты, высокие концентрации солей, повышенное содержание поверхностно активных веществ и др.[10-12]. Многокомпонентность природных субстратов приводит к тому, что применяемые ферменты теряют свою активность из-за взаимодействия с различными компонентами обрабатываемого сырья. Эти процессы ускоряются при повышении температуры. При этом не только растворимые компоненты, но и нерастворимые компоненты обрабатываемого сырья, играя роль твердой фазы, могут взаимодействовать с определенными группами белка и придавать ферменту конформационную неустойчивость. Как показывают исследования последних лет, многие из этих трудностей могут быть преодолены. При этом на передний план выходит проблема регуляции активности и стабильности ферментов в сложных субстратных смесях

В таких субстратных смесях, с которыми приходится иметь дело в производственных условиях, эффективность применения ферментных препаратов для осуществления соответствующего каталитического процесса сравнительно низка.

По современной номенклатуре технология спирта относится к биотехнологии. Основные процессы получения спирта — превращение крахмала в сахар и сахара в этиловый спирт под действием биологических катализаторов (ферментов). Так как ферменты для гидролиза крахмала до

сахаров вырабатываются плесневыми грибами и бактериями, а для превращения сахаров в спирт — дрожжами, технология спирта неразрывно связана с технической микробиологией.

Технология спирта включает в себя следующие процессы: подготовку сырья к развариванию, разваривание зерна для разрушения клеточной структуры и растворения крахмала; охлаждение разваренной массы и осахаривание крахмала ферментами солода (пророщенного зерна) или культур плесневых грибов; сбраживание сахаров дрожжами в спирт; отгонку спирта из бражки и его ректификацию, а также приготовление солода путем проращивания зерна или культивирования плесневых грибов и бактерий для получения амилолитических и протеолитических ферментных препаратов, выведение и размножение засевных дрожжей.

Способность солода осахаривать известна с древнейших времен, и с тех пор солод используется при получении спирта. Осахаривание разваренного сырья в производстве этанола на ряде спиртовых предприятий, отечественных и зарубежных, как и прежде, осуществляется за счет солода. Следует отметить, что за рубежом применению солода зачастую отдается предпочтение перед применением бактериальных и грибных ферментных препаратов в силу сложившейся традиции, а также естественности и чистоты процессов /56/.

Наиболее актуальными и перспективным направлением в совершенствовании технологии этанола становится эффективное использование всех высокомолекулярных полимеров зернового сырья [13]. Поэтому наряду с ферментами амилолитического комплекса, применяемыми в спиртовом производстве, целесообразно использовать и протеолитические ферменты, катализирующие гидролиза белков, пептидов, фосфорные соединения и др.

Известно, что зерно злаков в процессе его солодоращения обладает самодостаточной и высокоэффективной ферментативной системой перевода резервных веществ эндосперма в растворимую форму. Самодостаточность

системы обеспечивается совокупным действием таких гидролитических ферментов, как амилазы, протеазы, липазы, фосфатазы и др. В работе [14,15] авторы уделяют внимание на ферменты фосфорного обмена проращиваемого зерна, а именно «кислые» фосфатазы, катализирующие реакции превращения органического фосфата в неорганический. Уникальность этих ферментов заключается в том, что их накопление в проращиваемом зерне предшествует накоплению  $\alpha$ - и  $\beta$ - амилаз и протеаз. Вероятно, биологическая функция фосфатаз заключается не только в обеспечении энергетического метаболизма зернового ростка неорганическим фосфатом, но и возможным участием этого неорганического фосфата в активации процессов ферментативного гидролиза крахмала, белков и других резервных веществ зерна [16,17] . Однако доказательств в пользу возможного активизирующего воздействия этих форм неорганического фосфата при ферментативном гидролизе биополимеров зерна, автором не приводилось.

В настоящее время появилось сообщение об использовании ферментов фитазы в технологии производства спирта, катализирующего распад инозитфосфорной кислоты на инозит и свободную ортофосфорную кислоту. Авторы этого метода связывают ее интенсифицирующее действие на процесс осахаривания не с кислотным гидролизом крахмала, инициированным ортофосфорной кислотой, а с распадом фитина, который, как известно, ингибирует активность амилолитических ферментов. Упоминание о том, что неорганические кислоты, и в том числе ортофосфорная кислота, способны повышать степень растворения веществ зерна встречается в работе [18].

Применяемые в спиртовой промышленности ферментные препараты практически не содержат протеаз или содержат их в незначительном количестве. В связи с этим их применение способствует интенсивному гидролизу крахмала, но не обеспечивает дрожжи в полной мере азотистым питанием, которое необходимо для нормального развития дрожжевых клеток. Наличие легко ассимилируемого аминного азота в сусле имеет первостепенное значение для интенсификации спиртового брожения,

особенно на первом этапе, когда скорость процесса, вероятнее всего, лимитируется количеством дрожжей и их состоянием [19,20, 21,].

Одно из направлений реализации этой задачи – подбор специальных мультиэнзимных композиций, позволяющих рационально использовать все высокомолекулярные полимеры зернового сырья, а также селекция новых рас дрожжей с термотолерантными и осмофильными свойствами [22] .

В работе изучена [23] процесс спиртового брожения на средах, приготовленных из зернового сырья, обработанного протеолитическими ферментами. В качестве источника протеаз использовали ферментные препараты полученные культуральной жидкости *Aspergillus oryzae*: протооризин и комплексный ферментный препарат амилопротооризин (КФПА). Интенсификация процесса проходила как на стадии главного брожения, так и при дроблении. Показано, что увеличение выхода этилового спирта при сбраживании суслу, обогащенного продуктами протеолиза растительного белка, обуславливается проведением более экономичного процесса, повышением степени биоконверсии углеводов в этанол, сокращение потерь крахмала на образование побочных продуктов.

Таким образом, результаты исследований указывают на важную роль протеолитического комплекса в процессе спиртового брожения и дрожжегенерации. Воздействие протеаз на белковые вещества зернового суслу повышает эффективность его гидролиза, обогащает среду легкоусвояемыми аминокислотами и углеводами, что способствует конечном итоге повышению физиологической активности дрожжевых клеток, интенсификации процесса брожения и увеличению выхода целевого продукта.

### **Интенсификация процесса путем низкотемпературная разваривания**

В настоящее время уже ни у кого не вызывает сомнения вопрос о перспективности и целесообразности использования метода низкотемпературного разваривания крахмалистого сырья в технологии

производства пищевого спирта, который по сравнению с традиционным высокотемпературным способом разваривания имеет ряд несомненных преимуществ, а именно улучшается качество готового продукта и повышается безопасность эксплуатации варочного оборудования.

Повышение эффективности работы спиртозаводов определяется, прежде всего интенсификацией развития и размножения дрожжевых клеток, обладающих повышенной бродильной активностью, что в значительной мере обусловлено ускорением действия ферментных препаратов, используемых в спиртовой промышленности, и усилением глубины ферментативного расщепления полисахаридов крахмалсодержащего растительного сырья. Одним из возможных методов повышения эффективности получения спирта – использование биостимуляторов, которые позволяют интенсифицировать процесс спиртового брожения путем повышения бродильной активности дрожжей.

Другим направлением интенсификации производства спирта является повышение бродильной активности дрожжей за счет введения в питательную среду композиционных биологических стимуляторов (КБС) [26].

Водный раствор КБС подавался из расчета на объем бродильного чана в двух режимах:

1-й режим – начало дрожжегенерирования – НДГ;

2-й режим – конец дрожжегенерирования – КДГ.

Применение КБС в режиме НДГ запрещает отбор маточных дрожжей из дрожжанок с созревшими (до 1/3 отбрада) дрожжами. При этом режиме необходимо иметь в дрожжевом отделении дрожжанку (маточник с непрерывным процессом дрожжегенерирования), в которую после каждого отбора маточных дрожжей подается соответствующая порция осахаренного пастеризованного сусла.

В процессе испытаний установлено, что эффект от применения КБС в режиме КДГ возрастает, если после введения раствора КБС выдержать дрожжи в дрожжанке в течение, по крайней мере, часа перед передачей их в

бродильный чан. За это время увеличивается число дрожжевых клеток после воздействия на них КБС.

Таким образом, на основании проведенных промышленных испытаний действия КБС на спиртовое брожение установлено:

– влияние КБС более эффективно в режиме НДГ по сравнению с режимом КДГ;

– интенсификация процесса брожения;

– сокращение времени брожения до 40-50ч;

– увеличение концентрации спирта в бражке;

– улучшение качества получаемого спирта за счет снижения в нем примесей;

– возможность технологического управления экономическими результатами деятельности заводов.

#### **Электрофизический способ интенсификации процесса разваривания.**

В этой области было проведено много исследований. На основании полученных данных можно сказать, что наиболее перспективна электрофизическая обработка. Применение электрофизической обработки при производстве этанола [25] позволит интенсифицировать процесс получения спирта за счет более полной и глубокой модификации полимеров зерна, смягчения режимов и времени разваривания, сокращения количества осаживающихся материалов, улучшая доступность их к субстрату. Одновременно снижается расход теплоэнергоресурсов и увеличивается выход спирта из единицы крахмалсодержащего сырья. Все эти причины обусловили широкое применение ультразвука (УЗ) в биотехнологических процессах. Под УЗ-колебаниями понимают такие колебания, частота которых лежит за верхним пределом слышимости человеческого уха – 16 кГц.

Вторым перспективным способом электрофизической обработки является инфракрасное облучение (ИК). ИК-обработка зерна, как и другие виды гидродинамической обработки, которые проводятся с целью повышения потребительских свойств или их формирования, позволяет

организовывать более эффективную обработку зернопродуктов на последующих операциях.

Новый способ затирания с применением униполярной электрохимической обработки (УЭХО), которая позволяет ощутить энергию активации распада межмолекулярных связей крахмала, должен способствовать более быстрому и качественному растворению крахмала даже при низких значениях температуры водно-тепловой обработки.

При проведении опытов задавали значения температуры в интервале 80...100<sup>0</sup>С и времени 10–60 мин в режимах ультразвукового воздействия при разваривании.

При получении осахаренного сусла используются различные ферментные препараты, расход которых установлен нормативными документами. Однако в ряде случаев при переработке зерна не достигается полный гидролиз крахмала, что приводит к ухудшению конечных показателей: повышенному содержанию несброженных углеводов в зрелой бражке и низкому накоплению спирта. С целью улучшения технологического процесса производители часто увеличивают количество вносимых ферментных препаратов, на этот прием лишь повышает себестоимость спирта и не всегда является оправданным [26].

Получение спирта из различного зернового сырья – сложный биохимический и органический процесс, требующий постоянного поддержания микробиологической чистоты в производстве. Развитие посторонних микроорганизмов на любом этапе переработки зерна приводит к снижению содержания сбраживаемых веществ в осахаренном сусле и, как следствие, уменьшению выхода спирта и ухудшению его качества.

Причиной появления различных бактерий, грибов или диких дрожжей в процессе получения качественного осахаренного сусла являются многие факторы, к которым можно отнести, прежде всего зерновое сырье, технологическую воду, ферментные препараты. Росту и развитию микроорганизмов могут способствовать также несоблюдение режимов

обработки зерна, недостаточная дезинфекция оборудования и технологических линий.

**Влияние перерабатываемого сырья.** Одним из основных источников внесения посторонней микрофлоры является перерабатываемое сырье, на поверхности которого могут быть обнаружены представители практически всех групп микроорганизмов: бактерии, плесневые грибы и дикие дрожжи.

В послеуборочный период микроорганизмы находятся в вегетативном состоянии и не оказывают неблагоприятного влияния на происходящие в зерне биохимические и физиологические процессы. Однако при несоблюдении режимов хранения в складских помещениях (влажности, температуры и количества воздуха) начинается интенсивный рост и развитие посторонней микрофлоры на поверхности зерновки, что приводит к значительной потере сбраживаемых углеводов, а в дальнейшем и к инфицированию всего производства. В результате жизнедеятельности бактерий, грибов или дрожжей в ходе технологического процесса образуются летучие примеси, способные оказывать отрицательное влияние на органолептические характеристики этанола.

**Влияние технологической воды.** Заводы спиртовой отрасли являются ресурсоемкими предприятиями пищевой промышленности, которые потребляют в своем производстве огромное количество воды для различных целей. Так, на 1000 дал спирта расходуется 440–450 м<sup>3</sup> воды на технологические нужды и 1000–1500 м<sup>3</sup> – на общезаводские. В производство вода поступает из различных источников: глубинных (артезианская скважина) и поверхностных (водохранилища, реки, пруды), поэтому может также являться источником инфекции.

При соответствующей обработке воды будет снижено содержание микроорганизмов на различных стадиях технологического процесса: при приготовлении замеса, разведении концентрированных ферментных препаратов и др. этот приём будет способствовать получению качественного зернового суслу.

Помимо микробиологической чистоты применяемой воды эффективность всего технологического процесса получения качественного спирта зависит и от других ее характеристик, таких, как содержание органических и неорганических солей, концентрации водопроводных ионов (рН).

**Влияние ферментных препаратов.** На получение осахаренного сусле большое влияние оказывают используемые ферментные препараты и их качество. Большинство спиртовых предприятий уже выбрали концентрированные препараты компании «РУСФЕРМЕНТ» за их высокую активность и микробиологическую чистоту. При правильно подобранной мультэнзимной композиции для гидролиза крахмалистой и некрахмалистой части зернового сырья специалисты отмечают стабильную работу предприятия. Однако использование качественных высокоактивных препаратов в некоторых случаях недостаточно для устойчивой работы. В процессе переработки зернового сырья независимо от схемы разваривания важным условием является также соблюдение требований к использованию препаратов, а именно приготовлению раствора концентрированного ферментного препарата и способам его дозирования.

Концентрированные препараты, в настоящее время представленные на спиртовом рынке, представляют собой жидкость, активность в которой достигает 2500–2600 ед./мл в альфа-амилазах и 6000–6300 ед./мл в глюкоамилазах, в то время как в культуральной жидкости активность составляет лишь 200–500 ед./мл. Высокая активность в концентрированных ферментных препаратах поддерживается на счет использования стабилизаторов, позволяющих длительное время сохранять эти значения при различных внешних изменениях.

Помимо микроорганизмов, вносимых извне, очагами инфекции могут служить неразваренные частицы крахмала зерна, образовавшиеся в результате неполного гидролиза ферментами. Производственники пытаются улучшить процесс путем увеличения норм расхода препарата, но в

большинстве случаев ожидаемого эффекта не достигают, так как основная проблема заключается в подготовке зерновой массы или субстрата к действию ферментов, а не самом ферменте. Поэтому использования только качественных высокоактивных препаратов без учета определенных их свойств порой не достаточно для стабильной работы. Для получения осахаренного сусла необходимо обеспечивать специфичность действия ферментных препаратов на субстрат и учитывать их лабильность (изменение свойств в зависимости от условий среды – рН, температуры, присутствия активаторов и ингибиторов).

Таким образом, от правильно подобранных температурных режимов ведения процессов, от степени измельчения зерна, от рН технологической воды зависит качество осахаренного сусла. И если хотя бы один из этих параметров не будет соответствовать оптимуму работы препарата, фермент не распознает субстрат и не вступит с ним во взаимодействие, что приведет к развитию посторонней микрофлоры и нарастанию кислотности разваренной массы и осахаренного сусла.

Исходя из вышеизложенного, можно сделать следующие выводы.

Неполный гидролиз крахмала зернового сырья не всегда зависит от действия ферментов. На оптимальную работу концентрированных препаратов оказывает влияние микробиологическое состояние осахаренного сусла, которое зависит от различных факторов. Увеличенное количество концентрированных препаратов свидетельствует о технологических нарушениях в производстве. В этом случае следует проанализировать технологические факторы, определяющие подготовку субстрата:

качество зернового сырья (степень зрелости зерна, условия сушки, содержание примесей, микотоксинов, др.);

режимы водно-тепловой подготовки зернового сырья по мягкой схеме;

соблюдение рабочих зон температур и рН среды для оптимальной работы мультиэнзимной композиции концентрированных препаратов;

режим стерилизации.

Нарушение стабильности технологического процесса (особенно в схемах переработки зернового сырья при пониженных температурах) приводит к инфицированию осахаренного суслу, а следовательно, ухудшению процесса брожения. Поэтому только при использовании процесса стерилизации эффективность водно-тепловой обработки зернового сырья будет максимальной.

Технология предусматривает измельчение зерна на молотковой дробилке, смешивание с водой ферментными препаратами в смесителе-дозаторе шнекового типа. Доброкачественный замес обеспечивает получение однородной консистенции без комков, так как эти включения не провариваются, что является причиной потерь сбраживаемых веществ и служит источниками инфекции [27].

Далее масса равномерно поступает в виброкавитационную мельницу для сверхтонкого диспергирования, где происходит механоакустическая гомогенизация с эффективным экстрагированием и растворение крахмала зерен.

За счет исключительно тонкого помола твердых частиц готового замеса (95-97% помола проходит через сито № 10, подвергнутого механоакустическому воздействию при невысокой температуре (68...70<sup>0</sup>С), создаются благоприятные условия для активного функционирования как собственных, так и дополнительно введенных бактериальных ферментов зерна. Вследствие этого начальное (частичное) осахаривание происходит уже на стадии подработки зернового замеса и крахмал расщепляется до сбраживаемых сахаров. На осахаривание расходуется значительно меньше осахаривающих материалов (ферментов), так как активированный гидролиз проходит под механоакустическим воздействием. Измельчение, разваривание (растворение) и частично осахаривание сырья осуществляются в одном аппарате.

Благодаря эффективному смешиванию веществ зерна, ферментов и воды в аппарате отпадает необходимость чана для замеса (вместо него используют мало габаритный шнековый смеситель-дозатор).

*Новая технология позволяет снизить*

температуру обработки сырья до 68...70<sup>0</sup>С;

расход ферментов;

расход газа на водно-тепловую обработку;

энергозатраты на ректификацию браги до 30<sup>0</sup>С;

затраты на освидетельствование котлонадзорного оборудование;

*повысить*

концентрацию сухих веществ в сусле до 19–20%;

крепость бражки до 10–11%;

выход спирта на 0,5% из расчета на 1т условного крахмала;

*улучшить* условия труда и повысить его безопасность, исключив использование котлонадзорного оборудования;

*исключить* чан замеса из технологической схемы;

*освободить* производственные площади.

Таким образом, внедрение технологической схемы разваривания крахмалистого сырья на основе виброкавитационной мельницы конусного типа и шнекового смесителя-питателя позволило разработать новый тип схемы мягкого режима разваривания крахмалистого сырья в производстве пищевого этилового спирта.

Опыт работы по этой схеме и результаты эксплуатации мельницы конусного типа дают основание решить вопрос об исключении молотковых дробилок из технологической схемы и перейти на мокрый помол цельного зерна в мельницах такого типа.

Спиртовое брожение представляет собой сложный биохимический процесс, осуществляемый дрожжевыми клетками при сбраживании углеводов в этанол. Для обеспечения нормальной жизнедеятельности дрожжей необходимо обеспечить оптимальный состав сбраживаемой среды,

которая должна содержать достаточное количество сбраживаемых сахаров, ассимилируемых азотистых веществ, минеральных веществ[28].

Для повышения содержания аминного азота в сусле на стадии осахарования вносили нейтральную протеазу (ферментный препарат Нейтраза 1,5 МГ).оптимальные условия действия препарата: рН 5,8–6; температура 50...55<sup>0</sup>С. После внесения протеазы через 20–3 мин дрожжевое сусло подкисляли до рН 4,5 концентрированной серной кислотой, разбавленной 1:10, и выдерживали сусло при температуре 58...60<sup>0</sup>С в течение 2 ч. Опыты проводили при дозировке ферментного препарата 1; 3; 5 ед. ПС/г белка.

Микроорганизмы способны сравнительно быстро перестраиваться в соответствии с изменениями окружающей среды. Представленная природой возможность для управления их ростом и размножением может осуществляться, прежде всего, интенсификацией процессов основного метаболизма клетки различными факторами среды. В настоящее время известно, что ряд веществ, добавленных в среду культивирования, оказывает стимулирующее или угнетающее действие на рост микроорганизмов. Факторы внешней среды, которые могут ускорять, рост микроорганизмов, не вовлекаясь непосредственно в основной метаболизм, рассматриваются С.Дж. Пертом как активаторы или стимуляторы процессов жизнедеятельности клеток. Общим для стимуляторов роста является характер выражения эффекта, а именно, увеличение концентрации биомассы и синтеза вторичных метаболитов при использовании таковых в малых дозах.

В связи с многообразием стимуляторов роста, известных в настоящее время, с учетом природы происхождения их можно условно разделить на физические, химические и биологические.

Одним из способов увеличения выхода и улучшения качества дрожжей является введение в питательные среды стимуляторов биомассы микроорганизмов.

Известен широкий спектр стимуляторов, представляющих собой индивидуальное соединение органической и неорганической природы, так и смеси сложного состава, включая отходы различных биологических производств, позволяющих интенсифицировать процесс культивирования биомассы дрожжей, что проявлялось в увеличении, скорости и эффективности роста культуры, увеличении производительности ферментов, повышении качества готового продукта и улучшении экологических характеристик процесса. К таким стимулятором роста относят: сульфит натрия; гибберсиб-полигиббереллиновый препарат, полученный на основе гриба *Moniliforma*; ферментные препараты; отходы биологических и биотехнологических производств - производства кристаллического лизина, ксилита, протеиновых зеленых концентратов; оксиды парафинов; гипохлорит калия и другие.

Известно, что природные цеолиты Холинского местонахождения существенно влияют на дрожжевые клетки, увеличивая скорость их роста, повышая технологические показатели, устойчивость к внешним факторам и стойкость при хранении.

Известно, что любая живая ткань, отделенная от организма и сохраненная в неблагоприятных, но не убивающих ее условиях, подвергается биохимической перестройке, и образует биогенные стимуляторы, возбуждающие жизненные реакции организма, в который они введены тем или иным путем. Биогенные стимуляторы термостойки и растворимы в воде. Эти препараты получают из консервированных листьев алоэ, плаценты человека, селезенки и других тканей животных.

Биогенные стимуляторы в виде экстракта алоэ применяли для активации штаммов дрожжей в лабораторных условиях. Активизация штаммов по этой методике позволяет улучшить мальтазную и зимазную активность, повысить генеративную активность и устойчивость к неблагоприятным условиям, например к дефектам мелассы. Эти свойства закрепляются и становятся наследственным признаком культуры. Выход

товарных дрожжей, выращенных из активированных штаммов, повышается на 4%.

Выращивание технически чистых культур хлебопекарных дрожжей при добавлении и основной субстрат экстракта зеленого чая и количестве 0,25 % к объему питательной среды положительно влияет на генеративную функцию дрожжей, при этом удельная скорость роста повышается на 34-39%. Кроме того, экстракт зеленого чая повышает ферментативную активность, что выражается в повышении мальтазной активности дрожжевых клеток (на 5-7 мин) и интенсификации процесса выделения диоксида углерода в период брожения мучных полуфабрикатов.

Для активизации маточных дрожжей в производственных условиях наиболее эффективны тканевые препараты, изготовленные из печени, селезенки и поджелудочной железы животных. Применение таких препаратов улучшает подъемную силу, мальтазную и генеративную активность. Приобретенные свойства передаются следующим поколениям. В условиях производства выход дрожжей повышается на 1,5-2,0 % .

Влияние сине-зеленых водорослей на синтез биомассы дрожжей изучалось Гармановой Е.Л. Было показано, что гидролизат, включающий комплекс аминокислот, необходимых для развития клеток, можно применить в технологии получения хлебопекарных дрожжей, как источник аминокислот. При этом выход возрастает на 20-22%.

Получена активированная чистая культура хлебопекарных дрожжей путем добавления водоросли «*Spirulina platensis*» в количестве 0,01-0,05 мг. Это позволило на 40% увеличить выход биомассы дрожжей и сократить продолжительность культивирования на 35% .

Для повышения ферментативной активности хлебопекарных дрожжей предложено использовать пряно-ароматические добавки; семена петрушки, укропа, сельдерея и кориандра в количестве - 0,1-1,0 % или CO<sub>2</sub> - шрот, полученный после CO<sub>2</sub> - экстракции этих семян.

Известно, что в качестве стимулятора возможно применение экстракта

из зеленых проростков пшеницы. При введении экстракта в количестве 30% от объема, происходит увеличение массы дрожжей на 40-50% .

Питательная среда на основе ферментированной рисовой мучки для культивирования дрожжей с содержанием сухих веществ до 10,5 % превосходит мелассу по качественному составу и вполне может ее заменить.

Изучена возможность повышения сбраживающей способности дрожжей, путем их предварительной обработки в питательной смеси, содержащей муку из желудей или цельносмолотую фасолевую муку; в состав среды возможно дополнительное введение амарантовой муки, измельченных пшеничных зародышей и молочной сыворотки.

Известен способ активации дрожжей, которым в питательную среду специально вносят дополнительно 0,00003- 0,0007 % цистеина, цистина, или метионина (на первом этапе приготовления среды), а затем аланина, серина, глутаминовой кислоты по 0,00008 - 0,0050%/.

Для нормального развития дрожжей требуется наличие в среде веществ, стимулирующих накопление биомассы (биотина, инозита и пантотеновой кислоты). Все эти ростовые вещества содержатся в свекловичной мелассе в количествах (мкг/кг): инозит 5770000-800000, пантотеновая кислота 50000-110000, биотин 40-140. При этом количество инозита и пантотеновой кислоты обычно соответствует или несколько превышает то количество, которое необходимо для быстрого накопления биомассы с высоким выходом готовой продукции на единицу сырья.

Содержание биотина в мелассе, поступающей на дрожжевые заводы, колеблется в широких пределах - от 40 до 140 мкг/кг и в среднем составляет 83 мкг/кг, причем партии мелассы с более высоким содержанием биотина (115-140 мкг/кг) встречаются редко. Таким образом, по содержанию биотина свекловичная меласса, не удовлетворяет требованиям современного дрожжевого производства.

В заводской практике в качестве источника биотина используют кукурузный экстракт, получаемый в результате упаривания воды от замачивания кукурузы на крахмалопаточных заводах. Добавление его в количестве 6 % к массе мелассы дает положительный эффект при выращивании дрожжей на меласных средах, бедных биотином. Альтернативным источником биотина может также быть картофельный сок. Зольных веществ в упаренном картофельном соке значительно больше, чем в кукурузном экстракте. По содержанию витаминов картофельный сок несколько уступает кукурузному экстракту. В гидролизатах упаренного продукта обнаружено 16 аминокислот. Уваренный картофельный сок содержит биотина 1,32-2,15 мг/кг сухих веществ.

Использование дестиобиотина при выращивании дрожжей на меласных средах дает положительный эффект при добавлении его в количестве 400 мкг/кг мелассы. Скорость роста дрожжей увеличивается, улучшается и качество готовой продукции: подъемная сила увеличивается на 9 минут, зимазная активность - на 20 минут, мальтазная активность - на 35 минут, осмочувствительность - на 12 минут.

Согласно данным, на прирост 1 т дрожжей требуется 250 мг биотина. В мелассе его обычно около 80 мг/т. Недостающее количество необходимо восполнить добавлением дестиобиотина с учетом его активности.

Нормализация состава мелассы в результате добавления различных источников биотина вызывает значительное ускорение роста дрожжей. Однако при переработке некоторых партий мелассы наблюдается понижение стойкости готовой продукции, что происходит от недостаточного содержания калия в мелассе. Содержание калия в среде определяется при прочих разных условиях интенсивностью размножения дрожжей. С уменьшением в среде содержания калия, по крайней мере, до количества, не обеспечивающего содержания его в дрожжах, выход дрожжей, как правило, снижается.

Недостаток калия в среде компенсируется внесением его в виде

сернистой или хлористой соли. Калий может находиться в мелассе не только в свободном состоянии, но и в связанном, поэтому он не весь участвует в обменных реакциях при выращивании дрожжей. Присутствие ионов калия в мелассной среде требуется для проявления активности многих ферментов, которые участвуют в окислительно-восстановительных реакциях и принимают активное участие в процессе роста и размножения дрожжей. На мелассах с низким содержанием калия рост и размножение дрожжевых клеток отклоняется от нормы: замедляются новообразования клеток, появляются дрожжевые клетки с двумя-тремя почками. Поэтому, в конечном итоге, сокращается их выход.

Таким образом, при выращивании дрожжей на мелассе с низким содержанием калия необходимо добавлять калийное питание. Количество добавляемых к сырью солей калия должно составлять 3,5 % к массе мелассы, при этом увеличивается выход дрожжей и улучшается их качество — стойкость и осмочувствительность.

Препарат карбоксилии представляет собой смесь следующих солей:  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{ZnSO}_4$ ,  $\text{MnSO}_4$ . Содержащиеся в препарате металлы активизируют деятельность многих представителей всех шести классов ферментов. Его рекомендуют дозировать по 300-600 г на 100 т мелассы .

Известны данные о выходе биомассы дрожжей при разной величине отношения источников минерального питания в культуральной среде углерод/азот  $(\text{C/N})_x$  и углерод/фосфор  $(\text{C/Ф})_x$ , позволяющие прогнозировать содержание в дрожжах количество белков, аминокислот, углеводов и трегалозы.

В работе Ибрагимовой С.И. определены оптимальные концентрации солей (сернистого аммония, фосфорнокислого калия, фосфорнокислого аммония и карбамида), служащие дополнительным источником азота и фосфора, для повышения скорости роста и прироста биомассы хлебопекарных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* при культивировании на пшеничном сусле и спиртовой барде.

Существует способ, согласно которому дрожжи производят отъемнодоливным методом на питательной среде, содержащей мелассу, карбоксилин, источник азота, фосфора, калия. В качестве источника фосфора и калия используют монокалийфосфат в соотношении 1:15 — 1:40 к карбоксилину, а в качестве источника азота — аммиачную воду. Способ позволяет обеспечить рост дрожжей в нелимитированных условиях и гарантирует высокие скорости роста дрожжей и высокое качество полученной биомассы.

Подобрана питательная среда для выращивания наиболее продуктивных по белку штаммов дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, основу которой составляет пшеничное сусло (СВ — 17%), соли:  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ , мочевины, рН 4,0-5,5. Показано, что для получения максимального накопления биомассы хлебопекарных дрожжей исходное значение рН пшеничного сула должно быть близким к нейтральному, а концентрация растворенных углеводов в питательной среде 15 % .

Установлено, что активность размножения дрожжей возрастает при внесении в среду стимулятора роста органического происхождения, а при оптимальной его дозировке 40 -50 мг к объему среды увеличивается прирост биомассы на 32,7 - 42,8 % в сравнении с контролем. Стимулятор роста интенсифицирует обменные процессы дрожжевой клетки, следствием чего является увеличение ферментативной активности, а качество дрожжей удовлетворяет требованиям ГОСТа 171-81.

Установлено, что под влиянием витацитов и пищевого кремния существенно изменялся химический состав дрожжевых клеток, что приводило к улучшению морфологии и повышению физиолого-биохимической активности дрожжей, от которой непосредственно зависят продуктивность и технологические свойства дрожжей.

При выращивании дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* в производственных условиях на мелассной среде с минеральными солями, в качестве стимулятора роста используют панкреатическую РНКазу в

микродозах. РНКазу в ростостимулирующей дозе вносят в производственные емкости дважды: в инокулятор и посевной аппарат последовательно. Для улучшения потребительских свойств дрожжей РНКазу добавляют в ферментеры также на этапе дозревания дрожжей.

Также имеются данные изучения ферментативной активности хлебопекарного штамма *Saccharomyces cerevisiae* Y — 2635, культивируемого на различных питательных средах. Установлено, что дрожжи, выращенные на питательной среде с использованием геотермальной воды отличаются более высоким уровнем активности  $\beta$ -фруктофуранозидазы, алкогольдегидрогеназы и  $\alpha$ -глюкозидазы.

Запатентован способ, предусматривающий культивирование дрожжей в условиях аэрации на питательной среде, содержащей ферментативные гидролизаты крахмалопродуктов в качестве источника углерода, а в качестве источника азота и фосфора — минеральные соли, в качестве стимуляторов роста — автолизат дрожжей и кислотный гидролизат ржаных отрубей, отжимок ягод и фруктов. Данный способ позволяет увеличить выход биомассы хлебопекарных дрожжей и улучшить их ферментативную активность.

Применение аскорбиновой кислоты, моноглицеридов и липазы в соотношении (2,0-3,0):(90,0-92,0):(0,4-0,6) соответственно, позволяет повысить эффективность действия хлебопекарных дрожжей их биотехнологические и технологические свойства.

Введение в питательные среды в качестве активатора роста хлебопекарных дрожжей  $H_2O_2$  приводит к повышению окислительно-восстановительного потенциала как внутри, так и вне клеток, частичному инактивированию дрожжевых протеолитических ферментов и подавлению инфицирующих гнилостных бактерий. Кроме того,  $H_2O_2$  изменяет проницаемость клеточной оболочки дрожжей, увеличивает выход биомассы дрожжей на 3-6 %.

На примере бродильного штамма дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* показана целесообразность контроля факторов окислительного стресса для улучшения показателей ферментации. Обнаружено, что контролирование совместного воздействия стресс-факторов ( $H_2O_2$ , мягкий ультрафиолет, продукты перекисного окисления компонентов питательных сред) и антистресс-факторов (видимый свет низкой интенсивности, 10-100 мВт/л, и индуцируемые им процессы фоторепарации и перекрестные реакции ответа на окислительный стресс) в определенных условиях улучшает ростовые и биосинтетические характеристики используемой культуры дрожжей: повышает выход целевого продукта биосинтеза, удельную скорость роста, бродильную активность, устойчивость их к закислению среды.

При внесении оксиэтилидендифосфоновой кислоты при культивировании хлебопекарных дрожжей *S. cerevisiae* (штамм ЛК-14) на меласных средах выявлен эффект увеличения генеративной активности дрожжей на 37 % и увеличение их съема на 18,6 %, а также увеличение их подъемной силы на 13 %, осмочувствительности на 17 % и стойкости на 23 %.

С целью интенсификации процессов выращивания хлебопекарных дрожжей на меласных питательных средах предложен способ глубокой дестабилизации их органоминерального комплекса с помощью комплексонов. Показано, что их использование повышает доступность и усвояемость органических и минеральных ингредиентов дрожжами .

Исследовано влияние  $NaCl$ , глицерина, полиэтиленгликоля 600 и сорбата на жизнеспособность дрожжей в модельных системах. Установлено, что увеличение концентрации осмолитов в системе увеличивает их негативное влияние на развитие клеток дрожжей .

Увеличить выход биомассы дрожжей и их ферментативную активность на 10 % возможно путем введения 4 г антибиотика бацитрацина на 1 т мелассы в качестве стимулятора роста.

Внесение препарата, полученного из клеток остаточных пивных дрожжей путем разрушения их клеточных стенок и цитоплазматических мембран плазмолизом, позволяет увеличить прирост биомассы дрожжей в 2-3 раза, сократить процесс главного брожения на 2 суток, повысить флокуляционную способность дрожжей и стойкость их к автолизу и улучшить физиологические свойства дрожжей.

Известно, что в качестве стимулятора роста хлебопекарных дрожжей используют отход процесса денуклеинизации дрожжей, представляющий собой супернатант, полученный после кислотнo-термической обработки дрожжей. Использование этого компонента в составе питательных сред в количестве 1,45-3,84 % позволяет увеличить выход биомассы на 2,15-8,52 % по сравнению с контролем.

Имеется ряд научных разработок, отмечающих положительное влияние соединений фенольной природы на процессы биосинтеза биологически активных веществ микроорганизмами; их способность к ингибированию или стимулированию процессов биосинтеза зависит от строения вещества и его концентрации.

Предложено в качестве стимуляторов роста микроорганизмов, и в частности *Saccharomyces cerevisiae*, использовать синтетические антиоксиданты из класса арил(тио)сульфонилуксусных кислот (АТУК). Выход биомассы увеличивается на 5-10 % по сравнению с контролем. Физиологически активные концентрации синтетических антиоксидантов лежат в области  $10^{10}$ - $10^6$  % об.

Разработан способ стабилизации молекул ферментов и защиты свойств дрожжей от термического воздействия: культуру фазы логарифмического роста обрабатывают препаратом алкилоксибензолом в диапазоне концентраций 0.1-1 г/дм<sup>3</sup>, инкубируют и затем подвергают высушиванию.

Внесение стимулятора полифенольной природы Гипоксена в питательные среды в количестве 3 мг/дм<sup>3</sup> приводит к увеличению выхода

дрожжей на 18,3 % (в лабораторных условиях) и на 10,31 % (при проведении культивирования в полупромышленных условиях).

Из анализа литературных данных следует, что проблема исследования стимулирующего действия веществ различной природы и происхождения на рост, развитие, накопление и качество биомассы дрожжей не является новой. Однако в последнее время было получено множество соединений, обладающих биологической активностью, в частности фенольной природы, действие которых на физиологию дрожжей до конца не изучено. Поэтому проведение дальнейших исследований в этом направлении представляет значительный интерес.

Для изучения влияния ионов фосфора на эффективность биосинтеза биомассы дрожжевых клеток в сусло вносили ортофосфорную кислоту  $H_3PO_4$ . при осахаривании в сусло добавляли Нейтразу в дозировке 3 ед.ПС/г белка. В первом случае исследовали пробу без добавления кислоты (контроль); во втором случае дозировка ортофосфорной кислоты составляла 1 кг/т сырья; в третьем и четвертом, соответственно 3 и 5 кг/т сырья.

При внесении карбамида в дрожжевое сусло наблюдали увеличение продолжительности лаг-фазы. Возможно это связано с адаптацией дрожжей к новому источнику азотистого питания. Аммиачный азот используется дрожжевыми клетками для синтеза сначала более простых, а затем и более сложных составных частей клеточной протоплазмы.

Применение предложенного режима выращивания засевных дрожжей при сбраживании зернового сусла позволило сократить время брожения на 20%, увеличить выход спирта на 1,05%.

**Характеристика гидролитических ферментов используемых при переработке растительного сырья.** В настоящее время для осахаривания сусла, разжижения и декстринизации крахмального клейстера широкое применения находят ферментные препараты фирмы «ЭНДЭ индустриал корпорейшн»(США), «Эрбсле Гайзенхайм» (Германия), «Novo Nordisk» (Дания). Опыт работы спиртовых заводов показывает, что применение

ферментных препаратов микробного происхождения взамен солода является экономически эффективным для интенсификации процесса осахаривания крахмала, повышается степень использования сырья, стабилизируются технологические процессы, внедряются более совершенные энерго и ресурсосберегающие технологии [29-31].

Использование концентрированных ферментных препаратов дает возможность внедрения прогрессивные технологии, создавали на спиртовых заводах безопасные условия эксплуатации оборудования. Для эффективного внедрения ресурсосберегающих технологий, более полного использования всех составляющих зернового сырья, целесообразно применение гидролитических ферментов, широкой специфичности действия. К ним относятся ферменты, гидролизующие некрахмаленые полисахариды и белковые вещества зерна.

Для разваривания крахмалистого сырья фирмой «Энде индустриал Корпорэйшн» предлагается  $\alpha$ -амилазы получаемые путем глубинного культивирования бактерий рода *Bacillus licheniformis* (торговые названия: зимаджунт НТ-340 С<sup>+</sup> и С+N, амилаза НТ-4000, миквамил 1200С)-  $\alpha$ -амилазы получаемые путем глубинного культивирования микромицета *Aspergillus oryzae*. (торговая названия - клареца БС).[32].

Эти ферментные препараты гидролизуют внутренние альфа -1,4 глюкозидные связи крахмала и продуктов их последовательного расщепления, что приводит к быстрому снижению вязкости клейстеризованных растворов крахмала на стадии разжижения, тем самым, обеспечивая подготовки суслу к действию глюкоамилазы. Конечными продуктами действия  $\alpha$ -амилазы на крахмал являются декстрины различной молекулярной массы и олигосахариды. Температурный оптимум действия этих бактериальных препаратов составляет 60-90<sup>0</sup>С, а грибной амилазы 45-55<sup>0</sup>С. Грибная амилаза (клареза БС) обладает эндоамилазной способности и гидролизует  $\alpha$ -1,4 глюкозидные связи в амилазы и амилопектине крахмала с

образованием декстринов и олигосахаридов. При длительном гидролизе образуется большие количества мальтозы и глюкозы.

Выпускаемый фирмой ферментный препарат БНЗ-720С обладает  $\alpha$ -амилазной и протеазной активностью. Получают культивированием бактерий *Bacillus subtilis*. Этот ферментный препарат обладает эндоамилазной активностью и гидролизует  $\alpha$ -1,4- глюкозидные связи крахмала, что вызывает снижение вязкости затора. Сопутствующим ферментом в этом препарате является протеаза, которая способна осуществлять гидролиз протеина среди до пептидов низкого молекулярного веса.

В настоящее время в спиртовой промышленности для разжижения и осахаривания крахмала широко применяют амилолитических ферментные препараты, содержащие в основном  $\alpha$  амилазу и глюкоамилазу.

$\alpha$ -Амилаза – фермент эндогенного действия, который беспорядочно гидролизует внутримолекулярные связи в крахмальных субстратах и расщепляет  $\alpha$  -1,4- глюкозидные связи в амилозе и амилопектине. Продуктами гидролиза крахмала, катализируемого  $\alpha$  амилазой, являются  $\alpha$  декстрины, а также незначительное количество ди-и моносахаридов.

Глюкоамилаза – экзофермент последовательно расщепляет  $\alpha$  - 1,4- и  $\alpha$  - 1,6- глюкозидные связи с нередуцирующих концов в декстринах с образованием глюкозы.

Для спиртового производства интерес представляет такой амилолитический фермент, как пуллулаза, гидролизующий внутренние  $\alpha$  - 1,6-глюкозидные связи в пуллулане, амилопектине и предельных декстринах до мальтоолигосахаридов [33]. Однако воздействие пуллулазы на амилопектин несколько затруднено. Атакуемость полимера ферментом возрастает если субстрат подвергнут частичному расщеплению.

В этой связи немецкая фирма «Эрбсле Гайзенхайм» и российская компания «Делер» предлагают предприятиям широкий выбор эффективных ферментных препаратов и детальную технологическую консультацию,

которые позволяют заводам значительно поднять рентабельность своей продукции.

Все схемы подготовки крахмала в алкогольной промышленности требуют специальных ферментных комплексов для гидролиза растворимого крахмала до сбраживаемых сахаров, т.е. мальтозы и глюкозы.

**Дистицим БА** разработан для производств, где используют температуру разваривания 60...75<sup>0</sup>С.

**Дистицим БА-Т** содержит термостабильную  $\alpha$ -амилазу, а также небольшое количество мезофильной  $\alpha$ -амилазы. Он применяется при переработке пшеницы при 85...95<sup>0</sup>С.

**Дистицим БА-Т Специал** разработан как для мягкого разваривания ржи, так и для разваривания разного зерна в аппаратах Генце. В последнем случае фермент вносят в крахмальную массу после сброса давления.

**Декстрамил ВХ-** термостабильная кислотоустойчивая  $\alpha$ -амилаза. Использование данного препарата- лучший вариант для схемы с рециркуляцией барды, а также для переработки закисшего при хранении зерна.

**Дистицим Фунгал Альфа-** препарат  $\alpha$ -амилазы с побочной активностью  $\beta$ -амилазы, который отлично работает при слабокислых и нейтральных значениях рН сусла. Он одновременно разжижает и осахаривает сусло до мальтозы. Дистицим Фунгал Альфа обычно используют в мичуринской схеме или для доосахаривания декстринов в бродильном чане.

**Глюкомальт ТС-** комплексный препарат включающий глюкоамилазу,  $\alpha$ -амилазу и нейтральную протеиназу. Препарат применяют совместно с бактериальными ферментами при рН сусла выше 5,5. ферментативные активности сбалансированы для получения глубокого осахаривания с одновременным высвобождением аминного азота.

**Глюкамил** – комплексный препарат, включающий глюкоамилазу и кислотоустойчивую термотолерантную  $\alpha$ -амилазу. Его используют для осахаривания суслу при рН ниже 5,5.

**Дистицим АГ**- препарат с максимально высокой глюкоамилазной активностью. Он быстро действует на 1,6- связи амилопектина. Побочная активность протеиназы обеспечивает ускорение роста дрожжей при брожении.

В природе гранулы растворимого крахмала входят в органическую полимерную связь в эндосперме злаковых, состоящую из цепей  $\beta$ -глюканов и пентозанов, каждая из которых связана с другими посредством протеинов. Для высвобождения крахмальных зерен из эндосперма необходимо эту связь разрушить.

Программа «Эрбсле» по использованию протеиназ представляет ферменты, высвобождающие крахмал и показывает оптимальные условия их использования.

Бактериальную протеиназу **Дистицим П-7** используют для высвобождения крахмала и расщепления белков до потребляемых дрожжами аминокислот в процессе разваривания зерносырья.

Последняя разработка – грибная протеиназа **Дистицим Протацид Экстра**, позволяющая высвобождать недоступный для амилаз крахмал в процессе осахаривания и брожения, увеличивая при этом содержание свободных аминокислот. Ее использование позволяет увеличить выход спирта в существенном количестве.

Хорошо зарекомендовал себя комплексный препарат **Ликвимеш**, являющийся комбинацией грибных ферментов: кислотоустойчивой протеиназы, термотолерантных  $\beta$ -глюконазы и пентозаназы. Они позволяют снять вязкость суслу, обусловленную высвобожденными полисахаридами.

Соотношение  $\beta$ -глюканов и пентозанов для разных зерновых культур различно и составляет для ячменя 75:25, для пшеницы – 60:40, для ржи – 20:80.

Ферменты «Эрбсле» адаптированы для любого сырья. При переработке пшеницы лучше подходит Ликвимеш за счет своей высокой  $\beta$ -глюканазной активности, так как вязкость в данном случае обусловлена  $\beta$ -глюканами, а при использовании ржи – **Дистицим  $\beta$ -Г**, обладающий значительно большей пентозаназной активностью.

Таким образом, при переработке ржи рекомендуется применять комбинацию Дистицим Протацид Экстра + Дистицим  $\beta$ -Г для полного высвобождения крахмала и снижения вязкости, тогда как для пшеницы аналогичным эффектом обладает Ликвимеш. Доказано, что снижение вязкости увеличивает выход эталона в процессе брожения, особенно при совместном использовании протеиназ грибного происхождения, содержащихся в препаратах Ликвимеш и Дистицим Протацид Экстра.

ООО «ЭнзимБиоПродукт» выпускает ферментный препарат глюкоамилазы – Глюкозил 500Л, путем глубинного культивирования штамма плесневого гриба *Aspergillus niger*. Данный ферментный препарат способен гидролизовать  $\alpha$ -1,4 и  $\alpha$ -1,6 глюкозидные связи крахмала, декстринов, олигосахаридов, отцепляя при этом молекулы глюкозы от нередуцирующих концов цепей с образованием глюкозы. Этот препарат применяют для осахаривания частично расщепленных полимерных молекул после действия  $\alpha$ -амилазы. Для разжижения и снижения вязкости клейстеризованного крахмала выпускается ферментный препарат бактериальной  $\alpha$ -амилазы – Альфамил 2500Л получаемый путем глубинного культивирования штамма бактерий *Bacillus subtilis*. Фермент гидролизует внутренние  $\alpha$ -1,4 – глюкозидные связи крахмал, декстринов и продуктов их последовательного расщепления.

Термолаза 800Л – ферментный препарат бактериальной термостабильной  $\alpha$ -амилазы получают путем глубинного культивирования штамма бактерий *Bacillus licheniformis*. Фермент гидролизует внутренние  $\alpha$ -1,4 –гликозидные связи крахмал, глюкогена, продуктов их последовательного расщепления, что приводит к быстрому снижению вязкости клейстеризованных растворов крахмала на стадии разжижения, тем самым, обеспечивая подготовку сусла к действию глюкоамилазы.

ВискоСтар 150Л – ферментный препарат гемицеллюлазы получают путем глубинного культивирования штамма *Trichoderma longibrachiatum*. Данный ферментный препарат содержит ферменты, гидролизующие некрахмальные полисахариды зернового сырья. Основным ферментом комплекса является ксиланаза, ероне того, ФП содержит  $\beta$ -глюканазу и целлюлазу. ФП ВискоСтар 150Л применяют для гидролиза трудно сбраживаемых видов сырья, таких как рожь и ячмень.

Пролайн BS Ликвид – ферментный препарат нейтральной бактериальной протеазы, полученный из штамма *Bacillus subtilis*. Данный ферментный препарат гидролизует белок сырья, интенсифицирует спиртовое брожение, способствует снятию белкового осадения и нагара на оборудовании.

Пролайн РАС 30L – ферментный препарат кислой грибной протеазы, полученный из штамма *Aspergillus niger*. Данный ферментный препарат гидролизует пептидные связи в белках, способствует повышению физиологической активности дрожжей, улучшает показатель сбраживания сусла. Позволяет получить сусло, обогащенное аминокислотами. Ускоряет брожение на 40% и увеличивает выход спирта на 2%.

При использовании в спиртовом производстве различных видов зернового сырья необходимо учитывать не только крахмал как основной компонент зерна, но и присутствующие в нем белковые вещества, а также некрахмальные полисахариды.

Ферменты, гидролизующие некрахмаленные полисахариды и белковые вещества растительного сырья, играют значительную роль в повышении эффективности спиртового брожения. Проблему биотрансформации других высокомолекулярных полимеров зерна рассматривали параллельно с расширением исследований по использованию амилолитических ферментов [34-37].

Применяемый издавна зерновой солод как источник амилолитических ферментов обеспечивал достаточно глубокое осахаривание и выбраживание только за трое суток. Необходимо отметить, что зерновой солод не только выполнял задачу гидролиза крахмала до сбраживаемых сахаров, но и был источником легко усвояемого азотистого питания для дрожжей, так как в процессе ращения в нем накапливается значительное количество аминокислот (от 7% в ячмене и до 32% в солоде от общего азота). Накоплению аминокислот, пептонов и полипептидов в зерновом сусле способствовали также содержащиеся в солоде протеиназы [38,39].

Повышению эффективности действия зернового солода в спиртовом производстве посвящены многие работы.

Известно, что в зерне содержатся протеиназы типа папаина и пептидазы. В процессе соложения активность их возрастает в 40 раз. Зерновой солод имеет и определенную цитолитическую активность, под действием которой в некоторой степени происходит цитолиз – растворение клеточных стенок эндосперма.

Протеолитические ферменты солода могут быть разделены на две группы: 1) протеиназы, куда входят: а) протеазы с оптимумом рН 3-4,5, дающие первые продукты распада белков; б) триптические ферменты с оптимумом рН, близким к 6, дающие полипептиды и аминокислоты, и 2) пептидазы с оптимумом рН, близким к 7, расщепляющие полипептиды и дипептиды до аминокислот.

При разваривании крахмалистого сырья солодом, количество превращения белковых веществ меньше, чем количество превращения во время солодоращения. Из общего количества белка, содержащегося в солоде, всуло переходит около 35% (с колебаниями от 28 до 40%), причем из этого количества около половины (20%) находится солоде в готовом для растворения состоянии: значит, на долю белков, подвергаемых действию протеолитических ферментов во время процесса осахаривания, приходится меньшая часть.

Протеиназы солода способны расщеплять все настоящие белки, т.е. спирторастворимые и щелочерастворимые, превращая их частично пептоны и полипептиды. Следует отметить, что протеолитический распад оказывает влияние ряд факторов, обуславливаемых технологическим процессом; температура, концентрация водородных ионов, концентрация субстрата.

Протеиназы в сравнении с пептидазами отличаются большей термоустойчивостью, поэтому при высоких температурах осахаривания можно ждать накопления продуктов белкового распада с высоким молекулярным весом. При температуре, близкой к 50<sup>0</sup>, происходит наиболее сильное образование низкомолекулярных продуктов (аминокислот).

Протеолитические ферменты в растворах начинают разрушаться уже при довольно низких для разваривания температурах, но с другой стороны, часть экстрактивных веществ, перешедших в раствор, играет роль защитных коллоидов, задерживающих это разрушение ферментов. Все же температура 80<sup>0</sup> для протеолитических ферментов является уже губительной.

Оптимум действия протеиназ находится в зоне рН 4,0-4,5; при повышении щелочности количество растворимого белка понижается. Для действия пептидаз, расщепляющих полипептиды и обладающих оптимальным действием при рН 7,0. Температура 50<sup>0</sup> является наиболее благоприятной в пределах рН замеса для накопления низкомолекулярных фракции (аминокислотного азота); температура 60<sup>0</sup> наоборот, способствует накоплению максимального количества высокомолекулярных белковых

фракций, однако резкой разницы в величине этой фракции белка при температуре 60<sup>0</sup> и 50<sup>0</sup> не наблюдается.

Таким образом, применяемый в спиртовом производстве зерновой солод выполняет три задачи: осуществляет гидролиз крахмала до сбраживаемых углеводов, является источником азотистого питания для дрожжей и при осахаривании крахмалистого сырья производит частичное растворение клеточных стенок сырья.

Следует, однако, отметить, что скорость осахаривании крахмалсодержащего сырья все еще остается низкой, что затрудняет интенсификацию процесса брожения.

В этой связи значительный интерес представляет применение ферментов микробного происхождения, дающее возможность значительно повысить концентрацию необходимых ферментов в среде и тем же самым обеспечить глубокий гидролиз крахмала до сбраживаемых сахаров за сравнительно короткий период [40].

## **Выводы по главе 1.**

Относительно низкая эффективность использования зернового сырья в традиционной технологии спирта предопределена особенностями "однопродуктовых" схем за счет неполного использования потенциальных возможностей главных компонентов зерна: углеводов и белка. Отсюда решение проблемы экономии материальных ресурсов должно осуществляться путем внедрения ресурсосберегающих технологий, предусматривающих комплексную переработку зерна с получением нескольких ценных конечных продуктов.

Для разработки ресурсосберегающей технологии переработки пшеницы на спирт надо прицелло использовать

## Глава 2. ИССЛЕДОВАНИЕ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ

### СВОЙСТВ СЫРЬЯ И ГОТОВОЙ ПРОДУКЦИИ

**1.1. Реагенты и препараты ферментов.** В работе использовали уксусную кислоту, фосфорную кислоту, орто-борную кислоту, едкий натрий и, натрий хлористый марки «Х.Ч.».

В качестве белковых субстратов использовали белки пивной дробины полученный из завода «Интер-Рохат». Выделение их проводили согласно методике.

#### **2.2. Определения концентрации белка**

При добавлении к раствору белка щелочного раствора меди появляется фиолетовое окрашивание, интенсивность которого зависит пропорционально концентрации белка. Развитие окраски обусловлена наличием пептидных связей. Биуретовую реакцию дают не только белки, но и полипептиды. Для ее протекания необходимо наличие, по крайней мере, двух пептидных связей [41].

#### **Реактивы:**

1. Биуретов реактив - к 250 мл дистиллированной воды добавляют 0,75 г. сульфата меди ( $\text{Cu SO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ ) и 3 г. виннокислого натрия – калия ( $\text{Na KC}_4 \text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ ), затем при энергичном помешивании – 150 мл 10 % - ного раствора натриевой щелочи (свободной от углекислого натрия) и 1 г йодистого калия. Общий объем доводят до 1 л. Реактив хранят в полиэтиленовом сосуде или в силенке покрытой изнутри парафином.

2. Раствор альбумина, содержащий 10 мг белка в 1 мл.

#### **Ход определения:**

Построение калибровочной кривой – в пять химических пробирок помещают соответственно 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,0 мл раствора альбумина, содержащего 10 мг белка в 1 мл. общий объем в каждой пробирке доводят до

1 мл дистиллированной водой и затем добавляют по 4 мл биуретового реактива. Содержимое пробирок перемешивают и оставляют на 30 минут при комнатной температуре. Интенсивность окрашивания определяют спектрофотометрический при любой длине волн в диапазоне 540-660 нм или на фотоколориметре, используя соответствующий фильтр. Измерения проводят относительно кюветы, содержащей те же компоненты, за исключением белка. Полученные данные изображают графически, откладывая по оси ординат величину оптической плотности, а по оси абсцисс – количество белка, которое соответствует этой величине. Обработку исследуемых растворов ведут так же как и при получении калибровочной кривой, имея в виду, что содержание в них белка не должно быть выше 10 мг и ниже 1 мг. Измерив величину оптической плотности опытных проб и пользуясь калибровочной кривой, определяют содержание белка в исследуемом образце. В присутствии солей аммония могут образовываться окрашенные аммиачные комплексы. Это необходимо иметь при использовании данного метода.

### **2.3. Определение протеолитической активности ферментов**

Протеолитическую активность измеряли согласно модифицированному методу Ансона, используя в качестве субстрата бычий сывороточный альбумин. За единицу активности ферментов приняли 1 мкмоль тирозина, выделяющийся за 1 мин в расчёте на мл препарата [42].

Реакцию гидролиза белков проводили в среде 0,1 м универсального буфера при нужном рН, используя в качестве субстрата 1 мл 1%-ного раствора белков, а в качестве фермента - 1 мл раствора протеиназы, содержащего 0,02-0,03 ед. активности (мК моль тирозина за 1 мин). Смесь инкубировали в течение 10 мин при нужной температуре, после чего добавляли 2 мл 0,3 м трихлоруксусной кислоты, чтобы остановить ферментативную реакцию, и осаждали белок, а также высокомолекулярные продукты гидролиза. Смесь выдерживали еще 20 мин. При той же

температуре, затем фильтровали через бумажный фильтр и отбирали по 1 мл фильтрата, добавляли по 5 мл 0,5 М раствора углекислого натрия, перемешивали и быстро приливали по 1 мл рабочего раствора реактива Фолина. После 20 мин отстаивания растворы приобретали голубую окраску, интенсивность которой определяли на фотоэлектроколориметре (ФЕК-56М) со светофильтром N 9 (630 нм) против контрольной пробы в кюветах с толщиной слоя 10 мм.

Протеолитическую активность в ед\мг (А) вычисляли по формуле

$$A = \frac{D \times 4}{1,72 \times 10 \times m}$$

где: D- оптическая плотность;

4- реакционной смеси и раствора фермента после добавления ТХУ;

1,72- тирозиновый коэффициент, определяемый по градуировочной кривой;

10 – время гидролиза субстрата, мин;

m – Количество ферментного препарата, взятого на протеолиз (в мг на 1 мл ферментного раствора) или в мг иммобилизованного фермента.

#### **2.4. Определение амилолитической активности.**

Определение амилолитической активности проводили по стандартной методике [43]. За единицу активности принимали такое количество фермента, которое в течение 10 мин при 30<sup>0</sup>С катализировало гидролиз 10 мл 1%-ного раствора крахмала так, чтобы степень превращения субстрата составляла 30%.

Определение активности проводили следующим образом: к 5 мл ферментного раствора добавляли 10 мл 1%-ного раствора крахмала, предварительно нагретого до 30<sup>0</sup>С в 0,1 М Na-ацетатном буфере с нужным рН. Гидролиз крахмала проводили в течение 10 мин при 30<sup>0</sup>С при

перемешивании. Затем 0,1 мл аликвоты раствора переносят в пробирку с предварительно подготовленными 10 мл рабочего раствора йода (5 мг йода и 50 мг йодистого калия в 100 мл 0,1 н раствора соляной кислоты).

В контрольных опытах вместо ферментов брали дистиллированную воду. Количество прогидролизованного крахмала (С) в граммах определяют по формуле:

$$C = \frac{D_1 - D_2}{D_1} \cdot 0,1,$$

где  $D_1$  – оптическая плотность контрольного раствора;

$D_2$  – оптическая плотность опытного раствора;

0,1 – количество крахмала, взятое для испытания в качестве субстрата, г.

Амилазную активность определяют по формуле:

$$A = \frac{5,885 \cdot C - 0,001671}{n} \cdot 1000$$

где С – количество прогидролизованного крахмала, г;

n - количество фермента, взятое для испытания, мг;

1000 – коэффициент пересчета миллиграмма в грамм;

5,885 и 0,001671 – коэффициенты расчетного уравнения.

## 2.5. Определение содержания этилового спирта

Исследуемый образец подвергают перегонке. По плотности отгона устанавливают содержание спирта, пользуясь для этого таблицей плотностей водно-спиртовых смесей. Плотность отгона может быть определена пикнометром или ареометром. В последнем случае пользуются ареометрами-спиртомерами, шкала которых непосредственно показывает содержание спирта в % об.

**Специальные приборы.** Для получения отгона собирают перегонную установку, состоящую из перегонной колбы (круглодонной или

плоскодонной емкостью 200—250 мл), соединенной с вертикально установленным шариковым холодильником. Для предупреждения перебрасывания вина в приемник над перегонной колбой целесообразно устанавливать каплеуловитель. При массовых анализах можно рекомендовать установку из шести перегонных колб с общим холодильником.

**Техника определения при помощи пикнометра.** Мерную колбу на 100 мл (при точных работах — пикнометр на 50 или 100 мл) заполняют исследуемым вином и доводят до метки при 20<sup>0</sup>С при помощи термостатической ванны (см. описание при определении плотности).

Содержимое мерной колбы (пикнометра) переносят в перегонную колбу, трехкратно ополаскивают небольшим количеством дистиллированной воды, сливая ее в ту же колбу. Общий объем промывной воды не должен превышать  $U_3$  взятого объема вина. Затем перегонную колбу соединяют с холодильником и в качестве приемника подставляют освобожденную и ополоснутую водой мерную колбу (пикнометр). После этого приступают к перегонке, которую прекращают, когда мерная колба-приемник (пикнометр) будет заполнена отгоном приблизительно до 0,9 своего объема. Мерную колбу (пикнометр) тщательно взбалтывают и доводят до метки дистиллированной водой при 20<sup>0</sup>С, пользуясь для этого термостатической ванной.

Далее определяют плотность отгона при помощи пикнометра (см. методы определения плотности). В том случае, когда в качестве приемника служит пикнометр, определение упрощается, если известна заранее масса пустого пикнометра и масса его с водой.

## **Выводы по главе 2.**

Для проведения экспериментальных работ выбраны самые адекватные методы анализа белков, ферментов, содержание спирта и содержание дрожжевой биомассы. Эти методы широко используются научных исследованиях проводимых в нашей стране и за рубежом

### **Глава 3. РАЦИОНАЛЬНОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БЕЛКОВ ПРИ ПЕРЕРАБОТКИ ПШЕНИЦЫ НА СПИРТ**

В спиртовом производстве только чуть больше трети зерна расходуется на спирт, тогда как остальная часть его переходит в отходы. Такое положение дел, хотя и соответствует общей картине переработки сырья в пищевой промышленности, характеризующейся на 20-30% меньшим количеством вырабатываемой продукции из 1 т сырья, чем в развитых странах, но оно не может удовлетворять современное производство спирта.

Относительно низкая эффективность использования зернового сырья в традиционной технологии спирта предопределена особенностями "однопродуктовых" схем за счет неполного использования потенциальных возможностей главных компонентов зерна: углеводов и белка. Отсюда решение проблемы экономии материальных ресурсов должно осуществляться путем внедрения ресурсосберегающих технологий, предусматривающих комплексную переработку зерна с получением нескольких ценных конечных продуктов. Учитывая, например, что в структуре питания населения существует большой дефицит пищевого белка (25-40%), то разработку новых технологий производства этилового спирта, предусматривающих более эффективное использование грубых, некрахмальных фракций полисахаридов с выделением белковых препаратов можно считать актуальной.

Белки являются основой построения клеток здорового человека. Количество этих веществ в организме достигает порядка 20% от общей массы тела. И основная часть, а это больше половины, приходится на мышечную ткань. Потребляемые человеком белковые продукты делятся на два вида: животного происхождения и растительного. Стоит помнить, что белки состоят из заменимых и незаменимых аминокислот. Заменимые могут синтезироваться в организме, а незаменимые поступают только извне.

**Растительные белки**, в отличие от животных, не содержат холестерина и насыщенных жиров. Именно это свойство делает их более полезными.

Существует мнение, что растительный вид белков не является полноценным и не насыщает организм необходимыми веществами. Но это только миф, основанный на недостаточном количестве знаний в данной области.

*Растительные белки* в большей степени содержатся в бобах и семечках. Но в тоже время аминокислоты, главные строители этого вещества в организме, есть во всей пище, включающей в себя этот питательный элемент. Важно помнить, что если вы избегаете употребления мясной и молочной пищи, но при этом в вашем меню есть такие продукты, в составе которых есть белок, как мучные и макаронные изделия, рафинированные зерновые и рафинированные крупы, вы подвергаете свой организм тяжёлому испытанию. Ведь в них содержится мало жиров, аминокислот и витаминов, и они не отвечают требованиям здорового рациона питания. Для получения достаточного количества этих веществ и при этом обогащения организма необходимыми элементами, нужно добавить растительный вид белка, а также пищу, которая не подвергалась промышленной переработке.

Международные исследования неоднократно доказывают, что, отдавая предпочтение **продуктам с растительными белками**, люди в значительной степени меньше заболевают онкологией, чем те, которые выбирают животные белки.

Употребление в пищу значительного количества животных жиров и белка, и при этом ускоренный рост – не есть хорошо. Ведь слишком быстрое созревание означает приближение скорой старости. К тому же, неестественно-прогрессирующее физическое развитие в детстве способствует возникновению раковых опухолей и других болезней в более позднем возрасте.

Существует ряд исследований, подтверждающих вред введения в рацион значительного количества животных продуктов. В ходе одного из них стало известно, что употребление мужчинами мяса и молочной продукции прямо пропорционально появлению рака предстательной железы. В это же время у тех, кто отдает предпочтение продуктам с растительным белком, возможность развития этого заболевания существенно снижается.

Представим результаты другого исследования. Немецкие ученые выяснили, что риск появления раковой опухоли толстой и прямой кишки уменьшается в 2 раза у вегетарианцев (достигших совершеннолетия). Именно эта часть населения планеты, которая ведет вегетарианский образ жизни и употребляет растительную пищу на протяжении 20 лет, на 75% имеет меньшую смертность и частоту возникновения раковых заболеваний.

Этот вид белка качественно отличается от животных белков. Он не содержит холестерина и вредных жиров.

Если вы приняли решение перейти на вегетарианскую или веганскую диету, в которой намного меньше жира, чем в традиционной, следует знать, что растительный вид белков можно найти во многих свежих овощах и фруктах. Также их очень много в бобах, орехах и семечках. Питаясь данными продуктами, следует помнить, что такая диета должна быть сбалансированной. Замечательной альтернативой мясу могут быть пророщенные злаки, такие как пшеница и овёс. В процессе проращивания у зёрен происходят сложные преобразования крахмалов в целый список аминокислот, из которых наш организм впоследствии будет создавать полноценные белки для построения мышечной массы, кожи и скелета.

Отдавая предпочтение данному виду белка, вы также получаете клетчатку и другие фитохимические вещества. А это очень важно для сохранения здоровья.

Целью настоящей работы являлась разработка ресурсосберегающей технологии переработки зерна пшеницы с выработкой высококачественного

этилового спирта и белкового продукта за счет рационального использования сырьевых ресурсов.

Технология спирта включает в себя следующие процессы: подготовку сырья к развариванию, разваривание зерна для разрушения клеточной структуры и растворения крахмала; охлаждение разваренной массы и осахаривание крахмала ферментами культур плесневых грибов; сбраживание сахаров дрожжами в спирт; отгонку спирта из бражки и его ректификацию, а также культивирования плесневых грибов и бактерий для получения амилолитических и протеолитических ферментных препаратов, выведение и размножение засевных дрожжей.

Наиболее актуальными и перспективным направлением в совершенствовании технологии этанола становится эффективное использование всех высокомолекулярных полимеров зернового сырья. Поэтому наряду с ферментами амилолитического комплекса, применяемыми в спиртовом производстве, целесообразно использовать и протеолитические ферменты, катализирующие гидролиза белков, пептидов, фосфорные соединения и др.

Результаты исследований указывают на важную роль протеолитического комплекса в процессе спиртового брожения и дрожжегенерации. Воздействие протеаз на белковые вещества зернового суслу повышает эффективность его гидролиза, обогащает среду легкоусвояемыми аминокислотами и углеводами, что способствует конечном итоге повышению физиологической активности дрожжевых клеток, интенсификации процесса брожения и увеличению выхода целевого продукта.

Следует отметить, что для обеспечения нормальной жизнедеятельности дрожжей необходимо обеспечить оптимальный состав сбраживаемой среды, которая должна содержать достаточное количество сбраживаемых сахаров, ассимилируемых азотистых веществ, минеральных веществ.

Для повышения содержания аминного азота в сусле на стадии осахарования вносили нейтральную протеазу (ферментный препарат Нейтраза 1,5 МГ).оптимальные условия действия препарата: рН 5,8–6; температура 50...55<sup>0</sup>С. После внесения протеазы через 20–3 мин дрожжевое сусло подкисляли до рН 4,5 концентрированной серной кислотой, разбавленной 1:10, и выдерживали сусло при температуре 58...60<sup>0</sup>С в течение 2 ч. Опыты проводили при дозировке ферментного препарата 1; 3; 5 ед. ПС/г белка.

Согласно традиционной технологии при переработке пшеницы на спирт значительная часть белков подвергается ферментативному превращению. После брожения и ректификации бражки зерновой барде содержание белков значительно уменьшается, что снижает её кормовую ценность.

В пшенице содержится по меньшей мере 4 вида белковых веществ: альбумины – белки, растворимые в воде; глобулины – белки, растворимые в слабых (3-10%-ных) растворах нейтральных солей, проламины – белки, растворимые в 60-80%-ных растворах спирта; глютелины – белки, растворимые в слабых (0,2%-ных) растворах щелочей (табл.3.1).

Указанные белки в разной степени подвергались ферментативному гидролизу. Исследования, проведенные с различными протеолитическими ферментами показали, что при гидролизе белков пшеницы большое значение приобретает специфичность действия протеолитических ферментов.

Таблица 3.1.

Белковый состав некоторых зерновых культур

Культура	Состав, в масс. %			
	Альбумин	Глобулин	Проламин	Глютелин
Пшеница	4±0,2	8±0,35	40±0,18	48±2,2
Ячмень	12±0,48	30±0,98	35±1,2	23±0,76
Кукуруза <sup>1</sup>	0,5±0,02	20±0,9	40±1,7	30±1,4

В таблице 3.2. даны некоторые свойства кислых, нейтральных и щелочных протеиназ, используемых для гидролиза белков пшеницы. Из представленных данных видно, что среды испытуемых ферментов нейтральная протеиназа имеет более высокую активность к белкам пшеницы.

Таблица 3.2.

Некоторые свойства различных протеиназ микробного происхождения

Фермент	Удельная активность, ед/г	pH оптимум
Кислая протеиназа из <i>Aspergillus oryzae</i>	163±2,5	2,2-2,5
Нейтральная протеиназа из <i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	19200±80	6,7-7,0
Щелочная протеиназа из <i>Bacillus subtilis</i>	390±12	9,5-10

На рис.3.1а показана кинетика гидролиза различных белковых фракций пшеничной муки нейтральной протеиназой из *B. amyloliquefaciens*.

Из представленных данных видно, что с наиболее высокой скоростью гидролизуются щелочерастворимые белки, тогда как водорастворимые и спирторастворимые белки трудно гидролизуются нейтральной протеиназой. Начальная скорость гидролиза щелочерастворимых белков оказалось выше в 10-11 раз, по сравнению с альбумином, в 3-4 раза выше, чем спирторастворимых белков, в 2-2,5 раз больше чем солерастворимых белков. Реакции протекали в водной среде, хотя белки находились в нерастворимом состоянии. Ферментативный гидролиз щелочерастворимых белков нейтральной протеиназой протекал интенсивнее, чем с альбумином.

Такая же тенденция в гидролизе и закономерности можно наблюдать при гидролизе образцов пшеничной муки, селективно высвобожденных от различных сопутствующих белков (см. медотику).

На рис.3.1б представлена кинетика протеолитического гидролиза белков частично депротеинизированной пшеничной муки.

Р, мкмоль/мл

Р, мкмоль/мл

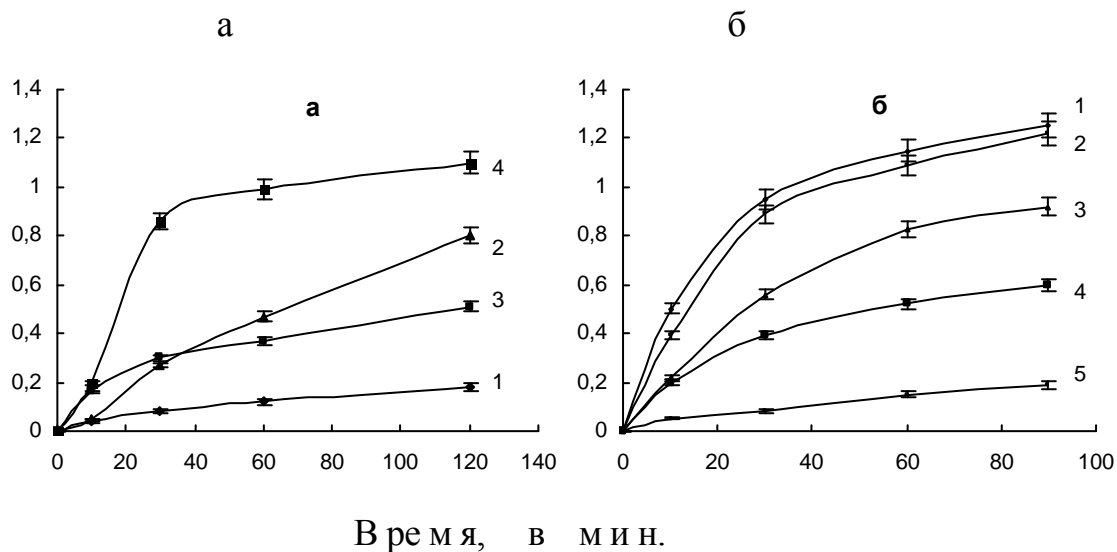


Рис.3.1. Кинетика гидролиза различных белков пшеничной муки нейтральной протеиназой из *B. amyloliquefaciens*.

а-гидролиз изолированных белков. 1-водорастворимые белки, 2-спирторастворимые белки, 3-солерастворимые белки, 4-щелочерастворимые белки. б-гидролиз белков частично депротеинизированной пшеничной муки. 1- обезжиренная пшеничная мука, 2-пшеничная мука освобожденная водорастворимых белков. 3-освобожденная дополнительно от солерастворимых белков, 4- освобожденная дополнительно от спирторастворимых белков. 5- промытые нерастворимые частицы разваренной пшеничной муки.

Из рисунка видно, что в водных средах нейтральная протеиназа способна гидролизовать водорастворимые и водонерастворимые белки. Обезжиренная пшеничная мука с высокой скоростью гидролизует нейтральной протеиназой. При последовательном удалении альбумина, глобулина и проламина из состава пшеничной муки образование продуктов гидролиза уменьшается. Сравнение продуктов гидролиза до и после удаления соответствующих белков, показывает долю продуктов гидролиза на соответствующий белок. При этом на долю альбумина и глобулина приходится меньшее количество продуктов гидролиза. Во всех случаях в начальных стадиях ферментации основная концентрация продуктов гидролиза приходится на долю щелочерастворимых белков.

В таблице 3.3 приведены данные о доле продуктов гидролиза белков, приходящие на каждую испытанную фракцию белка на начальном этапе ферментации пшеничной муки.

Таблица 4.3.

Концентрация продуктов ферментативного гидролиза белков приходящие на различные белки

Белки	Единица измерения	Время ферментации, в мин.	
		30	120
Водорастворимые белки	мкмоль/мл	0,06±0,003	0,06±0,003
Солерастворимые белки	мкмоль/мл	0,33±0,014	0,32±0,013
Спирторастворимые белки	мкмоль/мл	0,17±0,007	0,52±0,01
Щелочерастворимые белки	мкмоль/мл	0,39±0,015	0,6±0,03

С другой стороны было установлено, что тепловая обработка отрицательно влияет на расщепление щелочерастворимых, солерастворимых и спирторастворимых белков.

Как показали наши эксперименты, при термической обработки сырья за счет протекания процесса денатурации сопутствующих белковых веществ и меланоидинообразования получается ещё более гетерогенная сложная субстратная смесь.

Таким образом, использования протеолитических ферментов при разваривания сырья значительная часть белковых веществ подвергается гидролизу и образуется аминокислоты и пептиды. Кроме того при высоких температурах из-за меланоидинообразования значительная часть аминокислот потеряются. Поэтому для получения вторичных отходов с высоким содержанием нативных белков необходимо провести процесс разваривания без участия протеолитических ферментов. При этом процесс разваривания провести только с участием амилолитических ферментов. После завершения процесса разваривания смесь надо фильтровать для

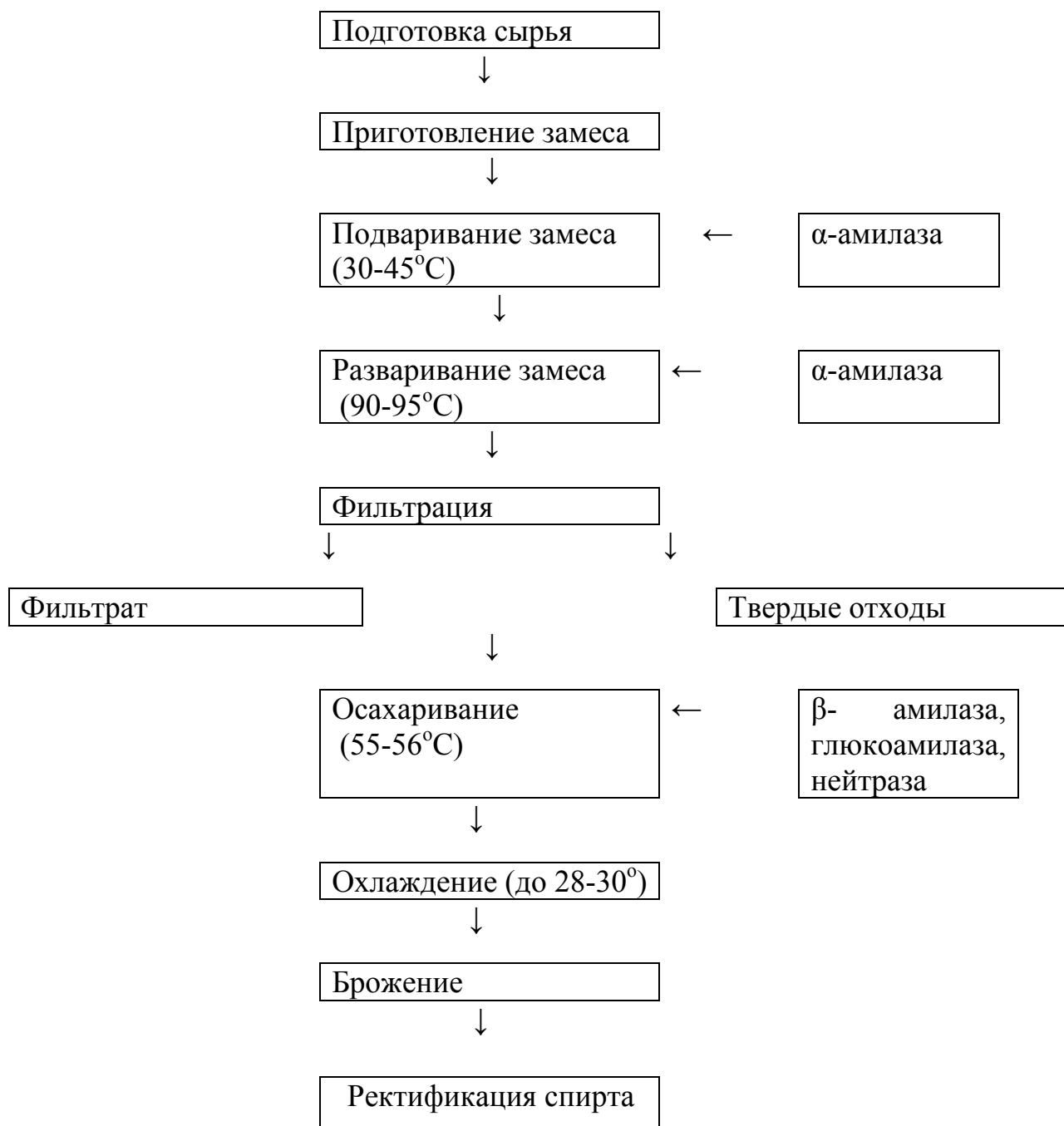
отделения твердых частиц замеса. Эта дает получению вторичных отходов (барды) с высоким содержанием белковых веществ.

Для сохранения кормовую ценность барды нами предлагается новая технология переработки пшеницы на спирт.

На основании полученных результатов предлагается следующая принципиальная технология переработки пшеницы на спирт.

### Принципиальная технологическая схема переработки

#### пшеницы на спирт



Согласно технологией процесс разваривания сырья проводится только с применением альфа амилазы. При этом происходит гидролиз крахмала, а водонерастворимые белки остаются не измененном состоянии. Затем смесь путем центрифугирования отделяется от твердых частиц. В состав сусла переходит только водорастворимые белки, гидролизованный крахмал и экстрактивные органические вещества пшеницы. Весь клейковина остается в составе твердых частиц. После дополнительной промывки твердая частица передается на процесс сушки.

Фильтрованное сусло с высоким содержанием углеводов и водорастворимых белков подвергается осахариванию с использованием бета-амилазы и нейтральной протеиназой. Нейтральная протеиназа необходимо для гидролиза водорастворимых белков. Процесс осуществляется согласно общепринятой схемой. Содержание продуктов гидролиза водорастворимых белков недостаточно для нормального функционирования и размножения дрожжей. Для дополнительного обогащения сусла аминным азотом задается расчетное количество белковых гидролизатов полученных из шрота хлопчатника.

Проведенные исследования показали, что после брожения существенное увеличения выхода спирта не наблюдается при пересчете на условный крахмал. Но при этом содержание белковых веществ в составе твердых частиц составляет 48-52% , а в контроле 26-28%.

В таблице приведена сравнительная характеристика полученных зерновых отходов.

Таблица 3.4.

Химический состав зерновой отходов известными и предлагаемыми способами переработки пшеницы.

Показатели, характеризующие барду	Известный способ	Предлагаемый способ
Содержание протеина	26-28	52
Содержание безазотистых экстрактивных веществ	40-50	20-25
Содержание клетчатки	12,8-13,4	8-9
Содержание жира	6-7,5	5-6
Содержание золы	7,6-8,7	6-7

Таким образом, целенаправленное использования гидролитических ферментов при переработке пшеницы на спирт, способствуют рациональное использования сырья с сохранением пищевой и кормовой ценности вторичных отходов производства.

Переработка зерна пшеницы по новой двухпродуктовой схеме с выработкой белкового продукта пищевого назначения осуществляется без снижения выхода этанола из 1 т сырья, по сравнению с однопродуктовой технологией.

### **Выводы по главе 3.**

Технология спирта включает в себя следующие процессы: подготовку сырья к развариванию, разваривание зерна для разрушения клеточной структуры и растворения крахмала; охлаждение разваренной массы и осахаривание крахмала ферментами культур плесневых грибов; сбраживание сахаров дрожжами в спирт; отгонку спирта из бражки и его ректификацию, а также культивирования плесневых грибов и бактерий для получения амилолитических и протеолитических ферментных препаратов, выведение и размножение засевных дрожжей.

Наиболее актуальными и перспективным направлением в совершенствовании технологии этанола становится эффективное использование всех высокомолекулярных полимеров зернового сырья. Поэтому наряду с ферментами амилолитического комплекса, применяемыми в спиртовом производстве, целесообразно использовать и протеолитические ферменты, катализирующие гидролиза белков, пептидов, фосфорные соединения и др.

Результаты исследований указывают на важную роль протеолитического комплекса в процессе подготовки сырья, разваривания, осахаривания и спиртового брожения.

Согласно предложенной технологии технологией процесс разваривания сырья проводится только с применением альфа амилазы. При этом происходит гидролиз крахмала, а водонерастворимые белки остаются не измененном состоянии. Затем смесь путем центрифугирования отделяется от твердых частиц. В состав сусла переходит только водорастворимые белки, гидролизованный крахмал и экстрактивные органические вещества пшеницы. Весь клейковина остается в составе твердых частиц. После дополнительной промывки твердая частица передается на процесс сушки.

Фильтрованное сусло с высоким содержанием углеводов и водорастворимых белков подвергается осахариванию с использованием бета-амилазы и нейтральной протеиназой. Нейтральная протеиназа необходимо для гидролиза водорастворимых белков. Процесс осуществляется согласно общепринятой схемой. Содержание продуктов гидролиза водорастворимых белков недостаточно для нормального функционирования и размножения дрожжей.

## ВЫВОДЫ

1. Изучен ферментативный гидролиз водорастворимых, солерастворимых и щелочерастворимых белков, выделенных из пшеничной муки. Сравнительная скорость гидролиза щелочерастворимых белков выше в 10-11 раз, чем альбумин, в 3-4 раза, чем спирторастворимых белков и в 2-2,5 раза по сравнению с солерастворимыми белками.
2. На основании полученных результатов разработана усовершенствованная технология разваривания крахмалсодержащего сырья. Для сохранения нативности белковых веществ рекомендуется не использовать протеолитические ферменты. Разваривания осуществляется только с использованием амилолитических ферментов.
3. После разваривания предлагается отделения жидкой фазы от твердых частиц путем вакуум фильтрования. Твердая фаза после промывки подается на сушильные установки. Жидкая фаза с содержанием углеводов и растворимых белков направляется на осахаривания.
4. Переработка зерна пшеницы по новой двухпродуктовой схеме с выработкой белкового продукта пищевого назначения осуществляется без снижения выхода этанола из 1 т сырья, по сравнению с однопродуктовой технологией.

## Библиография

1. Каримов И.А. Буюк ва мукадассан мустакил Ватан //Тошкент: Узбекистон, 2011, 200 с.
2. Каримов И.А. Мировой финансово-экономический кризис, пути и меры по его преодолению в условиях Узбекистана//Ташкент: «Экономика», 2009, 113 с.
3. Шилер Г.Г., Бузов И.П., Уманский М.С. Протеиназы в сыроделии. В сб.химия протеолитических ферментов., Углич.,-1979, с.41-47. Теплы М., Машек Я., Гавлова Я. Молокосвертывающие ферменты животного и микробного происхождения. (Пер. с чешск., под ред. Т.В.Долгих.), М.: Легкая и пищевая промышленность, 1980.- 272 с.6,7
4. Кретович В.Л. Ферментные препараты в пищевой промышленности. М.: Пищевая пром-сть, 1975, 535 с.
5. Lalla J.K., Nacema A.D. Preparations of protein hydrolysis I. Optimisation of conditions. //Indian Drugs. -1990, -v.27, -№7, p.378-385.
6. Sim Y.Ch, Lee S.G., Lee D.Ch., Kang B.Y. and other. Stabilization of papain and lysorime for application to cosmetic products // Biotechnology Letters. - 2000, № 22, № 2, p. 137-140.17
7. Лхотский А.Х. Ферменты в пивоварении. -М.: Пищевая промышленность.- 1975, с. 318.
8. Датунашвили Е.Н., Павленко Н.М., Ганка Б.С. Опыт использования гетерогенного ферментативного катализа в виноделии и соковой производстве. // Виноделие и виноградарство СССР, - 1975, -№6, -с. 54-56.
9. Ратушный А.С. Применения ферментов для обработки мяса. -М., Пищевая промышленность, - 1976, - 87 с.
10. Рахимов М.М., Хасанов Х.Т. Исследование процессов денатурации карбоксильных протеиназ в различных условиях. // Прикл.биохим. и микробиол.- 1995.- т-21.- №3.- с.354-359.

11. Albeck A., Kliper S., Inactivation of cysteine proteases by peptidal epoxides. Characterization of the alkylation sites on the enzyme and the inactivation //Biochemical J.-2000,-v.346,-№1, -p.71-76.
12. Vincezini M.T., Favilli F., Treves C. Vanni P., Specific interaction among some enzymes and sodium and dodecyl sulfate. // Life Sci.- 1982.- V. 31.- № 5.- p. 463-470.
13. Бушин М.А., Востриков С.В., Яковлев А.Н. Изменения углеводного состава и вязкости зернового замеса в процессе водно-тепловой обработки // Производство спирта и ликероводочных изделий,2006, №3, С.22.
14. Сотников В.А., Марченко В.В., Гамаюрова В.С. Лимитирующий фактор низкотемпературного разваривания крахмалистого сырья // Производство спирта и ликероводочных изделий, 2005, №1, С.12-16.
15. Сотников В.А., Марченко В.В., Гамаюрова В.С. Использование полифосфатов технологии низкотемпературного разваривания крахмалистого сырья при производстве спирта // Вестник Казанского технологического университета. 2003, №2, С.180-187.
16. Кулаев И.С. Биохимия высокополимерных полифосфатов. –М.: Изд-во МГУ, 1975. -247с.
17. Матковская Т.А., Попова К.И., Юрьева Э.А. Биофосфаты. Свойства, строение и применение в медицине. –М.: Химия. 2001. -223 с.87- 89
18. Моисенко В.С., Дячкина А.Б. Универсальная схема водно-тепловой обработки зернового сырья //Производство спирта и ликероводочных изделий. 2003, №4, С.21-22.
19. Римарева Л.В., Войнарский И.Н., Устинников Б.А. и др. Влияние протеолитических ферментов на физиологическое состояние и размножение дрожжей //Ферментная и спиртовая промышленность. 1983, №2, С.36-39.
20. Римарева Л.В., Макеев Д.М., Устинников Б.А. Влияние

- протеолитических ферментов на выход спирта //Пищевая промышленность. 1993, №2, С.29-30.
21. Римарева Л.В. Перспективы использования протеолитических ферментных препаратов // Пищевая промышленность. 1996, №3, С.44-45.
  22. Кадиева А.Т. Разработка интенсивной технологии этанола на основе целенаправленного применение мультиэнзимных систем и новых рас спиртовых дрожжей: Автореферат дисс...канд.техн.наук. –М., 2003.
  23. Римарева Л.В., Оверченко М.Б. Использование протеолитического ферментного препарата из *Aspergillus oryzae* в спиртовом брожении // Производство спирта и ликероводочных изделий. 2005, №4, с.12-14.
  24. Воробьева Г.И., Максимова Г.Н., Глухих С.А. Технология интенсификации производства спирта с применением композиционных биостимуляторов //Производства спирта и ликероводочных изделий. 2004, №2, С.16-18.
  25. Бирагова Н.Ф. Перспективные способы обработки зерна при производства спирта //Производства спирта и ликероводочных изделий, 2003, №1, С.17.
  26. Гусева Т.И., Калинина О.А., Колдин Э.Н. Микробиологические аспекты получения качественного зернового сула при производстве спирта //Производства спирта и ликероводочных исследований, 2004, №2, С.12-15.
  27. Анюшина А.Н., Егоро И.М., Егоров С.А., Кушаков И.С. и др. Технология низкотемпературного разваривания крахмалистого сырья в производстве спирта //Производство спирта и ликероводочных изделий, 2002, №4, С.37.
  28. Востриков С.В., Яковлев А.Н., Бушин М.А. Влияние сбалансированного состава зернового сула на процесс биосинтеза дрожжевой биомассы //Производства спирта и ликероводочных

- изделий, 2006, №2, С.32-33.
- 29 Технологическая инструкция по использованию в спиртовом производстве ферментных препаратов фирмы «ЭНДЭ ИНДУСТРИАЛ КОРПОРЕЙШН», ТИ 10-16125-01, Москва, 2001 г. 17 с.,
- 30 Хассельбек Г., Плохов А.Ю., Сахаров Ю.В. Применение ферментных препаратов фирмы «Эрбсле Гайзенхайм» в спиртовой промышленности//Производства спирта и лежководочных изделий, 2002, №3, С.22-23.
- 31 Чечнев Р.В., Андриенко Т.В. Новозаймс – подводя итоги //Производства спирта и лежководочных изделий, 2006, №2, С.29-30.104-106
- 32 Технологическая инструкция по использованию в спиртовом производстве ферментных препаратов фирмы «ЭНДЭ ИНДУСТРИАЛ КОРПОРЕЙШН», ТИ 10-16125-01, Москва, 2001 г. 17 с.104
- 33 Plant A.R., Semens R.V., Daiel R.M. Morgan H.W. Purification and preliminary characterization of an extracellular pullulanase from Thermoanaerobium//Appl.Microbiol/ And Biotechnol. 1987.v.26.,№5, P.427- 433.
- 34 Римарева Л.В., Оверченко М.Б., Игнатова Н.И., Кадиева А.Т., Шелехова Т.М. Технологические аспекты получения высококачественного спирта // Производство спирта и лежководочных изделий. 2002, №3, С. 16-19.
- 35 Рахимов М.М. Перспективы применения ферментов в пищевой промышленности Узбекистана.-Ташкент, Уз НИИНТИ,-1983, 41 с.
- 36 ГромовС.И. Рациональные схемы и технология механо-ферментативной обработки зернового сырья (производство спирта). //Лежководоч. пр-во и виноделие, 2005, №12, с.12-13.
- 37 РимареваЛ.В., Оверченко М.Б., Игнатова Н.И., Кадиева А.Т. Мультиэнзимные сисчемы в приозводства спирта//Приозводства

спирта и ликероводочных изделий, 2004, №3, С.22-24.

- 38 Зарубин Е.П., Данильчук Т.Н., Егоров В.В. Влияние переменного микроэлектротока на солодоращение ячменя. //Пиво и напитки. 2002. №2. С.24-25.
- 39 Шустер К., Вайнфуртнер Ф., Нарцисс Л. Технология солода. –М.: Пищевая промышленность, 1980.112-114.
- 40 Римарева Л.В. Микробные ферментные препараты в спиртовом производстве// Производства спирта и ликероводочных изделий, 2002, №4, С.27-31.
- 41 Ермакова А.Н. Методы биохимических исследований растений. Ленинград, 1972 г. С.47-48.

42	Препараты ферментные. Метод определения протеолитических активности. М., 1985, ГОСТ 20264.2-85.
43	Препараты ферментные. Метод определения амилалитической способности. М., 1985, ГОСТ 20262.2-85.

## ПРИЛОЖЕНИЯ