

Біокаталіз некрохмальних полісахаридів після спиртової барди при виробництві біоетанолу із крохмалевмісної сировини

Т.І. Лисак, науковий співробітник, аспірант

С.Т. Олійнічук, професор, доктор технічних наук, старший науковий співробітник

Ю.О. Батог, науковий співробітник, аспірант

О.О. Коваль, провідний інженер, аспірант, Лабораторія біоресурсів та переробки рослинної сировини Інститут продовольчих ресурсів НААН України

Показана можливість використання фільтрату барди у вигляді повного замітника технологічної води у технології спирту. Досліджено вплив підлуження барди та внесення целюлолітичного ферментного препарату на якісні показники зрілої бражки. Запропонована схема обробки барди, що забезпечить повну її утилізацію та дозволить збільшити вихід спирту на 2,1 дал/т сировини.

Ключові слова: післяспиртова барда, гідроліз, некрохмальні полісахариди, бродіння.

Показана возможность использования фильтрата барды в качестве полного заменителя технологической воды в технологии спирта. Исследовано влияние ошелачивания барды и внесения целюлолитического ферментного препарата на качественные показатели зрелой бражки. Предложена схема обработки барды, которая обеспечит ее полную утилизацию и позволит увеличить выход спирта на 2,1 дал/т сырья.

Ключевые слова: послеспиртовая барда, гидролиз, некрахмальные полисахариды, брожение.

The opportunity of using the distiller grains filtrate as 100% substitute for technological water in alcohol production is shown. The influence of distiller grains alkalinization and cellulolytic enzymes addition on fermented wort quality is investigated. The distiller grain treating scheme, which will provide full distiller grains utilization and 21 l/t of feedstock ethanol yield increase, is suggested.

Key words: distiller grains, hydrolysis, non-starch polysaccharides, fermentation

Постановка проблеми: при використанні у спиртовому виробництві зернової сировини за діючими технологіями не використовуються не крохмальні полісахариди, зокрема целюлоза та геміцелюлози, гідроліз яких може бути суттєвим резервом підвищення виходу спирту. Для підвищення ступеня біоконверсії всіх складових частин зерна потрібно створювати мультиензимні композиції препаратів цільового призначення.

Складність рішення полягає в тому, що ферментні препарати амілолітичного комплексу, протеолітичної та целюлолітичної дії мають різні оптимуми температури і активної кислотності, тому їх вносять окремо на різних стадіях технологічного процесу. Технологічні параметри гідролізу крохмалю є неприйнятними для дії целюлітичних ферментів за температурою, рН і тривалістю фермент-субстратної дії [5]. Тому глибина деполімеризації полісахаридів некрохмальної природи в умовах діючої технології є невелика, оскільки за наявності у реакційній суміші глюкози і мальтози утворюються непродуктивні фермент-субстратні комплекси, ефективність гідролізу зменшується, як за рахунок конкурентного, так і прямого інгібування целюлазної активності. Крім того, темпера-

турні режими і величина активної кислотності реакційного середовища в процесі гідролізу крохмалю не співпадають з оптимальними їх значеннями для активності целюлаз.

Найбільш вигідним може бути процес, в якому розділяються проміжні продукти гідролізу з подальшим їх оцукрюванням строго специфічними ферментними системами. Але такий процес не технологічний, його майже неможливо реалізувати у виробничих умовах. Найбільш технологічним є двостадійний процес, в якому гідроліз і оцукрення крохмалю здійснюється за діючою технологією, а негідролізовану фракцію целюлозного субстрату після перегонки спирту направляють на оцукрювання целюлолітичними ферментами.

Метою досліджень було дослідити вплив різних параметрів обробки післяспиртової барди на якість зброджування сусла та розробити ефективний технологічний прийом утилізації барди, спрямований на максимальне використання не крохмальних складових зернової сировини.

Об'єкти та методи досліджень. Об'єктами досліджень були ферментні препарати амілолітичної дії «АМІЛЕКС 4Т» та «ДІАЗИМ ССФ» та протеолітичної дії «АЛЬФАЛАЗА АФП» фірми

Таблиця 1

Вплив підлуженого фільтрату барди на показники бражки

Показник	Контроль (вода)	Кількість фільтрату барди, %		
		50	75	100
pH зрілої бражки	4,33	4,70	4,94	5,30
Σ CO ₂ , г	26,13	26,44	26,75	26,73
Вміст спирту, % об.	13,40	13,70	13,80	13,85
Загальний вміст незброджених цукрів, г/100 см ³	0,75	0,74	0,81	0,95
Загальний вміст незброджених цукрів за мінусом внесених з фільтратом барди, г/100 см ³	-	0,37	0,25	0,20
Вміст водорозчинних цукрів, г/100 см ³	0,54	0,70	0,75	0,94
Вміст водорозчинних цукрів за мінусом внесених з фільтратом барди, г/100 см ³	-	0,35	0,21	0,22
Вміст нерозчиненого крохмалю, г/100 см ³	0,19	0,04	0,06	0,01
Вміст спирторозчинних цукрів, г/100 см ³	0,48	0,52	0,24	0,52
Вміст декстринів, г/100 см ³	0,06	0,18	0,51	0,42
Істинні СР,%	3,5	5,0	6,0	7,0

«ДАНІСКО»; целюлолітичний ФП «Cellic STec 2» фірми «Novozymes»; технологія термоферментативної обробки та збродження суслу із крохмалевмісної сировини.

В роботі використовувались загальноприйняті в спиртовій промисловості методи досліджень [1]. Вміст крохмалю в сировині визначали хімічним методом за методом Еверса, вміст вологи – вологоміром РМ 600 (Японія), ступінь подрібнення – шляхом просіювання помелу зерна через сито з діаметром отворів 1 мм. Технологічний режим отримання спиртової бражки здійснювали методом біологічної проби. Для приготування середовища для культивування дріжджів і бродіння використовували кукурудзу, зерно якої подрібнювали на лабораторному млині до розміру частинок менше 1 мм; помел змішували з водою до однорідної маси. В приготовану масу вносили термостабільну α-амілазу з розрахунку 1-2 одиниці активності на 1 г крохмалю, нагрівали до температури 85-90 °С і здійснювали розчинення крохмалю впродовж 3 годин. Декстринізовану масу охолоджували до температури 55-57 °С, додавали глюкоамілазу (6 одиниць активності на 1 г крохмалю) і оцукрювали впродовж 1 години. Оцукрене сусло засівали чистою культурою дріжджів і зброджували за температури 30-32 °С. Кількість виділеного двоокису вуглецю визначали ваговим методом, загальну кислотність – титруванням, величину рН – потенціометрично [2]. Вміст незброджених вуглеводів та нерозчиненого крохмалю у напівпродуктах та дозрілій бражці визначали фотоколориметричним методом з антроновим реактивом, вміст етилового спирту – скляним спиртоміром [2], вміст сухих речовин – ареометрично [3]. Статистичну обробку результатів 3 серій дослідів проводили шляхом розрахунку середніх арифметичних величин із 5 вимірювань, їх середньоквадратичних відхилень і

похибок. Для визначення вірогідних відмінностей між середніми величинами використовували критерій Ст'юдента. Розбіжності вважали статистично вірогідними за $p < 0,05$ [4].

Результати досліджень та їх обговорення. Проведені нами досліди дали змогу розробити спосіб гідролізу некрохмальних полісахаридів зерна, який включає такі технологічні стадії: підлуження барди, охолодження, керування, ферментативний гідроліз і фільтрування.

Необхідність стадій підлуження і охолодження барди обумовлена створенням оптимальних параметрів для ферментів целюлолітичної дії. Дані, що характеризують показники бражки в залежності від кислотності фільтрату барди при його використанні на стадії приготування замісу замість води наведено в **табл. 1**.

З наведених даних видно, що підлуження фільтрату барди позитивно впливає на перебіг збродження сусла підвищеної концентрації. Вміст нерозчиненого крохмалю в бражці зменшується з 0,19 до 0,01 г/100 см³, що свідчить про оптимальні умови рН середовища для дії ферментів α-амілазного комплексу на стадії розчинення крохмалю. Вміст загального незбродженого цукру в бражці дещо зростає від 0,81 до 0,95 г/100 см³ при заміні води фільтратом на 75 і 100%, відповідно проти 0,75 г/100 см³ при приготуванні замісу на чистій воді. Але, враховуючи, що з фільтратом барди вноситься загального цукру 0,35 - 0,75 г/100 см³, то кількість незбродженого цукру на таку величину зменшується. Тобто внесений цукор з фільтратом барди повністю зброджується, що підтверджується збільшенням вмісту спирту з 13,4 до 13,85 %об., кількість якого корелює з вмістом незбродженого цукру.

Наступною стадією підготовки післяспиртової барди є ферментативний гідроліз некрохмальних

Вплив ферментолізу барди на показники бражки

Показники	Контроль	Дослід
рН зрілої бражки	4,4	4,9
Концентрація спирту, % об.	13,8	14,2
Загальний вміст незброджених цукрів, г/100 см ³	0,46	0,26
Вихід спирту, дал/ т сировини	40,7	41,6
Концентрація гліцерину, г/100 см ³	0,97	0,61
Концентрація домішок в дистилаті, мг / л.б.с.	375,6	380,8

Таблиця 3

Загальний вплив технологічних рішень з обробки барди на показники зрілої бражки

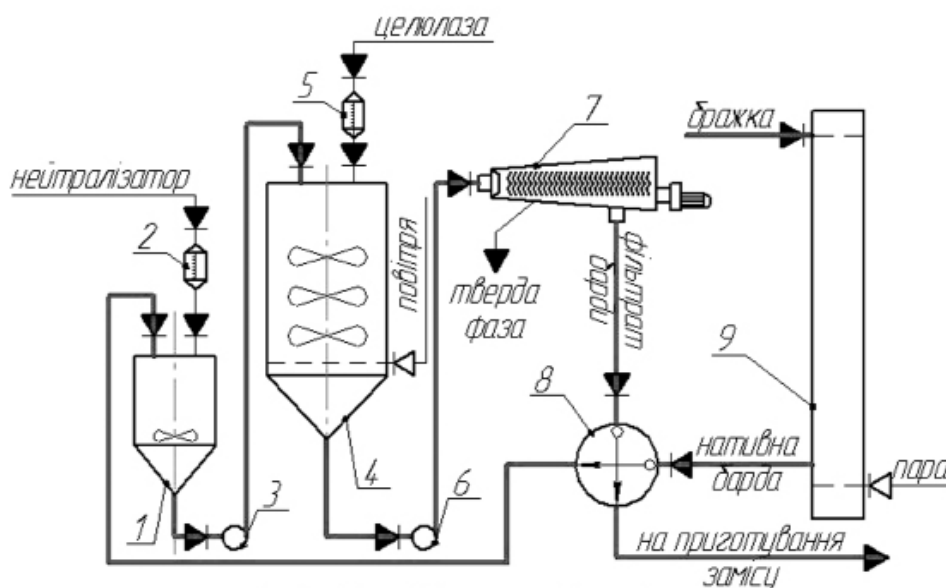
Показник	Заміс приготовлений			
	на воді	на непідлученому фільтраті барди	на підлученому фільтраті барди	на підлученому фільтраті барди з ферментолізом целюлозою
рН зрілої бражки	4,1	4,3	4,6	4,9
Вміст спирту, % об.	13,45	13,60	13,85	14,20
Загальний вміст незброджених цукрів, г/100 см ³	0,55	0,43	0,19	0,26
Вихід спирту, дал/ т сировини	39,5	40,0	40,7	41,6
Концентрація гліцерину, г/100 см ³	1,31	0,89	0,90	0,61
Концентрація домішок в дистилаті, мг / л.б.с.	375,9	370,1	385,8	380,8

полісахаридів зерна ферментами целюлолітичної дії. В цих дослідях отриману барду після збродження суслу підвищеної концентрації і відгонки спирту підлучували до рН 5,5, охолоджували до температури 45 °С, вносили целюлазу і витримували при перемішуванні впродовж трьох годин, фільтрували і отриманий фільтрат використовували замість води при приготуванні замісу. Показники зрілої бражки, отриманої при 100% – вий заміні води фільтратом барди після ферментолізу на-

ведено в табл. 2.

Обробка післяспиртової барди целюлозою забезпечує збільшення концентрації спирту в бражці на 0,4 %об., що відповідає 0,6 г/100 см³ цукру. Таким чином завод потужністю 3000 дал спирту в добу, який утворює 230 м³ барди, додатково може отримати 1380 кг цукру або 1339 кг крохмалю. За нормативного виходу спирту 66,6 дал з однієї тонни крохмалю, буде отримано 89-90 дал спирту.

Узагальнений вплив досліджених технологіч-



1-змішувач, 2-дозатор нейтралізатору, 3,6-насос, 4-апарат для гідролізу і аерації, 5- дозатор ферменту целюлолітичної дії, 7-декантатор, 8-рекуперативний теплообмінник, 9-бражна колона

Рис. 1. Схема обробки післяспиртової барди

БІОЕТАНОЛ

них рішень на показники дозрілої бражки наведено в **табл. 3**.

З наведених даних видно, що для біоконверсії крохмалю, білкових речовин і не крохмальних полісахаридів в спирт необхідно створювати мультиензимні композиції ферментних препаратів цільового призначення. Застосування комплексних ферментних препаратів, вибір технологічної стадії та створення оптимальних параметрів для їх дії дає змогу більш повно використати складові зернівки сировини і суттєво підвищити ефективність її переробки в спирт.

В результаті виконаних досліджень вибрано асортимент та співвідношення ферментів при переробці кукурудзи та розроблено технологічний режим їх використання. Зокрема, на одну тонну кукурудзи витрачається: 0,75–0,80 дм³ α-амілази для низькотемпературного розчинення і декстринізації крохмалю, 1,1–1,3 дм³ глюкоамілази для оцукрення крохмалю, 0,03–0,04 дм³ протеази для гідролізу білкових речовин і збагачення суслу амінокислотами, 0,015–0,020 дм³ целюлази для гідролізу не крохмальних полісахаридів. Таке співвідношення ферментів підвищує ефективність переробки кукурудзи в біоетанол і збільшує вихід спирту на 2,1 дал з тонни сировини в порівнянні з діючою технологією.

При цьому протеоліз білкових речовин здійснюється безпосередньо в бродильному апараті, де температура процесу і рН середовища сприятливі для протеолітичних ферментів, зокрема кислоти протеази. Натомість ці параметри є неприйнятними для дії целюлолітичних ферментів, що призводить до втрат полісахаридів з бардою. Більш вигідним є процес ферментолізу не крохмальних полісахаридів зерна шляхом обробки післяспиртової барди за схемою, наведеною на **рисунку 1**.

Нативна барда після бражної колони подається в спіральний теплообмінник 8, де частково охолоджується підготовленим фільтратом барди, що надходить з декантер 7. Після теплообмінника барда подається в збірник-змішувач 1, в який одночасно дозатором 2 подається луг і підтримується рН 5,0–7,0. Суміш ретельно перемішується і насосом 3 подається в апарат 4, в який одночасно дозатором 5 подається целюлаза для гідролізу некрохмальних полісахаридів зерна, і впродовж шести годин здійснюється аерація з витратами повітря в кількості 4м³/м³ год. Після гідролізу некрохмальних полісахаридів барда насосом 5 подається в декантер, де виділяється тверда фаза барди, а отриманий фільтрат підігрівається теплом нативної барди і повністю використовується на приготування замісу.

Таким чином, запропоноване технічне рішення створює ресурсозберігаюче виробництво спиртової бражки з крохмалевмісної сировини шляхом заміни технологічної води фільтратом барди при забезпеченні нормативних показників бражки, збільшує вихід спирту і вирішує початкову проблему біоетанольного і спиртового виробництва – утилізацію фільтрату барди.

Висновки

1. Експериментально обґрунтовано застосування ферментних систем для гідролізу високомолекулярних полімерів зерна кукурудзи.

2. Доведено, що найбільш ефективним способом деполімеризації полісахаридів зернівки є двостадійний процес, в якому гідроліз і оцукрення крохмалю здійснюється за діючою технологією, а негідролізовану фракцію целюлозного субстрату після перегонки спирту направляють на оцукрювання целюлолітичними ферментами.

3. Розроблено безвідходний і екологічний процес гідролізу некрохмальних полісахаридів зерна, що забезпечує збільшення виходу спирту на 2,1 дал з тонни сировини і вирішує важливу для виробництва проблему – утилізацію фільтрату барди.

Список використаної літератури

1. *Технологічний регламент виробництва етилового спирту з крохмалевмісної сировини, ТРУ 18.8049-2000, Україна, Київ, 2000.*
2. *Рухлядєва А.П.* Технохимический контроль спиртового производства. – М.: Пищевая промышленность, 1974. – 208с.
3. *Плевако Е.А., Бакушинская О.А.* Микробиология и химико-технологический контроль дрожжевого производства. – М.: Пищевая промышленность, 1994. – 269 с.
4. *Gubler E.V., Genkin A.A.* Nonparametric yardstick of statistics using in biomedical research. L.: Medicina. 1973, 144 p.
5. *Nascimento R.P., Junior N.A.*, Brewer's spent grain and corn steep liquor as substrates for cellulolytic enzymes production by *Streptomyces malaysiensis* // Letters in Applied Microbiology. - №48. – 2009, p.529-535.
6. *Dexi Bi, DQ Chu.* Utilization of dry distiller's grain and solubles as nutrient supplement in the simultaneous saccharification and ethanol fermentation at high solids loading of corn stover // Biotecnology letters. - №10 (2010)