

Леонід Вікторович Левандовський,
д-р техн. наук
Олексій Сергійович Олійнічук,
аспірант
Алла Феодосіївна Ткаченко

БІОЛОГІЧНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ОДНОЧАСНОГО ОЦУКРЮВАННЯ ТА ЗБРОДЖУВАННЯ КРОХМАЛЮ ЗМІШАНОЮ КУЛЬТУРОЮ SACCHAROMYCES CEREVISIAE TA ASPERGILLUS AWAMORI

Досліджено можливість безпосереднього зброд- жування сировини змішаною культурою пліснявого гриба Aspergillus awamori та Saccharomyces cerevisiae. Встановлено, що для ефективного оцукрювання крохмалю культурою гриба для приготування змішаної культури у виробничих умовах необхідно отримувати посівний матеріал гриба через вегетативну форму з мицелію шляхом вирощування на середовищі концентрацією 17-18% сухих речовин протягом 24 годин.

Ключові слова: дріжджі, пліснявий гриб, змішана культура, культивування, оцукрювання, зброджування, дозріла бражка, спирт.

Исследована возможность непосредственного сбраживания сырья смешанной культурой плесневого гриба Aspergillus awamori и дрожжей Saccharomyces cerevisiae. Установлено, что для приготовления смешанной культуры в производственных условиях необходимо получить посевной материал гриба через вегетативную форму из мицелия путем выращивания на среде концентрацией 17-18% сухих веществ в течение 24 часов.

Ключевые слова: дрожжи, плесневый гриб, смешанная культура, культивирование, осахаривание, сбраживание, зрелая бражка, спирт.

Investigated the possibility of starch-containing material fermentation with mixed culture of mold Asp. awamori and yeasts Saccharomyces cerevisiae. Determined that for efficient saccarification of starch with mold culture for preparation mixed culture in industrial conditions it is necessary to obtain mold seed material through vegetative form out of mycelium by the way of cultivation in the medium at, concentration 17-18% DS (Dry Substance) with duration of 24 hours.

Key words: yeasts, mold, mixed culture, cultivation, saccarification, fermentation, fermented mash, alcohol.

Біохімічний процес виробництва спирту ґрунтується на використанні одного типу мікроорганізмів дріжджів, які здійснюють зброджують прості цукри в етиловий спирт, є достатньо вивченим [1, 2]. Але питання використання змішаних популяцій для біоконверсії крохмалю в етанол майже не розглядається. Традиційно гідроліз крохмалю до зброджуваних цукрів здійснюють за допомогою ферментів амілолітичної дії мікробного походження.

Застосування таких ферментних препаратів на підприємствах України дало можливість обробляти крохмалевмісну сировину перед бродінням без застосування надлишкового тиску [3], що дає значну економію паливних ресурсів, але збільшує витрати оцукрюючи матеріалів на стадії розрідження та оцукрювання крохмалю. Тому дослідники ведуть пошук нових способів зменшення цих витрат, наприклад, запровадженням одноступеневої ферментації крохмалю без високотемпературного оброблення з

використанням амілолітичних властивостей мікроорганізмів [4].

Метою нашої роботи було розроблення способу безпосереднього зброджування крохмалевмісної сировини шляхом сумісного культивування Aspergillus awamori (як продуцент ферментів) і Sacch. cerevisiae із забезпеченням нормативних показників процесу і дозрілої бражки. Експерименти проводили в лабораторних умовах за такою схемою: подрібнення зерна з одержанням помелу, 90-100 % якого проходить крізь сито з діаметром отворів 1 мм; гідролітичне розрідження крохмалю власними ферментами зерна, оцукрювання крохмалю та анаеробне зброджування цукрів асоціацією мікроорганізмів з одержанням дозрілої бражки, перегонку її та отримання спиртового дистилату.

Як джерело оцукрюючих ферментів використовували культуральну рідину мікроскопічного гриба Asp. awamori штаму № 9, депонованого в колекції промислових мікроорганізмів ІМВ Г-100017. У якості продуцента етилового спирту застосовували термотолерантний штам дріжджів Sacch. cerevisiae раси XII Т.

Культивування гриба здійснювали в колбах на качалці (220 об/хв) за температури 30 С, рН 6,0-7,0 упродовж 24 годин на оцукреному суслі з пшениці, збагаченому азотом, фосфором та кукурудзяним екстрактом. Дріжджі вирощували за режимом технологічного регламенту виробництва бражки із крохмалевмісної сировини [3]. Процес одночасного оцукрювання та зброджування крохмалю здійснювали змішаною культурою спиртових дріжджів та пліснявого гриба за температури 35 °С.

Об'єктами досліджень були: культуральна рідина, виробничі дріжджі, дозріла бражка. Як сировину використовували зернові культури — жито, пшеницю, кукурудзу.

У дослідженнях використовували загальноприйняті методи техно-хімічного контролю в спиртовій галузі: активність а-амілази визначали колориметричним методом за ГОСТ ІСС 108-68, активність глюкоамілази поляриметричним методом за ГОСТ 202 64.4-71, кількість виділеного при бродінні діоксиду вуглецю визначали ваговим методом, загальну кислотність — титруванням, вміст незброджених вуглеводів та нерозчиненого крохмалю — фотоколориметричним методом з антроновим реактивом, вміст спирту — скляним спиртоміром. Сусло зброджували за методом "бродильної проби".

Культивування мікроорганізмів-продуцентів ферментів складається зі стадій отримання посівного матеріалу та виробничої культури. Однією з основних вимог до посівного матеріалу є забезпечення максимально активного синтезу ферментів при мінімальній величині засіву. В практиці виробництва ферментів в якості посівного використовують вегетативний матеріал, отриманий на рідких живильних середовищах глибинним способом, а також конідаційний, що вирощено на твердих живильних середовищах. З урахуванням особливостей спиртового

виробництва та з метою спрощення підготовки виробничої культури *Asp. awamori* для одночасного оцукрювання та зброджування крохмалю в спирт проведено дослідження впливу способу підготовки його посівного матеріалу продуцента на біосинтез ферментів (табл. 1).

аблиця 1

Характеристика фізіологічної активності посівного матеріалу		
Показники	Посівний матеріал гриба	
	з конідій	з міцелію
pH середовища	3,6	3,4
Видимі сухі речовини, %	8,0	7,6
Глюкоамілізна активність, од/см ³	6,12	18,38
а-амілазна активність, од/см ³	2,61	4,8

Наведені у табл.1 дані свідчать про те, що використання вегетативного матеріалу до засіву виробничої культури підвищує її біосинтетичну активність у 3 рази за активністю глюкоамілази, й у 1,8 рази -- а-амілази при однаковій тривалості культивування. При цьому співвідношення глюкоамілазної та а-амілазної активності в культуральній рідині становило 74 : 26, що є майже ідеальним для оцукрювання крохмалю. Таким чином, можна зробити висновок, що виробничу культуру гриба *Asp. awamori* для одночасного процесу оцукрювання та зброджування крохмалю дріжджами *Sacch. cerevisiae* отримувати через вегетативну культуру. Цей висновок підтверджується показниками дозрілої бражки, отриманої при одночасному оцукрюванні крохмалю та його зброджуванні з використанням гриба різного фізіологічного стану (табл. 2).

Таблиця 2

Вплив фізіологічної активності клонів гриба <i>Asp. awamori</i> на технологічні показники дозрілої бражки		
Найменування технологічних показників	Посівний матеріал гриба	
	з міцелію	з конідій
pH середовища	4,3	4,3
Кислотність, град.	0,8	0,8
Видимагустина, % СР	-0,7	-0,4
Істинні сухі речовини, % СР	2,9	2,75
Концентрація спирту, % об.	9,40	9,25
Загальні незброджені цукри, г/дм ³	1,6	3,2
Водорозчинні незброджені цукри, г/дм ³	1,2	1,6
Нерозчинений крохмаль, г/дм ³	0,3	1,4

Результати, що представлені у табл. 2, свідчать про те, що при вирощуванні гриба через вегетативний засівний матеріал та досягається підвищення ферментативної активності культуральної рідини більш глибоке оцукрювання крохмалю та його зброджування, що забезпечило скорочення втрат з незбродженими цукрами з 3,2 до 1,6 г/дм³ та з нерозчинним крохмалем від 1,4 до 0,3 г/дм³.

Накопичення спирту у дозрілій бражці зросло на 0,15 см³, що добре корелює зі зменшенням кількості незброджених цукрів. Таким чином, при культивуванні гриба *Asp. awamori* на оцукреному суслі спиртового виробництва кращі результати за активністю амілазного комплексу, повнотою зброджування цукрів та виходом спирту досягаються при використанні вегетативного посівного матеріалу в порівнянні з конідиальним.

Результати будь-якого мікробіологічного синтезу суттєво залежать від тривалості культивування посівного матеріалу, що визначає морфологічний й фізіологічний стан клітин. Перевірку впливу терміну культивування гриба на результати одночасного оцукрювання та зброджування крохмалю проводили шляхом використання культури *Asp. awamori* з різною тривалістю культивування — 24, 48 та 72 год. При співвідношенні об'ємів чистих культур дріжджів і грибів 1 : 0,25. Як контроль використовували зброджування чистою культурою дріжджів замісу, попередньо оцукреного концентрованими ферментними препаратами. Дані, що характеризують вміст спирту та незбродженого цукру при одночасному оцукрюванні та зброджуванні суслу змішаною культурою дріжджів та пліснявого гриба з різною тривалістю росту, наведено в табл.3.

Таблиця 3

Вміст спирту та загального цукру у дозрілій бражці		
Для оцукрювання крохмалю використано	Вміст спирту, % об.	Загальний цукор, г/100 см ³
Концентровані ферментні препарати (контроль)	6,8	0,23
Пліснявий гриб з терміном культивування:		
24 год	7,1	0,22
48 год	6,0	0,29
72 год	6,8	0,25

Із наведених даних видно, що незалежно від тривалості культивування *Asp. awamori*, накопичення спирту змішаною культурою було не меншим, ніж у контролі, де сусло оцукрювали концентрованими ферментними препаратами. Але найкращий результат за утворенням спирту (7,1 % об.) досягнуто у варіанті досліді з використанням гриба після 24 годин росту на ферментаційному середовищі. Із збільшенням тривалості культивування та старінням засівної культури кількість синтезованого спирту зменшується від 7,1 до 6,8 % об. Ці дані добре корелюють з величинами незбродженого цукру у дозрілій бражці: цей показник при використанні добової культури гриба найменший (0,22 г/100 см³) в порівнянні з дво- і трьохдобовим засівним матеріалом. Незброджений цукор у варіанті, де використано гриб після трьох діб росту, дещо менший, ніж у варіанті з дводобовою культурою, але й вміст спирту також зменшується, що свідчить про збільшення втрат цукру на підтримку життєдіяльності гриба.

Одним з основних технологічних недоліків періодичного зброджування сусла є пригнічення росту та метаболізму мікроорганізмів надлишком джерела вуглецю. Цей недолік усувається при ферментації негідролізованого крохмалю в спирт змішаною культурою *Aspergillus awamori* та дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*, оскільки цукри, що утворюються за рахунок ферментної системи гриба, тут же споживаються дріжджами. Важливим чинником, що впливає на технологічність даного способу в промислових умовах, є концентрація сусла для культивування гриба. Тому доцільно було дослідити вплив концентрації сухих речовин сусла на ферментативну активність *Aspergillus awamori*. Для цього гриб культивували на пшеничному оцукреному суслі з вмістом сухих речовин 6,12 та 18 % (табл.4).

Як видно з наведених у табл.4 даних, підвищення концентрації сусла не викликало негативного впливу на активність ферментного комплексу, при цьому втрати крохмалю на вирощування культури були дещо меншими при використанні сусла 18 % СР. Таким чином, отримані результати культивування гриба на суслі різної концентрації дають підставу стверджувати, що у виробничих умовах можливо використовувати сусло з концентрацією сухих речовин основного виробництва.

Таблиця 4

Технологічні показники посівного матеріалу в залежності від концентрації СР сусла

Показники	Концентрація сусла, % СР		
	6	12	18
рН середовища	3,2	3,5	4,0
Кислотність, град.	0,3S	0,40	0,47
Видима густина, % СР	4,3	10,1	15,8
Глюкоамілазна активність, од/см ³	19,5	20,1	21,0
а-амілазна активність, од/см ³	6,2	8,2	7,8
Загальний цукор, г/100 см ³	1,17	2,34	5,94
- « - « - « - , % до введеного крохмалю	40,6	40,6	46,0

Результати досліджень (табл.5) свідчать про те, що вміст спирту у дозрілій бражці при використанні посівного матеріалу гриба збільшувався від 8,85 до 9,25 % об. по мірі підвищення концентрації сусла для вирощування посівного матеріалу з 6 до 18 % СР. Таке збільшення концентрації спирту у дозрілій бражці частково можна пояснити підвищеним вмістом крохмалю внесеного на бродіння, оскільки втрати крохмалю на вирощування біомаси гриба були найменшими при використанні сусла концентрацією 18 % СР, а також меншими втратами з незбродженими цурками при зброджуванні основного сусла. Кількість незбродженого цукру при культивуванні гриба на суслі з 12 % СР зменшилась у 2,3, а 18му суслі — у 2,9 рази у порівнянні з 6 % -ним суслим. При культивуванні гриба на середовищі з концентрацією сухих речовин 6 % на 24 години росту культура знаходилась в кінці стаціонарної фази росту. Можна припустити, що при пересіві такої культури на повноцінне середовище вона зазнає метаболічного шоку, внаслідок чого зростає період лаг-фази та збільшуються втрати цукрів на підтримку життєдіяльності гриба.

Таблиця 5

Показники дозрілої бражки, одержаної з використання посівного матеріалу, вирощеного при різній концентрації сусла

Показники бражки	Концентрація сусла для вирощування гриба, % СР		
	6	12	18
рН бражки	4,0	3,9	4,0
Кислотність, град.	0,7	0,8	0,7
Видима густина, % СР	1,6	1,4	1,7
Дійсна концентрація СР, %	4,3	4,4	4,5
Концентрація спирту, % об.	8,85	9,05	9,25
Загальний цукор, г/100 см ³	0,39	0,17	0,15
Водорозчинний цукор, г/100 см ³	0,32	0,12	0,10
Нерозчинений крохмаль, г/100 см ³	0,07	0,05	0,05

Висновки. Обґрунтовано та розроблено спосіб безпосереднього зброджування крохмалевмісної сировини шляхом змішаною культурою *Aspergillus awamori* та *Saccharomyces cerevisiae*.

Встановлено, що виробничу культуру гриба для змішаної культури необхідно отримувати через вегетативну культуру з міцелію шляхом культивування тривалістю 24 години на середовищі з вмістом сухих речовин однакової концентрації із суслим спиртового виробництва

Спосіб дає змогу суттєво зменшити витрати комерційних ферментних препаратів, досягти повного гідролізу крохмалю та забезпечити нормативний вихід спирту із зерна. При цьому з технології спирту із зерна виключається стадія розварювання замісу, що дозволяє суттєво спростити виробничий процес, зменшити собівартість та підвищити конкурентноздатність кінцевого продукту — ректифікованого спирту.

ЛІТЕРАТУРА

1. Технологічний регламент виробництва етилового спирту з крохмалевмісної сировини: ТРУ 18.8049. — 2000: Затв. Держагропромом України 25.10.2000: Введено в дію з 01.12.2000. — К., 2000. . 4.1. — 143 с.
2. Технологія спирту / В.О. Маринченко, В. А. Домарецький, П.Л. Шиян та ін.; Під ред. проф. В.О. Маринченка. — Вінниця: "Поділля — 2000", 2003. — 496 с.
3. Технологічний регламент виробництва с оптових бражок при низькотемпературному розварюванні крохмалевмісної сировини з використанням концентратів ваних ферментних препаратів: ТР У 00032744-«! 1 — 2002: Затв.

Держагропром України 16.12.2Х1 — Чинний від 16.12.2002. — К., 2002. — 92 с.

4. Ethanol production from starch by a coimmobilized mixed culture system of *Aspergillus awamori* and *Saccharomyces*

cerevisiae/ Kurosawa Hiroshi, Nomura Noboru, Tanaka Hideo // *Biotechnol. and Bioeng.* — 1989. — 33, №6. — с. 716–723.