

УДК 663.53

**ПОРІВНЯЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РАС СПИРТОВИХ ДРІЖДЖІВ
У ВИРОБНИЧИХ УМОВАХ ПРИ ПЕРЕРОБЦІ СУСЛА ПІДВИЩЕНОЇ
КОНЦЕНТРАЦІЇ**

*Лисак Т. І., пров. інженер,
відділ технічного контролю управління технічної політики,
ДП «Укрспирт», м. Київ
ORCID ID: 0000-0003-0698-8235*

*Олійнічук С. Т., д.т.н.,
завідувач відділу технології продуктів бродіння,
Інститут продовольчих ресурсів НААН, м. Київ
ORCID ID: 0000-0002-2885-6754*

*Коваль О. О., н.с.,
відділ технології продуктів бродіння,
Інститут продовольчих ресурсів НААН, м. Київ
ORCID ID: 0000-0003-1035-5895*

<https://doi.org/10.31073/foodresources2019-12-13>

Здійснено порівняльну характеристику експериментальної раси дріжджів ДС-01-Е та комерційних сухих дріжджів в умовах ДП «Зарубинський спиртовий завод». Предметом роботи є повномасштабна технологія виробництва спиртової бражки із крохмалевмісної сировини. Мета досліджень. Перевірка здатності експериментального штаму дріжджів підтримувати ефективні метаболічні процеси в умовах здійснення усіх відповідних виробничих етапів. Методи. При здійсненні випробувань усі основні параметри технологічних операцій дотримано відповідно до діючих технологічних інструкцій на підприємстві. Ефективність переробки сировини оцінювалась шляхом аналізу вуглеводного складу бражки, отриманої за діючим режимом. В роботі використано загальноприйняті в спиртовій промисловості методи досліджень: вміст крохмалю визначено поляриметрично, вміст домішки – гравіметрично, вміст вологи – сушінням, вміст спирту в бражці – ареометрично, вміст незброджених вуглеводів – колориметрично, вміст гліцерину – колориметрично. Результати. Сухі дріжджі в процесі збродження сусла підвищеної концентрації перебували в стані осмотичного стресу, в результаті якого за відносно однакових концентрацій сухих речовин в суслі (19,1-19,55%мас.) у зрілих бражках, отриманих при використанні експериментального штаму дріжджів вміст спирту був на 0,3-0,55% об. вищим, що дозволяє у виробничих умовах досягти підвищення ступеня конверсії біополімерів сировини в цільовий продукт на 3,5-4,0%. Виявлено зниження синтезу гліцерину експериментальною расою дріжджів на 24,4% у порівнянні з комерційними сухими дріжджами. Висновки. Встановлено технологічні переваги використання експериментальної раси, що забезпечують зменшення питомих витрат енергії на виробництво готової продукції. Показано доцільність використання експериментальної раси дріжджів у повномасштабному технологічному циклі. Відпрацьовано оптимальні режими роботи бродильного відділення, спрямовані на інтенсифікацію процесів збродження сусла підвищеної концентрації з кукурудзи.

Ключові слова: Дріжджі, кукурудза, бродіння, біоетанол, *Saccharomyces cerevisiae*

COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF ETHANOL YEAST STRAINS IN PRODUCTION CONDITIONS UNDER HIGHER MASH SOLIDS CONCENTRATION CONDITIONS

Lysak T., Senior Engineer

Technical control department of Technical policy Office,
StE «Ukrspyr»», Kyiv, Ukraine
ORCID ID 0000-0003-0698-8235

Oliynichuk S., D-r of Sciences, Technics,

Head of Fermentation Products Technology Department,
The Institute of food Resources of NAAS, Kyiv, Ukraine
ORCID ID 0000-0002-2885-6754

Koval O., Researcher

Fermentation Products Technology Department,
The Institute of food Resources of NAAS, Kyiv, Ukraine
ORCID ID 0000-0003-1035-5895

<https://doi.org/10.31073/foodresources2019-12-13>

The comparative characterization of experimental yeast strain DS-01-E and commercial dry yeasts in conditions of SoE “Zarubyntsi ethanol plant” is conducted. Full-scale technology of corn-based fermented alcoholic mash is the subject of this work. Scope of research. Verification of experimental yeast strain ability to maintain effective metabolic processes under the conditions of all relative production stages. Methods. During the execution of trials, all the main parameters of technological operations are kept according to enterprise actual technological instructions. Feedstocks processing efficiency is evaluated by fermented mash, obtained by using the existing process diagrams, carbohydrates compound analysis. The common in ethanol production test methods are used in this work: polarimetric for starch content assay, gravimetric – for impurities content assay, drying – for humidity assay, aerometric – for ethanol content assay, colorimetric – for unfermented carbohydrates and glycerol assay. Results. During the higher gravity mash fermentation process, dry yeasts undergone the osmotic stress, because of which fermented mashes, obtained using the experimental yeast strain contained 0.3-0.55%v/v alcohol under the relatively equal mash solids content. This allows to reach the 3.5-4.0% biopolymers conversion increase under the production conditions. The 24.4% glycerol synthesis decrease by experimental yeast strains, comparing to dry yeasts is detected. Results. Technological advances of experimental yeast strain, which provide the reduction of specific energy resources for production of finished products, are determined. The expediency of experimental yeast strain usage in a full-scale technological cycle is shown. The optimal operational conditions of fermentation unit, aimed on higher gravity corn mash fermentation processes optimization, are worked out.

Key words: Yeasts, corn, fermentation, bioethanol, *Saccharomyces cerevisiae*

Постановка проблеми. Виробництво спирту із зброджуваних цукрів шляхом алкогольної ферментації є одним з найстарших та найбільш важливих типом біотехнологічних процесів, відомого людям. На даний момент спиртові дріжджі використовуються при виробництві спирту етилового паливного, технічного та харчового призначення, виробництві пива, вин, брендів, віскі, хлібопекарській промисловості тощо. І, відповідно до напрямку використання, у різні типи виробництв характеризуються різними вимогами до дріжджів-продуцентів [1]. Так, при виробництві біоетанолу, штами селекціонуються за їхньою здатністю до переробки різних видів сировини, забезпечуючи при цьому максимальний вихід цільового продукту – спирту, мінімального синтезу

побічних та вторинних продуктів бродіння [2], здатність витримувати високі значення осмотичного стресу як розчинених речовин у вихідному бродильному середовищі [3], так і безпосередньо продуктів власного метаболізму [4].

Внаслідок попередніх лабораторних досліджень, авторами встановлено [5–7], що експериментальний штам дріжджів ДС-01-Е володіє більш ефективними показниками щодо динаміки зброджування, повнотою утилізації вуглеводів поживного середовища, нижчими значеннями накопичення гліцерину в зрілих бражках, вищою осмотолерантністю та здатністю накопичувати вищі концентрації спирту в бражці в межах 11,5-14,0% об. у порівнянні з комерційними сухими дріжджами, що реалізуються на території України.

Наступним етапом наукових досліджень даного штаму стала його промислова апробація в промислових умовах. В рамках співпраці із ДП «Зарубинський спиртовий завод», спрямованої на удосконалення технології зброджування сусла із крохмалевмісної сировини, були проведені виробничі випробування штаму ДС-01-Е у повномасштабному технологічному циклі виробництва біоетанолу.

Матеріали та методи. Об'єктами досліджень були технологічне обладнання отримання спиртової бражки у виробничих умовах ДП «Зарубинський спиртовий завод» сусло, приготоване з крохмалевмісної сировини, продуценти етилового спирту *Saccharomyces cerevisiae*, процеси термоферментативної обробки і зброджування сусла, а також зріла бражка.

В якості продуцентів етилового спирту використовували експериментальний штам дріжджів *S. cerevisiae* ДС-01-Е, адаптований до зброджування сусла підвищеної концентрації (Інститут продовольчих ресурсів НААН, Україна) та сухі дріжджі Thermosacc® Dry (Lallemand Biofuels & Distilled Spirits, Данія), які широко використовуються на підприємствах спиртової галузі. Дослідження були спрямовані на перевірку здатності експериментального штаму дріжджів до роботи під час основних виробничих операцій: дріжджегенерування, накопичення біомаси, робота з від'ємами «маточних дріжджів» на наступні цикли дріжджегенерування, роботи в умовах технологічних невідповідностей концентрації сусла температури сусла, бражки та її розподілу по об'єму бродильних ємностей, виробничої мікрофлори, тощо.

Під час випробувань на виробництві переробляли подрібнену крохмалевмісну сировину, яка характеризувалась наступними показниками (табл. 1).

Таблиця 1

Показники якості сировини крохмалевмісної, що надходила на виробництво
(середнє значення)

Показник	Сировина	
	Кукурудза	Сировина крохмалевмісна подрібнена
Вміст крохмалю, %	61-62	56,0-58,0
Вміст домішки *, %	4,8	40,8
Вміст вологи в зерні, %	14,0	13,0

* Високий вміст домішки в сировині пояснюється великою кількістю дрібнодисперсної фракції

Сировину, що надходила на виробництво, очищували від мінеральних і органічних домішок розміром 2-3 см, зважували на електронних вагах, остаточне подрібнення сировини здійснювали на молоткових дробарках. Дисперсність помелу складала 96–98% проходу через сито з діаметром отворів 1,0 мм. Помел змішували в дисембраторах – змішувачах з водою за температури 75 °С. В комунікацію подачі води на дисембратор безперервно дозували розріджуючий ферментний препарат «TEGAMYL BLHL» в кількості 0,25 г/т умовного крохмалю. Отриманий заміс надходив в чан замісу об'ємом

17 м³. Тривалість перебування маси в чані замісу складала 30 хвилин за температури 80 °С. Заміс подавали у вузол гідродинамічної та ферментативної обробки (ГДФО), що складається з 3 апаратів, ємністю 50м³ кожний. Температура розчинення крохмалю становила 85-87°С, тривалість процесу – 4 години. Сусло з третього апарату ГДФО надходило на два спіральні теплообмінники, встановлені послідовно, де температура зменшувалась до 30–32°С. Сусло після розчинення крохмалю використовували для культивування дріжджів та бродіння.

Культивування дріжджів здійснювали в чотирьох дріжджегенераторах робочою ємністю 40 м³ кожний. При культивуванні дріжджів сусло в кожному дріжджегенераторі збагачували азотом та фосфором (карбамід – 14 кг, ортофосфорна кислота – 6л), а також вводили необхідні ферментні препарати (глюкоамілаза – 4л, протеаза – 0,5 л). Підкислення дріжджегенераторів проводили сірчаною кислотою до титрованої кислотності 0,3 (що відповідає рН 4,7 – 4,9). Для антисептування використовували препарат TEGAPEN в кількості 10-15 г на один дріжджегенератор.

Розмноження дріжджів контролювали за зниженням концентрації сусла і після досягнення цього показника на рівні 1/2 від початкової концентрації сусла дріжджі передавали в бродильний апарат.

Для бродіння сусла на підприємстві встановлено 10 бродильних апаратів (БА) об'ємом 220 м³ і один передаточний чан об'ємом 220 м³. Тривалість бродіння – 78-84 години від початку заливу. Гази бродіння вентилятором подавались на спиртовловлювач, який конструктивно виконує функції піногасіння та спиртовловлювання. Вміст спирту у водно-спиртовій рідині після спиртовловлювача становив 6,0–6,5%об.

Оцукрювання крохмалю здійснювали одночасно з процесом бродіння глюकोамілазою «TEGAMYL AQ90L» з витратами 0,55–0,62 л/т умовного крохмалю. Крім того, в бродильний апарат вносили карбаміду – 10 кг, ортофосфорної кислоти – 3,6л. Для зброджування сусла використовували сухі дріжджі Thermosacc® Dry та експериментальний штам дріжджів ДС-01-Е.

Ефективність переробки сировини оцінювали шляхом аналізу вуглеводного складу бражки, отриманої за діючим режимом. В роботі використовували загальноприйняті в спиртовій промисловості методи досліджень: вміст крохмалю визначали поляриметрично, вміст домішки – гравіметрично, вміст вологи – сушінням [8, 9].

У зрілих бражках визначали вміст незброджених вуглеводів фотоелектро-колориметричним методом з антроновим реактивом, вміст гліцерину – фотоколориметричним методом з хромотроповим реактивом, спирту – скляним спиртоміром, кислотність – потенціометрично, концентрацію сухих речовин (СР) – ареометрично [10, 11].

Одночасно з випробуванням експериментальної раси дріжджів було проаналізовано вплив внесення протеолітичного ферментного препарату на якісні характеристики зброджування сусла за умови додаткового його внесення в бродильний апарат на стадії головного бродіння. Для цього при заливі бродильних апаратів № 2 та №3 на «подушку» було внесено протеолітичний ферментний препарат TEGALASE AP35L в кількості 2 дм³ на бродильний апарат.

Результати та обговорення. Під час 1-го етапу проведення випробувань підприємство працювало на двох расах дріжджів, де бродильні апарати почергово заливались з використанням дріжджів TERMOSACC та штаму ДС-01-Е. З метою інтенсифікації процесів зброджування сусла за рахунок зменшення осмотичного навантаження на дріжджі та скорочення гол фази їх росту на стадії головного бродіння, було прийнято рішення про двоетапний залив бродильних апаратів. При цьому в один бродильний апарат вносились «подушка», усі допоміжні матеріали та засівні дріжджі, та основне сусло в кількості, рівній половині об'єму бродильного апарату. Після цього аналогічні операції проводились в наступному по порядку бродильному апараті в

бродильній батареї. Після доливу другого бродильного апарату суслom до половини, подачу суслу повертають до попереднього бродильного апарату та заливають його суслom до кінця. Потім доливають до кінця другий бродильний апарат. Згідно із проведеними раніше дослідженнями, даний технологічний прийом дозволяє інтенсифікувати роботу бродильного відділення на 10-15%.

Порівняльна характеристика показників дозрілої бражки наведені в таблиці 2.

Таблиця 2

Порівняння показників якості зрілої бражки при зброджуванні сусла з використанням сухих дріжджів та осмофільної раси дріжджів

Показник	Бродильний апарат					
	Сухі дріжджі			Експериментальні дріжджі		
	№9	№3	№7	№10	№2	№8
Концентрація сусла після ГДФО, %	19,55	19,45	19,10	19,45	19,5	19,10
Тривалість бродіння, год.	90	88	80	90	89	77
Вміст спирту, % об.	11,65	11,60	11,30	11,90	12,20	11,75
Загальний вміст незброджених вуглеводів, г/100 см ³	0,38	0,39	0,41	0,37	0,46	0,36
Водорозчинні вуглеводи, г/100 см ³	0,36	0,35	0,33	0,32	0,39	0,30
Нерозчинений крохмаль, г/100 см ³	0,02	0,04	0,07	0,04	0,06	0,06
Вміст декстринів, г/100 см ³	0,11	0,15	0,08	0,09	0,16	0,13
Спирторозчинні вуглеводи, г/100 см ³	0,23	0,18	0,24	0,22	0,22	0,15
Істинний вміст сухих речовин, %	3,0	3,0	3,0	2,8	3,1	3,0
Вміст гліцерину, г/100 см ³	0,87	0,83	0,77	0,74	0,51	0,61
Вміст цукру, введенного на бродіння, г/100 см ³	17,46	17,40	16,98	17,82	18,35	17,59
Втрати з незбродженим цукром, % від введенного на бродіння	2,18	2,24	2,41	2,08	2,51	2,05

Як видно із табл. 2, за втратами з незбродженими вуглеводами суттєвих відмінностей між штамами дріжджів не виявлено, але середня кількість синтезованого гліцерину сухими дріжджами була вищою і складала 0,82 г/100 см³ проти 0,62 г/100см³ у штама ДС-01-Е, що є більшим на 24,4%. Ці дані свідчать, що сухі дріжджі під час бродіння перебували в стані осмотичного стресу, в результаті якого при відносно однакових концентраціях сухих речовин в суслі (19,1-19,55% мас.) у зрілих бражках, отриманих при використанні експериментального штаму дріжджів вміст спирту був на 0,3-0,55% об. вищим. Дана різниця істотною та фактично дозволяє досягти підвищення ступеня конверсії біополімерів сировини в цільовий продукт на 3,5-4,0%.

При цьому для усіх досліджуваних бродильних апаратів вміст незброджених вуглеводів знаходились в регламентованих межах, як для загальної їх кількості, так і для кожної групи індивідуально.

На другому етапі досліджень концентрація етапі досліджень концентрацію сусла після ГДФО була збільшена до 20,50-20,70% мас. На даному етапі досліджень в якості продуцентів етанолу використовувались лише експериментальна раса дріжджів ДС-01-Е.

Характеристика показників зрілої бражки наведена в таблиці 3.

Таблиця 3

**Показники зрілої бражки при зброджуванні сусла підвищеної концентрації
з використанням осмофільної раси дріжджів**

Показник	Бродильний апарат		
	№10	№2	№4
Концентрація сусла після ГДФО, %	20,70	20,50	20,50
Тривалість бродіння, год.	82	90	86
Вміст спирту, % об.	12,00	12,40	12,30
Загальний вміст незброджених вуглеводів, г/100 см ³	0,38	0,34	0,39
Водорозчинні вуглеводи, г/100 см ³	0,31	0,29	0,38
Нерозчинений крохмаль, г/100 см ³	0,06	0,05	0,01
Вміст цукру, введенного на бродіння, г/100 см ³	17,97	18,52	18,42
Втрати з незбродженим цукром, % від введенного на бродіння	2,11	1,84	2,11

Як видно з табл.3, експериментальна раса дріжджів дозволяє забезпечити стабільну концентрацію спирту в зрілій бражці на рівні 12,00-12,40% об. При цьому вміст незброджених вуглеводів стабільно залишався в межах регламентованих значень (0,34-0,39 г/100см³ при максимально дозволених згідно норм втрат та виходів 0,45г/100см³).

Висновки. В результаті проведених виробничих випробувань експериментального штаму дріжджів ДС-01-Е, встановлено, що за однакової концентрації сухих речовин в суслі, експериментальний штам дріжджів забезпечував вищий вміст спирту в бражці на 3,6% відносних, що свідчить про більш високий вихід спирту з одиниці сировини, перш за все за рахунок зменшення накопичення гліцерину. Це також показує підвищену осмофільність в порівнянні з сухими дріжджами. При цьому експериментальна раса дріжджів забезпечувала вміст загальних незброджених вуглеводів на рівні 1,8-2,1% до введених, що є в межах регламентованих значень та характеризує нормальне ведення технологічного процесу.

Таким чином, експериментальний штам дріжджів відповідає вимогам до спиртових дріжджів для зброджування сусла з крохмалевмісної сировини, та є доцільним перехід на постійне використання експериментальної раси ДС-01-Е на постійній у технологічному циклі отримання спиртової бражки з крохмалевмісної сировини в умовах ДП «Зарубинський спиртзавод».

Бібліографія

1. Маринченко В. О., Домарецький В.А., Шиян В. П. Технологія спирту: підручник Вінниця: «Поділля-2000», 2003. 496 с.
2. Bellisimi E. Analysis and metabolic acclimatization of active dry yeasts for fuel alcohol industry, PhD Thesis University of Saskatchewan, 2004.
3. Boulton R., Singleton V., Bisson L., Kunkee R. Principles and practices of winemaking. Boston, MA: Springer US, 1999.
4. Thomas K., Ingledew W. Production of 21% (v/v) ethanol by fermentation of very high gravity (vhg) wheat mashes. Journal of Industrial Microbiology. 1992. Vol. 10, No. 1. P. 61–68. doi:10.1007/BF01583635.
5. Сичевський М. П., Олійнічук С. Т., Данілова К. О. Біосинтез етилового спирту різними расами дріжджів в умовах підвищеної концентрації сусла. Наукові доповіді Національного університету біоресурсів і природокористування України. 2016. Вип. 5. http://nbuv.gov.ua/UJRN/Nd_2016_5_10.
6. Oliynichuk S., Lysak T., Marynchenko L. The dependence of glycerol accumulation and starch hydrolyzates fermentation from wort concentration. Biotechnologia Acta. 2015. Vol. 8, № 4. P. 128–134. doi:10.15407/biotech8.04.128.

7. Олійнічук С. Т., Лисак Т. І., Коваль О. О. Зброджування сусла підвищеної концентрації з крохмалевмісної сировини. *Продовольчі ресурси: збірник наукових праць/ НААН; Ін-т прод. Ресурсів НААН*. 2016. Vol. 7. с. 139–143.
8. ГСТУ 46.045.2003 Зерно. Методи визначення умовної крохмалистості. Введено вперше. Чинний від 01.01.2004. Київ: 2004. 20 с.
9. ДСТУ 4864:2007 Сировина крохмалевмісна для спиртового виробництва. Методи визначення вологості. Введено вперше. Чинний від 01.07.2009. Київ: 2009. 13 с.
10. Великая Е. И., Суходол В. Ф. Лабораторный практикум по курсу общей технологии броидильных производств общие методы контроля). 2-е изд., перераб. и доп. М.: Легкая и пищевая пром-сть, 1983. 312 с.
11. Бойко Л. М. Физико-химические методы контроля броидильных производств. Киев: Техника, 1986. 192 с.

References

1. Marynchenko V., Domaretskyi V., Shyian P. (2003). *Tekhnolohiia spyrtu: Pidruchnyk. [Alcohol technology: Textbook]* Vinnytsia: «Podillia-2000».
2. Bellisimi, E. (2004). Analysis and metabolic acclimatization of active dry yeasts for fuel alcohol industry, PhD Thesis. University of Saskatchewan.
3. Boulton R., Singleton V., Bisson L., Kunkee R. (1999). *Principles and Practices of Winemaking*. Boston, MA: Springer US. <https://doi.org/10.1007/978-1-4757-6255-6>.
4. Thomas K., Ingledew W. (1992). Production of 21% (v/v) ethanol by fermentation of very high gravity (VHG) wheat mashes. *Journal of Industrial Microbiology*, 10(1), 61–68. <https://doi.org/10.1007/BF01583635>.
5. Sychevskyi M., Oliinichuk S., Danilova K. (2016). Biosyntezy etylovoho spyrtu riznymi rasamy drizhdzhiv v umovakh pidvyshchenoi kontsentratsii susla. [Biosynthesis of ethyl alcohol by different races of yeast in conditions of increased concentration of wort] *Naukovi dopovidi Natsionalnoho universytetu bioresursiv i pryrodokorystuvannya Ukrainy [Scientific reports of the National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine]*, Vol. 5. Retrieved from http://nbuv.gov.ua/UJRN/Nd_2016_5_10. [in Ukrainian].
6. Oliinichuk S., Lysak T., Marynchenko L. (2015). The Dependence of Glycerol Accumulation and Starch Hydrolyzates Fermentation from Wort Concentration. *Biotechnologia Acta*, 8(4), 128–134. <https://doi.org/10.15407/biotech8.04.128> [in Ukrainian].
7. Oliinichuk S., Lysak T., Koval O. (2016). Zbrodzhuvannya susla pidvyshchenoi kontsentratsii z krokhmalevmisnoi syrovyny. [The Fermentation of Very High Gravity (VHG) Wort from Starch Containing Raw Materials] *Prodovolchi resursy: zbirnyk naukovykh prats. NAAN; In-t prod. Resursiv NAAN [Food resources: Digest of scientific works NAAS; Inst. of Prod. Resources]*, 7, 139–143. [in Ukrainian].
8. HSTU 46.045.2003 Zerno. Metody vyznachennia umovnoi krokhmalystosti [Grain. Methods for starch content determining]. Vvedeno vpershe. Chynnyi vid 01.01.2004. (2004). Kyiv. [in Ukrainian].
9. DSTU 4864:2007 Syrovyna krokhmalevmisna dlia spyrtovoho vyrobnytstva. Metody vyznachennia volohosti [Starch containing raw materials for alcohol production. Methods of determination of moisture content]. Vvedeno vpershe. Chynnyi vid 01.07.2009. (2009). Kyiv [in Ukrainian].
10. Velikaya E., Suhodol V. (1983). *Laboratorniy praktikum po kursu obschey tehnologii broidilnykh proizvodstv (obschie metody kontrolya) [Laboratory workshop on Fermentation Technology (common methods of control)]*. 2-e izd., pererab. i dop. M.: Legkaya i pischevaya prom-st. [in Russian].
11. Boiko L. (1986). *Fyzyko-khymicheskiye metody kontrolya broidilnykh proyvodstv. [Physicochemical methods of controlling fermentation productions]*. Kyev: Tekhnyka. 192 p. [in Russian].