**АМИЛОЛИТИЧЕСКИЕ ПРЕПАРАТЫ**

Амилолитические препараты широко выпускаются в нашей стране и за рубежом. В основном это крупнотоннажное производство. Амилазы нахо­дят применение почти во всех областях, где перерабатывается крахмалсо-держащее сырье. Амилазы используют для осахаривания зернового и кар­тофельного крахмала. Самым большим потребителем амилолитических ферментов является спиртовая и пивоваренная промышленности, где в на­стоящее время солод (проращенное зерно) успешно заменяется амилолити­ческими ферментными препаратами.

 **Источники получения амилаз**

Амилазы очень широко распространены в природе. Они синтезируются многими микроорганизмами (бактерии, грибы, актиномицеты, дрожжи), животными и растениями. До развития ферментной промышленности глав­ным промышленным источником получения амилаз в европейских странах было проросшее зерно (солод). Для медицинских целей амилазы получали из животного сырья. В настоящее время главным источником амилаз явля­ются микроорганизмы, особенно бактерии, грибы и реже дрожжи.

**Механизм действия и свойства амилаз**

Субстратами для действия амилаз являются крахмал, состоящий из амило­зы и амилопектина, продукты частичного гидролиза крахмала и гликоген.

*Крахмал* - растительный полисахарид с очень сложным строением. Это двухкомпонентное соединение, состоящее из 13-30% амилозы и 70-85% амилопектина. Оба компонента неоднородны, их молекулярная масса (М. *м.)* колеблется в широких пределах и зависит от природы крахмала. Амилоза - это неветвящийся полимер, в котором остатки глюкозы соеди­нены α-1, 4-гликозидной связью; степень полимеризации около 2000. В «аномальных» амилозах с одной-двумя α-1, 6-связями полимеризация мо­жет возрасти до 6000 (рис.1). Амило­за практически не об­ладает восстанавлива­ющей способностью, так как в каждой мо­лекуле амилозы име­ется только одна сво­бодная альдегидная группа.

Молекула амилозы представляет собой растянутую спираль, шаг которой составля­ет 10,6 А и в каждый виток входит 3 остатка глюкозы. Максималь-

Рис 1. Строение амилозы:

а — амилоза без аномальных отклонений; б - схема возмож­ных ветвлений амилозы; в — спираль амилозы в растворе с за­ключенными в ее полость молекулами йода.

Концевые звенья с

альдегидными группами 1 разветвление

- 2 разветвления 4 разветвления 8 развет

16 концевых звеньев

64 концевых

звена

Рис. 2.2. Амилопектин, схема дихо­томического деления амилопектина (по К. Мейеру):

а - в плоскости; б - в пространстве.

ная длина молекулы амилозы достигает 7000 А. В растворе спираль сжимается за счет увеличения витка, в котором уже участвует 6 остатков глю­козы. При вхождении молекул йода в спираль амилозы возни­кает характерный синий цвет. Строго говорить о величине молекулы амилозы нельзя, т. е. даже из одного образца крахмала извлекается амило­за, с величиной молекулы от 500 до 2000 остатков глюкозы. Амилопектин имеет большую молекулярную массу, чем ами­лоза, и более сложное строе­ние. Это ветвящийся полиса­харид. Предполагается, ами­лопектин ветвится дихотоми­чески, т. е. число концевых звеньев всегда на единицу больше числа звеньев, дающих ветвление, а сумма этих чисел дает общее число звеньев по всей цепи (см. рис. 2.2).

**Механизм действия.** К группе амилотических ферментов относятся α- и β-амилазы, глюкоамилаза, пуллуланаза, изоамилаза и некоторые другие ферменты. Амилазы бывают двух типов: эндо- и экзоамилазы. Четко выра­женной эндоамилазой является а-амилаза, способная к разрыву внутримо­лекулярных связей в высокополимерных цепях субстрата.

Глюкоамилаза и β-амилаза являются экзоамилазами, т. е. ферментами, атакующими субстрат с нередуцирующего конца.

При изучении механизма действия амилаз имеются определенные слож­ности, и прежде всего они заключаются в том, что субстрат - крахмал неод­нороден и имеет различные характеристики по степени полимеризации гли-козидной цепи и количеству ветвлений.

Реакции, катализируемые амилазами, имеют две стадии: короткую -предстационарную и длительную - стационарную. Во время первой стадии эндоамилаза быстро уменьшает молекулярную массу субстрата, образуя смесь линейных и разветвленных олигосахаридов. Второй этап реакции продолжается, пока продукты гидролиза не перестанут окрашиваться йо­дом; он протекает значительно медленнее и зависит от индивидуальных свойств фермента и его природы. Поэтому конечные продукты гидролиза а-амилазами могут быть различными. Первая стадия воздействия фермента на субстрат хотя и носит неупорядоченный характер, имеет для всех видов α-амилаз схожий механизм.

Существует две гипотезы о механизме действия экзоамилаз на субстрат. Первая гипотеза предполагает, что, воздействуя на субстрат по одноцепочечному или «молниеобразному» механизму, экзоамилаза образует фер­мент-субстратный комплекс с захватом нередуцирующего конца цепи.

Дальнейшее продвижение фер­мента по этой цепи происходит до полного ее гидролиза. По второй гипотезе (β- и глюко­амилаза действуют на субстрат путем механизма множественной атаки, т. е. фермент образует комплекс с молекулой субстрата, затем через несколько этапов этот комплекс распадается и фер­мент связывается с новой моле­кулой субстрата. Иными слова­ми, при множественной атаке происходит нечто среднее между неупорядоченным механизмом и одноцепочечной, «молниеобразной» атакой. Для полного гидро­лиза по этому механизму одна

молекула субстрата должна образовывать много раз фермент-субстратные комплексы. При этом возможен гидролиз нескольких связей в одном ката­литическом акте.

Механизм воздействия амилаз на субстрат может быть рассмотрен с не­скольких позиций:

1. вид разрываемой связи (α-1,4 или α-1,6);
2. тип воздействия на субстрат (эндо- или экзо-);
3. влияние на скорость гидро­лиза степени полимеризации субстрата;

4) возможность гидролиза олиго­сахаридов;

1. способность фермента к множественной атаке субстрата.

Наличие признаков амилаз, отраженных в 3 и 4 позициях, при действии на линейные субстраты может свидетельствовать о существовании у этих ферментов подцентровой структуры. Вероятно, активный центр амилазы может состоять из нескольких подцентров, каждый из которых может вступать в контакты с глюкозным остатком. Энергия взаимодействия (А;), выраженная в единицах свободной энергии (кДж/моль), определяет подцентровое сродство фермента к субстрату. Это сродство индивидуаль­но и может быть как положительным, так и отрицательным. Вероятность существования подцентровых структур амилаз помогает установить стро­ение активного центра амилаз, дает более четкое объяснение субстратной специфичности, но не дает объяснений механизма гидролиза разветвлен­ных субстратов.

α-Амилаза. а-Амилаза (а-1,4-глюкан-4-глюканогидролаза, КФ 3.2.1.1.) яв­ляется эндоамилазой, вызывающей гидролитическое расщепление α-1,4-гли-козидных связей внутри высокополимеризованного субстрата. Фермент на­зван α-амилазой потому, что он высвобождает глюкозу в α-мутамерной форме.

а-Амилаза - водорастворимый белок, обладающий свойствами глобулина и имеющий *М. м.* 45 000-60 000. Своего рода исключением является α-амилаза В. macerans, которая имеет *М. м.* 130 000. Есть указания, что некото­рые термостабильные α-амилазы имеют М. м. 14 000-15 000, но в их моле­кулах содержится в 2-3 раза больше атомов кальция.

Все а-амилазы относятся к металлоэнзимам, содержание в них Са колеб­лется от 1 до 30 г атом на 1 г моль фермента. Полное удаление кальция

приводит к инактивации фермента. Повторное введение кальция в среду мо­жет частично восстановить его активность. α-Амилаза В. subtilis с помощью иона цинка способна образовывать димерную форму, чего лишены другие α-амилазы. Все α-амилазы устойчивы к воздействию протеаз. Они богаты ти­розином и триптофаном. Глютаминовая и аспарагиновая кислоты составля­ют 25% массы белка. Наличие этих кислот в а-амилазе связывают с их оса-харивающей способностью. Так, разжижающие α-амилазы не имеют сульфгидрильных групп, а осахаривающие содержат один остаток цистеина. Сравнительно мало или совсем отсутствуют в а-амилазах содержащие серу аминокислоты. Некоторые α-амилазы грибного происхождения имеют уг­леводный фрагмент, в состав которого могут входить манноза, ксилоза, гексозоамин, но функции его не установлены.

В зависимости от вида микроорганизма свойства ос-амилаз могут сильно отличаться не только по механизму воздействия на субстрат и конечным продуктам, но и по оптимальным условиям для проявления максимальной активности.

Действуя на целое крахмальное зерно, α-амилаза атакует его, разрыхляя поверхность и образуя каналы и бороздки, т.е. как бы раскалывает зерно на части. Клейстеризованный крахмал гидролизуется ею с образованием на окрашиваемые йодом продукты - в основном состоящие из низкомоле­кулярных декстринов. Процесс гидролиза крахмала многостадийный. В результате воздействия α-амилазы на первых стадиях процесса в гидролизате накапливаются декстрины, затем появляются неокрашивающиеся йо­дом тетра- и тримальтоза, которые очень медленно гидролизуются α-амилазой до ди- и моносахаридов.

Все α-амилазы проявляют наименьшее сродство к гидролизу концевых связей в субстрате. Некоторые же а-амилазы, особенно грибного происхож­дения, на второй стадии процесса гидролизуют субстрат более глубоко с об­разованием небольшого количества мальтозы и глюкозы. Схему гидролиза под действием а-амилазы можно записать следующим образом:

 а-Амилаза

Крахмал,----------------*>* а-Декстрины + Мальтоза + Глюкоза

гликоген (много) (мало) (мало)

**β-Амилаза.** β-Амилаза (α-1,4-глюкан мальтогидролаза, КФ 3.2.1.2) - активный белок, обладающий свойст­вами альбумина. Каталити­ческий центр фермента со­держит сульфгидрильные и карбоксильные группы и имидозольный цикл остат­ков гистидина. β-Амилаза -экзофермент концевого дей­ствия, проявляющий срод­ство к предпоследней **β-1,4-**связи с нередуцирующего конца линейного участка амилозы и амилопектина.

В отличие от α-амилазы β-амилаза практически не гидролизует нативный крахмал, тогда как клейстеризованный крахмал гидро­лизуется ею с образованием мальтозы β-конфигурации, поэтому данная амилаза по аналогии с α-амилазой на­зывается β-амилазой. Если гидролизу подвергается амилоза, то гидролиз идет полностью до мальтозы. Не­значительное количество декстринов может образовы­ваться при гидролизе «ано­мальных» амилоз, так как гидролиз β-амилазой идет только по линейной цепи до α-1,6-связей. Если субстратом для β-амилазы служит амилопектин, то гидролиз идет в значительно меньшей степени. β-Амилаза отщепляет фрагмент с не­редуцирующего конца участка от внешних линейных ветвей, имеющих по 20-26 глюкозных остатков, с образованием 10—12молекул мальтозы. Гид­ролиз приостанавливается на предпоследней α-1,4-связи, граничащей с α*-*1,6-связью. В гидролизате накапливается 54-58% мальтозы, остальное составляют высокомолекулярные декстрины, содержащие значи­тельное количество а-1,6-связей - так называемые β-декстрины. Действие β-амилазы на крахмал можно записать в виде следующей схемы:

 β-Амилаза

Крахмал,----------------*>* Мальтоза + р-Декстрин

гликоген (54-58%) (42-46%)

β-Амилазы проявляют большую стабильность в отсутствие ионов Са2+. Молекулярная масса β-амилазы растений достаточно высока, она составля­ет от 50 000до 200 000**.** Фермент может состоять из одной или четырех

субъединиц до 50 000 каж­дая. Фермент содержит SH-группы и чувствителен к действию тяжелых метал­лов. Считается, что (β-ами-лаза обладает высокой спо­собностью к множествен­ной атаке субстрата. Для амилозы средней молеку­лярной массы в одном при­соединении фермента к суб­страту возможно отщепле­ние до четырех остатков мальтозы. При увеличении молекулярной массы суб­страта возможно и большее количество мест атаки.

**Глюкоамилаза**. Глюкоамилаза (а-1,4-глюкан глюкогидролаза, КФ 3.2.1.3.) широко распространена в природе. Она синтезируется многими ми­кроорганизмами и образуется в животных тканях, особенно в печени, почках, плаценте кишечника и т. д. Фермент в литературе известен под различ­ными названиями: амилоглюкозидаза, γ-амилаза, лизосомальная α-глюкозидаза, кислая мальтаза, матулаза и экзо-1,4-α-глюкозидаза. Глюкоамилаза катализирует последовательное отщепление концевых остатков α-D-глюкозы с нередуцирующих концов субстрата. Это фермент с экзогенным механизмом воздействия на субстрат. Многие глюкоамилазы обладают способностью так же быстро, как и α-1,4-связь, гидролизовать α-1,6-глюкозидные связи. Но это происходит только в том случае, когда за α-1,6-связью следует α-1,4-связь, поэтому декстран ими не гидролизуется. От­личительной особенностью глюкоамилаз является способность в десятки раз быстрее гидролизовать высокополимеризованный субстрат, чем олиго-и дисахариды.

 В литературе высказывается мнение, что ме­ханизм атаки субстрата глюкоамилазой может быть двух типов: либо одно-цепочечный, либо множественной атаки, и что активный центр имеет под-центровую структуру.

Почти все глюкоамилазы являются гликопротеидами, содержащими от 5 до 35% углеводов, которые состоят из олиго-, ди- и моносахаридов. Угле­водный компонент может быть целостным фрагментом или же разбитым на индивидуальные соединения, которые прикрепляются к белку через трео­нин и серин. Например, у глюкоамилазы A. niger их 20. Большинство из­вестных глюкоамилаз имеет оптимум рН при 4,5-5,2, реже - при 5,7-6,0, в основном для дрожжевых глюкоамилаз.

РН-стабильность микробных глюкоамилаз лежит в широком диапазоне -от 2,5 до 9. Термостабильность глюкоамилаз лежит в интервале от 30 до 45°С и редко повышается до 55-60°С. Глюкоамилазы различного происхо­ждения заметно отличаются по молекулярной массе, которая, по данным различных авторов, имеет значения от 48 000 до 210 000. Следует заме­тить, что далеко не все микробные глюкоамилазы способы полностью гид­ролизовать крахмал до глюкозы. Еще в 60-х годах И.Фукумото предложил все микробные глюкоамилазы разделить на два типа:

1. полностью гидро­лизующие крахмал до глюкозы и
2. гидролизующие крахмал до глюкозы на 80-85%.

В то время предполагалось, что степень гидролиза зависит только от свойств глюкоамилаз и их происхождения. Позже было показа­но, что при росте культуры параллельно накапливаются и другие амилоли­тические ферменты, обладающие не только гидролитическим, но и трансферазным действием. Это гликозилтрансфераза и α-амилаза. Даже в слу­чае, если система открытая и продукт гидролиза (глюкоза) постоянно уда­ляется из системы, процесс может дойти до полного гидроли­за крахмала до глюкозы. Если же система закрытая и концентрация суб­страта велика, то при достижении определенной концентрации глюкозы в реакционной среде в результате переноса глюкозильных остатков на глю­козу, ди- и олигосахариды начинают накапливаться изомальтоза, паноза, нигероза, изомальтотриоза и другие сахара, которые имеют горький вкус. В результате процесс не может дойти до полного превращения крахмала в глюкозу и возникает ошибочное представление, что глюкоамилаза не пол­ностью гидролизует крахмал. Сама же глюкоамилаза может проявлять не­большую трансферазную активность, но только при концентрации глюко­зы свыше 60-70%. Поэтому ранее принятое деление глюкоамилаз на два типа следует считать необоснованным.

## ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ СХЕМЫ И РЕЖИМ ПОЛУЧЕНИЯ СПИРТА

Технология этилового спирта из крахмалистого сырья основана на ферментативном гидролизе зернового или картофельного крахма­ла и сбраживании образующихся сахаров дрожжевыми микроорга­низмами, т.е. является биохимической технологией.

Процесс получения спирта из зерно-картофельного сырья вклю­чает следующие стадии: очистка и подготовка сырья, водно-тепло­вая обработка его, осахаривание разваренной массы и охлаждение сусла, приготовление засевной культуры дрожжей, сбраживание сус­ла, перегонка бражки и ректификация спирта.

Производство спирта из крахмалистого сырья осуществляется по периодической, полунепрерывной и непрерывной схемам. По пе­риодической схеме с использованием разварников Генце получали этиловый спирт с конца XIX в. В настоящее время эта схема оста­лась только на некоторых спиртовых заводах малой мощности (до 800 дал). Полунепрерывная схема производства, основанная на ис­пользовании периодически действующих аппаратов, впервые была внедрена на заводах СССР в 1917—1950 гг. По этой схеме до сих пор работают около 15—20% спиртовых заводов страны.

**ПРИНЦИПИАЛЬНАЯ ТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ СХЕМА ПОЛУЧЕНИЯ ЭТИЛОВОГО СПИРТА ИЗ КРАХМАЛИСТОГО СЫРЬЯ**

**ОСАХАРИВАЮЩИЕ МАТЕРИАЛЫ**

Крахмал, растворенный при разваривании зерна и картофеля, гидролизуют (осахаривают) амилолитическими ферментами зер­нового солода или культур микроорганизмов, преимущественно микроскопических (плесневых) грибов и бактерий.

Амилолитические ферменты содержатся во многих высших растениях, но наиболее богато ими пророщенное в определен­ных условиях зерно растений семейства мятликовых (злаков), называемое солодом. Способность солода осахаривать крахмал известна с древнейших времен, и с тех пор солод используется при получении спирта. Также давно известно свойство микро­скопических грибов осахаривать крахмал. С их помощью восточ­ные народы приготовляли различные охмеляющие напитки.

Культуры микроскопических грибов или ферментные пре параты применяют в спиртовой промышленности большинства зарубежных стран, причем в основном в виде концентрирован­ных сиропообразных препаратов или сухого порошка, реже — в виде культуральной жидкости.

Культуры микроскопических грибов имеют ряд преимуществ по сравнению с солодом. Их выращивают на пшеничных отрубях или в составе питательной среды используют обычную кукуруз­ную муку, тогда как для приготовления солода расходуется 14...20 % кондиционного (96 % проростаемости) зерна в расчете на массу крахмала сырья.

При солодоращении теряется 16...18 % крахмала, часть крах­мала солода в процессе производства спирта остается неосаха­ренной и, следовательно, не сбраживается. Кроме того, с соло­дом вносятся в сусло посторонние микроорганизмы, вследствие чего в большей мере протекают и другие виды брожения, отри­цательно отражающиеся на выходе спирта. В случае применения смеси солодов из различных злаков с целью полного осахарива­ния крахмала работа солодовен усложняется.

Культуры микроскопических грибов содержат комплекс ами­лолитических ферментов, отличающихся от ферментов солода и позволяющих глубже и полнее гидролизовать крахмал. В микро­скопических грибах активнее целлюлозолитические ферменты, расщепляющие гемицеллюлозы до сахаров, часть которых сбра­живается дрожжами, при этом повышается выход спирта.

С помощью культур микроскопических грибов можно увели­чить концентрацию ферментов и таким образом сократить про­должительность осахаривания и последующего дображивания сусла в 2...3 раза.

Микроскопические грибы быстро размножаются, для выра­щивания поверхностной культуры достаточно около 1,5 сут, про­ращивание же зерна для получения солода длится 9... 10 сут. Глубинные культуры выращивают в стерильных условиях, что обеспечивает «чистоту» процесса спиртового брожения.

Действие солода и культур микроскопических грибов не огра­ничивается осахариванием крахмала, они еще способствуют на­коплению в сусле достаточного количества органического азота для питания дрожжей и частичному растворению клеточных сте­нок эндосперма сырья. В осуществлении этих процессов, а также в выращивании солода и микроскопических грибов участвуют многочисленные ферменты, поэтому необходимо знание их хи­мической природы, строения и механизма действия.

**ПОЛУЧЕНИЕ СОЛОДА**

Технология солода складывается из следующих основных про­цессов: замачивание и проращивание зерна; сушка солода и удаление ростков. На отечественных спиртовых заводах для оса­харивания используют сырцовый — несушеный солод (непра­вильно называемый «зеленым»). Этот солод не может долго хра­ниться, поэтому на каждом спиртовом заводе его готовят в коли­чествах, необходимых для текущей работы.

**ЗАМАЧИВАНИЕ ЗЕРНА**

Основная цель замачивания — увлажнить зерно; дополнитель­ная — отмыть от остатков пыли, удалить легкие зерновые и не­зерновые примеси и подавить микроорганизмы. Замачивание ведут с применением воздуха и воды, чередуя насыщение зерна водой и аэрацию.

Во время замачивания протекают физико-химические и биохимические процессы, приводящие к глубоким изменениям в зерне.

ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ ПРИ ЗАМАЧИВАНИИ ЗЕРНА

Зерно прорастает нормально при влажности 40...46 %. При меньшей влажности ростки быстро увядают, накапливается мало ферментов, эндосперм плохо и неравномерно растворяется. Переувлажненное зерно долго не начинает прорастать, а затем быстро трогается в рост с большим выделением теплоты. Зама­чивание обычно заканчивается по достижении влажности 38...40 %, но обильно орошают зерно водой во время проращи­вания.

Вода поступает в зерно через плодовую и семенную оболочки, обладающие полупроницаемостью, поэтому в процессе замачива­ния главную роль играют ультрафильтрация и осмодиффузия. Цветочная пленка (мякинная оболочка) в начале замачивания непроницаема, и вода впитывается по тонким капиллярам — трахеидам зародышевой части, не покрытой этой оболочкой. Сорбируясь крахмалом, белками и другими высокополимерами и растворяя минеральные вещества, через полупроницаемые стен­ки клеток зародыша и эндосперма вода проникает внутрь зерна.

Со временем вследствие вымывания инкрустирующих веществ становится проницаемой и мякинная оболочка.

В нормально замоченном зерне ячменная влага распределена неравномерно. Наибольшая влажность (около 47 %) в основа­нии — в зоне расположения зародыша; в самом зародыше влаж­ность еще выше (68...75 %). В середине зерна влажность 38 %, в кончике 39 %.

Скорость замачивания зависит от структуры, размера зерна и температуры. Пленчатое, высокобелковое и крупное зерно обыч­но увлажняются медленнее, чем голое, низкобелковое и мелкое, хотя нередки исключения из этого правила. Зерно, выращенное в сухом жарком климате, впитывает влагу хуже зерна, получен­ного во влажном умеренном теплом климате. С повышением температуры скорость замачивания возрастает

Зерно большинства культур замачивают при 18...20 °С (смеси зерна и воды). При более высокой температуре необходимы час­тая смена воды, энергичное аэрирование, тщательное подавление микрофлоры, что усложняет управление процессом. Исключение составляет просо, которое насыщается влагой труднее, поэтому температуру замачивания его поддерживают в пределах 25...30 *°С.*

В воде с высокой жесткостью (14... 15 мгэкв/л) и большой щелочностью замачивание замедляется. Такое же действие ока­зывают хлориды; сульфаты, наоборот, ускоряют замачивание.

Во время замачивания зерно набухает, увеличиваясь в объеме, например, на 40...45 *%* (ячмень). Из твердого и хрупкого оно становится мягким и эластичным.

БИОХИМИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ ПРИ ЗАМАЧИВАНИИ ЗЕРНА

В результате увеличения влажности зерна при замачивании резко усиливается жизнедеятельность и в первую очередь дыха­ние зерна, сопровождающееся потребностью в кислороде. Вместе с тем запас кислорода в воде очень быстро уменьшается, напри-

мер при замачивании ячменя на 60...80 мин он исчезает, поэтому обеспечение зерна кислородом затруднено. Проникновению кис­лорода в зерно через зародыш (в начале замачивания) препятст­вует щиток, а через оболочки впоследствии — большое количест­во воды в тканях. Диффузия кислорода в воде примерно в 10 000 раз медленнее, чем в газе; кроме того, растворимость его в воде в 40 раз меньше, чем диоксида углерода. Недостаток кислорода в процессе замачивания подтверждается и значением дыхательного коэффициента, который выше единицы (около 1,07), а через 8 ч от начала замачивания равен 1,38, т. е. наблюдается уже анаэ­робное дыхание.

При кислородном голодании образуется этиловый спирт, вредно влияющий на жизнеспособность зародыша. В таких условиях частично нарушается структура тканей и зерно легко переувлажняется. Во время последующего проращивания тре­буются длительная перестройка типа дыхания, сжигание спир­та и других метаболитов, на образование которых были затра­чены углеводы. Отсюда следует, что с самого начала замачива­ния должны быть созданы условия для нормального дыхания зерна.

При замачивании зерна одновременно с усилением дыха­ния происходит глубокая перестройка всего ферментного комплекса.

**ПРОРАЩИВАНИЕ ЗЕРНА**

Цель солодоращения — накопление ферментов, растворение межклеточных пластинок и стенок клеток эндосперма, что необ­ходимо для снабжения развивающегося зародыша питательными веществами и перехода ферментов в сусло.

Зерно проращивают в таких условиях, чтобы расход крахмала

на дыхание и образование новых вегетативных органов был ми­нимальным, при возможно меньшем обсеменении микроорга­низмами, особенно кислотообразующими.

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И ЦИТОЛИТИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЗЕРНА

При проращивании в зерне происходят процессы распада и синтеза. В эндосперме гидролизуются резервные вещества — крахмал, белки, а также пектиновые вещества, гемицеллюлозы, целлюлоза; образующиеся растворимые продукты поступают через щиток в зародыш. В результате процессов синтеза из заро­дыша вырастают стебелек и корешки.

БИОХИМИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЗЕРНА

Ферменты синтезируются в вегетативных частях растения — листьях и стеблях — и уже из них мигрируют в созревающее зерно. По исследованиям А. Н. Баха и А. И. Опарина, актив­ность ферментов в зерне вначале увеличивается, в период молоч­ной спелости достигает максимума, в период восковой спелости снижается и, наконец, во вполне созревшем зерне еле проявля­ется. При проращивании зерна активность ферментов вновь уве­личивается, достигая даже значительно большей величины, чем в период молочной спелости.

Понижение активности амилаз при созревании зерна объяс­няется связыванием их с белками. В таком, зимогенном, состоя­нии амилазы нерастворимы и потому неактивны. Активность их восстанавливается после воздействия протеаз, освобождающих амилазы из зимогена.

В созревающем зерне ячменя, ржи, пшеницы и овса при­сутствуют α- и β-амилазы, но в зрелом зерне обнаруживаются лишь следы β-амилазы. Заметное содержание свободной α-амилазы найдено в зерне ржи и овса. В пророщенном зерне всех этих культур содержание р-амилазы не превышает таковое при действии папаина на исходное зерно, т. е. р-амилаза накапли­вается в солоде в результате освобождения из зимогена. По­лагают, что ос-амилаза накапливается таким же путем и час­тично синтезируется.

Динамика изменения ферментативной активности ячменя при его проращивании (по Г. И. Фертману и А. Н. Лазаревой) показана на рис. 3. Видно, что величины *АС* и *ДС* достигают максимального значения на 10-е сутки, по другим данным, у ржи — на 7...8-е сутки. Декстринолитическая способность возрастает v овса на 10... 12-е, у

проса — на 5...6-е сутки. Исходя из этого, устанавливают и продолжи­тельность солодоращения.

**Рис. 3. График изменения фер­ментативной активности в про­растающем ячмене**

В солоде амилолитические фер­менты распределены неравномерно: в ячменном приблизительно 70 % ами­лаз локализовано в нижней части эн­досперма, прилегающей к щитку, в верхней части их около 25, в щитке 4, в стебельке и корешках 1 %.

Цитолитические ферменты в процессе проращивания зерна также активируются, и активность их возрастает до определенного времени, у ячменя — до 5...7 сут. Наибольшей активности цитазы со­ответствует переход твердого состояния мучнистого тела в рыхлое, когда эндосперм легко может быть растерт между пальцами.

Главная роль в растворении клеточных стенок принадлежит гемицеллюлазам и пектиназам. Основной составной частью ге-мицеллюлоз ячменя является β-глюкан, гидролиз которого ката­лизируется эндо-β-глюканазой. Меньшая роль принадлежит ара-бинозидазе и ксиланазе.

В зерне злаков из протеиназ содержится фермент типа папаина, из пептидаз — аминопептидазы, карбоксипептидазы и дипептидазы.

В результате действия протеиназ из зимогена освобождаются амилазы, под действием пептидаз накапливаются аминокислоты, главным образом аспарагиновая и глутаминовая. Активность протеаз возрастает в процессе солодоращения соответственно увеличению активности амилаз

Протеиназы ячменя, как и папаин, в зависимости от природы гидролизуемого белка могут проявлять свою активность при рН 3,8; 6,3 и 8,6, в соответствии с чем их подразделяют на кислые, нейтральные и щелочные. При солодоращении наибольшую ка­талитическую активность проявляют кислые протеиназы, актива­торами которых служат сульфгидрильные соединения, содержа­щие группу —Н, цистин и восстановленный глютатион. В пер­вые сутки проращивания зерна количество глютатиона значительно увеличивается, причем в зародыше более энергично, чем в эндосперме. В последующие сутки накопление глютатиона в зародыше происходит медленнее, но все время в зародыше его больше, чем в эндосперме.

Активность кислой протеиназы в продолжение солодораще­ния возрастает приблизительно в 40 раз. Пептидазная активность проявляется также сильно, но позже протеиназной.

К концу проращивания в зерне накапливаются довольно ак­тивные липаза и фосфатаза (фитаза, нуклеотидаза). Активность фосфатазы тем выше, чем ниже температура солодоращения.

По данным А. Н. Баха и А. И. Опарина, в зерне активность фер­ментов дыхания — оксидазы, пероксидазы и каталазы — выше ак­тивности гидролитических ферментов. В результате проращивания повышается активность обеих групп ферментов, но соотношение их активности резко изменяется в обратную сторону и тем сильнее, чем ниже температура. Поэтому в процессе солодоращения накапливает­ся значительное количество гидролитических ферментов при срав­нительно небольших тратах крахмала на дыхание.

ИЗМЕНЕНИЕ ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА ЗЕРНА

Несмотря на то что солодоращение протекает при сравнитель­но низких температурах, сильно отличающихся от оптимальных для действия ферментов, за время проращивания зерна происхо­дят существенные изменения его химического состава.

Наибольшие преобразования претерпевает крахмал — основ­ной резервный углевод зерна. Приблизительно 20 % от всего его количества гидролизуется: из них 8...9 % расходуется на дыхание, 3...4 % на построение стебля и корней и 8... 10 % остается в виде сахара, придающего солоду сладкий вкус.

Свободные сахара состоят главным образом из сахарозы, ин-вертного сахара и мальтозы. При температуре проращивания 15...16 °С образуются преимущественно сахароза и продукты ее гидролиза, при температуре 20...23 °С — мальтоза.

В нерастворенных гранулах крахмала при рассмотрении под микроскопом хорошо видны канальцы и повреждения поверх­ности, что является результатом действия амилаз. Размер гранул несколько уменьшается, повышается содержание амилозы, внешние цепи амилопектина укорачиваются. Температура клейс-теризации возрастает приблизительно на 4 С, а вязкость клейс­тера, наоборот, понижается.

Количество целлюлозы в зерне и солоде почти одинаково. Это объясняется тем, что наряду с растворением клеточных сте­нок эндосперма примерно такое же количество клетчатки обра­зуется в новых вегетативных органах. Количество пентозанов в солоде на 2...3 % больше, чем в исходном зерне. Большая часть пентозанов растворима в воде и состоит не только из высокомо­лекулярных продуктов гидролиза, но и из моносахаридов (ксило­зы, арабинозы).

Белковые вещества также претерпевают значительные изменения. Присуществующих способах производства спирта азотистое питание для дрожжей накапливается в основном процессе солодоращения. Некоторое количество растворимого азота образуется и при осахари­вании разваренной массы, но оно относительно невелико.

Изменения состава белковых веществ ячменя и солода харак­теризуют данные, приведенные в табл. 1. Наиболее сильному гидролизу подвергается гордеин, несколько меньшему — глюте­лин; количество альбумина и глобулина почти не изменяется. Одновременно в 4...5 раз увеличивается содержание аминокис­лот. Об их составе некоторое представление может дать анализ ячменя и пивоваренного солода.

**Содержание общего азота в зерне и солоде, %**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Белковые вещества | Ячмень | Солод |
| Гордеин Глютелин Глобулин Альбумин Протеазы Аминокислоты | 36 30 10 125 7 | 17 21 11 10 9 32 |

Общее содержание азота на протяжении всего периода соло-доращения остается практически таким же, содержание аминно­го азота резко возрастает на 6...8-е сутки, а затем темпы роста замедляются. Белки исходного ячменя гидролизуются примерно на 55 %, из которых около 23 % сосредоточивается в проростках в виде качественно иных белков.

В процессе солодоращения содержание жиров уменьшается на 10...30 %. От фосфорорганических соединений отщепляются фосфаты. Образуются продукты неполного окисления углево­дов — лимонная, щавелевая, молочная и другие органические кислоты, которые вместе с аминокислотами повышают общую кислотность, например с 1,5...2,5 мл 1 н. раствора NaOH на 100 г ячменя до 4,4...7,5 мл на 100 г солода. Однако значения рН в вытяжках из ячменя и солода вследствие буферных свойств мало различаются, но буферная емкость вытяжки из солода на 20...40 % больше.

При солодоращении освобождается инозит и возрастает со­держание других витаминов — тиамина и рибофлавина, имею­щих важное значение для жизнедеятельности и бродильной энергии дрожжей. Образуются эфиры и другие соединения, при­дающие солоду специфический запах: свежих огурцов — ячмен­ному, стручков акации, медовый или яблочный — просяному и т. д.

ИНТЕНСИФИКАЦИЯ ПРОЦЕССА СОЛОДОРАЩЕНИЯ

Для интенсификации солодоращения с сокращением срока проращивания и повышением ферментативной активности в спиртовой промышленности применяют биостимуляторы — гиб-берелловую кислоту и комплексный ферментный препарат МЭК-1.

Гибберелловую кислоту используют в виде водного раствора при поливе зеленого солода в процессе выращивания, а также при замачивании зерна перед солодоращением. При поливе рас­ход гибберелловой кислоты (в пересчете на чистое ее количест­во) — 600 мг/т (ячмень, рожь и овес) и 400 мг/т (просо). Если

эту кислоту добавляют на стадии замачивания зерна, то расход ее увеличивается и составляет 660...800 мг/т.

При использовании гибберелловой кислоты продолжитель­ность выращивания ячменного и овсяного солода 8...9 сут. Фер­ментативная активность зеленого солода, обработанного гиббе­релловой кислотой, повышается не менее чем на 15 % по срав­нению с необработанным солодом.

Для интенсификации солодоращения нормального зерна, а также при получении солода из нестандартного зерна в целях повышения прорастаемости и увеличения ферментативной ак­тивности в качестве биостимулятора кроме гибберелловой кисло­ты применяют комплексный ферментный препарат МЭК-1. Под его действием интенсифицируются процессы растворения муч­нистой части зерна, образования амилолитических ферментов при проращивании, в результате чего продолжительность солодо­ращения сокращается с 10...12 до 6...7 сут.

В комплексный ферментный препарат МЭК-1 входят Амило­субтилин Г1Ох и Амилоразин П1Ох.

Препарат МЭК-1 (мультиэнзимная композиция, тип I) пред­ставляет собой порошок светло-бежевого цвета влажностью 12...13 %. Амилолитическая активность препарата (АС) 2650 ед/г, протеолитическая (ПС) — 30 ед/г. Расход МЭК-1 составляет 50 г стандартного препарата на 1 т солодового зерна при замачива­нии. Препарат применяют в виде рабочего водного раствора (50... 100 г препарата растворяют в 10 л воды). Рабочий раствор используют не только для замачивания, но и для полива при проращивании из расчета 200 л на I т солодового ячменя.

Повышение ферментативной активности солода с помощью биостимуляторов при уменьшении общей продолжительности проращивания способствует сокращению удельных потерь крах­мала.

**ПРИГОТОВЛЕНИЕ СОЛОДОВОГО МОЛОКА**

Готовый солод, направляемый в производство, учитывают по массе или объему. Лучший способ его подачи — гидравлический: он удобен, солод хорошо промывается водой и очищается от микроорганизмов. Недостатки гидроподачи — большой расход воды (около 1000 % массы солода) и потеря части отломанных корешков со сточной водой.

Солод вместе с водой насосом перекачивается на барабанное разделительное сито, транспортная вода проходит через улови­тель корешков, а солод направляется в дробилку и далее в бак для приготовления солодового молока. Чтобы улучшить доступ ферментов к разваренной массе сырья, солод измельчают на молотковых, дисковых или вальцовых дробилках. Более тщатель­ное измельчение достигается на дисковых дробилках.

Рабочий орган дисковой дробилки — два вертикальных сталь­ных диска, из которых один установлен неподвижно, другой вращается с частотой 750 об/мин. Зубья дисков поставлены так, что зуб одного диска входит в выемку между зубьями второго, образуя бороздки, по которым солод проходит от центра к пери­ферии дисков. Расстояние между зубьями дисков регулируется с помощью специального приспособления, расположенного между поддерживающими вал подшипниками и состоящего из коробки и двух регулирующих маховичков. В некоторых конструкциях дисковых дробилок для лучшего измельчения солода предусмот­рена многократная циркуляция его между дисками дробилки и баком. В таких циркуляционных дробилках корпус улиткообраз­ный, а зубья привариваются тангенциально.

Для дезинфекции солода при гидротранспортировании в транспортную воду добавляют хлорную известь или хлорамин ХБ технический. Раствор хлорной извести готовят из расчета 400 мг активного хлора на 1 л воды. Например, хлорной извести марки Б II сорта, содержащей не менее 32 % активного хлора, берут 125 г на 100 л воды. В воде с указанной концентрацией активно­го хлора солод выдерживают 25...30 мин.

При подаче ленточным транспортером или ковшовым элева­тором солод обрабатывают в течение 25...30 мин в сборнике с мешалкой водным раствором хлорной извести, который затек спускают в канализацию. При отсутствии хлорной извести ис­пользуют формалин из расчета 2,8 л 30 %-ного формальдегида на 1 м3 воды.

Тонкоизмельченный солод дополнительно обрабатывают фор­малином в сборнике с мешалкой. В этой емкости солод смеши­вают с водой в соотношении 1:(2...2,5), после чего в солодовое молоко (на 1 м3) приливают 25...28 мл 37 %-ного раствора фор­малина с таким расчетом, чтобы концентрация его в сусле со­ставляла 0,025 %. Раствор выдерживают в течение 25...30 мин, разбавляют чистой водой и перекачивают в расходный сборник. Общий расход воды 4...5 л на 1 кг солода.

Для осахаривания зерно-картофельного крахмала применяют смесь ячменного (50 %), просяного (25 *%)* и овсяного (25 %) солодов, причем общее содержание просяного и овсяного соло-дов должно быть не менее 30 %. Можно использовать смесь из двух солодов: ячменного и овсяного или просяного. Ячменный солод можно заменить ржаным полностью или частично, а про­сяной — солодом из чумизы. Запрещается применять солод из одной культуры, например ячменя, при производстве спирта из зерна той же культуры.

При осахаривании разваренной массы смесью солодов, состоя­щей, например, из 70 % ячменного и 30 % просяного солодов, с нерастворенным крахмалом в бражке теряется до 20...40 % крахма­ла солода, так как крахмала ячменного солода растворяется

60...64 %, просяного — 24 %. При проращивании на солод не­стандартного зерна, имеющего пониженную прорастаемость, эти потери могут быть значительными только за счет непроросших зерен.

**ПОЛУЧЕНИЕ МИКРОБНЫХ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ**

Микроорганизмы способны синтезировать разнообразные ферменты. В зависимости от состава питательной среды и усло­вий культивирования они легко переключаются с синтеза одного фермента на синтез другого. У микроорганизмов сравнительно короткий цикл развития (10... 100 ч), вследствие чего можно по­лучать сотни «урожаев» в год.

Продуцентами ферментов могут быть бактерии, грибы, дрож­жи и актиномицеты. Для промышленного получения фермент­ных препаратов используют как природные штаммы микроорга­низмов, выделенные из естественных сред, так и мутантные,

отселекционированные в результате воздействия на природные штаммы физических и химических мутагенов.

Микроорганизмы синтезируют одновременно комплекс фер­ментов, но некоторые из них, особенно мутантные штаммы, продуцируют один фермент в значительных количествах. Для лучшего использования крахмалсодержащего сырья в спиртовом производстве осахаривающие материалы должны содержать не только амилолитические ферменты, но и ферменты, гидролизую­щие другие углеводы сырья — целлюлозу и гемицеллюлозы. Для обеспечения дрожжей азотистым питанием имеют значение и протеолитические ферменты.

Несмотря на то, что для успешного осахаривания нужен ком­плекс ферментов, отбор микроорганизмов-продуцентов до сих пор проводился главным образом по высокой активности амило­литических ферментов — α-амилазы и глюкоамилазы.

 **МИКРООРГАНИЗМЫ - ПРОДУЦЕНТЫ ФЕРМЕНТОВ**

Наиболее часто в качестве продуцентов амилолитических фер­ментов в спиртовом производстве используют микроскопические грибы, реже — дрожжеподобные организмы и споровые бактерии.

**МИКРОСКОПИЧЕСКИЕ ГРИБЫ**

Для получения амилаз широко применяют микроскопические грибы рода Aspergillus, видов: niger, oryzae, usamii, awamori, bata-tae, рода Rhizopus, видов: delemar, tonkinensis, niveus, japonicum и др., а также отдельные штаммы Neurospora grassa и Mucor.

Микроскопические грибы очень широко распространены в природе; основное место их обитания — почва. Несмотря на на­личие многих родов и видов микроскопических грибов, все они характеризуются нитевидным строением тела и специфическим строением плодоносящих органов. Тело гриба состоит из длин­ных переплетенных нитей сероватого или белого цвета, называе­мых гифами. Они распространяются по поверхности питательно­го субстрата, образуя мицелий, и частично врастают в него. Некоторые гифы, поднимающиеся над поверхностью в виде лег­кого пушка, имеют более сложное строение и представляют собой органы плодоношения, называемые конидие- или спорангиеносцами. У мукоровых грибов на конце спорангиеносца нахо­дится шаровидное вздутие, окруженное оболочкой, внутри кото­рого образуются споры. У аспергиллов конец конидиеносца имеет булавовидное утолщение, от которого отходят удлиненные клетки, называемые стеригмами; от стеригм отшнуровываются более мелкие круглые клетки — конидии.

Отделившиеся конидии или споры, попадая в благоприятные условия, начинают прорастать, затем гифы ветвятся, образуя ми-

целий; при истощении питательных веществ в среде гриб пере­ходит в стадию споро- или конидиеобразования. Споры и кони­дии микроскопических грибов содержат пигменты, что и придает зрелым культурам характерную окраску.

Аспергиллы — типичные аэрофилы, поэтому они могут раз­виваться только на поверхности твердой или жидкой среды или в жидкой, достаточно аэрируемой среде. Оптимальная температура для большинства аспергиллов 25...30 "С, для неко­торых — до 35 °С. Большинство грибов при поверхностном культивировании могут переносить кратковременное повыше­ние температуры до 40 °С и даже 45 °С без заметной потери активности ферментов. Оптимальная влажность среды для них около 65 %.

Для питания аспергиллов необходимы углеводы, азотистые и минеральные вещества. В качестве источника углевода, кроме моносахаридов, многих олиго- и полисахаридов, могут служить спирты и органические кислоты, однако для накопления ами­лазы в среде обязательно должны присутствовать крахмал, дек­стрины или мальтоза. В средах, содержащих другие сахара, в том числе глюкозу, грибы не образуют амилазы. Источником азота могут быть белки и их гидролизаты, аммонийные соли и нитраты.

Среда должна содержать соединения, в состав которых входят сера, фосфор, калий, магний и микроэлементы. Большинство микроскопических грибов усваивают серу из сульфатов, а фос­фор — из фосфатов. Аспергиллы не нуждаются в готовых вита-

минах и факторах роста, так как способны сами синтезировать их из более простых соединений, имеющихся в среде. Препараты ферментов из микроскопических грибов включают, как правило, широкий набор ферментов, поэтому могут полностью заменять зерновой солод.

На спиртовых заводах стали широко применять высокоактив­ный по глюкоамилазе штамм Asp. awamori 466 и ВУД-Т2, выра­щиваемые на концентрированном кукурузном сусле (18 % сухих веществ). Готовая культура имеет активность до 250 ед. ГлА на 1 мл, других ферментов образует мало.

**ДРОЖЖЕПОДОБНЫЕ ОРГАНИЗМЫ**

Амилолитические ферменты синтезируют также некоторые дрожжи и дрожжеподобные грибы родов Saccharomyces, Candida, Endomycopsis и Endomyces.

В спиртовом производстве нашли применение End. bispora и End. species 20-9, выращиваемые глубинным способом и проду­цирующие главным образом активную глюкоамилазу; ос-амилаз-ная активность проявляется слабо. Высокоактивный End. bispora имеет разветвленный мицелий, образует бластоспоры; гифы — септированные, зернистые; на твердых агаризованных средах об­разуют колонии с воздушным серовато-белым мицелием, на жидких питательных средах — гифы и некоторое количество бластоспор.

Дрожжеподобные грибы в спиртовом производстве самостоя­тельно не применяют, так как они не содержат других фермен­тов, необходимых для нормального осахаривания сусла из крах-малсодержащего сырья. Обычно их используют в смеси с фер­ментными препаратами из микроскопических грибов или бактерий.

**БАКТЕРИИ**

Активные амилазы способны синтезировать многие бактерии: Вас. subtilis, Вас. diastaticus, Вас. mesentericus, Вас. macerans и Вас. polymycus и др.

Бактерии — продуценты амилолитических ферментов пред­ставляют собой палочки длиной 1,2...1,3 мкм и диаметром 0,6...0,8 мкм. Палочки соединяются по две, три, иногда образуют цепочки. Цикл развития бактерий короче, чем микроскопичес­ких и дрожжеподобных грибов. Например, культуру Вас. dias­taticus выращивают в глубинных условиях при температуре 60 °С в течение 10... 12 ч.

Бактерию Вас. subtilis-82, применяемую в настоящее время на спиртовых заводах как продуцент α-амилазы в смеси с препара-

тами глюкоамилазы, выращивают в течение 48...60 ч при темпе­ратуре 30...35 *'С.*

Особенность бактерий — их способность образовывать высо­коактивную термостойкую α-амилазу, необходимую для разжи­жения и декстринизации крахмального клейстера на стадии под-варивания замесов и осахаривания сусла.

**ПРОИЗВОДСТВЕННЫЕ СПОСОБЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ - ПРОДУЦЕНТОВ ФЕРМЕНТОВ**

Существует два способа культивирования микроорганизмов — продуцентов ферментов: поверхностный и глубинный.

Первый способ, применяемый для культивирования микро­скопических грибов, характеризуется развитием мицелия на по­верхности твердого или жидкого субстрата. На жидком субстрате образуется пленка мицелия, продуцирующего не только амило­литические ферменты, но и органические кислоты, инактиви-рующие их, поэтому используют твердые субстраты с развитой поверхностью — пшеничные отруби, дробину барды, картофель­ную мезгу и др.

Максимальная активность ферментов достигается при культи­вировании грибов на пшеничных отрубях. Дробина барды бедна питательными веществами, и активность ферментов в культурах грибов, выращенных на ней, в 4...5 раз ниже, чем на отрубях. Зрелая культура грибов вследствие обволакивания частиц отру­бей мицелием имеет вид плотной войлокообразной массы.

При поверхностном культивировании пшеничные отруби должны быть увлажнены и простерилизованы. В стерильных ус­ловиях готовят посевную культуру, но выращивают грибы в не­стерильных условиях в кюветах, устанавливаемых в негерметич­ных растильных камерах. Теплоту, выделяющуюся в процессе роста грибов, удаляют продуванием через растильную камеру стерильного кондиционированного воздуха.

Поверхностный способ выращивания микроскопических гри­бов имеет ряд преимуществ. Так как во время роста гриба отруби не перемешиваются, посторонние микроорганизмы не распро­страняются по всей их массе и вызывают лишь незначительное местное инфицирование, которое, как правило, не влияет на активность ферментов. Это, однако, не исключает необходимос­ти тщательной стерилизации воздуха, среды и оборудования. Культуру на отрубях высушивают до содержания влаги 10... 11 %. В таком виде она может храниться продолжительное время без значительной потери активности. Это позволяет организовать централизованное снабжение спиртовых заводов сухой культурой микроскопических грибов, что является одним из преимуществ поверхностного способа выращивания.

Недостаток поверхностного способа — необходимость уста­навливать множество кювет, работу с которыми трудно механи­зировать. Себестоимость культуры гриба-продуцента высока,

причем в основном из-за затраты большого количества ручного труда. Механизация процесса выращивания возможна путем со­здания непрерывнодействующих установок или бескюветных ап­паратов с вертикальным толстым слоем питательной среды и интенсивным продуванием воздуха через этот слой.

Глубинную культуру микроорганизмов выращивают на жид­кой питательной среде при энергичной аэрации в герметически закрытых аппаратах и в стерильных условиях. Процесс полнос­тью механизирован. Стерильность глубинной культуры микроор­ганизма — продуцента ферментов положительно отражается на результатах сбраживания сусла дрожжами.

ПОВЕРХНОСТНОЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИКРОСКОПИЧЕСКИХ

ГРИБОВ

**Питательные среды.** При поверхностном культивировании твердой средой обычно служат пшеничные отруби, содержащие в достаточных количествах все вещества, необходимые для пита­ния грибов. Лучшие результаты достигаются при содержании не менее 16 % крахмала в отрубях или в другой питательной среде.

**Получение посевного материала.** Для засева производственной питательной среды может быть использован посевной материал трех видов: споры, мицелий и спороносящая культура, выращен­ная на твердой питательной среде.

Споровый материал готовят поверхностным культивировани­ем гриба на твердой или жидкой питательной среде в специаль­ных аппаратах с кюветами. В первом случае гриб выращивают в пробирке на косом агаре до обильного образования спор, затем спорами засевают колбы со стерильными пшеничными отрубя­ми, наконец, спороносящую культуру передают в специальный аппарат. По окончании спорообразования в этом аппарате отби­рают споры посредством специального вибросепаратора при тщательной аспирации. Споры фасуют в полиэтиленовые ме­шочки, стеклянные или дюралюминиевые банки, в которых они могут сохраняться при температуре от 8 до 24 °С около 1,5 лет.

Во втором случае из спор, собранных в пробирке с косым агаром, готовят водную суспензию и ею засевают жидкую пита­тельную среду, которую направляют в растильный аппарат. Из-под выросшей спороносящей пленки удаляют жидкую среду, пленку подсушивают, снимают с кювет, измельчают и упаковы­вают. Готовый споровый материал не содержит примеси среды и обладает высокой всхожестью (90...95 %), которая сохраняется свыше 3 лет.

Споры (конидии), полученные любым методом, обладают во­доотталкивающей способностью и почти не смачиваются водой. Это свойство приводит к неравномерности засева среды и, сле­довательно, к неодинаковой скорости роста культуры. Смачивае-

мость спор можно улучшить, если добавить в их водную суспен­зию 25...50 мг поверхностно-активного вещества, например ал-килбензолсульфата на 1 г спорового материала. При этом всхо­жесть спор остается без изменения.

Для сокращения длительности культивирования микроскопи­ческих грибов в производственных условиях можно применять предварительное проращивание спор в течение 7 ч в жидкой питательной среде до появления ростовых трубочек. При этом продолжительность лаг-фазы сокращается на 8...9 ч и увеличива­ется оборачиваемость растильных камер.

При использовании спорового материала упрощается техноло­гический процесс, появляется возможность более полно механи­зировать его, а также сократить площадь цеха чистой культуры. Централизованное производство спорового материала для груп­пы предприятий, работающих с данным штаммом гриба, выгод­но создать в одном специализированном цехе чистой культуры. Положительный опыт подобной организации имеется в произ­водстве лимонной кислоты биотехнологическим способом.

Исследователями б. ВНИИПрБ было предложено засевать производственную питательную среду мицелием, полученным глубинным культивированием гриба или бактерий в колбах на качалке. При высокой производительности предприятия целесо­образно выращивать посевной мицелий в небольших ферменте­рах, как это было предложено А. П. Левчиком и осуществлялось на Мичуринском экспериментальном ферментно-спиртовом за­воде.

На спиртовых заводах получило распространение приготовле­ние посевного материала в виде поверхностной культуры гриба на пшеничных отрубях, которое складывается из следующих двух операций:

1. выращивание спороносной культуры гриба в пробирках на сусло-агаре;
2. засев спорами пшеничных отрубей в колбах и выращивание культуры гриба.

Культуру получают из лаборатории чистых культур ВНИИПрБ. Исходная — музейная чистая культура хранится в холодильнике при температуре от 2 до 4 °С. Один раз в месяц пересевают споры музейной культуры из пробирки в пробирку с сусло-агаром с соблюдением правил проведения микробиологических работ. При этом первая засеянная пробирка является музейной, а остальные две-три пробирки используют для дальнейшего размножения. За­сеянные пробирки помещают в термостат при температуре 30 °С и выдерживают в нем в течение 4...6 сут.

При нормальном росте поверхность сусло-агара равномерно покрывается спороносящим мицелием. Культура гриба с плохим спороношением, медленно растущим мицелием, пушком вторич­ного роста в производство не допускается. Пробирки с вырос-

шей культурой вынимают из термостата и хранят в холодильни­ке. Перед посевом в колбы проверяют чистоту культуры высевом в чашки Петри и микроскопированием.

Чистая культура на сусло-агаре служит исходным материалом для размножения грибов на пшеничных отрубях в колбах. Отру­би смешивают с водопроводной водой в соотношении 1:0,7 и переносят в несколько колб по 10...20 г в каждую. Колбы закры­вают ватными пробками и стерилизуют в автоклаве при избыточ­ном давлении 0,15 МПа в течение 1 ч. После охлаждения до комнатной температуры в колбы вносят суспензию спор гриба, содержащую 150...200 тыс. спор в 1 мл. Для этого в пробирку с культурой гриба на сусло-агаре прибавляют 10 мл стерильной водопроводной воды и при помощи стерильной пипетки над огнем соскабливают конидии гриба. Полученную суспензию ис­пользуют для посева (2...2,5 % массы засеваемой среды или 0,4...0,5 мл на 10 г отрубей).

Выращивание ведут в термостате при температуре 30 °С в течение 4...5 сут. Одну из колб предназначают для дальнейшего размножения чистой культуры, остальные колбы хранят в холо­дильнике до последующего цикла. В колбу, используемую для размножения, вливают 50...60 мл стерильной водопроводной воды и над пламенем стерильной пипеткой тщательно переме­шивают.

Расход чистой культуры при пересеве из колбы в колбу или банку составляет 5... 10 % массы засеваемой среды.

**Размножение посевного материала.** Пшеничные отруби подго­тавливают так же, как и при получении чистой культуры. Отру­би, стерилизованные в бюксах под избыточным давлением 0,15 МПа в течение 1,5 ч, переносят на специальный стол, пред­варительно вымытый и продезинфицированный. Охлаждение от­рубей до температуры 40...42 "С проводят перемешиванием с со­блюдением правил микробиологической чистоты. Затем их засе­вают спорами из колбы с чистой культурой (расход культуры 0,5... 1 % массы отрубей). Суспензию спор готовят из расчета 1 часть культуры на 5 частей воды. Засеянные отруби распределя­ют по кюветам, предварительно простерилизованным при 120 °С в течение 2 ч, слоем толщиной 2...2,5 см. Кюветы сверху закры­вают крышкой, под которую подкладывают стерильную бумагу; на отверстие по центру крышки накладывают стерилизованную ватную подушку, после чего кюветы помещают в термостат на 18...24 ч при температуре 30...32 "С. В дальнейшем кюветы уста­навливают на стеллажи, расположенные в самой растильной ка­мере, и ведут выращивание при 24...28 °С в течение 3...4 сут. Выросшую культуру затем помещают в комнату подсушки и в воздушно-сухом состоянии передают на хранение в кладовую, температура в которой не должна превышать +8 °С, но не ниже 0°С.

Посевной материал, приготовленный описанным способом, представляет собой спороносную культуру гриба, содержащую не менее 0,7 млрд спор в 1 г, из которых 86...90 % способны к прорастанию. Посевной материал не должен содержать посто­ронней микрофлоры, подвергаться замораживанию, оттаиванию и увлажнению.

**Производственное культивирование.** Технологическая схема получения культуры микроскопических грибов в растильных ка­мерах на кюветах приведена на рис, 4. Этот способ связан с большими затратами ручного труда, однако пока применяется на заводах.

Пшеничные отруби ковшовым элеватором / подают на авто­матические весы *2,* отсюда они поступают в загрузочный бункер *3,* а из него — в стерилизатор *5.* В этом аппарате отруби увлаж­няются водой, подаваемой через форсунки из бака *4* для сте­рильной воды. На 1 кг отрубей добавляют 0,2 л воды и 7...8 мл соляной кислоты относительной плотностью 1,19 или 2,7...3,0 мл серной кислоты плотностью 1,84. Отруби стерилизуют острым паром при температуре 103... 105 "С (давление 0,07 МПа) в тече­ние 1...1,5 ч, периодически включая мешалку. По окончании стерилизации влажность отрубей доводят до 58...60 %, охлаждают их до 40...42 °С и затем вносят культуру гриба, полученную в отделении чистых культур.

Расход посевного подсушенного материала составляет 0,5...0,6 % массы отрубей. Посевной материал вводят в виде водной суспензии, приготовляемой из культуры гриба в 5... 10-кратном количестве кипяченой воды.

**Рис. 4. Технологическая схема получения культуры микроскопических грибов в**

**камерах на кюветах**

Засеянную среду тщательно перемешивают в течение 15...20 мин, выгружают на раскладочный стол *6* и распределяют по кюветам. Наполненные кюветы ставят в этажерки 7, перево­зят их на тележках в растильную камеру *8,* в которой поддержи­вают температуру 30...32 °С в течение 12... 16 ч (до начала интен­сивного роста). В дальнейшем из кондиционера *9* в камеру пода­ют вентилятором кондиционированный воздух температурой 26...28 °С и относительной влажностью 96...100 %. К концу вы­ращивания культуры температуру снижают до 24...26 °С. Общая продолжительность выращивания 36...42 ч. В тех случаях, когда использование готовой культуры для осахаривания разваренной массы задерживается более чем на 2 ч, ее высушивают до влаж­ности 18...20 %.

При необходимости транспортировки на дальние расстояния культуру гриба дробят на шнеке-дробилке *10* и дезинтеграторе *11* до получения частиц размером не более 10 мм и высушивают в сушилке *18* теплым воздухом до содержания влаги не более 10... 12 *%.* Воздух нагревают в калорифере *20* и подают в сушилку вентилятором *19.* Отработавший воздух удаляют вентилятором *17* и выбрасывают в атмосферу через циклон *14.* Высушенную культу­ру шнеком *16* подают на весы 75 для фасования. Сюда же подают­ся уловленные в циклоне частички культуры, унесенные воздухом. Освободившиеся кюветы проходят через мойку *12,* обеспложива­ются в стерилизаторе *13* и возвращаются под загрузку.

Готовую культуру гриба упаковывают в бумажные крафт-мешки. Каждый мешок снабжают этикеткой или биркой с указа­нием завода-изготовителя, наименования продукта, даты выпус­ка, номера партии, активности ферментов и массы. Хранят куль­туру в сухом помещении на деревянных стеллажах.

Предложены технологические схемы производства поверх­ностных культур плесневых грибов с использованием механизи­рованных растильных установок: с вертикальными каналами (ус­тановка была смонтирована на Мичуринском эксперименталь­ном заводе и может быть использована на предприятиях средней мощности — до 2 т культуры гриба в сутки); непрерывнодейст-вующей конвейерно-пластинчатой, предназначенной для специа­лизированных ферментных предприятий мощностью более 2 т культуры в сутки.

ГЛУБИННОЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ

При глубинном культивировании микроорганизмы развивают­ся во всем объеме жидкой питательной среды. Так как подав­ляющее большинство продуцентов ферментов — строгие аэробы, среду интенсивно аэрируют. В микроорганизмах протекают два связанных процесса — синтез биомассы и синтез ферментов.

**Питательные среды.** Для глубинного культивирования используют жидкие среды, содержащие твердые компоненты. При ра­боте с комплексными средами, основанными на естественном сырье с добавлением отрубей, ростков, кукурузного жмыха, глю-тена, свекловичного жома, спиртовой барды, следят за тем, чтобы не было крупных комочков, так как они затрудняют сте­рилизацию и могут привести к закупорке коммуникаций. Поэто­му перед смешением твердых компонентов необходимо прово­дить их просеивание или грубую фильтрацию (например, зерно-картофельной барды).

Жидкую часть питательной среды (воду или фильтрат барды) обогащают питательными солями, гидролизатами белков, амино­кислотами, источниками витаминов, различными углеводами. Содержание сухих веществ в жидких средах может колебаться от 1,5 до 20 % в зависимости от продуцента и принятого режима культивирования.

В научно-исследовательских организациях постоянно прово­дится работа по улучшению эффективности производства фер­ментных препаратов, в основном по повышению активности, зрелой культуры. Это достигается не только селекцией штаммов микроорганизмов, но и совершенствованием условий культиви­рования, в том числе и изменением состава питательной среды, поэтому приведенные среды могут подвергаться значительным изменениям при корректировании аэрации и других условий культивирования.

**Получение и размножение посевного материала.** Для засева производственной питательной среды при глубинном культиви­ровании посевной материал готовят глубинным или поверхност­ным способом. Вид посевного материала зависит от продуцента:

для грибов это вегетативная мицелиальная масса или споронося-щая поверхностная, для бактерий — молодая растущая культура на начальной стадии спорообразования.

Посевной материал получают постадийным увеличением массы культуры продуцента. При небольшой производительнос­ти цеха это сводится к одной или двум операциям, а для заводов большой производительности представляет собой многоступен­чатый процесс.

В связи с вводом штаммов микроскопического гриба Asp. awamori 466 или ВУД Т-2 усовершенствована и значительно упрощена схема приготовления спорового взамен вегетативного посевного материала. В простейшем виде она выглядит следую­щим образом. Пробирку с исходной культурой на агаризованной питательной среде пересевают водной суспензией в колбы со стерильными отрубями, которые выдерживают в термостате до полного созревания культуры. Из колб посевной материал в виде водной суспензии спор пересевается непосредственно в произ­водственный ферментер, минуя инокулятор. В зависимости от объема ферментера количество посевных колб увеличивают в 2..4 раза. Спорового посевного материала вполне хватает для того, чтобы вырастить достаточно активную культуру при обычной продолжительности процесса. При этом получаются большой выигрыш в трудоемкости операций и более надежная защита от инфекции, так как в 2 раза сокращаются число операций и продолжительность выращивания посевного материала.

Культивирование на всех стадиях должно проводиться при оптимальной температуре, аэрации и строго определенное время. Если возникают непредвиденные задержки в использовании, то

посевной материал охлаждают до 8... 10 °С и хранят не дольше 4 ч, иначе качество его может резко ухудшиться.

Посевной материал как на отдельных стадиях, так и готовый подвергают тщательному микробиологическому контролю. Он не должен быть инфицирован посторонней микрофлорой, в нем должно содержаться определенное количество спор или клеток на единицу массы, генетически заложенные в нем свойства про­дуцировать ферменты должны стойко сохраняться.

**Производственное культивирование.** Известны следующие спо­собы глубинного культивирования: периодический, непрерывно-циклический и непрерывно-проточный.

*Периодический способ* характеризуется несменяе­мостью питательной среды в ферментере, состав которой в про­цессе развития постепенно изменяется. Процесс протекает по-стадийно: в ферментер набирают питательную среду и задают посевной материал; после размножения микроорганизмов и на­копления продуктов их обмена зрелую культуру выгружают, а все оборудование, коммуникации и запорные устройства промыва­ют, а затем стерилизуют паром.

При *непрерывноциклическом способе* микро­организмы, расположенные на неподвижной насадке в фермен­тере, омываются средой, протекающей в замкнутом контуре, до полного потребления ими питательных веществ. После этого зрелую культуру выгружают, начиная с последнего, аппараты промывают, стерилизуют и цикл повторяют с последнего голов­ного ферментера. Богатая питательными веществами среда в ходе такой циклической ферментации постепенно истощается; по времени пребывания среды в зоне реакции этот процесс более продолжителен, чем периодический.

*Непрерывно-проточный* способ культивирова­ния микроорганизмов более совершенен. Суть его заключается в том, что микробная популяция развивается в проточной пита­тельной среде. Способ имеет две разновидности: гомогенно-не­прерывный и градиентно-непрерывный. В первом случае выра­щивание ведут в одном ферментере; при тщательном перемеши­вании среды и аэрации обеспечивается одинаковое состояние культуры во всем объеме жидкости. В ферментер при этом не­прерывно поступает свежая среда, а из него также непрерывно вытекает избыток зрелой культуральной жидкости.

Градиентно-непрерывное культивирование осуществляют в батарее ферментеров, соединенных переточными трубами. Засе­янная среда с большим содержанием углеводов и других ингре­диентов непрерывно перетекает из одного ферментера в другой и также непрерывно вытекает в виде готовой культуры.

Непрерывным культивированием в проточных средах можно выращивать микроорганизмы в условиях, оптимальных для их стадии развития. При этом такие важные факторы, как концент-

рация питательных веществ, количество продуктов обмена, рН, содержание растворенного кислорода, резко изменяющиеся при периодическом способе культивирования, поддерживаются по­стоянными на заданном уровне или изменяются по разработан­ной программе.

Способы непрерывного культивирования в производстве фер­ментных препаратов для спиртового производства еще находятся в стадии производственных испытаний. Поэтому, к сожалению, в настоящее время на заводах до сих пор применяют периоди­ческое культивирование микроорганизмов.

**КОНЦЕНТРИРОВАНИЕ ФЕРМЕНТНЫХ РАСТВОРОВ**

Глубинные культуры микроскопических грибов в жидком виде не могут сохраняться длительный срок без потери актив­ности, перевозить их на большие расстояния вследствие значи­тельного содержания в них воды (до 85...90 %) также экономи­чески не всегда оправдано. Поэтому при организации снабжения культурой спиртовых заводов целесообразно ее предварительно концентрировать.

Концентрирование культур можно осуществлять на вакуум-выпарных установках с получением сиропов при температурах, обеспечивающих сохранение ферментов, или на распылительных сушилках с получением порошкообразного ферментного пре­парата. Однако эти способы сопровождаются значительными по­терями активности (до 50 %) и поэтому не нашли распростране­ния на спиртовых заводах. Начиная с семидесятых годов во ВНИИПрБТ был разработан и внедрен на Мичуринском экспе-

риментальном заводе способ концентрирования глубинных куль­тур ультрафильтрацией.

Способ основан на проведении процесса фильтрации через ряд полупроницаемых мембран, в результате чего ферменты и другие высокомолекулярные вещества задерживаются или выво­дятся из аппарата в виде ультраконцентрата (концентрированно­го сиропа). Вода и часть низкомолекулярных веществ (пермеат) проходят через мембраны и также удаляются.

Потери активности при ультрафильтрации составляют до 15 % в пересчете на первоначальную активность исходной освет­ленной культуральной жидкости.

При использовании концентрированных препаратов на стан­ции осахаривания применяют обычное оборудование для дозиро­вания ферментных осахаривающих материалов.

**ПОДГОТОВКА КУЛЬТУР МИКРООРГАНИЗМОВ**

**К ПРИМЕНЕНИЮ ДЛЯ ОСАХАРИВАНИЯ РАЗВАРЕННОЙ МАССЫ**

При замене солода глубинной культурой микроскопических грибов в ферментер по окончании ферментации при тщательном перемешивании добавляют 40%-ный раствор формалина из рас­чета 2 л на 1 м3 культуральной жидкости. После этого культуру перекачивают насосом в расходные баки, из которых она через дозатор непрерывно поступает в осахариватель.

При замене солода сухой поверхностной культурой микроско­пических грибов или смесью культур их взвешивают, смачивают водой в соотношении 1:1 и тщательно измельчают на дробилках, применяемых для дробления солода. Измельченную массу на­правляют в сборники и смешивают с теплой водой (28...30 °С) из расчета 3...4 л на 1 кг исходной культуры. Для стерилизации приливают 20...25 мл 40%-ного раствора формалина на 1 дал суспензии, тщательно перемешивают 15...20 мин, после чего вы­держивают в течение 20...30 мин и передают в расходные баки.

Если применяют смесь поверхностной культуры микроскопи­ческих грибов и солода, например Asp. awamori или Asp. oryzae и

ячменного или ржаного солода, то их Дробят вместе и приготав­ливают водную суспензию так же, как солодовое молоко.

Расход поверхностной культуры, удовлетворяющей требовани­ям стандарта, определяемый по/массе крахмала зерна и картофе­ля, включая крахмал, в культуре препарата, составляет 5 %, в том числе Глюкаваморина П — 4 %, Амилоризина П — 1 %; при использовании смеси солода и поверхностной культуры: на крах­мал картофеля и зерна — 4 % солода и 2 % Глюкаваморина П или 4 % солода и 3 % Амилоризина.

Расход глубинной культуры микроорганизмов, а также кон­центрированных препаратов на осахаривание рассчитывают по их активности.

Ниже приведен пример с культурой Asp. awamori 466. Эта культура имеет незначительное количество а-амилазы, поэтому ее необходимо применять в смеси с другими источниками а-амилазы. Например, при полной замене солода Глюкаваморином Гх и Амилосубтилином Гх расход ферментов рассчитывают, ис­ходя из норм расхода ферментов в единицах активности на 1 г перерабатываемого крахмала сырья. Причем этот расход изменя­ется в зависимости от принятой продолжительности брожения.

Так, при 72-часовом брожении расход α-амилазы должен со­ставлять 1,5...2 ед. АС, глюкоамилазы — 6 ед. на 1 г крахмала. При 48-часовом брожении расход α-амилазы остается неизмен­ным, а глюкоамилазы увеличивается до 15 ед. ГлА на 1 г крахма­ла. При этом достигаются равные показатели выбраживания.

Аналогично рассчитывают расход и других препаратов мик­роорганизмов — источников α-амилазы. Препарат α-амилазы ре­комендуется подавать в две точки технологической схемы: 0,5 ед АС — на разжижение подвариваемой массы в предразварник и 1 ед. АС на 1 г крахмала — в осахариватель вместе с глюкоами­лазой.

Если препарат α-амилазы содержит и другие амилолитические ферменты, в частности глюкоамилазу, то следует их учитывать и соответственно сокращать расход Глюкаваморина.

Так как активность Глюкаваморина Гх, ВУД Т-2 может быть очень высокой (100...250 ед/мл), то для лучшего дозирования его рекомендуется разбавлять водой из расчета 4...8 м3 на 1 м3 препарата.

 Препарат Глюкаваморин можно применять и в смеси с соло­дом. В этом случае в зависимости от расхода солода рассчитыва­ют и расход препарата в единицах ГлА на 1 г крахмала. Так, при 72-часовом брожении и расходе зерна на солод 5 % массы пере­рабатываемого крахмала необходимо 4 ед. ГлА на 1 г крахмала.