На правах рукописи

ФИЛИППОВА НАДЕЖДА КОНСТАНТИНОВНА

АЭРОБНОЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ЧИСТОЙ КУЛЬТУРЫ СПИРТОВЫХ ДРОЖЖЕЙ

03.00.23 - Биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата технических наук

Казань - 2004

Работа выполнена на кафедре химической кибернетики Казанского государственного технологического университета

Научные руководители: доктор технических наук, профессор
Емельянов Виктор Михайлович

Официальные оппоненты: доктор технических наук, профессор
Шатифуллин Вилен Насибович

доктор биологических наук, профессор
Багаева Татьяна Вадимовна

Ведущая организация: Российский химико-технологический университет
им. Д И. Менделеева

Защита диссертации состоится 22 декабря 2004 г. в 14.00 часов на заседании специализированного совета Д 212.080.02 при Казанском государственном технологическом университете по адресу: 420015, г. Казань, ул. К. Маркса, 68 (зал заседаний Ученого совета, А-330)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Казанского государственного технологического университета

Автореферат разослан «19» ноября 2004 г.

Ученый секретарь
специализированного совета
доктор технических наук А.С. Сироткин

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Анализ ситуации на мировом рынке показывает, что при существующей технологии российский спирт не сможет составить конкуренцию без улучшения качества продукции и повышения рентабельности производства. В условиях рыночной экономики перед спиртовой отраслью стоят сложные задачи, в первую очередь, это снижение себестоимости продукции за счет создания и внедрения принципиально новых современных ресурсосберегающих технологий, обеспечивающих увеличение выпуска этанола при максимальной степени утилизации крахмалистого сырья и отходов производства, разработки новых способов интенсификации процессов дрожжегенерации, брожения и соответствующей реконструкции предприятий отрасли.

Назрела необходимость совершенствования действующих технологических схем, имеющих комплекс недостатков, основными из которых являются низкая засевная плотность дрожжевой культуры и высокая вероятность заражения посевного материала посторонней микрофлорой, что существенно влияет на протекание процесса брожения, выход и качество спирта.

Одним из направлений решения задачи модернизации спиртового производства является интенсификация процесса наращивания чистой культуры спиртовых дрожжей с высокой концентрацией клеток.

Интенсификация процессов дрожжегенерации, поддержание культуры спиртовых дрожжей в активном состоянии с высокой плотностью дрожжевой популяции позволит повысить эффективность спиртового производства, ускорить процессы разбраживания и главного брожения сусла, сократить потери спирта и сырья.

В связи с этим представляется перспективной и актуальной разработка аэробной технологии получения чистой культуры спиртовых дрожжей, позволяющая в стерильных условиях нарастить высокую концентрацию засевных дрожжей*.

Цель работы. Целью настоящей работы явилось создание новой технологии получения чистой культуры спиртовых дрожжей с высокой плотностью, выращенной в аэробных условиях на стерильной питательной среде

Снабжение дрожжей кислородом при культивировании способствует интенсивному накоплению биомассы, а стерильные условия ведения процесса сохраняют физиологические свойства исходного промышленного штамма,

*Соруководителем диссертационной работы по вопросам расчетов энерго-материального баланса являлся к.т.н., докторант Мухачев С.Г.

РОС. НАЦИОНАЛЬНАЯ БИБЛИОТЕКА С.Петербург 956

препятствуют вытеснению высокопродуктивной части популяции малопродуктивной - снижают вероятность инфицирования инокулята посторонней микрофлорой, что повышает качество засевной культуры.

В соответствии с поставленной целью требовалось решить следующие задачи:

- определить состав питательной среды, оптимальный для роста и размножения дрожжевых клеток в аэробных условиях с учетом простоты приготовления, дешевизны и доступности выбранных компонентов;

- изучить влияние физико-химических параметров (скоростей подачи воздуха и перемешивания, температуры, активной кислотности среды) на процесс культивирования спиртовых дрожжей в лабораторных условиях;

- исследовать влияние подпиток на процесс дрожжегенерации;

- сформулировать требования к аппаратурному оформлению участка чистой культуры;

- выбрать оптимальные условия аэробного культивирования спиртовых дрожжей в биотехнологическом комплексе участка чистой культуры;

-.провести опытно-промышленные испытания аэробной технологии с определением микробиологической чистоты дрожжевой культуры;

- рассчитать материальный баланс процесса аэробного выращивания дрожжевой культуры и оценить экономию субстрата;

Научная новизна. Разработана и запатентована новая технология получения биомассы чистой культуры спиртовых дрожжей в аэробных условиях на стерильной питательной среде в биореакторах интенсивного массообмена.

Впервые в производственных условиях показана возможность десятикратного увеличения концентрации дрожжевой культуры, выращенной по новой аэробной технологии дрожжегенерации. Сформулированы основные требования к аппаратурному оформлению участка чистой культуры бродильного отделения, разработан биотехнологический комплекс для промышленного участка получения чистой культуры.

Экспериментально показано, что спиртовые дрожжи, выращенные по аэробной технологии, сохраняют физиологические свойства исходного промышленного.штамма, что препятствует вытеснению высокопродуктивной части дрожжей.

Практическая значимость. Выращено требуемое для спиртового производства количество дрожжевых клеток за короткое время с существенно меньшим расходом сырья.

Выбраны оптимальный состав питательной среды, доступный для спиртового производства, и условия культивирования спиртовых дрожжей в аэробных условиях.

Создана высокоэффективная технология, для ее реализации разработано оборудование участка чистой культуры бродильного отделения.

Изготовлен опытный экземпляр установки, на которой в промышленных условиях наработана чистая культура спиртовых дрожжей с концентрацией клеток более 1200 млн кл/мл.

Проведены опытно-промышленные испытания аэробного выращивания чистой культуры спиртовых дрожжей на Александровском и Шумбутском спиртовых заводах Республики Татарстан.

Разработан технологический регламент по наращиванию чистой культуры спиртовых дрожжей в аэробных условиях.

Показано, что за счет повышения продуктивности дрожжевой системы достигается эффективное сбраживание осахаренного сусла, наблюдается ускорение процесса брожения, как на начальной стадии, так и всего процесса в целом.

Установлено, что использование аэробной технологии генерации спиртовых дрожжей позволит сэкономить примерно 389 тонн зерна для спиртового предприятия производительностью 2600 дал спирта в сутки.

Апробация работы. Основные положения и материалы диссертационной работы были доложены на научно-практической конференции «Современные ресурсо- и энергосберегающие технологии в спиртовой и ликеро-водочной промышленности (Казань, 2000г.), Третьей международной научно-практической конференции «Научно-технический прогресс в спиртовой и ликеро-водочной отрасли» (Москва, 2001г.), на ежегодных научно-технических конференциях Казанского государственного технологического университета 2000-2004г.г.

Публикации По материалам диссертации опубликовано 14 работ, получен патент.

Объем и структура работы. Диссертация состоит из введения, 5 глав, выводов, списка литературы, включающего 102 наименования источников. Работа изложена на 114 страницах, проиллюстрирована 14 рисунками и 14 таблицами.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении изложены общие представления о решаемой в работе задаче, обоснована необходимость и показана актуальность разработки новой технологии аэробного культивирования чистой культуры спиртовых дрожжей.

В первой главе представлен обзор научных публикаций по новым способам интенсификации бродильных производств. На основе анализа и в соответствии с выводами из литературного обзора показано, что главными недостатками существующих технологических процессов является низкая засевная плотность дрожжевой культуры, высокая вероятность инфицирования

дрожжей, что в конечном счете существенно влияет на протекание процесса брожения, скорость сбраживания сусла и выход целевого продукта. Сформулированы цели и задачи диссертационной работы.

Во второй главе представлен комплекс экспериментальных исследований, проведенных в лабораторных условиях, по определению состава питательной среды (ПС), оптимальной для роста и размножения дрожжевых клеток в аэробных условиях с учетом простоты приготовления, дешевизны и доступности используемых компонентов для спиртового производства.

В главе рассматривается влияние физико-химических параметров - условий культивирования (температуры, активной кислотности среды, массообменных характеристик аппарата) на процесс роста спиртовых дрожжей, определяется время, состав и количество вносимых подпиток для получения высоких концентраций клеточной массы. Сформулированы основные требования к аппаратурному оформлению аэробного процесса получения чистой культуры спиртовых дрожжей.

В третьей главе рассмотрено аппаратурное оформление промышленного участка чистой культуры спиртовых дрожжей, обоснован выбор оптимальных условий аэробного культивирования, изложены результаты опытно-промышленных испытаний аэробной технологии культивирования спиртовых дрожжей в периодическом режиме на биотехнологическом комплексе. Приведены исследования микробиологической чистоты выращенной по аэробной технологии дрожжевой культуры путем высева на плотную питательную среду.

В четвертой главе представлены исследования по использованию чистой культуры спиртовых дрожжей, выращенных по аэробной технологии, в технологической цепочке - дрожжанка - возбраживатель - бродильные чаны, показана перспективность и целесообразность применения аэрации при выращивании чистой культуры. Приведен расчет экономической эффективности применения аэробной дрожжегенерации в бродильном производстве.

В пятой главе рассмотрен материальный баланс процесса аэробного выращивания посевной культуры спиртовых дрожжей, дана оценка величины экономии субстрата при переходе к процессу аэробного выращивания спиртовых дрожжей и ее доля в стоимости конечного продукта.

Разработка технологии аэробного культивирования спиртовых дрожжей

На первом этапе работы были проведены экспериментальные исследования по выбору для аэробного культивирования спиртовых дрожжей питательных сред, содержащих необходимые для клеточного материала соединения при соблюдении основных требований - простоты приготовления и дешевизны используемых компонентов. Исследованы разнообразные составы питательных

сред, как синтетические, так и натуральные, в которых проводилось выращивание спиртовых дрожжей: среда Ридер; модифицированная среда Ридер; сусло, карбамид, дрожжевой автолизат; сусло, фильтрат послеспиртовой барды и т.д., определены концентрации основных компонентов, а также условия культивирования спиртовых дрожжей: температура, активная кислотность, массообменные характеристики аппарата.

Опыты проводили в лабораторных условиях на культуре спиртовых дрожжей Saccharomyces cerevisiae раса XII. Питательные среды предварительно подвергали стерилизации в автоклаве при 1 избыточной атмосфере в течение 0,5 часа. Дрожжи, выращенные в пробирках на сусло-агаре, стерильно засевали в колбы. Рост культуры определяли подсчетом клеток в камере Горяева, физиологическое состояние дрожжей - микроскопированием. Пробы для анализа отбирали сразу после засева и по истечении 4 часов через каждые 2 часа. Для контроля брали процессы анаэробного выращивания дрожжей на пастеризованном сусле с содержанием редуцирующих веществ 11-12% масс, в соответствии с действующим на сегодня технологическим регламентом для спиртового производства. Усредненное по трем контрольным ферментациям значение концентрации спиртовых дрожжей на 15 час роста составило 130,5 млн.клУмл при остаточных редуцирующих 4,3% масс.

В ходе эксперимента рассмотрена возможность использования в качестве основного компонента питательной среды фильтрата послеспиртовой барды богатого аминокислотами, витаминами, минеральными веществами. Это позволило с одной стороны утилизировать отходы спиртового производства, с другой - упростить и удешевить питательную среду.

Результаты экспериментов приведены в таблице 1.

Таблица 1

Результаты культивирования спиртовых дрожжей Saccharomyces cerevisiae раса XII на различных питательных средах в качалочных колбах на 15-й час роста

№	Состав питательной среды	РВ,%	Концентрация дрожжевых клеток, млн/мл, нач /кон
1	Среда Ридер, дрожжевой автолизат 2%	2,0	14,0/112,0
2	Среда Ридер модиф дрожжевой автолизат 4%	2,1	18,0/197,0
3	Сусло, среда Ридер модиф (без глюкозы), дрожжевой автолизат 4%	2,0	10,0/101,0
4	Сусло, среда Ридер (без глюкозы), дрожжевой автолизат 4%, карбамид 0,2%	2,6	16,0/175,0
5	Сусло, фильтрат барды, карбамид 0,2%	2,1	144,0/302,0
6	Сусло, фильтрат барды, карбамид 0,2%	4,2	11,0/540,0
7	Сусло, фильтрат барды, карбамид 0,2%	6,0	10,0/575,0
8	Сусло, фильтрат барды, карбамид 0,2%	8,1	18,0/200,0

Проведенный сравнительный анализ полученных экспериментальных данных показал, что интенсивное усвоение питательных веществ и более высокое накопление биомассы дрожжей при прочих равных условиях происходит на питательной среде, состоящей из сусла, разбавленного фильтратом послеспиртовой барды до содержания редуцирующих веществ 4 - 6% масс, с добавлением 0,2% масс, карбамида. Низкие концентрации сахара позволили направить процесс в сторону накопления биомассы дрожжей. Для приготовления питательной среды использовали осахаренное сусло (РВ более 10% масс.) с высоким содержанием сухих веществ (СВ не менее 18% масс). Фильтрат послеспиртовой барды получали из грубой барды после отделения дробины на ситах с отверстиями 1,0-1,2 мм.

В результате на качалочных колбах в аэробных условиях выращена популяция спиртовых дрожжей с концентрацией клеток 500-600 млн.кл/мл, что в 4 - 5 раз больше концентрации заводской маточной культуры, выращенной в анаэробных условиях. Выбранная питательная среда является полноценной средой, содержит комплекс веществ, необходимый для выращивания дрожжей, доступна для спиртового производства, проста в приготовлении.

Изучено влияние температуры и активной кислотности на рост дрожжевой культуры Saccharomyces cerevisiae раса XII в аэробных условиях.

Исследование влияния температуры и активной кислотности на рост дрожжевой клетки проводили в диапазоне изменения температур от 26 до 34 °С, активной кислотности - от 4,4 до5,4.

Установлено, что интенсивный рост и размножение спиртовых дрожжей в аэробных условиях происходит при температуре 28-30°С и активной кислотности среды, поддерживаемой в пределах 4,8-5,0 ед. pH.

Проведена серия экспериментов с выбранной питательной средой и условиями культивирования на культурах, широко используемых в спиртовом производстве, Saccharomyces cerevisiae раса XII, раса М и раса Y717. Результаты исследований обобщены в таблице 2.

Таблица 2

Культивирование различных рас спиртовых дрожжей Saccharomyces cerevisiae за 17 часов роста

Культура	РВ, % нач/кон.	Титр клеток, млн.кл/мл, нач./кон.
Раса XII	4,8/0,6	11,3/572,8
Раса М	4,8/0,15	13,5/610,5
Раса Y717	4,8/0,7	10,2/592,6

Из таблицы видно, что при выбранных условиях культивирования активный рост и накопление биомассы спиртовых дрожжей характерны для всех исследуемых культур.

Исследования, связанные с выбором массообменных характеристик процесса, обеспечивающих высокое накопление биомассы спиртовых дрожжей, при оптимальных значениях температуры и активной кислотности, проведены на лабораторной установке. Установка снабжена системой автоматизированного управления технологическим процессом, включает контуры термостатирования, статирования активной кислотности, оксистатирования, измерения и управления расходом жидких и газообразных потоков. Лабораторная установка обеспечивала проведение периодического культивирования в асептических условиях с высокой точностью стабилизации параметров.

На первом этапе исследований сульфитным методом изучали влияние гидродинамических факторов - скорости вращения мешалки и удельного расхода воздуха на скорость абсорбции кислорода в аппарате. На рисЛ представлены зависимости сульфитных чисел аппарата от удельного расхода воздуха и оборотов перемешивающего устройства.

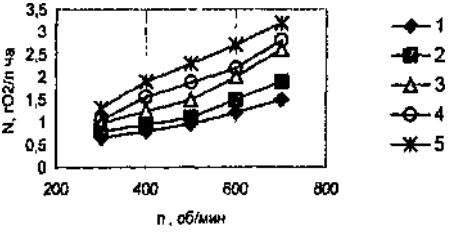

Рис 1. Влияние скорости перемешивания на сульфитные числа аппарата при различных скоростях подачи аэрирующего воздуха, где
1 - 0,3 л/л мин; 2 - 0,5 л/л мин; 3-1,0 л/л мин;
4-1,5 л/л мин; 5 - 2,0 л/л мин;

Разведение чистой культуры дрожжей осуществляли путем последовательного пересева культуры из пробирок в качалочные колбы и затем в ферментер. Культивирование проводили сериями по три процесса. Из приведенного графика следует, что в исследуемых диапазонах расхода воздуха и оборотов мешалки можно добиться четырехкратного увеличения сорбции кислорода.

Разведение чистой культуры дрожжей осуществляли путем последовательного пересева культуры из пробирок в качалочные колбы и затем в ферментер. Культивирование проводили сериями по три процесса

Все три процесса, как правило, выполняли при одинаковых условиях с целью получения достоверных данных о параметрах процесса.

Стерильную питательную среду заливали в аппарат, засевали спиртовые дрожжи из расчета 10% от объема питательной среды. Культивирование вели при температуре 28-30°С; активной кислотности равной 4,8-5,0 ед. pH. Температуру культивирования поддерживали с помощью термостата, pH культуральной жидкости в требуемом диапазоне обеспечивали автоматическим титрованием 5% водным раствором аммиака. Физиологическое состояние клеток определяли микроскопированием, концентрацию редуцирующих веществ (РВ%) в культуральной жидкости - по методике Бертрана, количество дрожжевых клеток - подсчетом клеток в камере Горяева, биомассу дрожжевой суспензии - фотоколориметрическим и весовым методами.

Режим оксистатирования в процессе культивирования позволил снять лимитацию дрожжевой культуры кислородом. Уровень растворенного кислорода в процессе культивирования не опускался ниже 10% от насыщения, что достигалось увеличением массообменных характеристик аппарата по мере роста дрожжевой популяции. В таблице 3 представлены усредненные по трем ферментациям результаты культивирования, для сравнения через дробную черту приведены характеристики процесса, проведенного при неизменной скорости сорбции кислорода. Во время культивирования дрожжей в лабораторном аппарате, начиная с 3 часа роста, через каждый час проводили отбор проб, микроскопию культуральной жидкости, следили за физиологическим состоянием дрожжей, количеством мертвых и почкующихся клеток, ветвистых и одиночных форм.

Таблица 3

Влияние массообменных характеристик аппарата на рост культуры спиртовых дрожжей Saccharomyces cerevisiae раса XII в лабораторном биореакторе

Час роста	РВ, %	n, об/мин	Q, л/л мин	Титр клеток, млн/мл	Биомасса, г/л	N, $гO_2$/л час
0	4,1	300	0,3	74,0	5,2	0.65
3	3,9	300	0,3	126,8	9,2	0,65
4	3,2	400	0,3	232.0	16,0	0,80
5	2,6	500	0,3	400,0	26,0	0,97
6	2.3	600	0,3	547,0	39,2	1,20
7	0.6	700	0,3	612,0	41,8	1,50

Как показали исследования, вначале ферментации дрожжи не нуждались в интенсивной аэрации, и только по мере накопления биомассы дрожжей требовалось увеличение массообменных характеристик аппарата.

Режим оксистатирования, примененный в лабораторном эксперименте, позволил определить не только характер изменений массообменных характеристик в процессе роста дрожжевой культуры, но и время внесения подпиток в процесс культивирования. При повышении уровня растворенного кислорода с минимального значения 7-10% от насыщения до 30% от насыщения, обусловленного исчерпыванием субстрата в среде, подавали концентрированную подпитку, состоящую из сусла с РВ не менее 10% масс, в различных количествах. Исходили из того, чтобы количество поданного сусла, а значит и РВ культуральной жидкости, не превышало верхней границы по редуцирующим веществам, определенной в 6%. Исследования проводили на выбранной ранее питательной среде и при оптимальных условиях культивирования. Использовали смесь культур спиртовых дрожжей Saccharomyces cerevisiae раса XII и раса М, применяемую на Александровском спиртзаводе Республики Татарстан.

В таблице 4 представлены средние данные по трем ферментациям с подпиткой культуральной среды суслом.

Таблица 4

Культивирование дрожжей Saccharomyces cerevisiae раса XII и раса М с подпитками в лабораторном аппарате

Час роста	РВ, %	n, об/мин	Q, л/л мин	N, $гO_2$/л час	Титр клеток, млн/мл	Подпитка, сусло.
0	6,1	300	0,3	0,65	74,0	
3	5,8	300	0,3	0,65	232,5	
5	2,0	300	0,3	0,97	400,0	
						Подпитка
6,5	5,4	600	0,5	1,50	322,0	
7,5	3,5	600	0,5	1,50	434,1	
8	2,3	700	0,5	1,90	606,0	
						Подпитка
9,5	4,8	700	0,5	1,90	662,0	
10	4,0	700	0,5	1,90	700,0	
11	2,5	700	0,5	1,90	881,0	
12	1.6	700	0,5	1,90	1100,0	
13	-	700	0,5	1,90	1280,0	
14	0,3	700	0,5	1,90	1410,0	

Микроскопирование культуральной жидкости в течение всего процесса культивирования показало, что в экспоненциальной фазе роста количество почкующихся клеток составило 80-85%, мертвые клетки встречались крайне редко (менее 1%). Следует отметить, что для получения высокой биомассы дрожжей оптимальным являлось внесение подпиток в количестве, не допускающем субстратного ингибирования и спиртообразования, возвращающем содержание редуцирующих веществ в среде к начальным значениям (РВ 4 - 6 % масс).

Таким образом, на основании выполненных экспериментов подобраны режимы основных технологических параметров аэробного процесса культивирования спиртовых дрожжей.

Экспериментально установлено, что выбранные условия ведения процесса одинаково эффективны как для смеси культур Saccharomyces cerevisiae раса XII и раса М, так и для каждой культуры отдельно.

На рис. 2, 3 представлена динамика накопления биомассы спиртовых дрожжей раса XII и раса М соответственно в условиях ведения процесса с подпитками суслом.

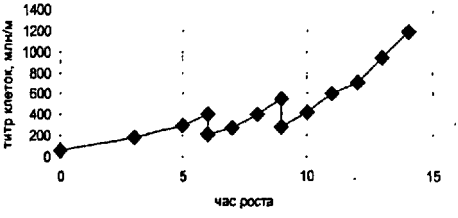

Рис. 2. Динамика роста биомассы дрожжей Saccharomyces cerevisiae расы XII при подпитках суслом

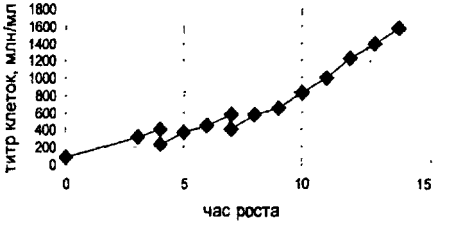

Рис. 3. Динамика роста биомассы дрожжей Saccharomyces cerevisiae расы М при подпитках суслом

Таким образом, культивирование спиртовых дрожжей в лабораторном ферментере с аэрацией при оптимальных температуре и активной кислотности среды, а также при своевременном внесении соответствующих подпиток позволило получить концентрации дрожжевых клеток более 1200 млн/мл, что в 8-10 раз превысило концентрацию биомассы дрожжей, выращенных анаэробно в соответствии с действующим технологическим регламентом спиртового производства.

На основании проведенных исследований выданы рекомендации на оборудование для реализации предложенной технологической схемы аэробного культивирования спиртовых дрожжей. Разработано аппаратурное оформление промышленного участка чистой культуры спиртовых дрожжей в виде каскада биореакторов с автоматическим регулированием основных параметров процесса. Комплекс по наработке чистой культуры спиртовых дрожжей интегрирован с технологическими линиями спиртового производства и представлен на рисунке 4.

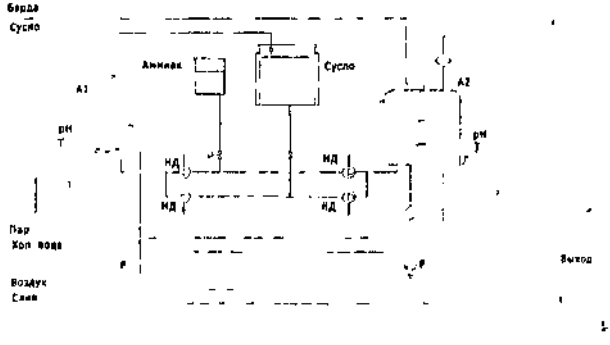

Рис.4. Схема участка получения чистой культуры

Биотехнологический комплекс участка чистой культуры включает в себя: малый ферментер объемом 5,5 литров (А1); большой ферментер объемом 300 литров (А2); емкости под подпитки и аммиак; системы дозирования аммиака и питательной среды; системы аэрации стерильным воздухом; системы измерения и управления расходом жидких и газообразных потоков Комплекс был установлен на Александровском спиртзаводе Республики Татарстан.

Проведены эксперименты по изучению скорости сорбции кислорода в зависимости от гидродинамических условий в малом и большом ферментерах. Определены оптимальные условия аэробного культивирования дрожжей в промышленном комплексе участка чистой культуры и проведены опытно-

промышленные испытания аэробной технологии. В стерильных условиях выращена культура спиртовых дрожжей с концентрацией клеток более 1200 млн.кл/мл, что в 8-10 раз больше концентрации заводской маточной культуры, выращенной по регламенту, действующему на предприятиях спиртовой отрасли.

Промышленный эксперимент по выращиванию посевной культуры сахаромицетов в аэробном режиме был реализован в дрожжегенераторе объемом 16 $м^3$ Шумбутского спиртзавода на культуре Saccharomyces cerevisiae раса 1986 (штамм используется в настоящее время в спиртовом производстве завода). Проведено три ферментации. Технологический режим работы дрожжегенератора включал в себя следующие стадии: залив осахаренного сусла; добавление барды; засев посевного материала не менее 30% об. Продолжительность каждого процесса культивирования составляла 6 - 8 часов. По результатам анализа опытно-промышленных испытаний аэробной технологии выращивания сахаромицетов расы 1986 в дрожжегенераторе плотность дрожжевой популяции составила 1200 - 1500 млн.кл/мл. Микроскопирование клеток показало хорошее физиологическое состояние культуры дрожжей.

В таблице 5 проведено сравнение усредненных величин экономического коэффициента ($Y_{x/s}$) и доли затрат субстрата в энергетическом обмене (D_s) двух аэробных режимов выращивания дрожжей Saccharomyces cerevisiae раса 1986 (№1, реализованный в 16-ти кубовом аппарате Шумбутского спиртзавода) и дрожжей Saccharomyces cerevisiae раса XII и раса М (№2, проведенный на Александровском спиртзаводе в 300 литровом аппарате).

Таблица 5

Усредненные характеристики аэробных режимов культивирования дрожжей Sacharomyces cerevisiae

Процесс №	Длительность цикла, час	RQ rCO_2/rO_2	$Y_{x/s}$, rX/rPB	D_s
1	8	1,53	0,519	0,35
2	12,5	2,4	0,37	0,54

Переход к новому штамму спиртовых дрожжей Saccharomyces cerevisiae раса 1986, а также режимные параметры, реализуемые в аппарате (процесс №1), приводят к снижению величины дыхательного коэффициента RQ и соответственно, к существенному уменьшению расхода субстрата в энергетическом обмене.

Для определения микробиологической чистоты спиртовой культуры, выращенной по аэробной технологии на промышленном участке чистой

культуры спиртовых дрожжей, со всех стадий культивирования, начиная с качалочных колб, малого и большого ферментеров проводили высев на плотную питательную среду в чашки Петри. В результате высева были получены однородные колонии дрожжей, посторонней микрофлоры обнаружено не было, все это подтверждало, что условия стерилизации аппаратов, подпиточных емкостей и коммуникаций, а также ведение технологии без нарушения условий асептики позволяют получить чистую культуру спиртовых дрожжей.

В главе 5 приведен энерго-материальный баланс процесса аэробного выращивания спиртовых дрожжей, способ расчета величины дыхательного коэффициента, на основании чего дана оценка затрат субстрата в энергетическом обмене.

Таким образом, новая аэробная технология дрожжегенерации решает проблему сохранения селективных свойств исходного промышленного штамма и в десять раз увеличивает концентрацию дрожжевой популяции. На аэробную технологию наработки чистой культуры нами получен патент РФ «Способ культивирования дрожжей для спиртового производства».

Разработан технологический регламент на выращивание чистой культуры спиртовых дрожжей.

На Александровском спиртзаводе Республики Татарстан проведены опытно-промышленные испытания процесса генерации спиртовых дрожжей, выращенных по аэробной технологии, в дрожжанке, возбраживателе, бродильных чанах.

Производственную дрожжанку, заполненную стандартной регламентной средой, засевали дрожжами, выращенными с аэрацией. Параллельно опытному процессу дрожжегенерации контрольный процесс проводили во второй дрожжанке в аналогичных условиях на рециркуляционных дрожжах, полученных путем отсева части культуральной среды из предыдущей дрожжанки - «дрожжевом отъеме», в соответствии с регламентом спиртового производства. При снижении концентрации сухих веществ в сусле до 1/3 от первоначального значения выращенные в дрожжанке производственные дрожжи направлялись в возбраживатель.

Было осуществлено 3 периодических цикла брожения в дрожжанках (объемом 8 м) и возбраживателе (объемом 30 м^3).

На рис.5, 6 представлены графики динамики накопления, биомассы (усредненные по трем процессам) при сбраживании зернового сусла с массовой долей сухих веществ СВ 16%, при pH=3,4 смесью япиртовых дрожжей Saccharomyces cerevisiae раса XII и раса М в дрожжанках и возбраживателе. Сусло сбраживали при температуре 30°С до отброда по сухим веществам равным 1/3 от первоначальной концентрации сусла.

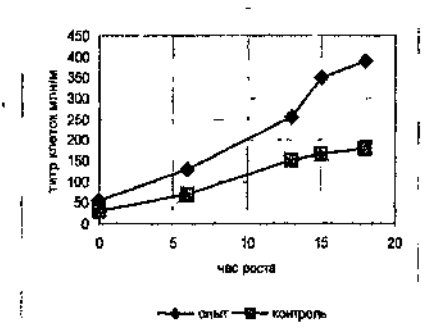

Рис. 5. Динамика накопления биомассы в дрожжанке

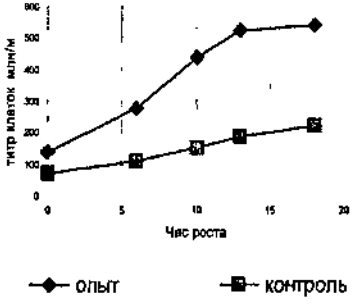

Рис.6. Динамика накопления биомассы спиртовых дрожжей в возбраживателе

Как следует из приведенных результатов, дрожжи, выращенные по аэробной технологии в биотехнологическом комплексе и пересеянные далее в дрожжанку и возбраживатель, продолжают интенсивно расти и размножаться, что выражается в увеличении как общего количества клеток, так и почкующихся клеток (более 70%). В возбраживателе в опытном процессе была получена дрожжевая суспензия с концентрацией клеток 540 млн.кл/мл. И, напротив, контрольные дрожжи, «дрожжевой отъем», несмотря на адаптацию клеток к условиям сбраживаемой среды, имеют более низкую активность, что подтверждено кривой динамики накопления биомассы дрожжей. Биомасса спиртовых дрожжей в контрольном процессе выросла до 210 млн.кл/мл.

Анализ результатов показал, что дрожжи выгоднее готовить с аэрацией среды, это увеличивает производительность дрожжегенераторов, поскольку при прочих равных условиях биомасса дрожжей, чистая культура которых выращена аэробно, возрастет в 2 - 2,4 раза.

Проведено 3 контрольных и 3 опытных процессов брожения в бродильных чанах.В таблице 6 представлены усредненные характеристики процессов брожения в бродильных чанах.

Таблица 6

Результаты процессов брожения дрожжей Saccharomyces cerevisiae раса XII и раса М в бродильных чанах, чистая культура которых выращена по аэробной (опыт -О) и анаэробной регламентной технологии (контроль-К).

Час брожения	T°, C		СВ, %		РВ, %		Титр клеток, млн.кл/мл		Несброженные углеводы, г/100 мл		Крепость бражки, %	
	К	О	К	О	К	О	К	О	К	О	К	О
0	26	26	11,3	11,0	6,1	5,8	60	115				
24	28	30	4,6	4,1	2,2	1,65	102	211				
36	30	28	2,6	2,1	-	-	-	-				
40	30	28	-	-	1,89	1,35	186	262				
44	29	28	1,9	1,6	-	-	-	-				
48	29	26	-	-	1,65	0.9	180	271				
52	28	26	1,7	1,6	1,4	0,64	-	-				
56	28	26	-	-	-	-	176	183				
60	27	26	1,7	1,6	1,2	-	-	-				
64	26	25	-	-	-	-	128	120				
68	25	25	-	-	0,99	-	-	-				
72	25	25	1,6	1,6		-	115	118	0,38	0,25	7,6	7,8

Максимум брожения опытного чана приходился на 24-й час (быстрый рост температуры брожения до 30°С, снижение СВ с 11 до 4,1%, высокая степень утилизации углеродсодержащих субстратов - уменьшение РВ с 5,8 до 1,65% масс), в то время как для контрольного чана максимум брожения приходился на 36-ой час. В опыте концентрация несброженных углеводов в бражке составила 0,25 г/100 мл, в контроле - 0,38 г/100 мл. Крепость бражки в опыте составила - 7,8%, в контроле - 7,6%.

Используя аэробную технологию культивирования чистой культуры спиртовых дрожжей удалось сократить потери спирта на 0,58 дал с тонны крахмала, так как потери спирта при повышении содержания несброженнцх углеводов в бражке на 0,1 г/100мл составляют 0,45 дал с тонны крахмала.

В контроле при использовании возвратных засевных дрожжей происходит замедление процессов, связанных с утилизацией основных компонентов сусла, брожение длится дольше на 20-25%.

Таким образом, применение аэрации при выращивании спиртовых дрожжей создает возможность повышения производительности бродильного отделения Александровского спиртзавода за счет сокращения продолжительности процессов дрожжегенерации и брожения примерно на 20% при экономии зерна примерно на 389 тонн в год. При стоимости зерна 3000 руб/т. (данные на 2 квартал 2004 г.) годовой экономический эффект для спиртзавода с выпуском 2600 дал спирта в сутки составит 1 167 000 рублей.

ВЫВОДЫ

1. Впервые предложен новый способ культивирования спиртовых дрожжей в стерильных условиях, позволяющий быстро и эффективно нарастить чистую культуру с высокой плотностью клеток, выбран оптимальный состав питательной среды для аэробной дрожжегенерации, доступный для спиртового производства, дешевый и простой в исполнении.

2. Экспериментально определены основные технологические параметры процесса аэробного культивирования спиртовых дрожжей. При этом исследовано влияние на выход дрожжевой массы таких параметров как температура, активная кислотность среды, аэрация, перемешивание, режим подачи подпиток.

3. Сформулированы основные требования к аппаратурному оформлению участка чистой культуры. Показано, что выбранные условия ведения процесса одинаково эффективны как для Saccharomyces cerevisiae раса XII, так и для Saccharomyces cerevisiae раса М, раса Y717, раса 1986, а также для смеси культур рас XII и рас М, применяемой в спиртовом производстве. По данным лабораторных исследований выполнен рабочий проект опытно-промышленной установки, уточнены технологические параметры ведения процесса. Биотехнологический комплекс с автоматическим регулированием основных параметров процесса смонтирован в цехе спиртового производства Александровского завода Республики Татарстан.

4. При разработке технологии и аппаратурного оформления участка чистой культуры решена задача доступности технологического процесса для заводского применения. Разработана интенсивная технология наработки чистой культуры спиртовых дрожжей, оформлен технологический регламент для участка чистой культуры.

5. По аэробной технологии наработки чистой культуры спиртовых дрожжей получена концентрация клеток более 1200 млн.кл/мл, что в 10 раз больше, чем в анаэробных условиях по регламенту, действующему на сегодня в спиртовой промышленности. Требуемое для спиртового производства

количество дрожжевых клеток выращено за короткое время и с существенно меньшими затратами.

6. Рассчитан энерго-материальный баланс процесса аэробного выращивания посевной культуры спиртовых дрожжей, дана оценка величины экономии субстрата при переходе на аэробную технологию.

7. Проведены испытания по определению микробиологической чистоты культуры, наработанной на биотехнологическом комплексе, путем высева на плотную питательную среду. Установлено, что условия стерилизации аппаратов, подпиточных емкостей и коммуникаций, а также ведение технологического процесса без нарушений условий асептики, позволяют вырастить чистую культуру спиртовых дрожжей.

8. Технологический процесс прошел опытно-промышленную проверку. На способ получения чистой культуры получен патент.

Достигнутые технологические показатели и экономическая эффективность ставят разработку технологического процесса аэробного культивирования чистой культуры спиртовых дрожжей в приоритетное положение по сравнению с имеющимися на сегодняшний день разработками.

Основное содержание диссертации отражено в следующих публикациях:

1. Культивирование дрожжей ,на отходах спиртового производства / В.М. Емельянов, Р.Р. Шайхутдинов, И.С. Владимирова, Н.К. Филиппова, Р.Т. Валеева, И.Е.Табаков // **III** Международный конгресс «Окружающая среда для нас и будущих поколений»: Тез. докл. - Самара, 1998.-С.26-28.

2. Разработка интенсивной технологии аэробного культивирования спиртовых дрожжей /В.М. Емельянов, И.С. Владимирова, Р.Р. Шайхутдинов, Н.К. Филиппова, Р.Т. Валеева // Научно-практическая конференция «Современные ресурсо- и энергосберегающие технологии в спиртовой и ликеро-водочной промышленности»: Тез.докл. - Казань, 2000. - С. 17 - 18.

3. Интенсивная аэробная технология культивирования спиртовых дрожжей / И.С. Владимирова, Н.К. Филиппова, В.М. Емельянов, Р.Т.Валеева // **III** международная научно-практич. конф. «К 70-летию создания ВНИИ пищевой биотехнологии»: Тез.докл. - М.: Пищпром, 2001. - С. 63-71.

4. Патент РФ № 2136746 от 10.09.99. приоритет 17.08.98. Способ культивирования дрожжей для спиртового производства. Емельянов В.М., Шайхутдинов Р.Р., Владимирова И.С., Филиппова Н.К., Валеева Р.Т., Табаков И.Е. по заявке №98115662.

5. Аппаратурно-технологическое оформление участка аэробной генерации спиртовых дрожжей / В.М.Емельянов, Ю.П. Александровская, Р.Ш. Еналеев, И.С. Владимирова, Н.К. Филиппова, Р.Т. Валеева // **III** междунар.научно-практич. конф. «К 70-летию создания ВНИИ пищевой биотехнологии»: Тез.докл - М.: Пищпром, 2001. - С. 72-76.

№ 23897

6. Интенсивная технология дрожжегенерации / И.С. Владимирова, Н.К. Филиппова, В.М. Емельянов, Р.Т. Валеева // 1-Международный конгресс «Биотехнология - состояние и перспективы развития»: Тез.докл. - Москва, 2002. -С. 64-70.

7. Филиппова Н.К., Емельянов В.М., Владимирова И.С. Разработка интенсивной технологии аэробного культивирования чистой культуры спиртовых дрожжей Sacch. cerev. // Биотехнология. - 2002. -№1. - С. 49-53.

8. Аэробная технология генерации спиртовых дрожжей / Н.К. Филиппова, В.М. Емельянов, Ю.П. Александровская, И.С. Владимирова, Р.Т. Валеева // XVII Менделеевсий съезд по общей и прикладной химии. « Биомолекулярная химия и биотехнология»: Тез.докл. - Казань, 2003. - С. 310.

9. Аэробная дрожжегенерация в мембранном биореакторе / С.Г.Мухачев , Ю.П. Александровская, Н.К. Филиппова, В.М. Емельянов // Научная конф. «Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии»: Тез.докл. - Казань, 2004.-С. 64-65.

10. Биотехнологический комплекс участка чистой культуры спиртовых дрожжей / В.М. Емельянов, И.С.Владимирова, Ю.П. Александровская, Н.К. Филиппова, Р.Ш. Еналеев, Р.Т. Валеева // 1-Международный конгресс «Биотехнология - состояние и перспективы развития»:, Тез.докл. - Москва, 2002. - С. 45-47.

11. Кинетика аэробного культивировния спиртовых дрожжей в мембранном биореакторе / С.Г. Мухачев, Ю.П. Александровская, Н.К. Филиппова, В.М. Емельянов // Вестник Казанского технологического университета. - 2003, № 2. - С. 168-172.

12. Повышение производительности цеха сухих кормовых дрожжей Шумбутского спиртзавода / В.М. Емельянов, С.Г. Мухачев, И.С.Владимирова , Н.К.Филиппова, Р.Т.Валеева // «Аннотации сообщений «Научной сессии КГТУ» - Казань, 2004. - С. 103.

13. Исследование процесса дрожжегенерации в мембранном биореакторе / В.М. Емельянов, Ю.П. Александровская, Н.К.Филиппова, И.С. Владимирова, Р.Т. Валеева // Научная конф. «Постгеномная эра в биологии и проблемы биотехнологии»: - Тез.докл. - Казань, 2004. - С. 36-37.

14. Аэробное культивирование чистой культуры спиртовых дрожжей / Н.К.Филиппова, В.М. Емельянов, И.С. Владимирова, Р.Т.Валеева // КГУ 200 лет. Секция «Новые направления исследований в биологических науках»: Тез.докл. -. Казань, 2004. - С. 78-81.

Соискатель Филиппова Н.К.

Заказ 319 Тираж 100

Издательство Казанского государственного технологического университета