

---

Хоконова М. Б., Цагоева О. К.

Khokonova M. B., Tsagoeva O. K.

**ИЗУЧЕНИЕ АКТИВНОСТИ ФЕРМЕНТОВ МИКРОБНОГО  
ПРОИСХОЖДЕНИЯ В СПИРТОВОМ ПРОИЗВОДСТВЕ**

**STUDY OF THE ACTIVITY OF MICROBIAL ENZYMES  
ORIGINS IN ALCOHOL PRODUCTION**

---

*В настоящее время проблеме применения микробных ферментов в перерабатывающих отраслях промышленности продолжают уделять все большее внимание ученые и производители во многих странах мира. По прогнозам специалистов, использование ферментных препаратов микробного происхождения в промышленности имеет устойчивую тенденцию к увеличению. При этом, потребность спиртовой отрасли России в комплексных ферментных препаратах составляет около 7 тыс. тонн, доля отечественных препаратов менее 15%. В связи с этим, целью данной работы являлось изучение жизнедеятельности ферментов микробного происхождения, проявление у них активности при нейтрализации барды и поверхностном методе культивирования в спиртовом производстве. Объектами исследований служили ферменты микробного происхождения, плесневые грибы, затор спиртового производства, барда. Исследования проводились в условиях ООО «Русь» и на кафедре «Технология производства и переработки сельскохозяйственной продукции» Кабардино-Балкарского ГАУ в 2019 году. Высокая амилолитическая активность отмечена при культивировании плесневого гриба на среде с крахмалом, мальтозой, декстринами, сахарозой, лактозой и глюкозой, причем активность фермента на глюкозе не ниже, чем на мальтозе, декстринах или крахмале. Количество амилазы, образующейся на средах с достаточно высоким содержанием крахмала, в большей степени зависит от концентрации азота в среде, чем от концентрации крахмала. Однако для максимального образования мальтозы и декстриназы концентрация крахмала должна быть повышена и составлять 4 и даже 6%. Таким образом, образование ферментов амилолитического комплекса плесневыми грибами происходит при ассимиляции ими различных источников минерального и*

*органического азота, а также простых сахаров, декстринов и крахмала.*

*Currently, the problem of the use of microbial enzymes in the processing industries continues to be given increasing attention by scientists and manufacturers in many countries of the world. According to experts, the use of enzyme preparations of microbial origin in industry has a steady upward trend. At the same time, the need of the alcohol industry in Russia for complex enzyme preparations is about 7 thousand tons, the share of domestic drugs is less than 15%. In this regard, the aim of this work was to study the vital activity of enzymes of microbial origin, their manifestation of activity in the neutralization of stillage and surface cultivation method in alcohol production. The objects of research were enzymes of microbial origin, mold fungi, mash of alcohol production, bard. The studies were conducted in the conditions of LLC Rus and at the Department of Technology of Production and Processing of Agricultural Products of the Kabardino-Balkarian State Agrarian University in 2019. High amylolytic activity was observed during the cultivation of molds on medium with starch, maltose, dextrans, sucrose, lactose and glucose, and the enzyme activity on glucose is not lower than on maltose, dextrans or starch. The amount of amylase formed on media with a sufficiently high starch content is more dependent on the concentration of nitrogen in the medium than on the concentration of starch. However, to maximize the formation of maltose and dextrinase, the starch concentration should be increased to be 4 or even 6%. Thus, the formation of enzymes of the amylolytic complex by molds occurs when they assimilate various sources of mineral and organic nitrogen, as well as simple sugars, dextrans and starch.*

*По мере повышения температуры реакционная способность ферментов сначала увеличивается, а затем, пройдя определенный уровень, начинает быстро снижаться. Установлено, что продолжительность осахаривания не влияет на конечные результаты брожения. Оптимальные условия при осахаривании заторов, необходимы не столько для обеспечения наибольшего количества продуктов гидролиза крахмала в осахаривателе, сколько для сохранения максимальной активности ферментов.*

**Ключевые слова:** *спиртовая отрасль, ферменты, культивирование, состав среды,*

*характеристика затора, технологический режим.*

*As the temperature rises, the reactivity of the enzymes first increases, and then, after passing a certain level, it begins to decrease rapidly. It was found that the duration of saccharification does not affect the final results of fermentation. The optimal conditions for saccharification of congestion are necessary not only to ensure the greatest amount of starch hydrolysis products in the saccharifier, but to maintain maximum enzyme activity.*

**Key words:** *alcohol industry, enzymes, cultivation, medium composition, mash characterization, technological mode.*

---

**Хоконова Мадина Борисовна –**

доктор сельскохозяйственных наук, профессор кафедры технологии производства и переработки сельскохозяйственной продукции, ФГБОУ ВО «Кабардино-Балкарский государственный аграрный университет имени В.М. Кокова», г. Нальчик  
Тел.: 8 928 910 37 04  
E-mail: [dinakbgsha77@mail.ru](mailto:dinakbgsha77@mail.ru)

**Khokonova Madina Borisovna –**

Doctor of Agricultural Sciences, Professor of the department of technology production and processing of agricultural product, FSBEI HE «Kabardino-Balkarian State Agrarian University named after V.M. Kokov», Nalchik  
Tel.: 8 928 910 37 04  
E-mail: [dinakbgsha77@mail.ru](mailto:dinakbgsha77@mail.ru)

**Цагоева Ольга Константиновна –**

аспирант 2-го года обучения, направления подготовки «Промышленная экология и биотехнологии», ФГБОУ ВО «Кабардино-Балкарский государственный аграрный университет имени В.М. Кокова», г. Нальчик  
Тел.: 8 928 708 74 74  
E-mail: [tsagoeva123@yandex.ru](mailto:tsagoeva123@yandex.ru)

**Tsagoeva Olga Konstantinovna –**

postgraduate student of the 2nd year of study, areas of training «Industrial ecology and biotechnology», FSBEI HE «Kabardino-Balkarian State Agrarian University named after V.M. Kokov», Nalchik  
Tel.: 8 928 708 74 74  
E-mail: [tsagoeva123@yandex.ru](mailto:tsagoeva123@yandex.ru)

---

**Введение.** В настоящее время проблеме применения микробных ферментов в перерабатывающих отраслях промышленности продолжают уделять все большее внимание ученые и производственники во многих странах мира.

По прогнозам специалистов, использование ферментных препаратов микробного происхождения в промышленности имеет устойчивую тенденцию к увеличению, при этом 2/3 текущего объема составляют ферменты для пищевой промышленности, а их основная доля приходится на спиртовую отрасль [9, 10].

При этом потребность спиртовой отрасли России в комплексных ферментных

препаратах составляет около 7 тыс. тонн, доля отечественных препаратов менее 15%.

В связи с этим, целью данной работы являлось изучение жизнедеятельности ферментов микробного происхождения, проявление у них активности при нейтрализации барды и поверхностном методе культивирования в спиртовом производстве.

**Методология проведения работ.** Объектами исследований служили ферменты микробного происхождения, плесневые грибы, затор спиртового производства, барда.

**Экспериментальная база.** Исследования проводились в условиях ООО «Русь» и на кафедре «Технология производства и переработки сельскохозяйственной

продукции» Кабардино-Балкарского ГАУ в 2019 году.

**Результаты исследований.** Высокая амилолитическая активность отмечена при культивировании плесневого гриба на среде с крахмалом, мальтозой, декстринами, сахарозой, лактозой и глюкозой, причем активность фермента на глюкозе не ниже, чем на мальтозе, декстринах или крахмале [1]. Крахмал и продукты его гидролиза считаются

все же лучшими источниками углерода при культивировании гриба поверхностным и глубинным способом.

При глубинном культивировании плесневого гриба *Asp. oryzae* 153, способного продуцировать высокоактивную амилазу, было установлено, что максимальное количество фермента образуется грибом при содержании в среде 2% крахмала и 0,3% азота в форме серноокислого аммония (табл. 1).

**Таблица 1** – Образование ферментов при глубинном культивировании

Источники углерода (2%)	Конечный рН	Вес сухого мицелия, г	Количество амилазы	
			на 100 мл	на 1 г сухого мицелия
Крахмал	8,0	1,46	93,70	64,20
Декстрины	7,9	2,07	69,10	33,40
Мальтоза	8,2	1,75	77,70	44,40
Глюкоза	8,2	1,79	20,60	11,50
Клетчатка	7,3	не учитыв.	1,90	-
Инулин	7,9	1,55	5,25	3,39
Сахароза	6,8	1,89	0,53	0,28
Манноза	8,3	1,81	1,28	0,71
Ксилоза	8,3	1,72	2,74	1,59
Маннит	7,2	2,00	1,92	0,96
Глицерин	7,2	2,15	0,39	0,18
Этиловый спирт	-	нет роста	-	-
Уксуснокислый натрий	8,5	0,22	1,66	7,65
Яблочнокислый натрий	8,2	0,18	0,30	1,68
Янтарнокислый аммоний	7,7	0,18	0,30	2,00

Количество амилазы, образующейся на средах с достаточно высоким содержанием крахмала (2; 4 или 6%), в большей степени зависит от концентрации азота в среде, чем от концентрации крахмала. Однако для максимального образования мальтозы и декстриназы концентрация крахмала должна быть повышена и составлять 4 и даже 6%.

Таким образом, образование ферментов амилолитического комплекса (амилазы, мальтазы, декстриназы) плесневыми грибами происходит при ассимиляции ими различных источников минерального и органического азота, а также простых сахаров, декстринов и крахмала.

Практически доказано, что накопление грибом *Aspergillus niger* амилолитических ферментов стимулируется добавлением в барду окиси магния. По данным В.В. Вяткина в среднем активность декстриназы от магния повышается на 50% по сравнению с

активностью, получаемой при нейтрализации барды углекислым кальцием [2] (табл. 2).

При определении оптимальной концентрации магния для роста грибов рекомендуется исходить из следующих соотношений его к фосфору: на каждый ион магния необходимо 36 ионов фосфора. Сера входит в состав молекулы глутатиона, который активирует действие протеолитических ферментов, что важно при размножении микроорганизма. Одновременно сера присутствует в важных аминокислотах: метионине, цистеине, цистине, а также стимулирует обратившие амилазы [3].

По мере повышения температуры реакционная способность ферментов сначала увеличивается, а затем, пройдя определенный уровень, начинает быстро снижаться.

Температурный оптимум ферментов амилолитического комплекса приведен в

таблице 3. Мальтоза и декстриназа относительно наиболее стабильны.

**Таблица 2** – Активность ферментов при нейтрализации барды

рН		Амилаза		Декстриназа		Мицелий, г	Нейтрализующее в-во	Субстрат
начальный	конечный	ед./100 мл	%	ед./100 мл	%			
5,0	5,5	5,2	100	490	100	3,50	CaCO <sub>3</sub>	Барда с содержанием 3% растворимых веществ
5,2	5,0	3,7	70	695	140	2,82	MgCO <sub>3</sub>	
5,3	5,5	34	100	630	100	4,05	CaCO <sub>3</sub>	Барда с содержанием 5% растворимых веществ + 2% муки
5,7	4,8	34	100	1072	170	3,98	MgCO <sub>3</sub>	

**Таблица 3** – Оптимальные условия жизнедеятельности ферментов

Ферменты	Оптимальные	
	рН	температура, °С
Амилаза	4,5-5,5	50
Мальтоза	4,5-4,7	58-62
Декстриназа	4,5-6,5	58-62
Суммарное действие по степени осахаривания	4,7-5,1	58-61

В процессе осахаривания крахмалистого сырья ферментами гриба гидролиз крахмала не заканчивается в осахаривателе, а проходит, в основном, во время брожения. Поэтому полнота осахаривания крахмала в осахаривателе для последующего сбраживания и выхода спирта не имеет принципиального значения.

В таблице 4 приведена активность ферментов в культурах плесневых грибов рода *Aspergillus* при поверхностном методе выращивания.

**Таблица 4** – Активность ферментов в культурах плесневых грибов рода *Aspergillus* при поверхностном методе выращивания

Виды грибов	Состав среды	Активность ферментов сухой среды		
		амилазная	декстриназная	мальтозная
<i>Aspergillus oryzae</i>	Пшеничные отруби	37,1	240	22
<i>Aspergillus oryzae</i>	Барда-дробина	5,1	120	3,4
<i>Aspergillus oryzae</i>	Рожь-крупка	6,6	210	17
<i>Aspergillus oryzae</i>		45	240	26
<i>Aspergillus niger</i>	Пшеничные отруби	1,2	300	78
<i>Aspergillus oryzae</i> И-475		124	665	-
<i>Aspergillus awamori</i>		16	400	57
<i>Aspergillus oryzae</i>	Картофельная мезга, отруби, ростки	26	283	-
<i>Aspergillus oryzae</i> К. С.	Пшеничные отруби	44	250	-
<i>Aspergillus awamori</i>		-	315	-
<i>Asp. oryzae</i>		63	-	-
<i>Aspergillus awamori</i>		11	625	103
<i>Aspergillus oryzae</i> 153		43	326	33
<i>Aspergillus awamori</i> ч		15	858	126
<i>Aspergillus niger</i> S-4		1	501	77

Оптимальная (50°C) температура осахаривания крахмалистых заторов ферментами гриба обеспечивает длительное сохранение активности амилазы и декстриназы. Дополнительная проверка показала, что повышение температуры осахаривания до 58 и даже 62°C не ухудшает ни одного показателя брожения, но с точки зрения стерильности заторов эти температуры неравнозначны. Низкие температуры (от 50 до 55°C) способствуют развитию инфекций и слабо влияют на процесс клейстеризации нерастворимого крахмала сырья; выше 58°C – могут вызвать инактивацию ферментов. Поэтому принята температура осахаривания 57-58°C, длительность брожения при этом составляет около 62 часов.

Следует применять культуру с такой активностью ферментов, которая могла бы обеспечить гидролиз крахмала основного затора на 70-80%. Некоторые авторы считают, что в производстве необходимо получить амилазу, обеспечивающую превращение не ниже 20% растворимого крахмала в продукты гидролиза [5-7].

В зависимости от активности расход грибной культуры может колебаться в определенных пределах.

Скорость и глубина гидролиза углеводов сырья определяются активностью глубинной культуры плесневого гриба. Следует также установить и оптимальные внешние физико-химические условия, обеспечивающие максимальное действие комплекса ферментов: значения pH, состав среды, температура, длительность процесса.

Состав среды играет важную роль в защите многих ферментов от инактивации, вызываемой температурой [9]. Например, установлено, что причиной инактивации при нагревании солодовых вытяжек является коагуляция белка. Если в среде находятся сахара или пептон, то они препятствуют коагуляции и этим защищают амилазу от инактивации [8]. Следовательно, процесс осахаривания крахмала разваренного сырья, содержащего сахара, декстрины, белки, полипептиды, может осуществляться и при повышенной температуре, менее опасной в этих условиях для инактивации амилазы, чем в водных растворах. Ионы двухвалентных металлов ( $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ) стабилизируют молекулу амилазы и

препятствуют ее расщеплению протеолитическими ферментами.

Но даже в течение часа и при температуре 55°C степень осахаривания крахмала не превышает 51% и может изменяться от концентрации вносимых ферментов. В таблице 5 дана характеристика затора, осахаренного глубинной культурой *Aspergillus niger* S-4 в течение 5 мин. при 55°C.

**Таблица 5** – Характеристика затора, осахаренного глубинной культурой *Aspergillus niger*

Объем грибной культуры, %	pH	Концентрация сухих веществ, %	Мальтозы, г/100 мл	Редуцирующих веществ, г/100 мл	% осахаривания
5	5,9	15,0	5,02	12,88	41
10	5,9	14,6	5,48	12,57	46
15	5,8	14,0	6,60	12,26	61

Дальнейший процесс гидролиза происходит при брожении. Следовательно, продолжительность осахаривания не влияет на конечные результаты брожения [4]. Оптимальные условия при осахаривании заторов необходимы не столько для обеспечения наибольшего количества продуктов гидролиза крахмала в осахаривателе, сколько для сохранения максимальной активности ферментов.

**Область применения результатов:** спиртовая отрасль.

**Выводы.** Таким образом, на основании проведенных исследований установлено, что образование ферментов амилаолитического комплекса плесневыми грибами происходит при ассимиляции ими различных источников минерального и органического азота, а также простых сахаров, декстринов и крахмала. По мере повышения температуры реакционная способность ферментов сначала увеличивается, а затем, пройдя определенный уровень, начинает быстро снижаться. Установлено, что продолжительность осахаривания не влияет на конечные результаты брожения. Оптимальные условия при осахаривании заторов необходимы не столько для обеспечения наибольшего количества продуктов гидролиза крахмала в

осахаривателе, сколько для сохранения

### Литература

1. Хоконова М.Б., Цагоева О.К. Качественные показатели зерновых заторов, осахаренных ферментами глубинной культуры солода // Актуальная биотехнология. Воронеж. 2019. №3 (30). С. 244-248.

2. Хоконова М.Б., Цагоева О.К. Качественные показатели продуктов брожения в спиртовом производстве // Известия Кабардино-Балкарского ГАУ. Нальчик: КБГАУ, 2019. №1(23). С. 52-55.

3. Ашапкин В.В. Контроль качества продукции физико-химическими методами: учеб. пособие для студ. вузов. М.: ДеЛи принт, 2005. 124 с.

4. Ашхотов Э.Ю. Экономические и экологические проблемы выбора технологии переработки (утилизации) отходов производства биоэтанола: научное издание. Нальчик: Издательство М. и В. Котляровых, 2009. 172 с.

5. Биохимия / под. ред. Северина Е.С. 5-е изд., испр. и доп. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. 316 с.

6. Спиртовая, дрожжевая и ликероводочная промышленность // Обзорная информация. Выпуск 5. М.: АгроНИИТЭИПП, 1992. 40 с.

7. Технология пищевых производств / под. ред. А.П. Нечаева. М.: Колос, 2007. 189 с.

8. Технология спирта / ред. В. Л. Яровенко. 2-е изд., перераб. и доп. М.: КОЛОС, 1996. 464 с.

9. Фараджеева Е.Д., Федоров В.А. Общая технология бродильных производств: учеб. пособие. М.: Колос, 2002. 408 с.

10. Качмазов Г.С. Дрожжи бродильных производств: практическое руководство. СПб.: Лань, 2012. 224 с. [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://e.lanbook.com>

### References

1. *Hokonova M.B., Cagoeva O.K.* Kachestvennye pokazateli zernovykh zatorov, osaharennykh fermentami glubinnoy kul'turysoloda // Aktual'naja biotekhnologija. Voronezh. 2019. №3(30). S. 244-248.

2. *Hokonova M.B., Cagoeva O.K.* Kachestvennye pokazateli produktov brozhenija v spirtovom proizvodstve // Izvestija Kabardino-Balkarskogo GAU. Nal'chik: KBGAU, 2019. №1(23). S. 52-55.

максимальной активности ферментов.

3. *Ashapkin V.V.* Kontrol' kachestva produkcii fiziko-himicheskimi metodami: ucheb. posobie dlja stud. vuzov. M.: DeLi print, 2005. 124 s.

4. *Ashhotov E.YU.* Ekonomicheskie i ekologicheskie problemy vyibora tehnologii pererabotki (utilizatsii) othodov proizvodstva bioetanol: nauchnoe izdanie. Nalchik: Izdatelstvo M. i V. Kotlyarovyih, 2009. 172 s.

5. Биохимия / под. ред. Северина Е.С. 5-е изд., испр. и доп. М.: GeOTAR-Media, 2008. 316 s.

6. Spirtovaya, drojjevaya i likerovodochnaya promyshlennost // Obzornaya informatsiya. Vyipusk 5. M.: AgroNIITEIPP, 1992. 40 s.

7. Tehnologiya pishhevyykh proizvodstv / pod. red. A.P. Nechaeva. M.: Kolos, 2007. 189 s.

8. Tekhnologiya spirta / red. V.L. Yarovenko. 2-e izd., pererab. i dop. M.: KOLOS, 1996. 464 s.

9. *Faradzheva E.D., Fedorov V.A.* Obshhaja tehnologija brodil'nyh proizvodstv: ucheb. posobie. M.: Kolos, 2002. 408 s.

10. *Kachmazov G.S.* Drojji brodilnyih proizvodstv: prakticheskoe rukovodstvo. SPb.: Lan, 2012. 224 s. [Elektronnyiy resurs]. Rejim dostupa: <http://e.lanbook.com>

