

BETTER WAYS OF ALCOHOL PRODUCTION MIXING SACCHARIFICATION USING ENZYMIC AGENTS OF PROTEOLYTIC ACTIVITY

V. Marynchenko, V. Galanska

National University of Food Technologies

L. Marynchenko

National Technical University of Ukraine "Kyiv Politechnical Institute"

Key words: Starch raw Batch alcohol production Proteolytic enzyme Fermentation	ABSTRACT The feasibility of using the proteolytic enzyme agent Neytraz for hydrolysis of grain proteins and supplementary food of yeasts with amine nitrogen has been proved experimentally. A positive effect of this enzyme agent on the dynamics of fermentation mash, depth of substrate utilization and alcohol yield has been found. If the dosage of Neytraza enzyme is 0.2–0.3 kg per 1 ton of conventional starch, the content of amino nitrogen in wort increases by 62–88 %; the allocated carbon dioxide, by 2,1–3,2 %; the number of yeast cells, by 35–89 %; the volume of alcohol in experimental matured brew, by 0,61–0,73 %; and the content of unfermented carbohydrate decreases by 12–15 %.
Article history: Received 3.04.2013 Received in revised form 17.04.2013 Accepted 15.05.2013	
Corresponding author: E-mail: marinchenko37@ukr.net	

УДОСКОНАЛЕННЯ СПОСОБУ ОЦУКРЮВАННЯ ЗАМІСІВ СПИРТОВОГО ВИРОБНИЦТВА З ВИКОРИСТАННЯМ ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТУ ПРОТЕОЛІТИЧНОЇ ДІЇ

В.О. Маринченко, В.В. Галанська

Національний університет харчових технологій

Л.В. Маринченко

Національний технічний університет України «Київський політехнічний інститут»

Експериментально обґрунтовано доцільність використання ферментного препарату Нейтраза протеолітичної дії з метою гідролізу білкових речовин зерна та додаткового живлення дріжджів аміним азотом. Встановлено позитивний вплив цього ферментного препарату на динаміку збродження сусла, глибину утилізації субстрату та вихід спирту.

Ключові слова: крохмалевмісна сировина, заміс спиртового виробництва, протеолітичний ферментний препарат, збродження.

Спиртове виробництво належить до однієї з важливих, перспективних і, водночас, матеріаловитратних галузей переробної промисловості — витрати на сировину та допоміжні матеріали у собівартості спирту складають до 70 % [1]. Основним видом сировини для виробництва спирту є зерно злакових культур, яке є джерелом вуглеводів, азотовмісних речовин, вітамінів та мінеральних компонентів.

На переважній більшості спиртових заводів, які перероблюють крохмалевмісну сировину, впроваджено прогресивну ресурсо- та енергозбережну технологію термофермен-

тативної обробки замісів з використанням комплексних ферментних препаратів (КФП) розріджуючої та оцукрювальної дії, які замінили солод із високоякісного зерна [2,5]. Це призвело до зменшення вмісту амінного азоту в суслі, оцукреному ферментними препаратами, що спричиняє подовження терміну зброджування сусла внаслідок зменшення швидкості накопичення дріжджів і їх фізіологічної активності. Адже найбільш доступним джерелом азоту для дріжджів-сахароміцетів є саме аміний азот, який може бути одержано з білків і пептидів зерна після їх попереднього гідролізу.

Тому, у разі застосування термоферментативного гідролізу крохмалю зерна за допомогою КФП амілолітичної дії для підвищення ефективності підготовки сировини до зброджування та забезпечення гідролізу білкових речовин зерна доцільно застосовувати також ферментні препарати протеолітичної дії [3,4]. Крім того, для утворення біомаси дріжджів з використанням амінокислот, одержаних в результаті гідролізу білків зерна протеолітичними ферментами, зменшуються витрати вуглеводів, які будуть використані на утворення спирту.

Метою цієї роботи є дослідження використання протеолітичного ферментного препарату Нейтраза у підготовці сировини до зброджування із застосуванням КФП для забезпечення дріжджів аміним азотом.

Дослідження проводили в лабораторних умовах з використанням помелу зерна пшениці ступеня дисперсності 98 % проходу через сито з діаметром отворів 1 мм, крохмалистістю 50 %, вологістю 14 %. Як джерело α -амілази застосовували ферментний препарат Термамил СЦ ДС (Novozymes A/S, Данія), глюкоамілази — Глюколад (Ензим, Вінниця), протеази — Нейтразу (Novozymes A/S, Данія). Для зброджування сусла використовували термотолерантні сухі дріжджі марки «Oenoferm C2».

Розріджування замісів помелів зерна здійснювали за температури 80 °С протягом 3,0 год. Витрати розріджуючого ферментного препарату склали 0,3 кг на 1 т умовного крохмалю.

Оцукрювання розріджених замісів проводили ферментним препаратом Глюколад в бродильних колбах за температури 35 °С з розрахунку 1,0 кг на 1 т умовного крохмалю.

В колби також вносили протеолітичний ферментний препарат Нейтраза у різних співвідношеннях 0,1; 0,2; 0,3 та 0,4 кг на 1 т умовного крохмалю. У фільтраті визначали вміст амінного азоту [6].

В кожену колбу задавали засівні дріжджі з розрахунку 20 млн клітин на 1 см³ сусла. Зброджування сусла проводили методом «бродильної проби» у конічних колбах протягом 72 год за температури 30 °С. Динаміку зброджування сусла контролювали за виділенням діоксиду вуглецю ваговим методом кожні 10 годин, починаючи з 12 год бродіння [6].

У зрілій бражці визначали вміст спирту рефрактометричним методом, титровану кислотність — титруванням 1 н розчином NaOH, вміст спирту — рефрактометричним методом, масову концентрацію незброджених цукрів і нерозчинного крохмалю — фотоколориметричним методом з резорциновим реактивом. Загальну кількість дріжджових клітин в 1 см³ бражки визначали методом прямого підрахунку в камері Горяєва [6].

В результаті додавання на стадії оцукрювання розрідженого замісу протеолітичного ферментного препарату Нейтраза вміст амінного азоту збільшувався на 45 % навіть після внесення порівняно невеликої кількості ферментного препарату (0,1 кг/т умовного крохмалю) Підвищення дози препарату до 0,4 кг приводило до збільшення амінного азоту на 97,9 % відносно контролю (таблиця 1).

Відомо [1], що загальна потреба дріжджів в азоті складає від 20 до 25 мг на 10 млрд клітин. Наявність амінного азоту сприяє підвищенню їх регенеративної, бродильної активності, осмофільності і термотолерантності. Активне розмноження дріжджів спостерігається за концентрації амінного азоту на рівні 35 мг/дм³ сусла. Отже, доцільною дозою ферментного препарату Нейтраза для внесення в сусло може бути від 0,2 до 0,3 кг на 1 т умовного крохмалю.

Таблиця 1. Вплив дозування ферментного препарату Нейтраза на вміст амінного азоту в суслі

Вміст амінного азоту в 100 дм ³ суслу у разі внесення ферментного препарату Нейтраза, кг на 1 т умовного крохмалю									
К		0,1		0,2		0,3		0,4	
мг	Зміни відносно контролю, %	мг	Зміни відносно контролю, %	мг	Зміни відносно контролю, %	мг	Зміни відносно контролю, %	мг	Зміни відносно контролю, %
19,60	-	28,42	45,0	31,78	62,1	36,78	87,7	38,78	97,9

Для підтвердження сприятливого впливу протеолітичного ферментного препарату на подальше зброджування суслу дріжджами дослідили динаміку виділення діоксиду вуглецю під час бродіння суслу з додатковим внесенням ферментного препарату Нейтраза у тих самих дозуваннях (таблиця 2).

Таблиця 2. Динаміка зброджування суслу з додатковим внесенням у нього ферментного препарату Нейтраза

Тривалість бродіння, год	Кількість виділеного діоксиду вуглецю, г, під час зброджування суслу у разі внесення в нього ферментного препарату Нейтраза, кг на 1 т умовного крохмалю				
	К	0,1	0,2	0,3	0,4
12	0,75	0,52	0,53	0,54	0,55
22	1,83	1,34	1,35	1,37	1,38
32	3,19	2,79	2,80	2,82	2,85
42	2,64	3,00	3,02	3,05	3,09
52	0,63	2,06	2,07	2,09	2,11
62	0,45	0,11	0,12	0,13	0,13
72	0,23	0,02	0,03	0,03	0,03
Всього	9,72	9,84	9,92	10,03	10,14

Із дослідних даних видно, що в перші години зброджування накопичення діоксиду вуглецю в дослідних варіантах проходило повільніше, ніж у контрольному, що можна пояснити більш активним розмноженням дріжджів. Але після 42 годин зброджування виділення CO₂ значно збільшувалось в дослідних зразках і тривало на високому рівні до 52 годин процесу.

Після 62 годин зброджування кількість виділеного діоксиду вуглецю була значно меншою у дослідних зразках порівняно з контролем, що свідчить про закінчення процесу головного бродіння і початок доброджування. Динаміка зброджування дослідних зразків свідчить про більш інтенсивний процес зброджування в період з 32 до 52 години спостереження, тоді як в контрольному варіанті найбільш енергійне бродіння було з 22 до 42 години, процес розвивався повільніше і так само повільніше відбувалось доброджування суслу. Загальна ж кількість виділеного діоксиду вуглецю була на 1,2 – 4,3 % вищою в зразках із внесенням ферментного препарату Нейтраза, що свідчить про позитивний ефект такого технологічного прийому.

Варто відзначити, що титрована кислотність зрілої бражки в дослідних зразках і контрольному варіанті була на одному рівні і становила від 0,48 до 0,50 см³ 1 н NaOH на 20 см³ бражки, що свідчить про відсутність впливу внесення протеолітичного ферменту на цей показник і активне розмноження контамінуючої мікрофлори.

Підтвердженням більш активного розмноження дріжджів у разі додаткової кількості амінного азоту в суслі, спричиненої дією протеолітичного ферментного препарату і додатковим гідролізом білкових речовин є результати прямого підрахунку дріжджових клітин у зрілій бражці. Так, якщо в контрольному зразку накопичилось 85 млн дріжджових клітин в 1 см³, то в дослідних зразках їх кількість була значно більшою: 90, 115, 160 і 170 млн в 1 см³ для дозування Нейтрази 0,1; 0,2; 0,3 і 0,4 кг на 1 т умовного крохмалю, відповідно. Власне, це пояснюється задоволенням потреб дріжджів у азотному живленні для синтезу білка для їх розмноження і, як наслідок, підвищенням їхньої фізіологічної активності, що, в свою чергу, зумовлює необхідний рівень енергетичного метаболізму в процесі утилізації вуглеводних компонентів.

Аналіз концентрації вуглеводів у зрілій бражці (таблиця 3) показав правильність цього твердження. Адже в дослідних зразках загальна концентрація незброджених вуглеводів була нижчою на 9,1 – 18,3 %, ніж у контролі, також на 8,2 – 15,3 % менше залишилось нерозчиненого крохмалю. Отже, з огляду на більш повне використання сировини внесення протеолітичного ферменту в сусло також є доцільним.

Таблиця 3. Глибина утилізації вуглеводів сусла у разі додаткового внесення у нього ферментного препарату Нейтраза

Тип вуглеводів	Масова концентрація вуглеводів у зрілій бражці, г/100 см ³ , у разі внесення в сусло ферментного препарату Нейтраза, кг на 1 т умовного крохмалю				
	К	0,1	0,2	0,3	0,4
Загальні вуглеводи	0,448	0,407	0,394	0,381	0,366
Розчинні вуглеводи	0,312	0,281	0,273	0,266	0,258
Нерозчинений крохмаль	0,098	0,090	0,085	0,084	0,083

Збільшення глибини утилізації вуглеводів сусла у разі додаткового внесення у нього ферментного препарату Нейтраза може бути також пояснено підвищенням їх доступності для амілолітичних ферментів внаслідок дії протеолітичних ферментів на білкові речовини, які оточують зерна крохмалю, набухають під час нагрівання замісу, змінюючи його реологічні властивості та підвищуючи в'язкість. Отже, можна передбачити, що зі збільшенням концентрації сусла роль протеаз у замісі буде збільшуватись.

Для підтвердження більш повного використання вуглеводів в процесі зброджування сусла з використанням протеолітичних ферментів визначали вміст спирту в зрілих бражках контрольних і дослідних зразків (таблиця 4).

Таблиця 4. Об'ємна частка спирту в дозрілих бражках

Об'ємна частка спирту в дозрілих бражках, % об., у разі внесення в сусло ферментного препарату Нейтраза, кг/т умовного крохмалю				
Контроль	0,1	0,2	0,3	0,4
8,26	8,29	8,31	8,33	8,34

Як видно із дослідних даних, внесення протеолітичних ферментів позитивно впливає на накопичення спирту в бражці. Об'ємна частка спирту в дослідних зразках бражки збільшувалась на 0,61 % порівняно з контролем за витрат Нейтрази 0,2 кг на 1 т умовного крохмалю і на 0,97 % — за витрат Нейтрази 0,4 кг на 1 т умовного крохмалю. Це

пояснюється тим, що дріжджі на накопичення біомаси використовували додаткове живлення, яке було отримане з амінокислот, одержаних в результаті доданого протеолітичного препарату, а збережені цукри було використано для утворення спирту.

Проаналізувавши результати досліджень по вмісту амінного азоту, динаміці зброджування зернового суслу, одержаного за прогресивною технологією термоферментативної обробки замісів, а також показників зрілої бражки, науково і експериментально підтверджено доцільність внесення ферментного препарату Нейтраза на стадії підготовки зернової сировини до зброджування в кількості 0,2 – 0,3 кг на 1 т умовного крохмалю.

Висновки

В технології спирту із крохмалевмісної сировини із застосуванням термоферментативної обробки замісів амілолітичними ферментними препаратами додавання в композицію протеолітичного ферментного препарату Нейтраза є суттєвим фактором для збільшення амінного азоту в суслі, інтенсифікації процесу зброджування і підвищення глибини утилізації субстрату за рахунок кращого забезпечення дріжджів амінокислотним живленням білкових речовин зерна. У разі дозування ферментного препарату Нейтраза на рівні 0,2 – 0,3 кг на 1 т умовного крохмалю вміст амінного азоту в суслі збільшувався на 62 – 88 %, кількість виділеного діоксиду вуглецю — на 2,1 – 3,2 %, кількість дріжджових клітин — на 35 – 88 %, об'ємна частка спирту в дослідних дозрілих бражках — на 0,61 – 0,97 %, вміст незброджених вуглеводів зменшувався на 12 – 15 %.

Запропонований спосіб підготовки зернової сировини до зброджування потребує дослідження з оптимізації місця введення ферментного препарату Нейтраза в технологічний процес, гідромодулю замісу для різних видів крохмалевмісної сировини.

Література

1. *Технологія спирту*: підручник для студентів вищих навчальних закладів / В.О. Маринченко, В.А. Домарецький, П.Л. Шиян [та ін.] // Під ред. проф. В.О. Маринченка. — Вінниця: Поділля-2000, 2003. — 496 с.
2. *Технологічний регламент виробництва спиртових бражок при низькотемпературному розварюванні крахмаловмісної сировини з використанням концентрованих ферментних препаратів селективної дії*. ТР 00032744-812-2002. — К.: УкрНДІспиртбіопрод, 2002. — 92 с.
3. *Римарева Л.В.* Роль протеаз в спиртовом брожении / Л.В. Римарева, М.Б. Оверченко // Микробные биокатализаторы для перерабатывающих отраслей АПК: Сб. научн. тр. — М., 2006. — С. 127 – 137.
4. *Дячкина А.Б.* Роль белково-протеиназного комплекса в технологии получения этанола из зерна / А.Б. Дячкина, Г.П. Карпиленко, В.С. Моисеенко // Производство спирта и ликероводочных изделий, 2007. — №2. — С. 26 – 29.
5. *Патент України № 35346 МКІ С12F3/00*. Спосіб одержання спиртових бражок із крахмаловмісної сировини / І.С. Гулий, Ю.В. Жихарев, І.Д. Жолнер, П.Л. Шиян, В.О. Маринченко [та ін.] — Заявл.09.09.1999; Опубл. 16.06.2003. Бюл. № 6.
6. *Інструкція по технічному і мікробіологічному контролю спиртового виробства*. — М.: Агропромиздат, 1986. — 390 с.

УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ СПОСОБА ОСАХАРИВАНИЯ ЗАМЕСОВ СПИРТОВОГО ПРОИЗВОДСТВА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТА ПРОТЕОЛИТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ

В.А. Маринченко, В.В. Галанская

Национальный университет пищевых технологий

Л.В. Маринченко

*Национальный технический университет Украины
«Киевский политехнический институт»*

Экспериментально обоснована целесообразность использования ферментного препарата Нейтраза протеолитического действия с целью гидролиза белковых веществ зерна и дополнительного питания дрожжей аминным азотом. Установлено позитивное влияние этого ферментного препарата на динамику сбраживания сусле, глубину утилизации субстрата и выход спирта.

Ключевые слова: *крахмалосодержащее сырье, замес спиртового производства, протеолитический ферментный препарат, сбраживание.*