

ФЕРМЕНТАТИВНИЙ ГІДРОЛІЗ КРОХМАЛЮ

У роботі досліджено вплив електрохімічно активованої води у складі субстрату на активність ензимного препарату Amylex 3T та на швидкість ферментативного гідролізу крохмалю. Експериментально встановлено результативність використання електрохімічно активованої води на стадії одержання суслу з крохмалевмісної сировини у спиртовому виробництві, оскільки в технологічних умовах не лише підвищується альфаамілазна активність ензиму, а й забезпечується його стабільність.

Ключові слова: крохмаль, гідроліз, ферментний препарат, католіт, аноліт.

N.O. PANKIV, L.YA. PALIANYTSIA, R.B. KOSIV, N.I. BEREZOVSKA
National University «Lviv Polytechnic»

ENZYMATIC HYDROLYSIS OF STARCH

Abstract: The aim of this work is to study the influence of electrochemically activated water on α -amylase activity of enzyme Amylex 3T and on the rate of starch enzymatic hydrolysis, which is set by the number of hydrolyzed starch under the action of the enzyme at a temperature close to the temperature of wort liquefaction (90 °C).

For research used the enzyme preparation Amylex 3T (Danisco), which is widely apply in the alcohol production. Electrochemical activation of water realized in the diaphragm electrolyzer. As a result of electrolysis received catholyte (pH 10,94) and anolyte (pH 2,79). Mixture of catholyte and anolyte obtained by their mixing in equal proportions (pH 6,74). For the starch hydrolysis as a substrate used 2% starch solution, which is prepared from catholyte, anolyte and their mixture (1:1). As a control solution served starch with distilled water. Amylex 3T diluted distilled water. The activity of enzyme Amylex 3T and rate of hydrolysis was determined by optical density of the solution resulting from iodine-starch reaction.

The expediency of the using of electrochemically activated water (catholyte) for substrate making, as activity of Amylex 3T increased by 84,57% compared with the control was proved. In the process of enzymatic hydrolysis of starch, prepared with catholyte, at 90 °C duration 90 minutes its speed was significantly higher than control and did not decline throughout the duration of the reaction.

The presence of anolyte in starch solution decreasing of α -amylase activity of enzyme Amylex 3T was caused. Preparation of the substrate from a mixture of catholyte and anolyte in ratio 1:1 contributed to increasing of Amylex 3T activity to 10,04%, and the rate of starch hydrolysis at 90 °C for 40 and 60 minutes was higher compared with the control.

Keywords: starch, hydrolysis, enzyme, catholyte, anolyte.

Вступ

Основним завданням харчової індустрії, зокрема спиртового виробництва, є ресурсо- та енергозбереження на кожній стадії виробництва. Так, при розробленні низькотемпературної схеми розварювання крохмалевмісної сировини значний внесок в науку зробили вчені-мікробіологи, які виділили ферментні препарати (ФП) бактеріальної термостабільної α -амілази [1]. На сьогодні 78–81 % промислових ензимних препаратів, які використовують у харчовій промисловості припадає на спиртову галузь та пивоваріння [2].

Аналіз останніх публікацій

Ферментні препарати, на відміну від солоду, який раніше використовувався, має ряд переваг: висока активність, селективність дії, зручність у дозуванні, термотолерантність та мікробіологічна чистота [1]. Проте вони характеризуються відносно високою вартістю, яка у кінцевому результаті впливає на собівартість спирту. Такий недолік можна виправити шляхом зменшення витрати ферментного препарату за рахунок підвищення його активності та стабільності. Забезпечення стабільності ферменту дозволить інтенсифікувати технологічний процес, що призведе до повнішого розрідження та оцукрювання сировини, збільшення виходу екстракту, а як наслідок – до збільшення виходу етилового спирту.

Багато досліджень присвячено розробленню способів активації ферментних препаратів, які використовують для каталізу біотехнологічних процесів. У роботі [3] встановлено, що при 50-разовому обробленні розчинів ФП у ротаційно-пульсаційному апараті амілолітична та глюкоамілазна активності зростають на 16 % та 17 % від початкової.

Проведення попередньої активації мультиензимної композиції на основі Laminex BG і Альфалад БН у присутності С₇-алкілоксибензолу у технології одержання пивного суслу з ячмінного солоду та ячменю, сприяє зменшенню тривалості оцукрювання затору на 15–30 %, збільшенню виходу екстракту на 4–7% та дозволяє знизити в 2 рази витрату ферментів при використанні несолодженої сировини [4]. Відомі позитивні результати активації ферментів солоду лазерним випромінюванням ультрафіолетового діапазону при затиранні зернопродуктів [5].

Біоконверсія крохмалевмісної сировини у спиртовому виробництві відбувається за участю розріджуючих та оцукрюючих ензимних препаратів. У якості перших служить α -амілаза, яка належить до ендоамілаз. Оцукрюючим екзоферментом є глюкоамілаза. Відомо про синергійний ефект екзо- та ендоферментів [6, 7] тобто дія одного ензиму підсилює дію іншого, що важливо для глибшої конверсії крохмалю.

Крім безпосереднього впливу різних чинників на ферменти, для інтенсифікації біотехнологічних процесів використовують оброблення води, призначеної для технологічного процесу. Технологічна вода входить до складу напівпродуктів та її хімічний склад впливає на хід технологічних процесів та якість спирту [8], отже, і на сировину та ферменти.

До альтернативних методів оброблення води належать фізичні способи, такі як дія магнітного поля, ультразвуку та інші [9]. Проте, на сьогодні велика увага науковців спрямована на електрохімічну активацію

води з утворенням католіту та аноліту. У процесі електролізу [10] в катодній камері утворюються гідроксиди натрію і калію, за рахунок чого рН зростає, відбувається зсув вуглекислотної рівноваги з утворенням важкорозчинних карбонатів кальцію і магнію, випадають в осад іони важких металів і заліза у вигляді нерозчинних гідроксидів. При анодному електрохімічному обробленні рН води знижується, ОВП зростає за рахунок утворення стійких і нестабільних кислот (сульфатної, хлоридної, гіпохлоритної, надсульфатних), а також пероксиду водню, пероксосульфатів, пероксокарбонатів, кисневмісних сполук хлору та різних проміжних сполук, що утворюються в процесі самовільного розкладу і взаємодії названих сполук. Крім цього, збільшується вміст розчинних хлору та кисню, зменшується концентрація водню, азоту, змінюється структура води [10].

Постановка завдання

У процесі розварювання крохмалевмісної сировини у спиртовому виробництві використовують комплекси ферментних препаратів, які знижують в'язкість суслу на стадії розріджування та розщеплюють крохмаль, декстрини та олігосахариди до глюкози на стадії оцукрювання. У роботі [11] експериментально доведено, що електрохімічно активована вода підвищує активність ферментного препарату Amylex 4T, проте варто дослідити вплив католіту, аноліту та їх суміші на активність інших ФП амілолітичної дії та на процес гідролізу субстрату при температурі, близькій до технологічних умов.

Тому, метою даної роботи є дослідження впливу електрохімічно активованої води на альфаамілазну активність Amylex 3T та на швидкість ферментативної реакції гідролізу крохмалю (за кількістю прогідролізованого крохмалю) під дією ферменту при температурі, близькій до температури розріджування.

Результати досліджень

Для дослідження використовували ензимний препарат Amylex 3T (фірма Danisco), який широко використовують у виробництві спирту. Цей ФП гідролізує внутрішні α -1,4-глікозидні зв'язки крохмалю, глікогену, продуктів їх послідовного розщеплення, що призводить до швидкого зниження в'язкості клейстеризованих розчинів крохмалю на стадії розрідження, забезпечуючи підготовку субстрату до дії глюкоамілази. Amylex 3T є препаратом бактеріальної термостабільної α -амілази, який одержують глибинним культивуванням штаму бактерій *Bacillus licheniformis*. Оптимальними умовами дії даного ензиму є діапазон рН 5,5–7,0 та температури 80–95 °С.

Приготування електрохімічно активованої води здійснювали у діафрагмовому електролізері наливного типу ЕАВ-3К. Такий апарат працює на принципі індукваного зовнішнім електричним впливом направленою відхилення активності електронів у водному середовищі від рівноважного стану [12]. Так, за рахунок насичення катодної камери іонами OH^- тут утворюється лужна вода (католіт), а анодній камери іонами H^+ – кисла вода (аноліт). Як вихідну воду використовували водопровідну. Суміш католіту та аноліту отримували змішуванням однакових їх об'ємів.

Альфаамілазу активність визначали згідно [13]. Як субстрат використовували 2 % розчин крохмалю, приготований на основі католіту, аноліту, їх суміші (1:1). Для кращого пояснення природи впливу активованої води на гідроліз субстрату додатково готували його на основі кислоти HCl та лугу NaOH з такими ж значеннями рН як аноліту та католіту, відповідно. Контролем служив розчин крохмалю з дистильованою водою. Amylex 3T розводили дистильованою водою. Значення рН досліджуваних зразків води наведено на рис. 1.

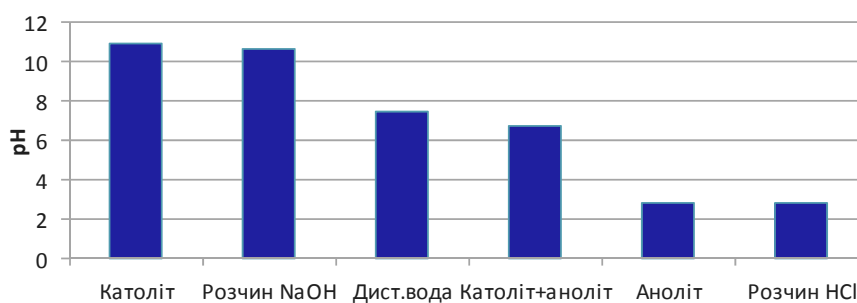


Рис. 1. Значення рН досліджуваних зразків води

Першим етапом роботи було визначення альфаамілазної активності у субстратах, приготованих на різних зразках води, значення рН яких наведено на рис. 2.

У зразках, де субстрат приготований на основі католіту, розчину лугу та суміші католіт+аноліт спостерігалася вища у порівнянні з контролем альфаамілазна активність Amylex 3T (рис. 3). Так, вона зростає на 84,57 %, 16,54 % та 10,04 % відповідно.

Аноліт та розчин кислоти спричинили зниження активності на 29,1 % та 45,75 % (рис. 3). Такі результати, пояснюються тим, що з підвищенням концентрації H^+ -іонів та температури, зменшується стабільність α -амілази [14]. Отримані результати узгоджуються з [11].

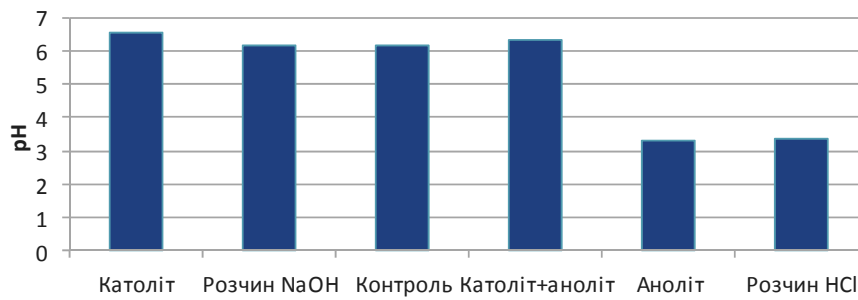


Рис.2. Значення рН субстратів, приготованих на різних зразках води

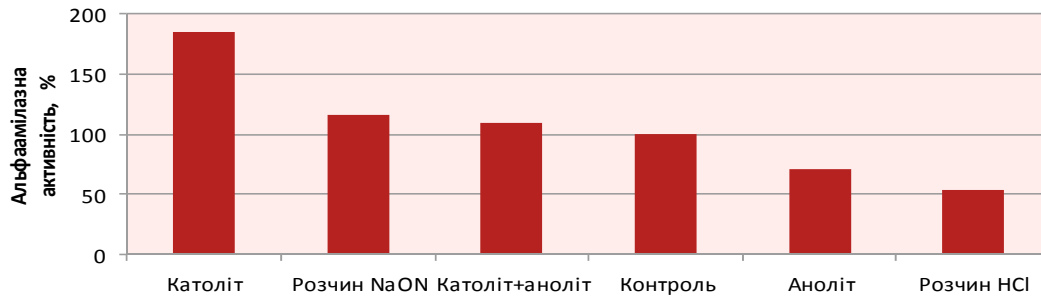


Рис. 3. Альфаамілазна активність ФП Amylex 3Т

Наступним етапом було вивчення швидкості ферментативного гідролізу крохмалю при температурі 90 °С. Для цього у конічні колби наливали розчин субстрату, нагрівали у термостаті до 90 °С та вносили розведений розчин ензимного препарату. Суміш швидко перемішували і витримували при цій температурі 90 хв., при цьому відбирали по 0,5 см³ суміші у точках 10, 20, 40, 60, 90 хв. Швидкість гідролізу визначали за оптичними густинами розчинів, отриманих в результаті йод-крохмальної реакції. Контролем була проба, до якої вносили дистильовану воду.

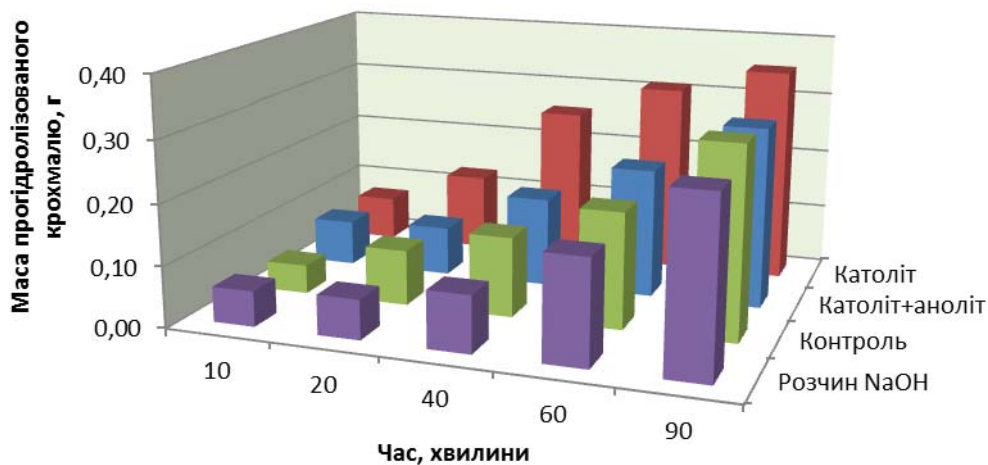


Рис. 4. Швидкість ферментативної реакції гідролізу крохмалю у часі

При використанні аноліту та розчину кислоти у складі субстрату для ферментативного гідролізу крохмалю при 90 °С відбулася інактивація ферменту. З усіх досліджуваних зразків активуюча властивість католіту проявилася найбільше (рис.4). Так, вже на 10 хвилину гідролізу маса прогідролізованого крохмалю була на 53,6 % вищою у порівнянні з контролем. Далі також відбувалося підвищення швидкості гідролізу на 40,46 %, 98,4 %, 64,23% та 13,25 % на 20, 40, 60 та 90 хв, відповідно, відносно контролю.

Швидкість гідролізу у зразку з католітом+аноліт та у контрольному зразку була перемінною на різних проміжках часу. На 40 та 60 хв маса прогідролізованого крохмалю у зразку з сумішшю була вищою на 12,94 % та 12,29 %, ніж у контролі, проте на 90 хвилину знизилася на 4,71 %. Зразок з розчином NaOH характеризувався найнижчою швидкістю гідролізу.

Висновки

Отже, в ході проведених експериментальних досліджень по вивченню впливу електрохімічно активованої води на альфаамілазну активність ферментного препарату Amylex 3Т доведено доцільність використання електрохімічно активованої води (католіту) у складі субстрату, оскільки активність ензиму зросла на 84,57 % у порівнянні з контролем. У процесі проведення ферментативного гідролізу крохмалю, приготованого на католіті при 90 °С протягом 90 хв його швидкість була значно вищою, ніж контролю і не знижувалася впродовж всієї тривалості реакції.

Наявність у складі розчину крохмалю аноліту спричинило зменшення альфаамілазної активності ензимного препарату. Приготування субстрату на основі суміші католіту з анолітом у співвідношенні 1:1

сприяло підвищенню активності Amylex 3T на 10,04 %, а швидкість гідролізу крохмалю при 90 °C на 40 та 60 хвилини була вищою у порівнянні з контролем.

Література

1. Шиян П. Л. Іноваційні технології спиртової промисловості. Теорія і практика / П. Л. Шиян, В. В. Сосницький, С. Т. Олійничук. – К. : Вид. дім. «Асканія», 2009. – 424 с.
2. Дехтяренко Н.В. Виробництво ферментних препаратів в Україні / Н.В. Дехтяренко // Наукові вісті НТУУ «КПІ». – 2013. – № 3. – С. 48–58.
3. Бліщ Р.О. Вплив кавітації на активність ферментних препаратів спиртового виробництва / Р.О. Бліщ, А.М. Лудин, С.Р. Мельник, В.О. Маринченко // Вісник Національного університету "Львівська політехніка". – 2003. – № 488. – С. 140–143.
4. Лысюк В.М. Совершенствование технологии пивного сусла на основе активации гидролитических ферментных препаратов микробного происхождения : автореферат дис. на соискание науч. степени канд. техн. наук : спец. 05.18.07 «Биотехнология пищевых продуктов и биологических активных веществ» / Лысюк Василий Михайлович / Моск. гос. ун-т пищевых пр-в (МГУПП). – М., 2011. – 25 с.
5. Романова З.М. Вплив лазерного опромінення на активацію ферментів солоду при отриманні пивного сусла / З.М. Романова, В.С. Зубченко, М.В. Карпутіна, Р.М. Подаєв // Харчова промисловість. – 2010. – № 9. – С. 20–22.
6. Beldman G. Synergism in cellulose hydrolysis by endoglucanases and exoglucanases purified from *Trichoderma viride* / G. Beldman, A. G. J. Voragen, F. M. Rombouts, W. Pilnik // *Biotechnology and Bioengineering*. – 1988. – Vol. 31, Issue 2. – P. 173–178.
7. Fujii M. Synergism of α -amylase and glucoamylase on hydrolysis of native starch granules / M. Fujii, T. Homma, M. Taniguchi // *Biotechnology and Bioengineering*. – 1988. – Vol. 32, Issue 7. – P. 910–915.
8. Технологія спирту / [В.О. Маринченко, В.А. Домарецький, П.Л. Шиян, В.М. Швець, П.С. Циганков, І.Д. Жолнер] / під ред. В.О. Маринченка. – Вінниця : "Поділля-2000", 2003. – 496 с.
9. Книжка Т.С. До питання аналізу існуючих методів активації води / Т.С. Книжка, Т.В. Бондаренко // *Наук. вісник нац. ун-ту біоресурсів і природокористування України*. – 2009. – Вип. 134, ч.2. – С. 24–31.
10. Электрохимическая активация: история, состояние, перспективы / [В.М. Бахир, Ю.Г. Задорожний, Б.И. Леонов, С.А. Паничева, В.И. Прилуцкий, О.И. Сухова] ; под ред. В.М. Бахира. – М. : ВНИИИМТ, 1999. – 256 с. : ил.
11. Паляниця Л. Я. Активация ферментного препарату Amylex 4T / Л.Я. Паляниця, Н.І. Березовська, Р.Б. Косів, Н.О. Паньків // *Молодий вчений*. – 2014. – № 7. – С. 11–13.
12. Куртов В.Д. Об удивительных свойствах электроактивированной воды / В.Д. Куртов. – К. : ГУИКТ, 2008. – 236 с.
13. Препарати ферментні для спиртового виробництва. Методи визначення амілолітичної активності : СОУ 15.9-37-241:2005 // Стандарт організацій Мінагрополітики України. Укргростандартсертифікація. – 2006. – 26 с.
14. Диксон М. Ферменты / М.Диксон, Е.Уэбб. – М. : Мир, 1984. – Т. 1. – 1118 с.

References

1. Shyian, P. L. Inovatsiini tekhnolohii spyrtovoi promyslovosti. Teoriia i praktyka / P. L. Shyian, V. V. Sosnytskyi, S. T. Oliinychuk. – K.: Vyd. dim. «Askaniia», 2009. - 424 s.
2. Dekhtiarenko, N.V. Vyrobnnytstvo fermentnykh preparativ v Ukraini / N.V. Dekhtiarenko // *Naukovi visti NTUU «KPI»*. – 2013. – №3. – S.48-58.
3. Blishch R.O. Vplyv kavitatsii na aktyvnist fermentnykh preparativ spyrtovoho vyrobnnytstva / R.O. Blishch, A.M. Ludyn, S.R. Melnyk, V.O. Marynchenko // *Visnyk Natsionalnoho universytetu "Lvivska politehnika"*. – 2003. – № 488. – S. 140-143.
4. Lyisyuk, V.M. Sovershenstvovanie tehnologii pivnogo susla na osnove aktivatsii gidroliticheskikh fermentnykh preparatov mikrobного proishozhdeniya : avtoreferat dis ... kandidata tehnikeskikh nauk : spets. 05.18.07 "Biotehnologiya pischevyykh produktov i biologicheskikh aktivnykh veschestv" / Lyisyuk Vasilii Mihaylovich; [Mesto zaschityi: Mosk. gos. un-t pischevyykh pr - v (MGUPP)]. - Moskva, 2011. - 25 s.
5. Romanova Z.M. Vplyv lazernoho oprominennia na aktyvatsiiu fermentiv solodu pry otrymanni pyvnoho susla / Z.M. Romanova, V.S. Zubchenko, M.V. Karputina, R.M. Podaiev // *Kharchova promyslovist*. – 2010. – №9. – S. 20-22.
6. Beldman, G. Synergism in cellulose hydrolysis by endoglucanases and exoglucanases purified from *Trichoderma viride* / G. Beldman, A. G. J. Voragen, F. M. Rombouts, W. Pilnik // *Biotechnology and Bioengineering*. – 1988. – Vol. 31, Issue 2. – P. 173–178.
7. Fujii, M. Synergism of α -amylase and glucoamylase on hydrolysis of native starch granules / M. Fujii, Homma T., Taniguchi M. // *Biotechnology and Bioengineering*. – 1988. – Vol. 32, Issue 7. – P. 910–915.
8. Marynchenko V.O. Tekhnolohiia spyrту. V.O. Marynchenko, V.A. Domaretskyi, P.L. Shyian, V.M. Shvets, P.S. Tsyhankov, I.D. Zholner. / Pid red. prof. V.O. Marynchenka. – Vinnytsia: "Podillia-2000", 2003. –496 s.
9. Knyzhka, T.S. Do pytannia analizu isnuuychkh metodiv aktyvatsii vody / T.S. Knyzhka, Bondarenko T.V. // *Nauk. visnyk nats. un-tu bioresursiv i pryrodokorystuvannia Ukrainy*. – 2009. – Vyp. 134, ch.2. – S. 24-31.
10. Bakhir, V.M. Elektrokhimicheskaya aktivatsiya: istoriya, sostoyaniye, perspektivy / V.M. Bakhir, Yu.G. Zadorozhnyi, B.I. Leonov, S.A. Panicheva, V.I. Prilutskiy, O.I. Sukhova.; Pod red. V.M.Bakhira. - M.: VNIIMT, 1999. - 256 s.: il.
11. Paliantsia L. Ia. Aktyvatsiia fermentnoho preparatu Amylex 4T / L.Ia. Paliantsia, N.I. Berезovska, R.B. Kosiv, N.O. Pankiv // *Molodyi vchenyi*. – 2014. – №7. – S.11-13.
12. Kurtov, V.D. Ob udivytelnykh svoystvakh elektroaktyvirovannoi vody / V.D. Kurtov. – K. : HUYKT, 2008. – 236 s.
13. Preparaty fermentni dlia spyrtovoho vyrobnnytstva. Metody vyznachennia amilolitychnoi aktyvnosti: SOU 15.9-37-241:2005 // *Standart orhanizatsii Minahropolityky Ukrainy. Ukhrostandartserlyfikatsiia*. – 2006. – 26 s.
14. Dikson M., Uebb.C. Fermenty: Per. s angl. – M. : Mir, 1984. – T.1 –1118 s