

*Т.І. Лисак, наук. співроб.,
С.Т. Олійнічук, д.т.н.,
Ю.О. Батог, наук. співроб.,
О.О. Коваль, пров. інженер*
Інститут продовольчих ресурсів НААН

ОСОБЛИВОСТІ ТЕРМОФЕРМЕНТАТИВНОЇ ОБРОБКИ ЗАМІСІВ ІЗ КРОХМАЛЕВМІСНОЇ СИРОВИНИ

Проаналізовано вплив температурного режиму гідролізу крохмалю на активність розріджуючого ферментного препарату «АМИЛЕКС 4Т». Визначено залежність ступеню конверсії крохмалю та накопичення спирторозчинних вуглеводів в суслі від дозування α -амілази. Встановлено взаємозв'язок між досліджуваними параметрами розчинення крохмалю та показниками зрілої бражки. Запропоновано ефективний спосіб поетапного дозування розріджуючого ферментного препарату.

Ключові слова: крохмаль, гідроліз, сусло, ферментний препарат, зріла бражка, спирт

*T.Lysak, res. worker
S.Oliynichuk, D. Sc., Technics
Y. Batog, res. worker
O.Koval, lead. eng.*
Food Resources Institute of NAAS

THE THERMOENZYMATIC TREATMENT FEATURES OF MASHES FROM STARCH- CONTAINING RAW MATERIALS

The influence of starch hydrolysis temperature mode on liquefying enzyme solution «AMYLEX 4T» activity is analyzed. The dependence of starch conversion ratio and alcohol-soluble carbohydrates in media accumulation on α -amylase dosage is determined. Correlation between investigated starch liquefaction parameters and fermented wort indexes is set. Effective method of gradual liquefying enzyme solution dosage is suggested.

Key words: starch, hydrolysis, mash, enzyme solution, fermented wort, alcohol

*Т.И. Лысак, науч. сотруд.,
С.Т. Олийничук, д-р.техн. наук,
Ю.А. Батог, науч. сотрудник,
О.А. Коваль, ведущий инженер*
Інститут продовольственных ресурсов НААН

ОСОБЕННОСТИ ТЕРМОФЕРМЕНТАТИВНОЙ ОБРАБОТКИ ЗАМЕСОВ ИЗ КРАХМАЛОСОДЕРЖАЩЕГО СЫРЬЯ

Проанализировано влияние температурного режима гидролиза крахмала на активность разжижающего ферментного препарата «АМИЛЕКС 4Т». Определена зависимость степени конверсии крахмала и накопления спирторастворимых углеводов в сусле от дозировки α -амилазы. Установлена взаимосвязь между исследуемыми параметрами разжижения крахмала и показателями зрелой бражки. Предложен эффективный способ поэтапного дозирования разжижающего ферментного препарата.

Ключевые слова: крахмал, гидролиз, сусло, ферментный препарат, зрелая бражка, спирт

Постановка проблеми. На фоні постійного розвитку ринку альтернативного палива все більше зростає потреба у виробництві паливних оксигенатів, зокрема біоетанолу. В Україні основна кількість підприємств, що виробляють даний продукт, в якості сировини використовує крохмалевмісні зернові культури. В умовах постійного росту цін на всі види зерна, виникає гостра необхідність в удосконаленні та оптимізації виробничих процесів з метою забезпечення рентабельності виробництва та конкурентоспроможності галузі на внутрішньому та світовому ринках.

Одним із таких заходів є підвищення концентрації сусла та, відповідно, спирту в зрілій бражці. Це збільшує коефіцієнт використання виробничої потужності підприємства, сприяє підвищенню енергоощадності підприємства за рахунок зменшення витрат гріючої пари на перегонку бражки та підвищення його екологічності внаслідок зменшення кількості основного органічного відходу виробництва – післяспиртової барди [1,2].

Однак такі рішення спричинюють низку технологічних проблем, зокрема підвищення в'язкості сусла, що, в свою чергу, може привести до закупорки технологічних комунікацій та аварійних зупинок виробництва. Дані процеси відбуваються внаслідок здатності амілопектину (однієї з основних сполук крохмального зерна) до утворення клейстерів за умов підвищених температур[1].

Окрім цього, підвищення концентрації сусла спричиняє зміни в перебігу технологічних процесів гідролізу крохмалю та зброджування отриманого сусла дріжджами. Внаслідок цього виникає проблема неповної асиміляції глюкози дріжджами та зменшення виходу спирту з тонни сировини, що негативно відображається на економічних показниках підприємства.

Тому більш ґрунтовне вивчення процесів, що відбуваються на стадії конверсії крохмалю в метаболіти, придатні для асиміляції дріжджами, є необхідним для кращого розуміння процесів та розробки новітніх методів їх контролю.

Основними параметрами, що контролюються впродовж розчинення крохмалю, є температура ведення процесу, його тривалість та дозування розріджуючого ферментного препарату (α -амілази).

Матеріали і методи. Об'єктами досліджень були амілолітичний ферментний препарат «Амілекс 4Т» фірми «Даніско», сусло, приготоване з кукурудзи, процеси термоферментативної обробки та зброджування сусла, зріла бражка.

В роботі використовували загальноприйняті в спиртовій промисловості методи досліджень [3,4]. Умовну крохмалистість зерна визначали поляриметрично, амілолітичну активність ферментних препаратів - колориметрично, технологічний режим зрілої бражки проводили методом «бродильної проби». Вміст спирту в бражних дистилятах визначали ареометрично, вміст незброджених вуглеводів в бражці - колориметрично з антроновим реактивом, реакцію середовища – потенціометрично.

Визначення накопичення спирторозчинних вуглеводів у процесі розчинення. В чотири конічні колби об'ємом 500 см^3 брали наважки по 73 г помелу кукурудзи, змішували з водою, доводили об'єми сумішей до 250 см^3 , вносили розріджуючий ФП «Амілекс 4Т» фірми «Даніско» із розрахунку 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 одиниць амілолітичної здатності на г крохмалю відповідно та проводили розрідження замісу впродовж 3 годин. Через 1, 2 та 3 години розрідження відбирали по 25 см^3 маси та визначали вміст спирторозчинних вуглеводів колориметричним методом з антроновим реактивом[3].

Визначення впливу температури на активність та стабільність розріджуючого ФП. По 1 см^3 ФП «Амілекс 4Т» фірми «Даніско» вносили в 2 мірні колби об'ємом 100 см^3 кожна. Після цього одну колбу витримували 3 години за температури $90\text{ }^\circ\text{C}$, а іншу - спочатку 1 годину за температури $55\text{ }^\circ\text{C}$, потім 1 годину при $75\text{ }^\circ\text{C}$ та 1 годину при $90\text{ }^\circ\text{C}$. Після кожної години витримки визначали активність ФП колориметрично згідно з [5].

Визначення ступеня гідролізу крохмалю в процесі розрідження. В шість конічних колб об'ємом 1000 см³ брали наважки по 146 г помолу кукурудзи, змішували з водою, доводили об'єми сумішей до 500 см³, вносили розріджуючий ФП «Амілекс 4Т» фірми «Даніско» із розрахунку 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 од. АЗ/г крохмалю відповідно та проводили розрідження замісу впродовж 3 годин. Ще у дві колби розріджуючий ФП вносили із розрахунку 1,0 од. АЗ/г крохмалю і витримували за температурним режимом 55 °С (1 год) - 75 °С (1 год) - 90 °С (1 год) та 75 °С (2 год) – 90 °С (1 год). Через 1, 2 та 3 години розрідження відбирали зразки маси та визначали вміст нерозчиненого крохмалю колориметричним методом з антроновим реактивом [3].

Постановка бродильних проб. 69 г помолу кукурудзи змішували з водою в конічній колбі об'ємом 500 см³, доводили об'єм суміші до 250 см³ та проводили розрідження відповідно до обраних в експерименті технологічних режимів. Після цього розріджену масу охолоджували до температури 30 °С, вносили оцукрюючий ФП «Діазим ССФ» фірми «Даніско» із розрахунку 6,0 од. ГЛЗ/г крохмалю, 0,01 см³ протеолітичного ФП «Альфалаза АФП» фірми «Даніско», антисептик та 10 см³ дріжджової суспензії. Після цього колби закривали кислотним затвором та проводили зброджування за температури 30°С впродовж 80 год. Для приготування дріжджової суспензії для кожної колби наважували 1,0 г сухих дріжджів «Ферміол», розводили у 10 см³ води, витримували 20-25 хв і вносили в колбу з сулом.

Результати досліджень та їх обговорення.

На першому етапі роботи нами було досліджено вплив температур, що відповідають технологічним режимам стадії розчинення, на активність та стабільність розріджуючого ФП «Амілекс 4Т» фірми «Даніско».

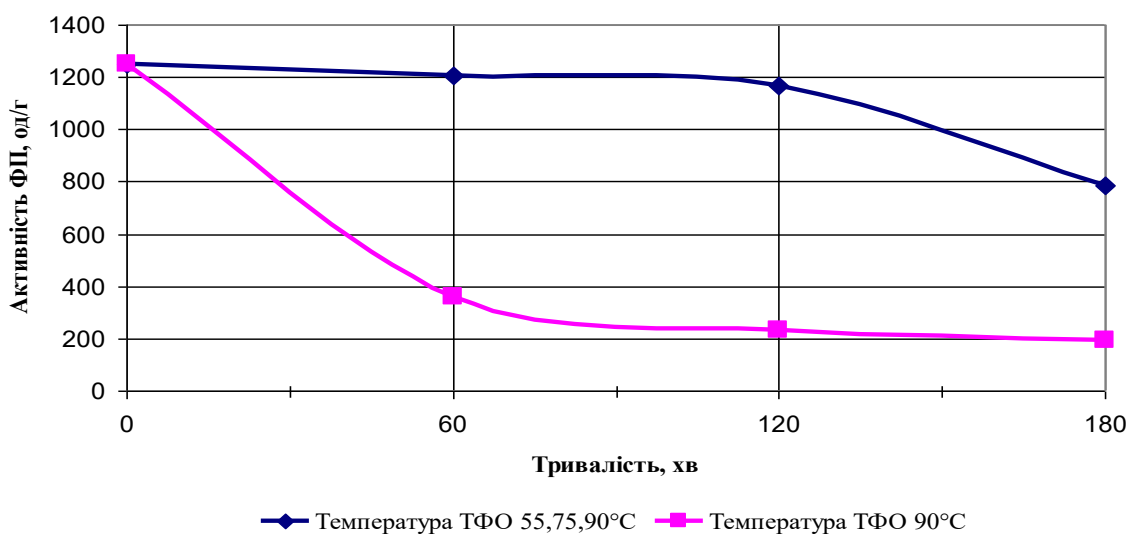


Рис.1. Вплив температурного режиму термоферментативної обробки (ТФО) крохмалю на активність розріджуючого ФП «Амілекс 4Т»

Як видно із рис.1, поетапне збільшення температури сприяло значному збереженню розріджуючої здатності ферменту. Так, після трьох годин витримки, контрольний зразок ФП втрачав значну частку своєї активності, яка складала 15,4 % проти початкової, в той час як технологічний режим «55-70-90» дозволив зберегти значну частину активності (62,9 % від початкової). Слід зазначити, що при витримці за температури 90 °С фермент втратив 73 % своєї активності вже після першої години витримки. Це може бути пов'язано з тим, що в умовах високих температур фермент знаходиться в умовах близьких до температурної інактивації, що негативно відобразилось на його амілолітичній здатності. В той же час,

перебуваючи в «комфортній» зоні за температур 50-75 °С, ФП навіть після двох годин зберіг 93 % своєї активності. Показовим є те, що протягом третьої години витримки за температури 90 °С α -амілазна активність дослідного зразка зменшилась лише на 33 %. Це може пояснюватись тим, що поступове збільшення температури розчину сприяє кращій адаптації ФП до екстремальних умов середовища. Таким чином, навіть враховуючи захисні властивості субстрату при утворенні фермент-субстратного комплексу в процесі розчинення крохмалю, можна зробити висновок про неефективне використання розріджуючих ФП за діючою технологією з точки зору значної втрати їх α -амілазної активності.

Враховуючи отримані дані, було вирішено визначити вплив технологічних параметрів розчинення крохмалю на такі якісні показники, як ступінь конверсії крохмалю, як субстрату для амілаз, та синтез фракції спирторозчинних вуглеводів, як представника продуктів реакції ферментативного гідролізу крохмалю.

В процесі аналізу динаміки конверсії крохмалю до уваги брались такі фактори, як температура процесу та дозування розріджуючого ФП. Як видно з Рис.2., збільшення концентрації α -амілази в середовищі та проведення процесу за температури 90 °С протягом трьох годин не мало значного впливу на ступінь гідролізу субстрату. Так, вже після однієї години ТФО за температури 90 °С вміст залишкового крохмалю складав 8,2-12,3 % від загального вмісту вуглеводів в середовищі. Після другої та третьої години обробки ці показники становили 3,6-4,7 % та 1,7-1,9 % відповідно.

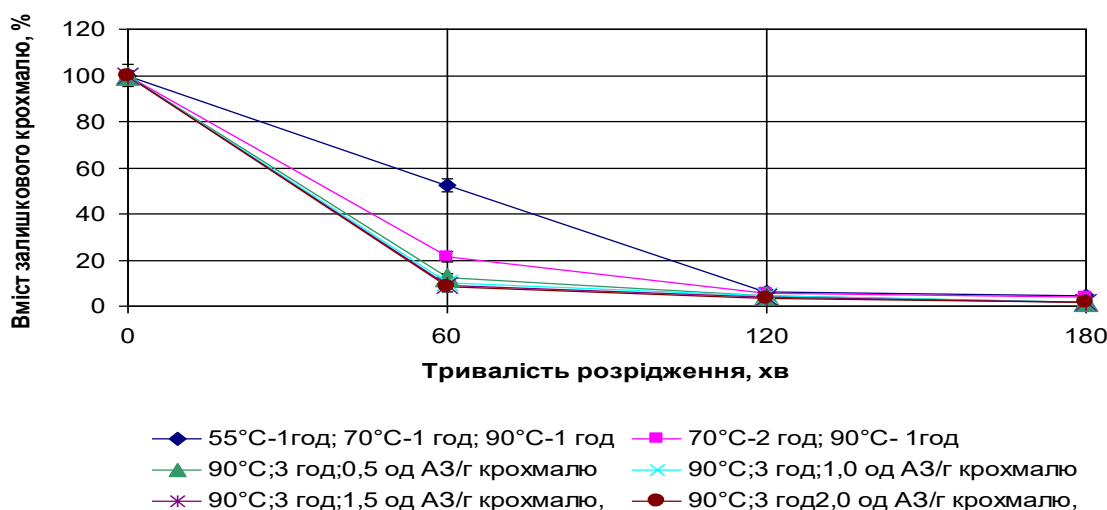


Рис.2. Вплив параметрів ТФО на ступінь конверсії крохмалю

В той самий час було здійснено перевірку тези щодо поетапного підвищення температури ТФО з метою збереження активності розріджуючого ферментного препарату та покращення тим самим якості розрідження крохмалю. При температурних режимах «55-75-90» та «75-90» (Рис.1.) процес гідролізу крохмалю проходив менш інтенсивно у порівнянні з ТФО за температури 90°C. Так, після 1 год обробки за режимом «55-75-90» вміст залишкового крохмалю становив 50% від початкового. За температури розрідження «75-90» цей показник становив 21 %, а при 90 °С - 10 %. Слід зазначити, після двох та трьох годин розрідження кількість залишкового крохмалю знаходились практично на одному рівні для усіх досліджуваних режимів ТФО.

Це може пояснюватись значно меншою швидкістю процесу клейстеризації крохмалю. В результаті цього в середовищі утворюється значно менше ділянок крохмальних полімерів, які є придатним субстратом для дії ферменту.

Разом з тим, ферментативні процеси характеризуються не тільки інтенсивністю деградації крохмалю, а і швидкістю утворення продуктів реакції. Тому нами було досліджено вплив дозування розріджуючого ФП «АМІЛЕКС 4Т» на накопичення спирторозчинних вуглеводів в суслі. Вибір даного показника був обумовлений природою дії α -амілази, а саме її здатністю до гідролітичного розщеплення 1-4 глікозидних зв'язків в будь-яких точках поліглікозидного ланцюга амілози та амілопектину з утворенням декстринів [1]. Тому продуктами даної реакції є фракції декстринів різної молекулярної маси та невелика кількість глюкози. До спирторозчинних вуглеводів належить фракція мальтодекстринів (кількість мономерів в ланцюгу ≤ 5). Таким чином, кількість спирторозчинних вуглеводів, як теоретично домінуючого продукту ферментативного гідролізу крохмалю, дає більш повне уявлення про кінетику процесів, що відбуваються в процесі розрідження крохмалю.

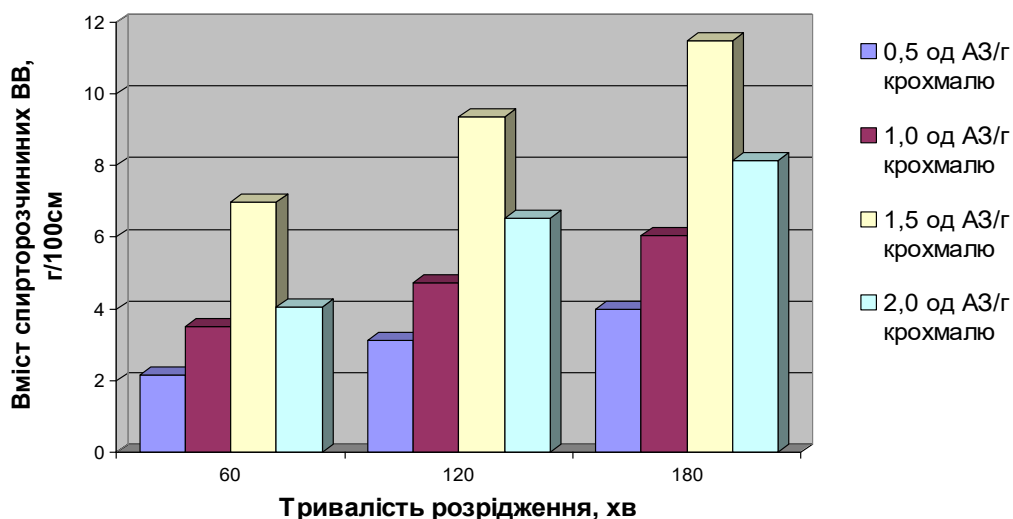


Рис.3. Динаміка накопичення спирторозчинних вуглеводів в залежності від тривалості розрідження та дозування розріджуючого ФП

Як видно з Рис.3., найвищу концентрацію спирторозчинних вуглеводів було отримано при внесенні в середовище 1,5 од АЗ/г крохмалю розріджуючого ферментного препарату. При зростанні концентрації α -амілази в розчині до 2,0 од АЗ/г крохмалю, вміст спирторозчинних вуглеводів в суслі був на 30-35% меншим в порівнянні з дозуванням 1,5 од АЗ/г крохмалю впродовж всього процесу розрідження. Це може свідчити про утворення непродуктивних фермент-субстратних комплексів та інгібування розріджуючого ФП.

Порівнюючи дані, представлені на Рис.2 та Рис.3, можна побачити, що в той час, як за температури 90 °С вміст нерозчиненого крохмалю практично не змінювався в період між 2 та 3 годинами гідролізу, вміст спирторозчинних вуглеводів продовжував збільшуватись впродовж усього процесу розрідження. Тому можна зробити висновок, що контроль вмісту спирторозчинних вуглеводів в суслі дає більш повне розуміння процесів, що проходять під час ферментативного гідролізу крохмального зерна.

Разом з тим накопичення дуже високих концентрацій в суслі спирторозчинних вуглеводів загалом та глюкози зокрема може спричинити осмотичний стрес у дріжджів та викликати так званий ефект Кребтрі [6,7], при якому дріжджі використовують анаеробні ланцюги асиміляції вуглеводів навіть в присутності кисню. Все це приводить до метаболічних змін в дріжджовій клітині та пригнічення її життєдіяльності, спиртостійкості та спиртоутворюючої здатності.

Тому нами було проведено контрольне зброджування сусел, отриманих з використанням досліджуваних режимів розчинення крохмалю, методом бродильної проби.

Як видно з табл.1, проведення розчинення крохмалю із поетапним збільшенням температури привело до погіршення якості зброджування. Так, вміст спирту у зрілій бражці в описуваному зразку був на 0,1-0,35% об. нижчим у порівнянні зі зразками, де температура розчинення залишалась 90 °С впродовж всього процесу. Окрім цього, загальний вміст вуглеводів становив 0,84 г/100см³, що на 0,3-0,5 г/100см³ більше у порівнянні з іншими зразками та на 0,25 г/100см³ вище регламентованих показників. Нерозчинений крохмаль становив 0,14 г/100см³ проти 0,1 г/100см³ регламентованих. Зазначене вказує на те, що процеси набухання крохмального зерна, його гідроліз ФП амілазного комплексу та, як результат, ферментація глюкози в спирт, пройшли не повною мірою. Тому, не зважаючи на збереження активності ФП в процесі ТФО, не досягається необхідна кількість клейстеризованого крохмалю, як елементу утворення фермент-субстратного комплексу.

Разом з цим, за однакової температури 90 °С при збільшенні дозування ФП «АМІЛЕКС 4Т» зростала кількість загальних незброджених вуглеводів для усіх досліджуваних тривалостей гідролізу. Слід звернути увагу на те, що найвища середня кількість залишкових вуглеводів виявилась у зразках з терміном розчинення крохмалю 2 год. Однак в цих зразках спостерігалось більше накопичення спирту та значення активної кислотності середовища. Це може бути свідченням того, що, як зменшення, так і збільшення тривалості розрідження крохмалю спричиняло метаболічні зміни в дріжджових клітинах, спонукаючи їх до синтезу більшої кількості органічних кислот.

Слід зазначити, що найбільше дозування ФП спричиняло накопичення в зрілій бражці найбільшої кількості нерозчиненого крохмалю. Це підтверджує тезу про те, що внесення надлишкової кількості α -амілази в середовище індукує утворення непродуктивних фермент-субстратних комплексів та погіршує якість гідролізу крохмалю.

Таким чином, найбільш ефективно зброджування суслу спостерігалось за умов витримки його за температури 90°C протягом 2 год та дозування ФП 0,5-1,0 од. АЗ/г крохмалю.

З метою компенсації температурної інактивації α -амілази в процесі розрідження крохмалю та мінімізації витрат ферментного препарату, як допоміжного матеріалу в технології біоетанолу, нами було проведено порівняльне зброджування суслу, отриманого при поетапному внесенні препарату «АМІЛЕКС 4Т». Для цього мінімальну досліджувану нами дозу ферменту (0,5 од. АЗ/г крохмалю) було розділено на дві частини. Першу (0,3 од. АЗ/г крохмалю) вносили безпосередньо в процесі приготування замісу. Другу (0,2 од. АЗ/г крохмалю) вносили по завершенню першої години розрідження. Визначали також вплив за таких умов розрідження при різних термінах обробки – 2 та 3 години. В якості контролів використовували зразки з одноразовим внесенням усієї кількості ФП (0,5 од. АЗ/г крохмалю) на стадії приготування замісу. Результати дослідів представлені в табл.2.

Роздільне внесення розріджувального препарату на два етапи мало позитивний вплив на якість зброджування суслу із кукурудзи незалежно від тривалості витримки (табл.2). Так, концентрація спирту в зрілій бражці збільшувалась на 0,05% об. за умови сумарної витримки впродовж 2 год і на 0,10% об. при сумарній тривалості ТФО 3 год. Однак, накопичення спирту в зрілій бражці за умови поетапного внесення ФП та витримки впродовж 2 год було найвищим і становило 11,65% об. проти 11,60% об. за умови витримки протягом 3 год з дробним внесенням α -амілази. Окрім цього, дане технологічне рішення сприяло зменшенню кількості загальних незброджених вуглеводів при меншій тривалості розрідження (0,36 г/100см³ проти 0,42 г/100см³).

Порівняльна характеристика зрілих бражок, отриманих за різними режимами ТФО

Показники бродіння	Умови процесу розчинення крохмалю												
Температура ТФО	1,0 од.АЗ/г крохмалю 75°С –2год + 90°С –1год	90°С											
		1 год				2 год				3 год			
		Дозування ФП, од АЗ/г крохмалю											
		0,5	1,0	1,5	2,0	0,5	1,0	1,5	2,0	0,5	1,0	1,5	2,0
Σ CO ₂ , г	22,51	23,35	23,23	23,40	23,28	23,30	23,42	23,42	23,25	23,48	23,27	23,14	23,42
Вміст спирту, %об	11,35	11,60	11,50	11,60	11,65	11,70	11,70	11,65	11,60	11,50	11,45	11,45	11,50
pH зрілої бражки	4,09	4,10	4,10	4,16	4,11	4,21	4,19	4,25	4,15	4,13	4,11	4,12	4,14
Загальний вміст вуглеводів, г/100см ³	0,84	0,29	0,28	0,37	0,39	0,37	0,46	0,54	0,55	0,33	0,34	0,38	0,44
Вміст водорозчинних вуглеводів, г/100см ³	0,69	0,22	0,23	0,30	0,31	0,36	0,42	0,48	0,48	0,31	0,31	0,37	0,33
Вміст нерозчиненого крохмалю, г/100см ³	0,14	0,06	0,05	0,06	0,07	0,01	0,04	0,05	0,07	0,02	0,02	0,01	0,09

Разом з тим, при більш тривалому процесі розрідження, підвищення виходу спирту з одиниці сировини за однакової кількості незброджених цукрів та нерозчиненого крохмалю свідчить про те, що застосування поетапного внесення розріджувачого ФП забезпечувало більш оптимальні умови для життєдіяльності та розвитку дріжджів на початкових стадіях бродіння.

Таблиця 2

Показники зрілої бражки з а різного режиму дозування розріджувачого ферментного препарату

№ колби	0,3 од. АЗ/г крохмалю (1 год.) + 0,2 од. АЗ/г крохмалю (1 год.)	0,5 од. АЗ/г крохмалю (2год.)	0,3 од. АЗ/г крохмалю (1год.) + 0,2 од. АЗ/г крохмалю (2год.)	0,5 од. АЗ/г крохмалю – (3год.)
Σ CO ₂ , г	23,42	23,44	23,37	23,38
Вміст спирту, %об	11,65	11,60	11,60	11,50
рН зрілої бражки	4,2	4,18	4,11	4,12
Загальний вміст вуглеводів, г/100см ³	0,36	0,42	0,38	0,38
Вміст водорозчинних вуглеводів, г/100см ³	0,28	0,4	0,33	0,33
Вміст нерозчиненого крохмалю, г/100см ³	0,07	0,01	0,05	0,05

Висновки

1. Встановлено, що різке підвищення температури в середовищі приводить до інактивації 80-85% розріджувачого ферментного препарату вже після першої години гідролізу, в той час як поетапне збільшення температури впродовж ТФО дозволяє зберегти до 65% його активності.

2. Синергізм процесів клейстеризації крохмальних зерен та їх ферментативного гідролізу є необхідною умовою ефективного проведення процесу розрідження.

3. Досліджено вплив дозування розріджувачого ферменту на накопичення спирторозчинних вуглеводів в середовищі та встановлено, що його дозування більш ніж 1,5од АЗ/г крохмалю спричиняє утворення непродуктивних фермент-субстратних комплексів та негативно відображається на якості гідролізу крохмалю

4. Показано перспективність використання визначення спирторозчинних вуглеводів, як додаткового методу контролю якості процесу розрідження крохмалю.

5. Проаналізовано вплив параметрів ТФО сировини на якісні показники зрілої бражки. Встановлено, надлишковий термін витримки сусла протягом 3 год та дозування розріджувачого ФП більше 1,0 од/г крохмалю спричиняють метаболічні зміни в дріжджовій клітині та втрати спирту в зрілій бражці на 0,1-0,25% об.

6. Запропоновано спосіб розчинення крохмалю, який передбачає витримку сусла протягом 2 год за температури 90°C та внесення розріджувачого ферментного препарату в два етапи. Встановлено, що за таких умов ТФО можна отримати бражку із концентрацією спирту на 0,4-0,8% вище, ніж за діючими технологіями.

Література

1. Технологія спирту: Підручник / В.О. Маринченко, В.А. Домарецький, П.Л. Шиян, [та ін.] ; під ред. В.О. Маринченка. - Вінниця: «Поділля-2000», 2003.-496 с.
2. Шиян П.Л. Інноваційні технології спиртової промисловості. Теорія і практика: Монографія / П.Л. Шиян, С.Т. Олійнічук, В.В. Сосницький. –К.: «Асканія», 2009. – 424 с.
3. Рухлядева А.П. Технохимический контроль спиртового производства / Рухлядева А.П. – М.: Пищевая промышленность, 1974. – 208с.
4. Технологічний регламент виробництва етилового спирту з крохмалевмісної сировини, ТРУ 18.8049-2000. - Україна, Київ. - 2000.
5. Препарати ферментні для спиртового виробництва. Методи визначання амілолітичної активності : СОУ 15.9-37-241:2005. - [чинний від 2006-04-01]. – К.: Мінагрополітики України, 2005. –13 с.
6. M. Thomson. Resurrecting ancestral alcohol dehydrogenases from yeast / M. Thomson, E. A. Gaucher, M. F. Burgan, D. W. De Kee, Tang Li, J. P. Aris, S. A. Benner. - Nat Genet., 2005: 37(6). - p. 630–635.
7. M.A. Alexander, T.Jeffries. Respiratory efficiency and metabolize partitioning as regulatory phenomena in yeasts / Enzyme and Microbial Technology 12(1). -Jan. 1990. - p. 2-19.