

*Т.І. Лисак, н. с.,
С.Т. Олійнічук, д-р. тех. наук.,
Ю.О. Батог, н. с.,
О.О. Коваль, пров. інженер,
Інститут продовольчих ресурсів
НААН України*

АМІНОКИСЛОТНИЙ ОБМІН В УМОВАХ ОТРИМАННЯ СПИРТОВИХ БРАЖОК ІЗ КРОХМАЛЕВМІСНОЇ СИРОВИНИ

Показано зміни в амінокислотному складі сусла внаслідок дії протеолітичних ферментних препаратів. Досліджено вплив протеаз на процес ферментації при підвищенні концентрації СВ та визначено оптимальне їх дозування для отримання бражок з вмістом спирту 13,0-13,5% об. Показана економічна доцільність даного технологічного прийому.

Ключові слова: спирт, сусло, протеаза, амінокислоти, бродіння, бражка.

Показаны изменения в аминокислотном составе сусла вследствие влияния протеолитических ферментных препаратов. Исследовано влияние протеаз на процесс ферментации при возрастании концентрации СВ и определено оптимальное дозирование при получении бражек с содержанием спирта 13,0-13,5%об. Показана экономическая целесообразность данного технологического приема.

Ключевые слова: спирт, сусло, протеаза, аминокислоты, брожение, бражка.

The change amino acid compound of the mash as a result of photolytic enzyme performance is shown. The influence of proteases on the fermentation process with increasing solids concentration of the mash is shown. Their optimal dosage is determined for obtaining fermented wort with alcohol value of 13,0-13,5%vol. Economical efficiency of this technological operation is shown.

Keywords: ethanol, mash, protease, amino acid, fermentation, fermented wort.

Постановка проблеми. Для нормального розвитку дріжджів необхідно, щоб у живильному середовищі містились не тільки зброджуванні вуглеводи, але і достатня кількість амонійного азоту, який засвоюється дріжджами. Відомо [3,4], що значну роль при вирощуванні засівних дріжджів відіграють амінокислоти, а тому середовище для культивування дріжджів повинно містити достатню їх кількість. Середовище, що було оцукрене солодом, збагачене азотним живленням та амінокислотами зокрема, оскільки вони утворюються при вирощуванні зерна і при оцукрюванні крохмалевмісного матеріалу внаслідок дії відповідних протеолітичних ферментів (пептидаз, дипептидаз і ін.), які знаходяться в солоді. Після впровадження схеми низькотемпературного розрідження як джерело гідролаз почали використовувати концентровані ферментні препарати, особливо зарубіжні, які протеолітичної системи або не мають, або ж її активність незначна. Відсутність же протеолітичних ферментів у амілолітичних ферментних препаратах збіднює живильне середовище, особливо стосовно амінокислот і інших важливих речовин для вирощування дріжджів.

Нестача азотних живильних речовин призводить до того, що кількість дріжджових клітин в дозрілих дріжджах не перевищує 70 млн/дм³ [1] замість необхідних 100–120 млн/дм³ [2,9]. Це викликало необхідність вивчення процесу розмноження дріжджів на суслі, оцукреному мікробними ферментними препаратами. Дослідження показали [4,9], що одним із шляхів подолання цього явища є підбір і використання суміші різних ферментних препаратів.

Мета роботи. Метою роботи було визначення зміни амінокислотного складу живильного середовища дріжджів, приготованого із кукурудзи та дослідження впливу протеолітичних препаратів на якісні показники процесу ферментації при збільшенні концентрації СР в суслі.

Матеріали і методи. Об'єктами досліджень були протеолітичні ферментні препарати «Альфалаза АФП» фірми «Даніско» та «Протеаза 25008» фірми «Новозим», сусло приготоване із кукурудзи, процеси термоферментативної обробки та зброджування сусла, зріла бражка.

В роботі використовували загальноприйняті в спиртовій промисловості методи досліджень [7,8]. Умовну крохмалистість визначали поляриметрично, технологічний режим зрілої бражки проводили методом бродильної проби. Вміст спирту в бражних дистилатах визначали ареометрично, вміст незброджених вуглеводів в бражці – колориметрично з антроновим реактивом, реакцію середовища – потенціометрично, вміст амінокислот в суслі і бражці визначали на амінокислотному аналізаторі

Методика проведення досліджень. На першому етапі проведених досліджень було визначено амінокислотний склад сусла в залежності від терміну дії протеази. Сусло готували з кукурудзи, ступінь подрібнення якої складав 94% прохід через сито з діаметром отворів 1мм. Гідромодуль замісу складав 1:4, сусло підкислювали 1М H₂SO₄ до рН=4,5, вносили протеолітичний ферментний препарат «Альфалаза АФП» з розрахунку 0,3кг/т зерна, що є рекомендованим дозуванням від виробника, витримували за температури 45°С впродовж 30, 45, 60 хв. Після цього в оброблених замісах визначався амінокислотний склад. Отримані результати наведено в табл. 1.

Таблиця 1

Амінокислотний склад білка кукурудзи в замісі і гідролізаті

Амінокислота	Концентрація, мг/100см ³				Скор, %
	Заміс (контроль)	Тривалість дії протеази, хв..			
		30	45	60	
Аспарагінова	4,62	4,73	4,90	5,38	6,87
Треонін	1,82	1,92	1,98	2,25	2,87
Серин	4,17	4,19	4,20	4,73	5,58
Глютамінова	3,39	3,59	3,76	4,09	5,21
Пролін	11,21	12,85	14,39	17,31	22,13
Гліцин	1,80	1,81	1,83	2,12	7,70
Аланін	3,68	3,86	3,90	4,28	5,46
Валін	2,90	3,41	3,55	4,96	5,74
Метионін	0,97	1,19	1,25	1,49	1,87
Ізолейцин	1,38	1,50	1,57	1,93	2,45
Лейцин	3,00	3,64	3,76	4,27	5,44
Тірозин	2,25	2,80	2,94	3,81	4,87
Фенілаланін	2,14	3,07	3,27	4,32	5,52
Гістидін	2,55	2,92	2,92	3,07	3,91
Лізін	4,24	4,81	4,85	5,77	7,37
Аміак	1,23	1,24	1,32	1,39	1,75
Аргінін	4,80	6,55	6,44	7,92	10,1
Всього	56,14	64,08	66,83	79,09	-

Результати досліджень. Відомо [2], що ключовими амінокислотами для спиртового бродіння є глютамінова, фенілаланін і лейцин, які найбільш інтенсивно споживаються дріжджами в процесі розмноження і росту. Для біосинтезу білка в період інтенсивного росту

біомаси поряд з цими амінокислотами необхідна наявність групи амінокислот: лізин, тирозин, аміномаляна, а для біосинтезу та дії ферментів: метіонін, цистеїн і серин.

Як видно із табл. 1 внаслідок дій протеази, вміст вільних амінокислот зростає на 10-40%. Сумарна їх концентрація в середовищі збільшується на 29% в порівнянні з контролем. Однак, уже на четверту годину бродіння більшість амінокислот повністю споживаються дріжджами, а такі амінокислоти, як аспарагінова кислота, глютамінова кислота визначаються на 17-ту годину. Їх наявність може бути пов'язана з осмопротекторними властивостями даних амінокислот.

В умовах низькотемпературної термоферментативної обробки крохмалевмісної сировини виникає питання щодо визначення стадії, на якій потрібно вносити протеазу, оскільки оптимум її дії відрізняється значенням рН середовища від ферментів амілазного комплексу. Оптимум рН для дії протеази – 4,0 – 3,8, а ферментів амілазного комплексу, відповідно 5,5 – 5,8, що близько до величини рН суміші помелу кукурудзи з водою. Тому в наступних дослідженнях порівнювали ефективність використання протеази на стадії приготування замісу, з його підкисленням сірчаною кислотою до рН 4,0, протеолізом за температури 60 °С впродовж години та наступною нейтралізацією розчином гідроксиду калію до рН 5,8. після цього заміс розріджували за температури 90-92 °С впродовж трьох годин, а оцукрювання здійснювали одночасно з бродінням. В другому варіанті протеази вносили на стадії бродіння. Отримані результати наведено в табл. 2.

Таблиця 2

Показники бражки в залежності від стадії внесення протеази

Показник	Сусло без протеази	Протеаза на стадії приготування замісу	Протеаза на стадії бродіння
Незброджені вуглеводи, г/100 см ³ :			
Загальні	0,28	0,27	0,23
Водорозчинні	0,21	0,20	0,19
Нерозчинений крохмаль, г/100 см ³	0,07	0,07	0,04
Концентрація спирту, % об.	7,8	7,9	8,0
Вихід спирту, дал/ т сировини	39,00	39,50	40,00

Встановлено, що в цій серії дослідів вміст спирту у дозрілій бражці збільшувався при використанні протеази, але найбільша концентрація спирту – 8,0% об. – досягалась при внесенні протеази на стадію бродіння. Це можна пояснити більш оптимальними умовами для дії протеази за значенням рН і більш тривалим терміном протеолізу.

На підставі результатів проведених досліджень можна зробити висновок, що збагачення середовища амінокислотами, які безпосередньо споживаються дріжджами, підвищує їх продуктивність за синтезом спирту. При цьому внесення протеази на стадії бродіння не тільки суттєво збільшує вміст спирту (8,0 проти 7,9% об.) в бражці та вихід спирту з тонни сировини (40,00 проти 39,5 дал/т), а й спрощує технологічний процес. Одним із шляхів збільшення рентабельності спиртового виробництва є підвищення концентрації СР в суслі та, відповідно, спирту в зрілій бражці. Однак це веде до збільшення осмотичного тиску середовища та негативно впливає на якісні показники бродіння. Тому наступним етапом досліджень було визначення впливу протеолітичних ферментних препаратів на динаміку біоконверсії та якісні показники зрілої бражки при зброджуванні кукурудзяного сусла підвищених концентрацій. Досліди проводили методом бродильної проби загальним об'ємом 250см³. В сусло вносили 50, 60, 70 г помелу кукурудзи, розчинення крохмалю

проводили за температури 90-92°C впродовж 3 год. В якості джерела α -амілази використовували ФП «Амілекс 4Т» фірми «Даніско» із розрахунку 1,5 од. АЗ/г крохмалю. Після цього сусло охолоджували до температури 30-32°C, вносили дріжджі раси XII і зброджували. Оцукрювання проводили суміщено із бродінням, в якості джерела глюкоамілази використовували ФП «Діазим ССФ» фірми «Даніско» із розрахунку 4 од. ГЛЗ/г крохмалю. В дослідні зразки вносили протеолітичний ФП «Альфалаза АФП» безпосередньо перед внесенням дріжджів. В контрольні колби азотне живлення не вносили. Результати дослідів висвітлені на рис. 1 та в табл. 3.

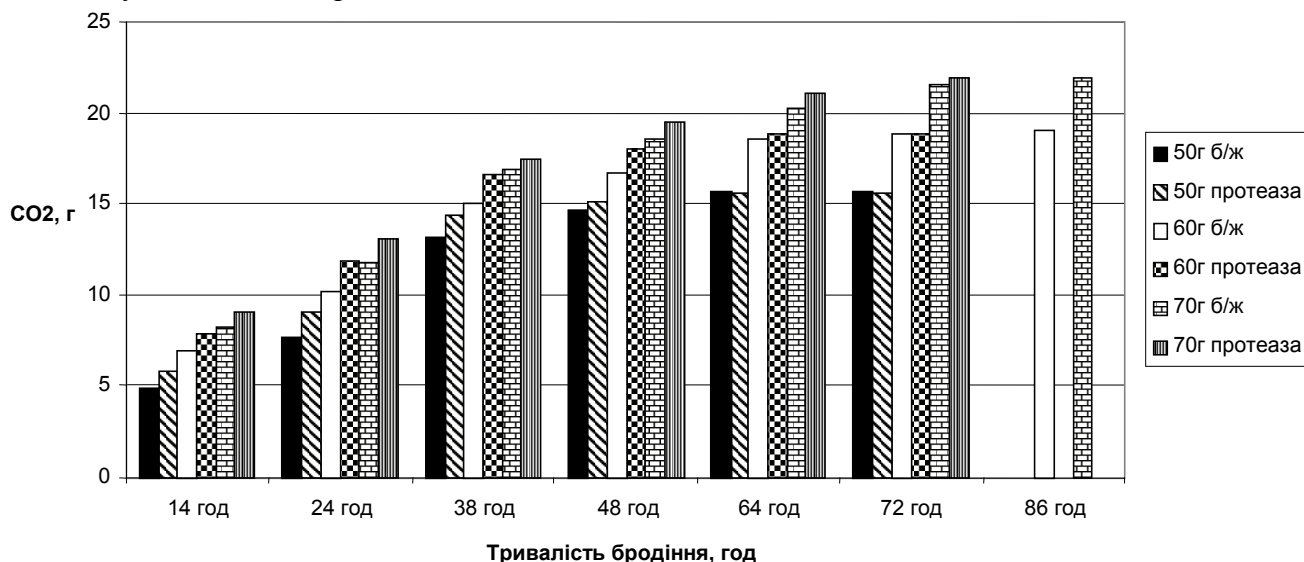


Рис. 1. Динаміка виділення CO₂ в залежності від внесення протеолітичних ФП при різних концентраціях СР в суслі

Як видно із рис. 1, при внесенні протеолітичних ФП швидкість зброджування зростала для всіх концентрацій СР. Так, наприклад на стадії головного бродіння дія протеаз збільшувала виділення вуглекислого газу на 12–15% впродовж перших 38 год. Слід зазначити, що найбільша різниця спостерігається для зразків з наважкою 60г/колбу. В умовах понижених концентрацій ефект від внесення протеази може бути меншим, оскільки таке середовище за своєю осмолярністю є більш оптимальним для росту і розвитку дріжджів. У зразках з наважками 70г/колбу відбувається посилення інгібуючого ефекту надмірного осмотичного тиску на клітини, що розмножуються. Разом з тим, внесення протеолітичних ФП позитивно впливало на стадію доброджування. Так, в дослідних зразках з наважками помолу 50г та 60г бродіння закінчувалось на 10–12 год раніше і максимальне виділення CO₂ спостерігалось на 48 та 64 годину відповідно. Для зразків з наважкою 70г/колбу бродіння припинялось на 72 годину при внесенні протеази, в той час як контрольна проба продовжувала бродити на 86 год.

Як видно із табл. 3, внесення протеолітичних ФП сприяло накопиченню спирту та зменшенню незброджених вуглеводів в бражках. Так, вміст загальних вуглеводів був менший на 9,3%, 35% та 22% для наважок 50, 60, 70 г/колбу відповідно, в основному за рахунок спирторозчинних вуглеводів, які відображають активність дріжджів впродовж бродіння. Одночасно, вихід спирту з тони сировини збільшувався на 1,00 дал, 0,83 дал та 0,54 дал відповідно до маси наважки.

Важливим моментом є те, що в умовах збільшення концентрації СР в суслі вихід спирту з тони сировини при використанні дріжджів раси XII зменшувався незалежно від внесення протеолітичних ФП (табл. 3). Це може пояснюватись тим, що збільшення осмотичного тиску змушує клітини витратити частину доступної енергії на осморегуляцію, забезпечення енергією транспортних систем, синтез низькомолекулярних осмопротекторів і

приводить до подовження лаг-фази росту, зменшення швидкості росту та продовження гліцери-піровиноградного бродіння [6]. Тому в подальших дослідженнях використовували дріжджі раси ДС-01-Е, селекціоновані на базі Інституту продовольчих ресурсів НААН України, які здатні ефективно зброджувати сусло підвищених концентрацій та накопичувати до 13,5–14% об. спирту.

Таблиця 3

Залежність показників зрілої бражки від внесення протеази при різних концентраціях сусла

Маса наважки	Живлення	рН	Вміст спирту, %об.	Вміст незброджених вуглеводів				Вихід спирту, дал/т сировини
				Загальні ВВ, г/100см ³	Нерозчинений крохмаль, г/100см ³	Декстрини, г/100см ³	Спирто розчинні ВВ, г/100см ³	
50	б/ж	4,17	8,0	0,43	0,12	0,19	0,08	40,00
	протеаза	4,10	8,2	0,39	0,09	0,24	0,07	41,00
60	б/ж	4,24	9,6	0,74	0,08	0,32	0,30	40,00
	протеаза	4,36	9,8	0,48	0,11	0,25	0,11	40,83
70	б/ж	4,44	11,05	0,89	0,20	0,26	0,38	39,46
	протеаза	4,55	11,2	0,69	0,22	0,22	0,21	40,00

Для визначення оптимального дозування протеолітичних ферментних препаратів таких умовах бродильну пробу готували з розрахунку 84 г помолу на 250 см³ сусла. Розчинення крохмалю проводили за температури 90–92°C протягом 3 год. Оцукрення розвареної маси проводили суміщено з бродінням. Протеазу додавали безпосередньо перед внесенням дріжджів. В якості джерела ферментів використовували наступні ФП: α -амілаза – «Амілекс 4Т» фірми «Даніско» із розрахунку 2 од. АЗ/г крохмалю; глюкоамілаза – «Діазим ССФ» фірми «Даніско» із розрахунку 6 од. ГЛЗ/г крохмалю; протеаза – «Альфалаза АФП» фірми «Даніско» та «Новозим 25008» фірми «Новозим». Дозування ФП зростало від 35 г/т сировини до 180 г/т сировини. В якості контролю використовували зразок, в який не вносили протеолітичні ФП. Результати дослідження представлені на рис. 2 і табл. 4.

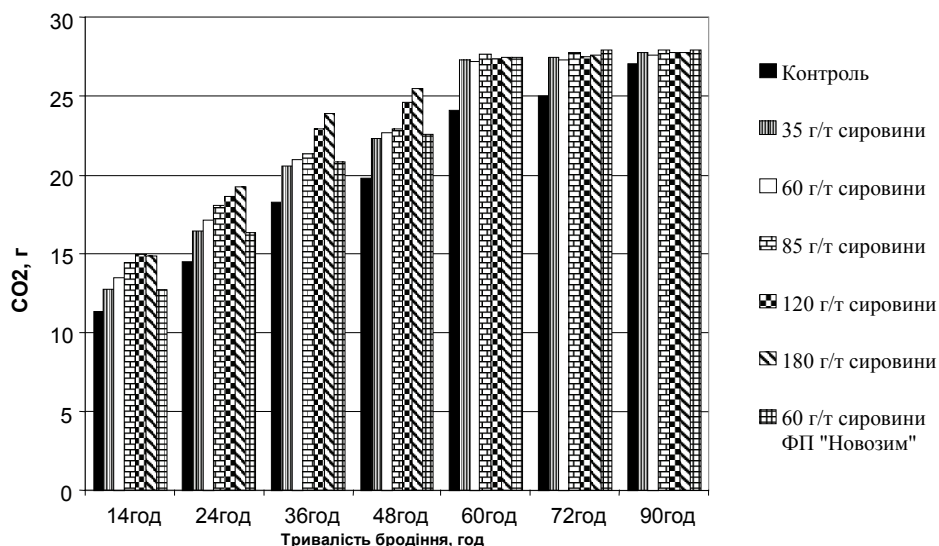


Рис. 2. Вплив дозування протеази на динаміку збродження концентрованого кукурудзяного сусла

Як видно із рис. 2, внесення ФП протеолітичної дії підвищувало швидкість зброжування пропорційно до збільшення азотного живлення в середньому на 19–20% на першу добу та 13–15% на другу добу проти контролю. Слід зазначити, що у зразку із ФП «Новозим 25008» виділення CO₂ відбувалось не так інтенсивно. Разом з тим, у всіх варіантах з протеолітичними ФП бродіння закінчилось на 60–72 год, в той час як контрольний зразок продовжував виділяти CO₂ і на 90 год ферментації, що свідчить про необхідність внесення протеаз при переробці сула підвищених концентрацій для забезпечення нормальної роботи бродильного відділення.

Аналізуючи дані, представлені в табл. 4, можна зробити висновок про позитивний вплив протеолітичних ФП на якісні показники зрілої бражки. Показовим є різке зменшення спирторозчинних вуглеводів на 51% навіть у зразках найменшими дозами протеази, що свідчить про значне покращення бродильної активності та збереження життєдіяльності дріжджових клітин. Це також може пояснюватись позитивним впливом додаткової кількості вільних амінокислот в середовищі на системи поглинання і транспорту цукрів всередині клітини [5]. Вміст декстринів та нерозчиненого крохмалю у більшості зразків залишалися на одному рівні. Варто зауважити, що у зразках з найвищим дозуванням протеолітичних ФП, незважаючи на найнижчий вміст незброжених вуглеводів, вміст спирту в бражці, і, відповідно вихід спирту з т сировини, був нижчий в порівнянні з меншими дозами ФП. Це може пояснюватись надмірними витратами цукрів на накопичення надлишкової біомаси дріжджів в процесі ферментації.

Таблиця 4

Якісні показники бродіння від дозування протеази

Дозування ФП, г/т сировини	pH	Вміст спирту, %об.	Заг. ВВ	Крохмаль	Декстрини	Спирто Розчинні ВВ	Вихід спирту
Контроль	4,36	13,45	1,16	0,08	0,30	0,74	40,02
35	4,63	13,65	0,71	0,10	0,24	0,36	40,62
60	4,87	13,70	0,64	0,05	0,25	0,31	40,77
85	4,77	13,60	0,65	0,07	0,25	0,31	40,62
120	4,67	13,50	0,63	0,06	0,40	0,13	40,17
180	4,70	13,50	0,41	0,04	0,18	0,17	40,17
60 «Новозим 25008»	4,59	13,65	0,62	0,09	0,37	0,14	40,62

Із порівняння протеази різних виробників видно, що при однаковому дозуванні в обох зразках залишалась приблизно однакова кількість вуглеводів, але вихід спирту із тони сировини у разі використання ФП «Альфалаза АФП» був більший на 0,4%, що дає підставу зробити висновок про доцільність та рентабельність використання протеази «Альфалаза АФП».

Економічна доцільність використання протеолітичних ферментних препаратів підтверджується розрахунками:

За потужності спиртового заводу 3000 дал/добу він переробляє 75 т кукурудзи. Тоді при дозуванні протеази 60 г/т сировини її потреби складатимуть 4,5 кг/добу. При ціні 90грн/кг ферментного препарату, витрати становитимуть 405 грн/добу.

При збільшенні виходу спирту на 0,7 дал/т сировини та ціні 130 грн/дал, прибуток від реалізації надлишкового спирту складатиме 6825 грн/добу. Економічний ефект від використання протеолітичних ферментних препаратів становитиме 6420 грн/добу.

Висновки. Використання протеолітичних ФП збагачує середовище вільними амінокислотами на 40% в порівнянні з звичайною схемою низькотемпературного розварювання крохмалевмісної сировини;

Збагачення середовища амінокислотами, які безпосередньо споживаються дріжджами, зменшує тривалість бродіння на 10–12 год, підвищує їх продуктивність за синтезом спирту та збільшує його вихід на 0,5–1,0 дал/т сировини, сприяє зменшенню незброджених вуглеводів на 10–40% для всіх досліджуваних концентрацій сусла. Найбільш оптимальним є суміщення процесів протеолізу та бродіння;

Протеоліз білків сировини в процесі зброджування є необхідним технологічним прийомом при отриманні бражок з концентрацією спирту 13,0–13,5%об. оскільки він дозволяє зберегти оптимальну тривалість зброджування сусла (72–74 год) та забезпечує регламентований вміст незброджених вуглеводів в бражці.

Оптимальною дозою досліджуваних протеолітичних ферментних препаратів («Альфааза АФП» та «Новозим 25008») при отриманні бражки з підвищеним вмістом спирту є 60 г/т сировини.

Економічний ефект від застосування протеолітичних ферментів для заводу потужністю 3000 дал становить 6400грн/добу

Список літератури

1. Леденев В.П. Влияние различных факторов на скорость роста, бродильную активность и конечную концентрацию дрожжевых клеток при периодическом дрожжегенерировании / В.П. Леденев, В.А. Кривенко, Н.Д. Моисеева и др. //ВНИИ пищевой биотехнологии - М.: - 1989.- 7с. Деп. в АгроНИИТЭИПищепром № 1996

2. Коновалов С.А. Биохимия дрожжей: Книга – М.: “Пищевая промышленность”. - 1980. – 265 с.

3. Маринченко В.О. Технологія спирту: Підручник/ В.О. Маринченко, В.А. Домарецький, П.Л. Шиян, та ін.// - Вінниця: «Поділля-2000», 2003.-496 с.

4. Паляниця Л.Я. Протеолітичні ферментні препарати у виробництві спирту із крохмалевмісної сировини / Л.Я. Паляниця, О.С. Гродзіцька, Н.І. Березовська, Р.Б. Косів, О.В. Швабюк. – Львів :“Львівська політехніка”. – 2008. - №609. – С 141-144.

5. Прист Ф. Дж. Микробиология пива / Ф. Дж. Прист, Й. Кемпбелл (ред.); пер. с англ. под общ. Ред. Т. В. Мелединой и Ыну Сойлда. – СПб.: Профессия, - 2005. – 368с.

6. Риборо-Гайон Ж., Теория и практика виноделия. Т. 2. Характеристика вин. Созревание винограда. Дрожжи и бактерии. Перевод с французского / Ж. Риборо-Гайон, Э. Пейно, П. Риборо-Гайон, П. Сюдро – М.: «Пищевая промышленность», 1979. – 352с.

7. Рухлядева А.П. Технохимический контроль спиртового производства. – М.: Пищевая промышленность, 1974. – 208с.

8. Технологічний регламент виробництва етилового спирту з крохмалевмісної сировини, ТРУ 18.8049-2000, Україна, Київ, 2000.

9. 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.