

Интенсификация спиртового брожения путем направленного протеолиза зернового сырья

Т. М. Тананайко, к. т. н.,

А. А. Пушкарь,

РУП «Научно-практический центр Национальной академии Республики Беларусь по продовольствию», г. Минск

Поддержание культуры спиртовых дрожжей в активном состоянии с высокой плотностью дрожжевой популяции позволяет повысить эффективность спиртового производства, ускорить процессы разбраживания и главного брожения сусла, сократить потери спирта и сырья. В связи с этим представляется перспективной и актуальной разработка технологии направленного применения протеолитических ферментных препаратов, позволяющей максимально эффективно задействовать белковые полимеры зернового сырья, обогатить сусло легкоассимилируемыми источниками азота, нарастить высокую концентрацию засевных дрожжей и, как следствие, ускорить процесс спиртового брожения.

Цель проводившихся исследований – изучение путей интенсификации процесса спиртового брожения с помощью направленного применения протеолитических ферментных препаратов.

Объектами исследования служили рожь (урожая 2009 г.), как наиболее перерабатываемая зерновая культура в спиртовом производстве Республики Беларусь, протеолитические препараты грибного происхождения «Альфалаза FP2», «Новозим 25008», дрожжи расы 985Т.

«Альфалаза FP2» – кислый протеолитический ферментный препарат (кислая эндопептидаза), полученная в результате ферментации штамма *Aspergillus niger*. Отличительной особенностью «Альфалазы FP2» является свойство легко и эффективно гидролизовать большинство белков различных зерновых субстратов.

«Новозим 25008» является комплексным ферментным препаратом, получаемым из штамма *Aspergillus oryzae*, обладает эндопротеазной и экзопептидазной активностью. Под действием ферментного препарата «Новозим 25008» происходит гидролиз белков и пептидов до аминокислот, необходимых для жизнедеятельности дрожжей.

В табл. 1 приведена характеристика исследуемых ферментных препаратов по данным фирм-производителей.

При традиционной характеристике ферментных препаратов установление оптимума температуры, pH и других кинетических параметров проводится с использованием стандартного субстрата. Однако в промышленных условиях и в условиях конкретной технологии спиртового производства в качестве субстрата выступает сложная гетерогенная система, а это приводит к изменению основных кинетических параметров ферментативной реакции. В частности, в технологии этанола – это многокомпонентная система, представляющая собой смесь зернового помола и воды. Состав данного субстрата оказывает влияние на характер протекания процесса протеолиза и изменяет оптимальные значения температуры и pH. Поэтому исследование гидролитической способности «Альфалазы FP2», «Новозима 25008» с использованием в качестве субстрата зерна ржи представляет большой интерес.

Протеолитическая активность определялась модифицированным методом Ансона. При определении в качестве

субстрата использовалось измельченное зерно ржи, характеризующееся 100%-ным проходом через сито $d=1$ мм, смешанное с водой в соотношении помол : вода – 1 : 4.

Результаты относительной активности протеаз и глюкоамилазы (в % от максимальной) представлены на рис. 1.

Так, при изучении влияния pH на активность исследуемых ферментных препаратов установлено, что оптимум pH при гидролизе белков зернового субстрата для препарата «Альфалаза FP2» сдвигается в область pH, равную 3,5–3,8. Причем при pH 3,0, который, по данным фирмы-изготовителя, является оптимальным для действия «Альфалазы FP2» на стандартном субстрате, ферментный препарат, действующий на зерновой субстрат, сохранял около 75 % своей активности. Следует также отметить, что в области pH 4,0–4,2 протеаза проявляет 80–90 % активности, что является значительным результатом и может быть использовано в технологии направленного протеолиза.

При гидролизе белков зернового субстрата ферментным препаратом «Новозим 25008» оптимум pH относительно стандартного субстрата сдвигается в менее кислые зоны и

Таблица 1. Характеристика ферментных препаратов

Препарат	Фирма-производитель	Активность, ед. ПС/мл исходного препарата	Оптимум	
			температуры, °С	pH
«Альфалаза FP2»	Danisco A/S (подразделение Genenkor International B.V., Дания)	1200	55–60	–3,0
«Новозим 25008»	Novozymes A/S (Дания)	620	50–55	–5,0

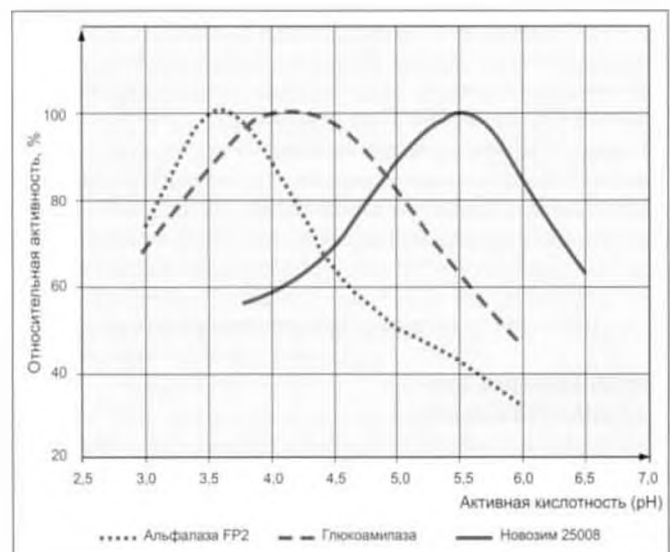


Рис. 1. Влияние pH на активность протеолитических ферментных препаратов

составляет 5,5–5,6. Причем при pH 5,0, который, по данным фирмы-изготовителя, является оптимальным для действия «Новозима 25008» на стандартном субстрате, ферментный препарат, действующий на зерновой субстрат, сохранял около 85 % своей активности.

Температурный оптимум для ферментного препарата «Альфа-лаза FP2» составляет 58–60 °С, а ферментного препарата «Новозим 25008» – 50–53 °С. Вместе с тем особый интерес представлял контроль стабильности «Альфылазы FP2» при оптимальных температурах протеолиза (рис. 2)

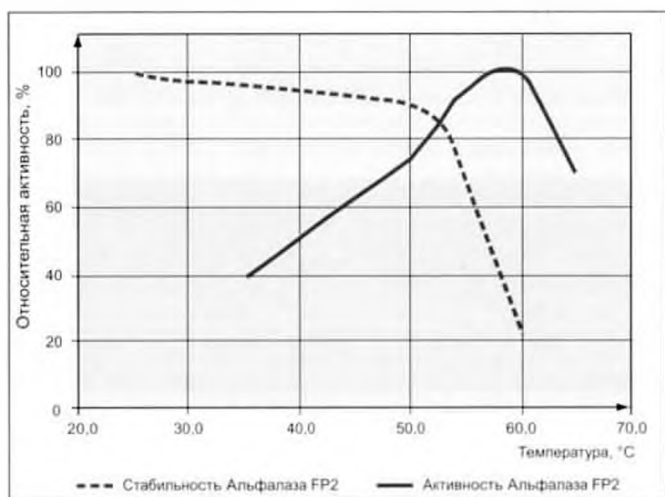


Рис. 2. Влияние температуры на активность кислой протеазы

Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что ферментный препарат «Альфылаза FP2», с учетом последующего пролонгированного протеолиза на стадии дрожжегенерации и сбраживания, наиболее рационально применять при температуре 50–53 °С

Современные приемы и методы использования кислых протеаз в соответствии с рекомендациями фирмы-изготовителя и исследованиями проведенными специалистами ГНУ ВНИИ пищевой биотехнологии РАСХН, предполагают внесение препаратов на стадии осахаривания и/или сбраживания сырья. Полученные результаты позволяют говорить о значительных перспективах данных способов использования протеаз. При этом следует отметить сокращение продолжительности сбраживания до 42–48 ч (Роль протеаз в спиртовом брожении / Л. В. Римарева, М. Б. Оверченко // Микробные биокатализаторы для перерабатывающих отраслей АПК / Сб. науч. трудов – М., 2006 / ВНИИПБТ, редкол. В. А. Поляков, Л. В. Римарева. – М., 2006. – С. 127–137). Однако применение протеолитических препаратов в дозировке 0,6–0,9 ед. ПС/г крахмала перерабатываемого производственного сусла и высокая дороговизна данных препаратов требуют поиска путей наиболее рационального их использования с максимальным эффектом.

Исследования по применению ферментных препаратов протеолитического действия на стадии приготовления замеса показали низкую перспективность данного приема, так как он приводит к прямым потерям сахара и свободных аминокислот вследствие реакции меланоидинообразования, протекающих на последующей стадии гидроферментативной обработки сырья. Кроме того, следует отметить непродолжительное время экспозиции фермента в процессе приготовления и водно-тепловой обработки замеса в зоне оптимальных для действия протеазы температур (Влияние технологических параметров на активность микробных протеаз в процессе получения ржаного сусла / Т. М. Тананайко и др. // Инновационные технологии в пищевой промышлен-

ности: часть 1. сб. докл. VII Междунар. научно-практич. конф. Минск, 2–3 окт., 2008 г. / Научно-практ. центр НАН Беларуси по продов. редкол. З. В. Ловкис и др. – Минск, 2008. – С. 76–83).

В целях интенсификации процесса производства спирта, увеличения плотности дрожжевой популяции, высокой бродильной активности, увеличения аминокислотного пула дрожжевых клеток и удлинения времени экспозиции кислой протеазы интересным представляется вариант применения «Альфылазы FP2» и «Новозима 25008» на стадии доосахаривания. При этом данная стадия протеолиза является промежуточной с дальнейшим ее протеканием на самой стадии дрожжегенерации и последующей стадии сбраживания.

Благоприятная зона pH для развития чистого посевного материала производственных дрожжей находится в интервале 4,0–4,2, а оптимум pH действия для препарата глюкоамилазы – 4,0–4,5 (В. А. Маринченко, В. А. Смирнов, Б. А. Устинников. Технология спирта. – М.: Легкая и пищевая промышленность, 1981). На основании этих данных, а также результатов исследования по pH и температурной активности кислых протеаз при воздействии на зерновой субстрат было предложено провести совмещенный протеолиз и доосахаривание для препарата «Альфылаза FP2» при pH 4,0–4,2 и температуре сусла 50–53 °С, для препарата «Новозим 25008» – pH 5,5–5,6 и температуре сусла 50–53 °С.

В целях изучения влияния протеолитических препаратов на показатели качества дрожжевого сусла было поставлено 7 опытных образцов

Для разжижения, декстринизации и осахаривания сусла по низкотемпературной схеме гидроферментативной обработки сырья использовались ферментные препараты бактериального и грибного происхождения «Амилекс 3Т» в дозировке 0,4 ед. АС/г условного крахмала, «Диазим Х4» – 7,4 ед. ГлС/г условного крахмала, «Ламинекс ВГ2» – 0,2 дм³/г сухих веществ зерна. Полученное сусло охлаждали до 52–53 °С, при необходимости корректировали активную кислотность внесением ортофосфорной кислоты, в образцы 2–6 вносили протеазу, образец 1 (без протеазы) использовали как контрольный. На доосахаривание дополнительно вносили «Диазим Х4» в количестве 5,0 ед. ГлС/г условного крахмала. Результаты совмещенного протеолиза и доосахаривания дрожжевого сусла представлены в табл. 2.

Полученные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что под действием протеолитических ферментов за счет глубокого протеолиза белков осахаренного сусла во всех образцах с протеазами происходит увеличение общего содержания аминокислот. При этом следует отметить, что к 1,5 ч протеолиза общее содержание аминокислот в образце с препаратом «Альфылаза FP2» (дозировка 0,2 ед. ПС/г условного крахмала) превышало контроль (без протеазы) в 1,5 раза, в образце с препаратом «Новозим 25008» (дозировка 0,2 ед. ПС/г условного крахмала) – в 1,3 раза.

Данные по накоплению свободных аминокислот показывают, что к 1,5 ч протеолиза для дозировок протеаз 0,2 и 0,3 ед. ПС/г условного крахмала происходит выравнивание содержания аминокислот. На основании полученных результатов для последующего процесса дрожжегенерации были отобраны образцы сусла с дозировками протеаз «Альфылазы FP2» 0,1 и 0,2 ед. ПС/г условного крахмала, «Новозима 25008» – 0,2 ед. ПС/г условного крахмала (соответственно образцы 2, 3, 6). Данный выбор обоснован экономической целесообразностью применения рассматриваемых дозировок.

Таблица 2. Качественные показатели дрожжевого сусла

№ обр.	Протеаза	Дозировка, ед. ПС/г условного крахмала	Технологические режимы	Продолжительность экспозиции					
				0,5 ч			1,5 ч		
				ОРВ, %	РВ, %	всего свободных аминокислот, мг/см ³	ОРВ, %	РВ, %	всего свободных аминокислот, мг/см ³
1	–	–	pH 5,8; t=56 °С	17,8	9,5	4,50	18,0	11,2	4,97
2	«Альфалаза»	0,1	pH 4,0; t=53 °С	17,8	9,7	5,20	17,9	11,9	7,04
3	«Альфалаза»	0,2	pH 4,0; t=53 °С	17,9	9,7	5,73	18,0	11,8	7,45
4	«Альфалаза»	0,3	pH 4,0; t=53 °С	17,8	9,6	6,21	18,0	11,8	7,49
5	«Новозим»	0,1	pH 5,5; t=53 °С	17,9	9,2	4,83	17,9	11,2	6,23
6	«Новозим»	0,2	pH 5,5; t=53 °С	17,8	9,1	5,02	17,9	11,3	6,68
7	«Новозим»	0,3	pH 5,5; t=53 °С	17,8	9,2	5,42	18,0	11,2	6,82

Таблица 3. Динамика процесса дрожжегенерации

№ образца	Начало дрожжегенерации		Продолжительность дрожжегенерации, ч									
			4		8		12		15		18	
	количество дрожжевых клеток, млн шт./см ³	ОРВ, %	количество дрожжевых клеток, млн шт./см ³	ОРВ, %	количество дрожжевых клеток, млн шт./см ³	ОРВ, %	количество дрожжевых клеток, млн шт./см ³	ОРВ, %	количество дрожжевых клеток, млн шт./см ³	ОРВ, %	количество дрожжевых клеток, млн шт./см ³	ОРВ, %
1	10	18,2	17	17,5	44	15,6	73,5	13,4	95	10,1	103	7,9
2	10	18,2	18,9	17,3	56	15,1	111,5	12,8	132	9,5	137	7,0
3	10	18,2	20	17,2	61	15,3	119,5	12,7	150	9,4	157	6,8
6	10	18,2	19,5	17,3	52,5	15,5	109,5	12,8	137	9,8	143	7,2

В контрольном и отобранном образцах с препаратом «Новозим 25008» проводили корректировку pH среды ортофосфорной кислотой до 4,0. После этого во все образцы (1, 2, 3, 6) вносили источник минерального азота (мочевина, 0,6 г/л сусла) и охлаждали до температуры складки 23–24 °С.

Подготовленные доосахаренные и протеонизированные образцы засеивали дрожжами расы 985Т из расчета первоначального их содержания 10 млн клеток на см³. Проводили дрожжегенерацию при температуре 26–28 °С. Полученные результаты процесса дрожжегенерации по контролю накопления уровня биомассы и потреблению углеводов представлены в табл. 3.

При исследовании динамики накопления дрожжевой биомассы и потребления углеводов в процессе дрожжегенерации установлено, что уже к 8 ч количество дрожжевых клеток, генерация которых происходила на сусле, обогащенном аминокислотами в результате протеолиза белков зерна ферментными препаратами составило 56, 61 и 52,5 млн клеток на см³ или в 1,2–1,5 раза больше, чем в контрольном образце. К 15 ч генерации разница оказалась еще более существенной и составила превышение в сравнении с контролем в 1,4–1,6 раза. При этом было достигнуто накопление дрожжевых клеток в образцах с «Альфалазой FP2» – 132 и 150 млн клеток на см³, с «Новозимом 25008» – 137 млн клеток на см³. Потребление углеводов коррелировало с накоплением дрожжевой биомассы и наиболее интенсивно происходило в протеонизированных образцах сусла, что подтверждает высокую ферментативную активность дрожжевых клеток.

Интенсивность потребления углеводов сусла и накопление дрожжевой биомассы показали высокую эффективность применения препарата кислой протеазы «Альфалаза FP2».

Для оценки влияния предложенного способа применения протеолитического ферментного препарата на процесс

спиртового брожения провели сбраживание образцов концентрированного ржаного сусла.

В целях разжижения, декстринизации по низкотемпературной схеме гидроферментативной обработки сырья при приготовлении образцов сусла А, В. С использовались ферментные препараты «Амилекс 3Т» в дозировке 0,4 ед. АС/г условного крахмала, «Ламинекс ВG2» – 0,2 дм³/г сухих веществ зерна, для осахаривания сусла «Диазим Х4» – 7,4 ед. ГлС/г условного крахмала, при этом:

1) в образцах А и В приготовление производственных дрожжей проводили согласно регламентируемому способу. На доосахаривание дополнительно вносили «Диазим Х4» – 5,0 ед. ГлС/г условного крахмала, корректировку pH до 3,9–4,0 перед внесением маточных дрожжей осуществляли ортофосфорной кислотой. Готовые производственные дрожжи вносили в осахаренное сусло в количестве 10 % от объема сбраживаемого сусла, при этом в образец В задавали «Альфалазу FP2» из расчета 0,04 ед. ПС/г крахмала. Образец А (без протеазы) использовали как контрольный;

2) в образце С в сусло для дрожжегенерации вносили дополнительно «Диазим Х4» – 5,0 ед. ГлС/г условного крахмала, охлаждали до 52–53 °С и корректировали активную кислотность внесением ортофосфорной кислоты до pH 4,0, задавали протеазу в дозировке 0,2 ед. ПС/г крахмала, доосахаривали, проводили дрожжегенерацию; готовые производственные дрожжи вносили в осахаренное сусло в количестве 10 % от объема сбраживаемого сусла.

Сбраживание образцов А, В, С осуществляли дрожжами расы 985Т при температуре 33–35 °С.

Экспериментально полученные данные (табл. 4) подтверждают, что применение протеазы на стадии дрожжегенерации (образец С) значительно интенсифицирует процесс брожения в сравнении с использованием протеазы непосредственно на стадии сбраживания (образец В) или контролем – без протеазы (образец А).

Таблица 4. Влияние направленного применения кислой протеазы на процесс спиртового брожения

Образцы	Концентрация СВ сусла, %	Показатели спиртового брожения										Выход спирта, % к контролю
		количество дрожжевых клеток				содержание углеводов, %						
		10 ч		18 ч		60 ч		66 ч		72 ч		
		млн/мл	% почк.	млн/мл	% почк.	ОРВ	РВ	ОРВ	РВ	ОРВ	РВ	
A	19,6	42	22	76	9	1,20	0,98	0,77	0,64	0,49	0,38	100,0
B	19,6	54	27	106	15	0,77	0,64	0,40	0,28	0,26	0,18	100,5
C	19,6	68	25	117	12	0,28	0,19	0,25	0,16	0,24	0,15	101,4

В опытном образце С, где протеазу использовали на стадии дрожжегенерации, отмечено ускорение размножения дрожжей: к 10 ч сбраживания количество дрожжевых клеток было в 1,6 раза больше в сравнении с образцом А (без протеазы) и в 1,3 раза – в сравнении с образцом В (протеаза внесена на брожение), к 18 ч – в 1,5 и 1,1 раза соответственно.

Интенсивное развитие и размножение дрожжевых клеток подтверждает их хорошее физиологическое состояние и высокую бродильную активность. Отмечено также более высокое содержание почкующихся клеток. Все это отразилось на интенсивности всего процесса сбраживания, при этом предлагаемый способ применения кислой протеазы обеспечивал глубокое выбраживание сусла уже к 60 ч и соответствовал показателям, достигнутому при применении протеазы на стадии брожения, к 72 ч. Дальнейшее продление процесса способствовало глубокому сбраживанию углеводов среды с одновременным увеличением выхода конечного продукта.

В результате анализа полученных при исследованиях данных можно сделать выводы:

- Совмещенный протеолиз и доосахаривание сусла позволяют интенсифицировать процесс доосахаривания, обогатить сусло легкоусвояемым азотным питанием, получить высокую плотность дрожжевой популяции. Дрожжевые клетки, выращенные на сусле с ферментным препаратом «Альфапаз FP2», отличаются повышенной бродильной активностью и улучшенным физиологическим состоянием.
- Применение препарата «Альфапаз FP2» на стадии совмещенного доосахаривания и протеолиза в дозировке 0,2 ед. ПС/г крахмала дрожжевого сусла при норме засева производственных дрожжей 10 % позволяет установить общий расход протеазы на перерабатываемый объем крахмала производственного сусла на уровне 0,02 ед. ПС/г крахмала.
- Предложенный способ применения протеазы интенсифицирует процесс брожения и обеспечивает глубокое выбраживание концентрированного сусла к 60 ч.

ПРОД ЭКСПО 2011 7-11 ФЕВРАЛЯ

18-Я МЕЖДУНАРОДНАЯ ВЫСТАВКА ПРОДУКТОВ ПИТАНИЯ, НАПИТКОВ И СЫРЬЯ ДЛЯ ИХ ПРОИЗВОДСТВА

www.prod-expo.ru

Центральный выставочный комплекс «Экспоцентр» Москва, Россия

Организатор: ЗАО «Экспоцентр»

При поддержке: Министерства сельского хозяйства Российской Федерации

ЭКСПОЦЕНТР МЕЖДУНАРОДНЫЕ ВЫСТАВКИ И КОНГРЕССЫ МОСКВА

ufi Associated Events