

Римарева Л.В., д.т.н., академик РАН, г.н.с., Игнатова Н.И., н.с., Оверченко М.Б., к.т.н., в.н.с., Антонова А.А., магистр, Серба Е.М., д.б.н., доцент, проф. РАН
Всероссийский научно-исследовательский институт пищевой биотехнологии – филиал
ФГБУН «ФИЦ питания, биотехнологии и безопасности пищи»
(Россия, г. Москва)

ИССЛЕДОВАНИЕ ФЕРМЕНТОВ ФИТОЛИТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ НА ПОКАЗАТЕЛИ ЗЕРНОВОГО СУСЛА И ПРОЦЕСС СПИРТОВОГО БРОЖЕНИЯ

*Аннотация. Биотехнологической основой производства этанола являются процессы конверсии высокомолекулярных полимеров растительного сырья с последующей микробной трансформацией сахаров в этанол. Эффективность этих процессов достигается за счет расширения сырьевой базы, скрининга высокопродуктивных рас спиртовых дрожжей, а также применения новых мультиэнзимных комплексов. В состав таких комплексов должны входить ферменты амилолитического, протеолитического и гемицеллюлазного действия. В настоящее время особый интерес в спиртовом производстве вызывают ферменты фитазного действия. Фитаза представляет собой фермент, расщепляющий фитиновую кислоту, которая является основной формой содержания минерального фосфора в тканях растений. Фосфор необходим для нормального роста и развития дрожжей. Большое количество фитиновой кислоты сосредоточено в зернах злаковых культур. Таким образом, применение комплексных ферментных препаратов, содержащих фитазу, позволит обогатить зерновое сусло дополнительным фосфором, что обеспечит стабильный процесс генерации дрожжей и спиртового брожения, позволит увеличить выход готового продукта, и, как следствие, положительно скажется на рентабельности производства в целом. В работе представлены результаты исследований влияния комплексного ферментного препарата, содержащего фитазу, на качество зернового сусла и эффективность его сбраживания дрожжами *Saccharomyces cerevisiae* 985T с термотолерантными и осмофильными свойствами.*

Ключевые слова: фитаза, ксиланаза, зерновое сусло, аминокислоты, углеводы.

L.V. Rimareva, Doctor of Technical Science, Academician of RAS, Chief Researcher, N.I. Ignatova, Researcher, M.B. Ovcherenko, Candidate of Technical Science, Leading Researcher, A.A. Antonova, Master, E.M. Serba, Doctor of Biological Science, Docent, Professor of RAS

All-Russian Scientific Research Institute of Food Biotechnology – Branch of the Federal Research Center for Nutrition and Biotechnology, Moscow, Russia

RESEARCH OF PHYTOLITHIC ENZYMES ACTIVITY ON GRAIN WORT INDICES AND ALCOHOL FERMENTATION PROCESS

Annotation. The biotechnological basis for the production of ethanol are the processes of plant raw materials high molecular polymers conversion with the subsequent microbial transformation of sugars into ethanol. The effectiveness of these processes is achieved through the expansion of the resource base, screening of highly productive alcohol yeast races, as well as the use of new multienzyme complexes. Such complexes should include enzymes of amylolytic, proteolytic and hemicellulase activity. At present, enzymes of phytase action are of special interest in alcohol production. Phytase is an enzyme, that cleaves phytic acid, which is the main form of mineral phosphorus content in plant tissues. Phosphorus is necessary for normal growth and yeast development. A large amount of phytic acid is concentrated in the grains of cereals. Thus, the use of complex enzyme

*preparations, containing phytase, will allow the enrichment of grain wort with additional phosphorus, which will ensure a stable process of yeast and alcohol fermentation, will increase the yield of the finished product, and, as a consequence, will positively affect the profitability of production as a whole. The paper presents the results of studies on the effect of a complex enzyme preparation, containing phytase, on the quality of grain wort and the efficiency of its fermentation by yeast *Saccharomyces cerevisiae* 985T with thermotolerant and osmophilic properties.*

Key words: phytase, xylanase, grain wort, amino acids, carbohydrates.

В связи с большой конкуренцией на алкогольном рынке России получение высококачественного этилового спирта — важная задача отрасли, так как она напрямую связана с качеством спиртных напитков, с их биохимическими и органолептическими свойствами [1].

Биотехнологической основой производства этанола являются процессы конверсии высокомолекулярных полимеров растительного сырья с последующей микробной трансформацией сахаров в этанол. Эффективность этих процессов достигается за счет расширения сырьевой базы, скрининга высокопродуктивных рас спиртовых дрожжей, а также применения новых мультиэнзимных комплексов. В состав таких комплексов должны входить ферменты амилолитического, протеолитического и гемицеллюлазного действия [2-4].

В настоящее время особый интерес в спиртовом производстве вызывают ферменты фитазного действия. Фитаза представляет собой фермент, расщепляющий фитиновую кислоту, которая является основной формой содержания минерального фосфора в тканях растений. Фосфор необходим для нормального роста и развития дрожжей. Большое количество фитиновой кислоты сосредоточено в зернах злаковых культур [5].

Таким образом, применение комплексных ферментных препаратов (ФП), содержащих фитазу, позволит обогатить зерновое сусло дополнительным фосфором, что обеспечит стабильный процесс генерации дрожжей и спиртового брожения, позволит увеличить выход готового продукта, и, как следствие, положительно скажется на рентабельности производства в целом.

Цель работы — исследование влияния ферментативных систем гемицеллюлазного и фитазного действия на процесс сбраживания ржаного сусла.

В качестве сырья для приготовления зернового сусла использовали рожь, подготовку которой проводили по «мягкой» ферментативной схеме разваривания. На стадии приготовления зернового замеса применяли термостабильную α -амилазу; на стадии осахаривания в опытном варианте — использовали ФП-источники глюкоамилазы, ксиланазы и фитазы. В контрольном варианте фитолитические ферменты не использовали.

Процесс сбраживания зернового сусла осуществляли спиртовыми дрожжами *Saccharomyces cerevisiae* 985T с термотолерантными и осмофильными свойствами по методу постановки бродильных проб. Брожение вели при температуре 35°C в течение 72 часов. Концентрацию сусла, дрожжей, остаточные редуцирующие углеводы (РВ), выход спирта определяли согласно инструкции технохимического контроля спиртового производства [8]. Реологические свойства зернового сусла оценивали путем измерения динамической вязкости методом вибрационной вискозиметрии с использованием синусоидального вибровискозиметра серии SV – 10 и программного обеспечения RsVisco. Состав и уровень образования побочных метаболитов, образующихся в процессе брожения, анализировали по разработанной методике на газовом хроматографе HP "Agilent" 6850 [9].

Комплексные ферментные препараты применяли на стадии подготовки ржаного сусла как источники глюкоамилазы и сопутствующих ферментов. В контрольном варианте (I) для приготовления зернового сусла использовали амилолитические ферменты для осахаривания крахмала (АС+ГлС). В варианте (II) к источнику глюкоамилазы добавили ФП, содержащий ксиланазу и β -глюканазу — для каталитического гидролиза гемицеллюлоз (АС+ГлС+КС). В варианте (III) для приготовления зернового сусла использовали комплекс ферментов, содержащий карбогидразы и фитазу (АС+ГлС+КС+ФС).

Установлено, что использование ФП – источника гемицеллюлаз (ксиланазы и β -глюканазы) способствовало существенному улучшению реологических свойств зернового суслу, вязкость которого снизилась в 4,2 раза: с 360 мПа·с до 85 мПа·с (рис. 1). При внесении комплекса ферментов, содержащих дополнительно фитазу, вязкость снизилась до 74 мПа·с.

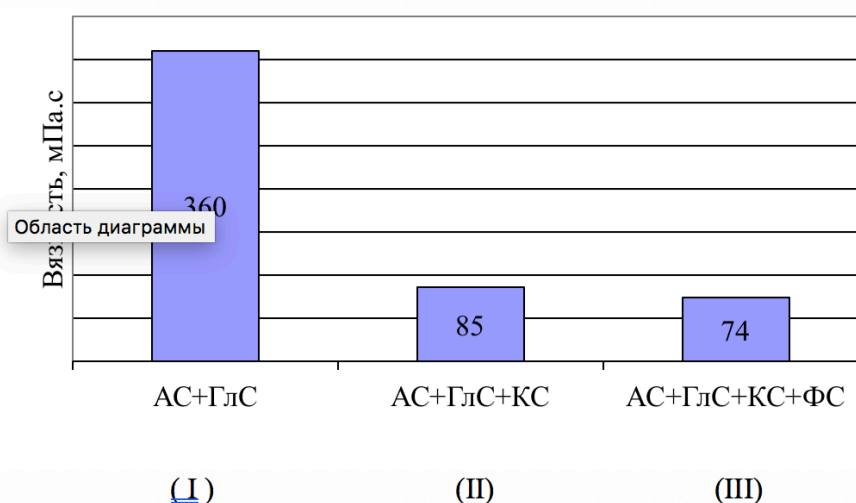


Рис. 1. Влияние субстратной специфичности ферментов на вязкость ржаного суслу

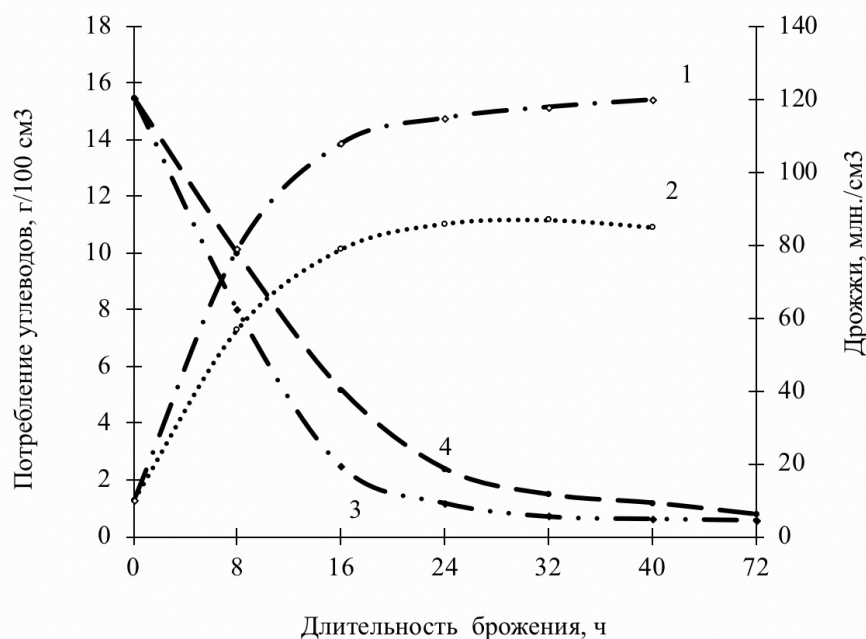
Результаты исследований показали, что концентрация растворимых сухих веществ зернового суслу (РСВ), приготовленного с использованием комплексных ферментных препаратов составила 24,8-25,2 %, а содержание редуцирующих углеводов (РВ) – 13,2-14,8%.

Наиболее высокие показатели РВ были достигнуты в II и III вариантах зернового суслу, приготовленных с использованием комплекса ферментов, содержащего гемицеллюлазы. По-видимому, это обусловлено наличием в составе комплекса β -глюканазной активности. Каталитическое действие β -глюканазы способствовало гидролизу глюканов зерна и образованию дополнительного количества редуцирующих углеводов (таблица 1).

Таблица 1 - Биохимические показатели зернового суслу

Вариант суслу и ферментный комплекс	Содержание, %	
	РСВ, %	РВ, %
I - AC+ГлС	24,8	13,2
II - AC+ГлС+КС	25,0	14,5
III - AC+ГлС+КС+ФС	25,2	14,7

Сравнительные исследования процессов генерации дрожжей и спиртового брожения на ржаном сусле, приготовленном с применением ферментных препаратов, различающихся по содержанию гидролитических ферментов, показали, что наличие в составе ферментного комплекса фитазы позитивно сказалось на процессе генерации дрожжей, концентрация которых увеличилась в 1,4 раза (рис. 2). При этом отмечено, что обогащение суслу биодоступным фосфорным питанием, в результате фитолитического воздействия на зерно, способствовало повышению физиологической активности дрожжевых клеток и соответственно интенсификации процесса брожения. Количество остаточных углеводов в опытном варианте, где при подготовке ржаного суслу использовали фитазу, уже к 40 ч брожения составило 0,65 г/100 см³, в то время как в контрольном варианте за 72 ч брожения этот показатель соответствовал 0,80 г/100 см³.



1, 3 - на зерновом сусле, обработанном фитазами;
 2, 4 - на зерновом сусле, не обработанном фитазами (контроль)

Рис. 2. Динамика накопления биомассы дрожжей (1, 2) и потребления углеводов (3, 4) при сбраживании зернового сусле, обработанного фитазами (1,3)

В результате проведенных исследований установлено, что применение на стадии подготовки зернового сусле ферментов фитолитического действия способствовало повышению эффективности процессов дрожжегенерации и спиртового брожения.

Исследования проведены за счет средств субсидии на выполнение государственного задания в рамках Программы Фундаментальных научных исследований государственных академий наук (тема № 0529-2018-0112).

Список литературы

1. Абрамова И.М. Особенности переработки пшеничного сырья, обеспечивающие производство спирта с высокими показателями качества //Производство спирта и ликероводочных изделий. – 2012. - № 1. – С. 4-6.
2. Римарева Л.В., Оверченко М.Б., Игнатова Н.И., Шелехова Н.В., Серб Е.М., Мартыненко Н.Н., Кривова А.Ю. Влияние ферментных комплексов на метаболизм спиртовых дрожжей и накопление ионов неорганической природы в концентрированном зерновом сусле. Вестник Российской сельскохозяйственной науки, 2016, №3, С. 28–31.
3. Курбатова Е.И., Соколова Е.Н., Борщева Ю.А., Давыдкина В.Е., Римарева Л.В., Поляков В.А., Погоржельская Н.С. Микромицет *Aspergillus foetidus* – продуцент комплекса гидролитических ферментов. Микология и фитопатология, 2017, №1, С.34 – 40.
4. Середя, А.С., Игнатова Н.И., Оверченко М.Б., Н.В. Цурикова, Римарева Л.В., Рожкова А.М., Зоров И.Н, Синицын А.П. Исследование гидролитической способности комплексных ферментных препаратов, полученных на основе высокоэффективных рекомбинантных штаммов *Aspergillus awamori* по отношению к полисахаридам зернового сырья. Хранение и переработка сельхозсырья, 2011, № 3, С. 54–56.
5. Жульков А.Ю, Витол И.С., Карпиленко Г.П. Роль зерновой фитазы при производстве и сбраживании ржаного сусле. Часть I. Исследование фитазного комплекса ржи. Хранение и переработка сельхозсырья, 2009, №5, С. 50–55.

6. Римарева Л. В., Цурикова Н. В., Костылева Е. В., Серeda А.С. Рекомбинантный штамм мицелиального гриба *Aspergillus awamori* – продуцент комплекса ферментов глюкоамилазы и ксиланазы. Патент РФ №2457246.
 7. Римарева Л.В., Цурикова Н.В., Костылева Е.В., Серeda А.С. Рекомбинантный штамм мицелиального гриба *Aspergillus awamori* – продуцент глюкоамилазы. Патент РФ №2457247.
 8. Поляков В.А., Абрамова И.М., Пoлыгалина Г.В., Римарева Л.В., Корчагина Г.Т., Пискарева Е.Н. Инструкция по теххимическому и микробиологическому контролю спиртового производства. Москва: ДеЛипринт, 2007, 480 с.
 9. ГОСТ Р 55792-2013. Бражка из пищевого сырья. Газохроматографический метод определения содержания летучих органических примесей. Москва: Стандартиформ, 2014, III, 18 с.
-