

INFLUENCE OF LIPOLYTIC ENZYMES ON THE FRACTIONAL COMPOSITION OF WHEAT ALCOHOL

Bobir S. KAYUMOV

Tashkent Institute of Chemical Technology, Tashkent, Uzbekistan, khayumov90@gmail.com

Saida Sh. KHAKIMOVA

Tashkent Institute of Chemical Technology, Tashkent, Uzbekistan, saidakhakimova81@gmail.com

Khasan T. KHASANOV

Tashkent Institute of Chemical Technology, Tashkent, Uzbekistan, xas.tyr@rambler.ru

Follow this and additional works at: <https://cce.researchcommons.org/journal>

 Part of the [Food Processing Commons](#)

Recommended Citation

KAYUMOV, Bobir S.; KHAKIMOVA, Saida Sh.; and KHASANOV, Khasan T. () "INFLUENCE OF LIPOLYTIC ENZYMES ON THE FRACTIONAL COMPOSITION OF WHEAT ALCOHOL," *CHEMISTRY AND CHEMICAL ENGINEERING*: Vol. 2024: No. 1, Article 10.

DOI: 10.34920/cce2024110

Available at: <https://cce.researchcommons.org/journal/vol2024/iss1/10>

This Article is brought to you for free and open access by Chemistry and Chemical Engineering. It has been accepted for inclusion in CHEMISTRY AND CHEMICAL ENGINEERING by an authorized editor of Chemistry and Chemical Engineering. For more information, please contact zuchra_kadirova@yahoo.com.

INFLUENCE OF LIPOLYTIC ENZYMES ON THE FRACTIONAL COMPOSITION OF WHEAT ALCOHOL

Bobir S. KAYUMOV (khayumov90@gmail.com)
Saida Sh. KHAKIMOVA (saidakhakimova81@gmail.com)
Khasan T. KHASANOV (xas.tyr@rambler.ru)
Tashkent Institute of Chemical Technology, Tashkent, Uzbekistan

*The purpose of this work is to study the influence of lipolytic enzymes on the fermentation activity and fractional composition of alcohol by the yeast *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation. Lipolytic enzymes, intensifying the fermentation process and increasing the yield of the target product, have a positive effect on the physiological activity of yeast cells. Hydrolysis of carboxylic acid esters also occurs due to the hydrolase activity of lipases. In the presence of exogenous lipases, hydrolysis of lipids occurs due to the hydrolase activity of lipases and the fractional composition of alcohol changes. The content of esters is reduced by 9%, fusel oils by 10% and isopropanol by 7-8%.*

Keywords: lipase, plant, rice, yeast, alcoholic, fermentation

ВЛИЯНИЕ ЛИПОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ НА ФРАКЦИОННЫЙ СОСТАВ ПШЕНИЧНОГО СПИРТА

Бобир С. КАЙУМОВ (khayumov90@gmail.com)
Саида Ш. ХАКИМОВА (saidakhakimova81@gmail.com)
Хасан Т. ХАСАНОВ (xas.tyr@rambler.ru)
Ташкентский химико-технологический институт, Ташкент, Узбекистан

*Целью настоящей работы является исследование влияния липолитических ферментов на бродительную активность и фракционный состав спирта дрожжами *Saccharomyces cerevisiae* во время спиртового брожения. Липолитические ферменты, интенсифицируя процесс брожения и увеличивая выход целевого продукта, положительно влияют на физиологическую активность дрожжевых клеток. Происходит также гидролиз сложных эфиров карбоновых кислот, за счет гидролазной активности липаз. В присутствии экзогенных липаз происходит гидролиз липидов, за счет гидролазной активности липаз и изменяется фракционный состав спирта. Содержание сложных эфиров уменьшается на 9%, сивушных масел на 10% и изопропанола на 7-8%.*

Ключевые слова: липаза, растительная, рисовая мука, дрожжи, спиртовые, брожение

LIPOLITIK FERMENTLARNING BUG'DOY SRIRTINI FRAKTSION TARKIBIGA TA'SIRI

Bobir S. KAYUMOV (khayumov90@gmail.com)
Saida Sh. KHAKIMOVA (saidakhakimova81@gmail.com)
Khasan T. XASANOV (xas.tyr@rambler.ru)
Toshkent kimyo-texnologiya instituti, Tashkent, O'zbekiston O'zbekiston

*Ushbu ishning maqsadi spirtli bij'ish jarayonida *Saccharomyces cerevisiae* achitqisining faolligiga va spirtning fraksiyon tarkibiga lipolitik fermentlarning ta'sirini o'rganishdir. Lipolitik fermentlar, fermentatsiya jarayonini tazlashiradi va maqsadli mahsulotning hosildorligini oshiradi, achitqi hujayralarining fiziologik faolligiga ijobiy ta'sir ko'rsatadi. Murakkab efirlarning gidrolizi lipazalarning gidrolitik faolligi tufayli ham sodir bo'ladi. Ekzogen lipazalar ishtirokida lipidlarning gidrolizi lipazalarning gidrolitik faolligi yuz beradi va spirtlarni fraksiyon tarkibi o'zgarishi sodir bo'ladi. Efirlarning tarkibi 9% ga, sivuxa moylari 10% ga va izopropanol 7-8% ga kamayadi.*

Kalit so'zlar: lipaza, guruch murtagi, achitqi, spirtli, fermentatsiya

DOI: 10.34920/cce2024110

Введение

В настоящее время при переработке растительного сырья для получения пищевых продуктов широко применяются гидролитические ферменты микробного происхождения [1-4].

В производстве спирта из зернового сырья в основном используются амилолитические, цитолитические и протеолитические ферменты [5-7]. Проводятся также исследовательские работы по использованию других гидролитических ферментов для обогащения сбраживаемого суслу с питательными веществами для дрожжей [8].

В этой связи биотрансформация высоко-

комолекулярных соединений зерна рассматривается параллельно с углублением исследований по широкому использованию гидролитических ферментов [9, 10].

Различают экзогенное и эндогенное питание спиртовых дрожжей. При экзогенном питании питательные вещества поступают в дрожжевую клетку из внешней среды, при эндогенном дрожжи используют (в основном при голодании) свои резервные вещества: гликоген, трегалозу, липиды, азотистые соединения [11, 12].

Во время приготовления сбраживаемого суслу из зерновых культур резервные вещества крахмал, белки и других органические

вещества расщепляются гидролитическими ферментами.

В качестве источника протеазы использовали протеолитический ферментный препарат Пролайв BS Ликвид. В качестве источника фитазы применяли ферментный препарат Кингфос. В качестве амилолитических ферментов используются Термамил SC, Термалаза 800L, Алфамил 2500 L, Сансупер 360 L и др. [13-15].

Липолитические ферменты (липазы) — группа ферментов, катализирующие реакции гидролитического расщепления жиров с образованием моно- и диглицеридов и свободных жирных кислот, при этом наибольшее сродство фермент проявляет к эфирным связям, расположенным на внешней части молекулы триглицерида [16]. Они также могут катализировать другие реакции, такие как этерификация, переэтерификация, ацидолиз, алкоголиз и аминолиз [17-20].

В зависимости от типа субстратов липазы способны катализировать ацидолиз (он включает сложный эфир и карбоновую кислоту), алкоголиз (он включает сложный эфир и спирт), аминолиз (сложный эфир может реагировать с амином) и переэтерификацию (где две ацильные группы обмениваются между двумя сложными эфирами) [17].

Известно, что органические кислоты имеют важное значение в метаболизме углерода, энергетическом обмене микроорганизмов, синтетических и диссимиляционных процессах. Использование кислот жирного ряда в качестве источника углерода зависит от вида и расы дрожжей, концентрации кислоты, длины ее углеродной цепи и степени электролитической диссоциации [21].

Целью данной работы являлось исследование влияния липолитических ферментов на динамику роста дрожжевых культур и на образование вторичных продуктов во время спиртового брожения.

Методы исследования

В работе использовали липолитические ферменты из рисовой мучки.

Состав бродящей среды. В лабораторных условиях модельная бродящая смесь состояла из следующих компонентов: мальтоза - 14%, $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ - 0,3%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,5%, pH 5,5.

В отдельных экспериментах процесс брожения осуществляли с использованием осажаренного зернового суслу полученного из Янгиюльского завода «Биохим».

Определение продуктов гидролиза липидов. Из бродящей смеси отбирают пробы по 0,25 мл и добавляют 1 мл 0,1 М HCl в этаноле и 5 мл гексана. Смесь тщательно встряхивают и после расслаивания из верхней части отбирают 1 мл пробы, вносят 3 мл цветного реагента Родамина 6Ж и измеряют оптическую плотность при 515 нм. По калибровочной кривой определяют содержание жирной кислоты [22].

Определение дрожжевой биомассы. Дрожжевую биомассу отделяли фильтрованием. Заранее высушенный и взвешенный (в течение 1-2 ч при 90-100 °C) бумажный фильтр помещают в воронку и фильтруют через него 10 мл культуры. Осадок на фильтре многократно промывают подкисленной дистиллированной водой. Затем фильтр с осадком клеток помещают в сушильный шкаф, высушивают в течение 1-2 ч при температуре 90-100 °C и взвешивают с точностью до 0,0001г. [23].

Определение содержания спирта. Вначале бражку подвергают перегонке на перегонном установке. Мерную колбу вместимостью 100 мл заполняют бражкой и доводят до метки при 20 °C. Содержимое колбы переносят в перегонную колбу на 250-300 мл без потерь. В качестве приемника используют мерную колбу вместимостью 100 мл, в которую предварительно наливают 10-15 мл воды. Патрубок, после холодильника, погружают в воду и приступают к перегонке. Для уменьшения потерь спирта приемную колбу помещают в баню со льдом. Перегонку производят со скоростью 3,5-4,5 мл/мин. Перегонку прекращают, когда мерная колба заполнится дистиллятом на $\frac{3}{4}$ объема. После этого прекращают подогрев содержимого перегонной колбы и приемную колбу доводят дистиллированной водой при 20 °C. Мерную колбу вместимостью 100 мл заполняют бражкой и доводят до метки при 20 °C. Содержимое мерной колбы тщательно перемешивают, определяют плотность дистиллята пикнометром и находят содержание спирта в бражке (в об.%) по таблице [24].

Определение состава спиртов. Образцы спирта сырца были проанализи-

рованы с использованием газового хроматографа Agilent 7890, соединенного со спектрофотометром 5975 CinertXLEI/CIMSD.

Результаты и обсуждение

В процессе сбраживания осахаренного суслу наряду с этиловым спиртом идет образование побочных продуктов (эферы, высшие спирты, альдегиды, органические кислоты и другие соединения, называемые примесями спирта). Их качественный и количественный состав сказывается на качестве готового продукта – пищевого этилового спирта. Образование вторичных продуктов зависит от качества основного сырья и вспомогательных материалов, параметров и режимов технологического процесса, а также расы используемых дрожжей [25-27].

Для нормального метаболизма дрожжевых клеток необходимо содержание в питательной среде всех веществ, а также необходимы условия, исключающие стрессовые воздействия, вызываемые температурами, высокими концентрациями углеводов и этанола [28].

Повышение бродительной активности дрожжей может быть достигнуто применением сбалансированного состава питательной среды [29].

Роль липолитических ферментов в процессе переработки зерна на спирт заключается в превращении липидов в жирные кислоты, моно- и диглицериды, а также глицерин.

Следует отметить, что органические кислоты имеют важное значение в метаболизме углерода, энергетическом обмене микроорганизмов, синтетических и диссимиляционных процессах.

Жирные кислоты со средней длиной углеродной цепи (от C₆ до C₁₀) в меньшей мере потребляются дрожжами и при очень низ-

ких концентрациях в среде (0,02—0,05%). Более высокие концентрации их подавляют развитие дрожжей. Жирные кислоты с 12—17 атомами углерода в молекуле потребляются избирательно в зависимости от рода и вида дрожжей [30].

В присутствии масляной и капроновой кислот процесс образования высших спиртов в значительной мере блокируется независимо от расы дрожжей.

Испытуемая нами липаза из рисовой мучки максимально проявляется при pH 7,5 и 8,0, но сохраняется в диапазоне pH от 4,0 до 9,0. Оптимальная температура действия 37 °С, фермент стабилен до 40 °С. Фермент гидролизует оливковое масло, масло рисовых отрубей и кокосовое масло, а также синтетические триацилглицерин и триолеин. Фермент катализирует гидролиз короткоцепочечной сложноэфирной связи быстрее, чем длинноцепочечной.

Во время спиртового брожения липолитические ферменты также могут гидролизовать липиды за счет гидролазной активности, а также образовывать эфиры жирных кислот со спиртами за счет синтетазных свойств.

Исследовано влияние липолитических ферментов на динамику роста дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* во время спиртового брожения и на образование вторичных продуктов. В результате установлено, что липолитические ферменты влияют на рост дрожжей и на образование вторичных продуктов.

В таблице 1 приведены результаты влияния липазы из рисовой мучки на накопление биомассы во время спиртового брожения на модельных системах.

Из представленных данных видно, что в отсутствие липазы (контрольный вариант) за 72-часовой период брожения содержание биомассы составляет 0,15 мг/мл. В присутствии липазы из рисовой мучки накопление биомассы со-

Таблица 1

Накопление содержания биомассы (мг/мл) при брожении в присутствии липазы

Условие	Время брожения, час.						
	0	12	24	36	48	60	72
В отсутствие липазы	0	0,4	0,8	0,9	1,0	1,1	1,2
В присутствии липазы	0	0,6	252	3,6	3,8	4,2	4,3

Состав среды: мальтоза - 14%; KН₂PO₄ -0,3%; MgSO₄·7H₂O – 0,5%; рисовая мучка- 5%; pH 5,5.

Таблица 2

Накопление этанола (об.%) во время брожения в присутствии липазы

Условие	Время брожения, час.						
	0	12	24	36	48	60	72
В отсутствие липазы	0	0,4	0,8	0,9	1,0	1,1	1,2
В присутствии липазы	0	0,6	252	3,6	3,8	4,2	4,3

Таблица 3

Влияние липаз из рисовой муки на химический состав спирта
 (содержание продуктов мг/л)

Состав	Контроль	Липаза из рисовой муки
Альдегиды	15,2117	10,9073
Эфиры	6,7643	6,1529
Сычушные масла	253,3613	227,8159
Изопропанол	0,3389	0,3139

ставляет 6,1 мг/мл.

При этом образование этанола также увеличивается в присутствии липаз из рисовой муки.

В таблице 2 приведены данные влияния липазы из рисовой муки на накопление этанола во время брожения. Из представленных данных видно, что липолитический фермент влияет на ход спиртового брожения.

В присутствии рисовой муки процесс брожения интенсифицируются и содержание спирта в бродящей среде достигает 4,3% против 1,2% контрольного.

Во время спиртового брожения в присутствии липаз происходит также гидролиз сложных эфиров карбоновых кислот и это влияет на образование вторичных продуктов. Результаты экспериментальных данных приведены в таблице 3.

Из представленных данных видно, что содержание сложных эфиров уменьшается на 9%, сычушных масел на 10 % и изопропанола на 7-8 %.

Таким образом, результаты исследова-

ний показывают важную роль ферментов липолитического комплекса в процессе спиртового брожения и дрожжегенерации. Воздействие липаз на липиды зернового суслу повышает эффективность его гидролиза, обогащает среду жирными кислотами, что способствует в конечном счёте повышению физиологической активности дрожжевых клеток, интенсификации процесса брожения и увеличению выхода целевого продукта.

Заключение

Липолитические ферменты, интенсифицируя процесс брожения и увеличивая выход целевого продукта, положительно влияют на физиологическую активность дрожжевых клеток. Происходит также гидролиз сложных эфиров карбоновых кислот, за счет гидролазной активности липаз. В присутствии экзогенных липаз происходит гидролиз липидов, за счет гидролазной активности липаз и изменяется фракционный состав спирта. Содержание сложных эфиров уменьшается на 9%, сычушных масел на 10% и изопропанола на 7-8%.

REFERENCES

- Whitehurst R.J., Oort M. Enzymes in Food Technology. Sheffield Academic Press, CRC Press, Sheffield, UK, 2002. (Russ. ed. Uaytxersta R.D, Oorta M. *Fermenty v pishvoy promyshlennosti*. SPb, Professiya Publ., 2014, 405).
- Rimareva L.V. Mikrobnyye fermentnyye preparaty v spirtovom proizvodstve [Microbial enzyme preparations in alcohol production]. *Proizvodstvo spirta i likerovodochnykh izdeliy*, 2002, 4, 27–31.
- Yano Sh. Enzymatic Saccharification and Fermentation Technology for Ethanol Production from Woody Biomass. *Journal of the Japan Petroleum Institute*, 2015, 58/3, 128-134. DOI:10.1627/jpi.58.128
- Yakovleva S.F., Yakovlev A.N., Korneeva O.S. Polucheniye etilovogo spirta iz rzhi s ispol'zovaniem mul'tienzimnoy kompozitsii [Production of ethyl alcohol from rye using a multi-enzyme composition]. *Biotekhnologiya*, 2011, 6, 63–69.
- Rimareva L.V., Serba E.M., Overchenko M.B., Shelekhova N.V., Ignatova N.I, Pavlov A.A. Enzyme complexes for activating yeast generation and ethanol fermentation. *Foods and Raw Materials*, 2022, 10/1,127–136.

6. Caspeta L, Coronel J, Montesde Oca A, Abarca E, González L, Martínez A. Engineering high-gravity fermentations for ethanol production at elevated temperature with *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*. 2019, 116/10, 2587–2597. DOI: 10.1002/bit.27103.
7. Shuster K., Vaynfurtner F., Narsiss L. *Tekhnologiya soloda* [Malt technology]. M., Pishhevaya promishlennost, 1980, 342.
8. Vostrikov S.V., Yakovlev A.N., Bushin M.A. Vliyaniye sbalansirovannogo sostava zernovogo susla na protsess biosinteza drozhzhevoy biomassy [The influence of a balanced composition of grain wort on the process of biosynthesis of yeast biomass]. *Proizvodstvo spirta i likerovodochnykh izdeliy*, 2006, 2, 32–33.
9. Yakovlev A.N., Agafonov G.V., Yakovleva S.F., Alekseeva N.I. i dr. Vliyaniye multienzimnoy kompozitsii na protsess brozheniya rzhanogo susla [The influence of a multi-enzyme composition on the fermentation process of rye wort]. *Proizvodstvo spirta i likerovodochnykh izdeliy*, 2013, 3, 26–28.
10. Sotnikov V.A., Marchenko V.V., Gamayurova V.S. Ispolzovaniye polifosfatov tekhnologii nizkotemperaturnogo razvarivaniya krakmalistogo syrya pri proizvodstve spirta [The use of polyphosphates in the technology of low-temperature boiling of starchy raw materials in the production of alcohol]. *Vestnik Kazanskogo tekhnologicheskogo universiteta*, 2003, 2, 180–187.
11. Rimareva L.V., Overchenko M.B., Ignatova N.I., Abramova I.I. Teoreticheskiye i prakticheskiye osnovy fermentativnogo kataliza polimerov zernovogo syrya v spirtovom proizvodstve [Theoretical and practical foundations of enzymatic catalysis of polymers of grain raw materials in alcohol production]. *Proizvodstvo spirta i likerovodochnykh izdeliy*, 2008, 3, 4–9.
12. Polyakov V.A., Serba E.M., Overchenko M.B., Ignatova N.I. The effect of a complex phytase-containing enzyme preparation on the process of rye wort fermentation. *Food and Raw Materials*. 2019, 7/2, 221–228.
13. Khasselbek G., Plokhov A.Yu., Sakharov Yu.V. Primeneniye fermentnykh preparatov firmy «Erbsle Gayzenxaym» v spirtovoy promyshlennosti [The use of enzyme preparations from “Erbsle Geisenheim” in the alcohol industry]. *Proizvodstvo spirta i likerovodochnykh izdeliy*, 2002, 3, 22–23.
14. Chechnev R.V., Andrienko T.V. Novozaymy – podvodya itogi [NovoZymes – summing up]. *Proizvodstvo spirta i likerovodochnykh izdeliy*, 2006, 2, 29–30.
15. Polyakov V.A., Rimareva L.V., Ksandopulo G.B. Perspektivniye biotekhnologicheskiye protsessy dlya spirtovoy promyshlennosti [Promising biotechnological processes for the alcohol industry]. *Proizvodstvo spirta i likerovodochnykh izdeliy*, 2002, 1, 6–8.
16. Gupta R., Rathi P., Bradoo S. Lipase mediated upgradation of dietary fats and oils. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2003, 43/6, 635–644. DOI: 10.1080/10408690390251147
17. Marlot C, Langrand G., Triantaphylides C., Baratti J. Ester synthesis in organic solvent catalyzed by lipases immobilized on hydrophilic supports. *Biotechnology Letters*. 1985, 7/9, 647–650.
18. da Cruz S.H., Cilli E.M., Erandes J.R. Structural complexity of the nitrogen source and influence of yeast growth and fermentation. *J. Inst. Brew.* 2002, 108/1, 54–61. DOI:10.1002/j.2050-0416.2002.tb00124.x
19. Borrelli G.M., Trono D. Recombinant lipases and phospholipases and their use as biocatalysts for industrial applications. *Int J Mol Sci*. 2015, 16/9, 774–840. DOI: 10.3390/ijms160920774
20. Pszczola D.E. Lipases and their industrial applications. *Food Technol*. 2001, 55, 54–64.
21. Viegas C.A., et al. Inhibition of yeast growth by octanoic and decanoic acids produced during ethanolic fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*. 1989, 55/1, 21–28.
22. Anderson M.M., McCarty R.E. Rapid and sensitive assay for free fatty acids using rhodamine 6G. *Anal. Biochem.*, 1972, 45, 260–270.
23. Egorov N.S. *Rukovodstvo k prakticheskim zanyatiyam po mikrobiologii*. [Guide to practical lessons in microbiology]. 3-e izdaniye. Moscow, Moscow University Publishing House, 1995, 129–132.
24. Poligalina G.V. *Tekhnokhimicheskiy kontrol spirtovogo i likerovodochnogo proizvodstva* [Technochemical control of alcohol and liquor production]. Moscow, Kolos Publ., 1999, 85–88.
25. Vostrikov S.V., Malseva O.Yu., Fedorova E.V. Dinamika nakopleniya primesey etilovogo spirta pri sbrajivaniy razlichnix vidov susla [Dynamics of accumulation of ethyl alcohol impurities during the fermentation of various types of wort]. *Izvestiya vuzov. Pishchevaya tekhnologiya*, 1999, 1, 19–21.
26. Liu P., Ivanova-Petropulos V., Duan C., Yan G. Effect of unsaturated fatty acids on intrametabolites and aroma compounds of *Saccharomyces cerevisiae* in wine fermentation. *Foods*, 2021, 10/2, 277. DOI: 10.3390/foods10020277
27. Rimareva L.V., Makeev D.M., Ustinnikov B.A. Vliyaniye proteoliticheskikh fermentov na vykhod spirta [Effect of proteolytic enzymes on alcohol yield]. *Pishchevaya promyshlennost'*, 1993, 2, 29–30.
28. Killian E., Ough C.S. Fermentation esters – formation and retention as affected by fermentation temperature. *American Journal of Enology and Viticulture*, 1979, 30, 301–305.
29. Vostrikov S.V., Yakovlev A.N., Bushin M.A. Vliyaniye sbalansirovannogo sostava zernovogo susla na protsess biosinteza drozhzhevoy biomassy [The influence of a balanced composition of grain wort on the process of biosynthesis of yeast biomass]. *Proizvodstvo spirta i likerovodochnykh izdeliy*, 2006, 2, 32–33.
30. Csutoras Cs., Bakos-Barczi N., Burkus B. Medium chain fatty acids and fatty acid esters as potential markers of alcoholic fermentation of white wines. *Acta Alimentaria*, 2022, 51/1, 33–42.