

УДК 663.12

DETERMINATION OF FERMENTATIVE YEAST ACTIVITY BY ETHANOL AND EXTRACT BY MEANS OF REFRACTOMETRIC METHOD

ВИЗНАЧЕННЯ БРОДИЛЬНОЇ АКТИВНОСТІ ДРІЖДЖІВ ПО СПИРТУ І ЕКСТРАКТУ РЕФРАКТОМЕТРИЧНИМ МЕТОДОМ

V. Ridkous

В. В. Рідкоус

In order to determine fermentative yeast activity by accumulated ethanol and unfermented real extract the efficiency and simplicity of measuring are the urgent tasks. Paper represents trials of determining of ethanol content and real extract by index of light refraction of fermented wort. Fermentation by chosen yeast of model wort – sucrose solution was carried out. In given starting concentration of sugar in wort (during fermentation) relation between content of accumulated ethanol (that is product of fermentation) and real extract (that is remained unfermented) on index of light refraction is identical described analytically. Previously, in given starting concentration of sugar in wort the relations of index of light refraction from content of accumulated ethanol and unfermented real extract (sucrose) in fermented wort have been analytically calculated for each concrete trial by means of refractometric tables for sucrose and ethanol and meanings of alcohol yield. The indexes of light refraction of fermented wort were measured by means of refractometry. Ethanol and real extract content have been determined by previously calculated relations. Determined indexes of ethanol and real extract were compared to the relevant indexes that were determined by standard methods. The possibility of using of analytical calculations and refractometric measuring foe express-method of detecting of ethanol and real extract content in fermented wort during determination of yeast fermentative activity has been proven on the ground of performed research. Average inaccuracies in determination of ethanol content is 0,14 vol. %, and in determination of real extract content is 0,20 mass %.

Актуальною задачею при визначенні бродильної активності дріжджів по накопиченому етиловому спирту і незбродженому дійсному екстракту є оперативність і простота замірів. У статті зроблена спроба визначення вмісту етилового спирту і дійсного екстракту по показнику коефіцієнта заломлення світла зброджуваного суслу. Проведено зброджування вибраними дріжджами модельного суслу – розчину цукрози. При заданій початковій концентрації цукру в суслі (в процесі його зброджування) залежність між вмістом накопиченого етилового спирту (що утворився зі збродженого екстракту) і дійсного екстракту (що залишився незбродженим) від показника коефіцієнта заломлення світла зброджуваного суслу, однозначно описується аналітично. Попередньо, для кожного конкретного випадку, при заданій початковій концентрації цукрози в суслі, по рефрактометричних таблицях для цукрози і етилового спирту, та значеннях виходу етилового спирту з цукрози, аналітично розраховували залежності значення показника коефіцієнта заломлення світла від вмісту накопиченого етилового спирту і незбродженого дійсного екстракту (цукрози) в зброджуваному суслі. Рефрактометричним методом замірялися показники коефіцієнта заломлення світла зброджуваного суслу і по попередньо розрахованих залежностях визначалися в ньому вміст етилового спирту і дійсного екстракту. Визначені показники етилового спирту і дійсного екстракту порівнювалися з відповідними показниками, визначеними стандартними методами. На підставі проведених експериментів доведена можливість використання аналітичних розрахунків і рефрактометричних вимірювань для експрес-методу знаходження вмісту етилового спирту і дійсного екстракту у зброджуваному суслі при визначенні бродильної активності дріжджів. Середні похибки при визначенні вмісту етилового спирту становлять 0,14 % об., а при визначенні вмісту дійсного екстракту дорівнюють 0,20 % мас.

Key words: fermentative yeast activity, ethanol, real extract, index of light refraction, refractometry.

Ключові слова: бродильна активність дріжджів, етиловий спирт, дійсний екстракт, показник коефіцієнта заломлення світла, рефрактометричний метод.

Постановка проблеми. Дріжджі є основною сировиною в технології бродильних, хлібопекарних і кондитерських виробництв. Головним показником якості дріжджів є їх бродильна активність.

Бродильна активність дріжджів – це спроможність одиниці маси дріжджів за одиницю часу при заданій температурі і рН зброджувати певну масу цукрів до етилового спирту і вуглекислого газу. Різні цукри зброджуються з різною швидкістю. Перш за все зброджуються глюкоза і фруктоза. Повільніше зброджуються мальтоза і цукроза, які попередньо за допомогою ферментів дріжджів гідролізуються до простих цукрів. В залежності від цукру, який в лабораторних умовах використовується в зброджуваному суслі, розрізняють зімазну і мальтазну активність дріжджів.

Зімазна активність дріжджів – це швидкість зброджування дріжджами глюкози, чи цукрози.

Мальтазна активність дріжджів – це швидкість зброджування дріжджами мальтози.

Бродильну активність дріжджів визначають такими методами:

- по зменшенню маси проби після бродіння за рахунок втрати вуглекислого газу, що є критерієм сили бродіння;
- по об'єму виділеного вуглекислого газу;
- по кількості накопиченого етилового спирту;
- по кількості незбродженого екстракту (цукру), що залишився.

Широко розповсюджене визначення бродильної активності дріжджів по об'єму виділеного вуглекислого газу здійснюється на різноманітних конструкціях лабораторних установок – *зімографів*. Але всі вони мають головний недолік – визначення відбувається на стадії пристосування дріжджів (лаг-фаза) до середовища бродіння, а результати носять більше порівняльний характер, ніж відображають реальну картину динаміки бродіння. І хоча всі

відомі способи визначення бродильної активності не можуть дати повної і точної уяви про інтенсивність процесу бродіння, який відбувається в виробничих умовах, заміри показників накопиченого етилового спирту і незброженого дійсного екстракту, при зброджуванні заданого суслу в лабораторних умовах, дають більш-менш повну уяву про динаміку бродіння. Але визначення вище наведених показників стандартними методами, для відстежування динаміки бродіння, громіздке, трудомістке і мало придатне навіть в лабораторних умовах.

Для оперативного відстежування динаміки бродіння в лабораторних умовах запропоновано скористатися аналітичним та рефрактометричним методами визначення етилового спирту і дійсного екстракту.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Рефрактометричний аналіз суміші із трьох компонентів ґрунтується на правилі адитивності показників заломлення:

$$n = n_0 + n_1 + n_2 .$$

Коли одним із компонентів суміші є вода (для дистильованої води $n_D^{20} = 1,33299$), то визначивши концентрацію другої з речовин іншим методом, можна рефрактометрично визначити концентрацію третьої речовини.

Але рефрактометричний аналіз потрійних систем, які складаються із розчинника і двох розчинених речовин, можливий і без попереднього кількісного визначення однієї з них. Для вирішення цього завдання з двома невідомими необхідне визначення другого, крім показника заломлення, параметру, що характеризує склад системи. Доволі часто використовується *рефракто-денсиметричний метод*, що полягає у вимірюванні показника заломлення і густини розчину. Сутність цього методу в наступному. Одному показнику заломлення може відповідати нескінченно велика кількість співвідношень двох розчинених речовин. Те ж саме можна сказати і за густину. Але одному показнику заломлення і одній густині (для того ж розчину) відповідає тільки одна концентрація кожного з двох розчинених речовин.

Визначення складу суміші рефракто-денсиметричним методом зазвичай відбувається графічно. Для цього готується велика кількість потрібних сумішей точно відомого складу і вимірюються їх показники заломлення і густини. Потім будується трикутна діаграма з сіткою ізорефракту і ізоденс (лінії однакових показників заломлення і лінії однакової густини). Для визначення складу досліджуваного розчину знаходять точку перетину ізорефракту і ізоденси, що відповідає показнику заломлення і густині суміші. Рефракто-денсиметричний аналіз був запропонований ще в 1843 році для визначення вмісту спирту і екстрактивних речовин у пиві [1, 2].

Головними недоліками даного методу є велика затрата часу та громіздкість на розробку діаграми (підготовчі роботи), невисока точність результатів аналізу, незручність користування діаграмою та необхідність мати порівняно велику кількість аналізованої суміші для точного визначення густини.

Для рефракто-денсиметричного аналізу потрібної системи цукроза – етиловий спирт – вода можна побудувати діаграму в прямокутній системі координат, що підвищує зручність користування діаграмою, але не усуває вище наведених недоліків.

Існує спосіб визначення спирту і екстракту у винах методом двох параметрів [3]. Заміри показника заломлення світла і густини вина дають змогу вирахувати об'ємну долю етилового спирту і масову долю загального екстракту. При розрахунку підставляються значення показника заломлення і густини, взяті по цукровій шкалі.

В основі методу лежить той факт, що етиловий спирт збільшує показник заломлення світла і зменшує густину вина, тому при збільшенні об'ємної долі спирту збільшується різниця між показами рефрактометра і ареометра. Цукри і інші розчинні речовини збільшують і показник заломлення світла, і густину вина, тому при збільшенні їх масової долі збільшується сума показників рефрактометра і ареометра. З цього витікає, що по різниці показань приладів можна визначити об'ємну долю спирту, а по їх сумі – масову долю екстракту.

Недоліком даного методу є необхідність мати порівняно велику кількість аналізованої суміші для точного визначення густини.

Повідомляється про вимірювання в технологічних потоках і стоках в цукрово-етанольній промисловості з використанням оптоволоконного датчика, що функціонує на принципі відбивання Френеля. Калібровку приладу здійснювали бінарними розчинами цукроза-вода і етанол-вода. Потім аналізували побічні продукти різних стадій виробництва. Абсолютна похибка не перевищувала $\leq 5\%$ мас. і $\leq 5\%$ об. відповідно для цукрози і етанолу. Оптиковолоконний датчик забезпечував надійні результати навіть для зразків зі складними композиціями, в порівнянні з чистими розчинами цукрози і етанолу, що дає надію в перспективі для його застосування на деяких стадіях виробництва [4].

Для всіх продуктів бродіння, таких як модельні суміші (для визначення бродильної активності дріжджів по динаміці бродіння), квас, пиво, вино, чи спиртова бражка, попередником є сусло. Сусло складається з води і розчинних сухих речовин, які називаються екстрактом. Менша частина екстракту дріжджами не зброджується, залишаючись в суслі в незмінному вигляді. Більша частина екстракту, що являє собою прості цукри (глюкозу, фруктозу), дисахариди (мальтозу, цукрозу), або трисахарид мальтотріозу, зброджується дріжджами до етилового спирту і вуглекислого газу. Вуглекислий газ виділяється з сусла в атмосферу, а етиловий спирт еквівалентно заміщає в суслі зброжені цукри. Тому, залежність між вмістом накопиченого етилового спирту (що утворився зі зброженого екстракту) і дійсного екстракту (що залишився незброженим), від показника коефіцієнта заломлення світла зброжуваного сусла, однозначно описується аналітично.

Дуже часто в лабораторній практиці є необхідність оперативного відстежування динаміки бродіння, наприклад, для визначення бродильної активності дріжджів, яку можна реалізувати вище наведеним методом.

Мета дослідження. Зроблена спроба визначення вмісту етилового спирту і дійсного екстракту по показнику коефіцієнта заломлення світла

зброджуваного сусла. Цей параметр вимірюється з високою точністю рефрактометричним методом і має малий час вимірювання, що дає можливість проводити експрес-аналізи.

Матеріали і методи. Для досліджень використовували цукор білий по ДСТУ 4623, воду дистильовану по ГОСТ 6709, дріжджі хлібопекарські пресовані по ДСТУ 4812, чи дріжджі сухі інстантні (високоактивні).

Для експериментальної оцінки методу готували сусло з 10 % мас. концентрацією цукрози. До сусла додавали дріжджі в кількості 1,0 % мас. по сухих речовинах (СР). Сусло зброджували періодичним способом при температурі 30 °С. Визначення етилового спирту та дійсного екстракту проводили як по нижче описаній методиці, так і по ДСТУ 7104.

Результати і обговорення. Теоретичний вихід етилового спирту зі 100 кг дисахаридів (цукрози) становить 53,835 кг. При бродінні сусла цукор також витрачається на розмноження і ріст дріжджів (до 1,5 %), утворення гліцерину (2,5÷7 %), ефірів, альдегідів, вищих спиртів і кислот. Всі ці побічні продукти спиртового бродіння при необхідності можливо буде врахувати за допомогою поправочного коефіцієнта, який буде залежати від накопиченого етилового спирту (тривалості бродіння).

Попередньо, для кожного конкретного випадку, при заданій початковій концентрації цукрози в суслі, по рефрактометричних таблицях для цукрози і етилового спирту (методом інтерполяції та розрахункових формул), і виходу етилового спирту з цукрози – 0,53835 кг/кг, в електронних таблицях Excel розраховували аналітично та зображали графічно залежність показника коефіцієнта заломлення світла від вмісту незбродженої цукрози і накопиченого етилового спирту в зброджуваному суслі.

Таблицю 1 заповнювали наступним чином. В стовпчику 1 записували концентрації цукрози (% мас.) з певним кроком від 0 до заданої (в даному випадку 10 % мас.). В стовпчику 2 записували взяті з рефрактометричної таблиці для цукрози відповідні показники коефіцієнтів заломлення світла. В стовпчику 3 вираховували концентрацію етилового спирту (% мас), що

утворився від зброджування цукрози: $(10,0 - \text{«значення стовпчика 1»}) \times 0,53835$. В стовпчику 4 вели перерахунок концентрації етилового спирту (з % мас. у % об.): «значення стовпчика 3» $\times d_4^{20}$ [для даної масової концентрації етилового спирту] : $0,78927$ [відносна густина 100 % етилового спирту]. В стовпчику 5 записували взяті з рефрактометричної таблиці для етилового спирту відповідні показники коефіцієнтів заломлення світла. В стовпчику 6 вираховували загальний показник заломлення світла суміші: («значення стовпчика 2» + «значення стовпчика 5» – $1,332986$). Потім, перезаписували значення стовпчиків 6, 1 і 4 (лівої частини таблиці) у стовпчики 7, 8 і 9 (у правій частині таблиці).

Для проведення досліджень використовували рефрактометр Аббе з похибкою вимірювань $n \pm 0,0002$.

В подальшому, рефрактометром заміряли показник коефіцієнта заломлення світла фільтрату зброджуваного суслу і по стовпчиках 7, 8, і 9 методом інтерполяцій визначали інші показники (табл. 1).

Таблиця 1. Розрахунки параметрів зброджуваного суслу в електронних таблицях Excel

Цукроза		Етанол			Суміш n_D^{20}	Суміш n_D^{20}	Цукроза, % мас.	Етанол, % об.
% мас.	n_D^{20}	% мас.	% об.	n_D^{20}				
1	2	3	4	5	6	7	8	9
0,0	1,332986	5,3835	6,744065	1,336257	1,336257	1,3363	0,00	6,74
1,0	1,334420	4,84515	6,075048	1,335909	1,337343	1,3373	1,00	6,08
2,0	1,335864	4,3068	5,4046	1,335520	1,338398	1,3384	2,00	5,40
3,0	1,337320	3,76845	4,7334	1,335289	1,339623	1,3396	3,00	4,73
4,0	1,338786	3,2301	4,061525	1,334960	1,340760	1,3408	4,00	4,06
5,0	1,340264	2,69175	3,38969	1,334611	1,341889	1,3419	5,00	3,39
6,0	1,341753	2,1534	2,71397	1,334314	1,343081	1,3431	6,00	2,71
7,0	1,343253	1,61505	2,036462	1,334016	1,344283	1,3443	7,00	2,04
8,0	1,344765	1,0767	1,358686	1,333647	1,345426	1,3454	8,00	1,36
9,0	1,346289	0,53835	0,679869	1,333296	1,346599	1,3466	9,00	0,68
10,0	1,347824	0	0	1,332986	1,347824	1,3478	10,00	0,00

Середні похибки при визначенні вмісту етилового спирту становлять 0,14 % об., а при визначенні вмісту дійсного екстракту дорівнюють 0,20 % мас. Ці значення похибок можна одержати на основі формул похибок та результатів експериментальної перевірки рефрактометричного методу.

В табл. 2 представлені результати дослідження зброджуваного суслу рефрактометричним методом і стандартними методами визначення вмісту етилового спирту і дійсного екстракту [5].

Таблиця 2. Вміст дійсного екстракту і етилового спирту при зброджуванні чисто цукрозовмісного сусла з початковою концентрацією 10 % мас.

Тривалість бродіння, год	Етиловий спирт, % об.		Дійсний екстракт, % мас.	
	Рефрактометричним методом	Дистиляційним методом	Рефрактометричним методом	Гравіметричним методом
1	0,3	–	9,5	–
2	0,8	–	8,8	–
3	1,3	–	8,1	–
4	2,0	1,98	7,1	7,09
5	2,5	–	6,3	–
6	3,1	–	5,4	–
7	3,7	–	4,4	–
8	4,3	4,34	3,7	3,65
9	4,8	–	2,9	–
10	5,1	–	2,4	–
11	5,4	–	2,0	–
12	5,6	5,65	1,7	1,64

Висновки

На підставі проведених експериментів доведена можливість використання аналітичних розрахунків і рефрактометричних вимірювань для експрес-методу знаходження вмісту етилового спирту і дійсного екстракту у зброджуваному суслі при визначенні бродильної активності дріжджів. Результати, одержані рефрактометричним методом, в межах точності досліду узгоджуються із результатами, одержаними стандартними методами. Малий час вимірювань, доступна апаратура і не складна методика вимірювань дають можливість широко використовувати метод в лабораторній практиці.

Література

1. Фармацевтическая химия. 1. Теоретический материал по темам. / Под ред. акад. РАМН, проф. А. П. Арзамасцева. Москва, 2004. 662 с. URL: http://pharmchem.nuph.edu.ua/assets/templates/farm/files/%D0%A3%D1%87%D0%B5%D0%B1%D0%BD%D1%8B%D0%B5%20%D0%BC%D0%B0%D1%82%D0%B5%D1%80%D0%B8%D0%B0%D0%BB%D1%8B/farmkhimia_kniga.pdf (дата звернення: 22.01.2018)
2. *Илларионова, Е. А., Сыроватский, И. П.* Метод рефрактометрии. Применение в фармацевтическом анализе : учебное пособие / Е. А. Илларионова, И. П. Сыроватский ; ФГБОУ ВО ИГМУ Минздрава России, Кафедра фармацевтической и токсикологической химии. Иркутск : ИГМУ, 2017. 51 с. URL: <http://docplayer.ru/59480339-Metod-refraktometrii-primenenie-v-farmaceuticheskom-analize.html> (дата звернення: 22.01.2018)
3. Визначення спирту і екстракту у винах методом двох параметрів / І. І. Побережець, В. І. Побережець, І. І. Побережець // Збірник наукових праць Уманського національного університету садівництва. 2014. Вип. 86(1). С. 122-128. URL: <http://www.journal.udau.edu.ua/assets/files/86/agro/ukr/20.pdf> (дата звернення: 22.01.2018)
4. Measurement of sucrose and ethanol concentrations in process streams and effluents of sugarcane bioethanol industry by optical fiber sensor / Eric Fujiwara, Eduardo Оно, Tarcio P. Manfrim, Juliana S. Santos, Carlos K. Suzuki. URL: <https://www.spiedigitallibrary.org/conference-proceedings-of-spie/7753/1/Measurement-of-sucrose-and-ethanol-concentrations-in-process-streams-and/10.1117/12.885096.short?SSO=1#ArticleLink> (дата звернення: 22.01.2018)
5. ДСТУ 7104:2009 Пиво. Методи визначання спирту, дійсного екстракту та розраховування сухих речовин у початковому суслі. URL: http://document.ua/pivo_-metodi-viznachannja-spirtu-diisnogo-ekstraktu-ta-rozra-std3594.html (дата звернення: 22.01.2018)

РІДКОУС Володимир Васильович

доцент кафедри готельно-ресторанної справи

Національного університет харчових технологій,

кандидат технічних наук

Моб.: +380506166198, +380983078182

E-mail: Ridkous@ukr.net

Дата надходження статті до редакції 12.03.2018