

<https://doi.org/10.15407/frg2019.04.347>

УДК 575.113.2:577.112.82

## ЛАБОРАТОРНИЙ МЕТОД ОЦІНЮВАННЯ ФЕРМЕНТАБІЛЬНОСТІ ЗЕРНА ДЛЯ СЕЛЕКЦІЇ ЗЕРНОВИХ КУЛЬТУР СПИРТО-ДИСТИЛЯТНОГО НАПРЯМУ ВИКОРИСТАННЯ

О.І. РИБАЛКА<sup>1,2</sup>, М.В. ЧЕРВОНІС<sup>1</sup>, С.С. ПОЛІЩУК<sup>1</sup>, І.О. СУРЖЕНКО<sup>1</sup>,  
Б.В. МОРГУН<sup>2,3</sup>, О.В. ДУБРОВНА<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Селекційно-генетичний інститут—Національний центр насіннезнавства та сортовивчення Національної академії аграрних наук України

65036 Одеса, Овідіопольська дорога, 3

<sup>2</sup>Інститут фізіології рослин і генетики Національної академії наук України

03022 Київ, вул. Васильківська, 31/17

<sup>3</sup>Інститут клітинної біології та генетичної інженерії Національної академії наук України

03680 Київ, вул. Академіка Заболотного, 148

e-mail: molgen@icbge.org.ua

Селекція сортів зернових крохмаловмісних культур спирто-дистилятного напрямку використання для виробництва питного етанолу й технічного біоетанолу неможлива без лабораторного оцінювання ферментабельності зерна селекційних ліній, визначення виходу етанолу та побічних продуктів ферментації. Для оцінювання ферментабельності зерна селекційного матеріалу пропонуємо розроблену й апробовану нами лабораторну процедуру. При розробці лабораторного методу ферментації зразків зерна за основу було взято галузевий стандарт ГСТУ 46.045-2003, змінений і доповнений численними власними модифікаціями. Розроблений лабораторний метод оцінювання ферментабельності включає етапи підготовки проб для аналізу, помел зерна, визначення його вологості та вихідних параметрів, таких як вміст у зерні крохмалю й білка. В окремих випадках визначають якість крохмалю, а саме, співвідношення амілоза/амілопектин і консистенцію ендосперму (твердість зерна). Власне сама лабораторна процедура включає фази желатинізації крохмалю, ферментативного розрідження водної суспензії борошна, ферментативного оцукрення крохмалю, дріжджового зброджування, дистиляції етанолу, визначення виходу етанолу й побічних продуктів ферментативного гідролізу зерна. Наведено приклади визначення ферментабельності зерна селекційних ліній пшениці з крохмалем типу ваксі та екстрам'якозерної пшениці. Метод пропонується для застосування у селекційних програмах створення сортів і гібридів зернових культур спирто-дистилятного напрямку використання.

**Ключові слова:** сорти злаків, селекція, крохмаль, ферментабельність, дистиляція, харчовий етанол, біоетанол, амілаза, глюкоамілаза.

За прогнозами CIA World Fact Book, глобальні запаси викопних енергетичних ресурсів Землі наближаються до критичної межі. При нинішніх темпах видобутку світові запаси нафти вичерпаються до 2052 р., ресурси газу добігають кінця до 2060 р., а вугілля для населення Землі вже не стане до 2088 р. [1]. Енергетичною альтернативою нафті сьогодні є два основні види відновлюваного палива — біодизель і біоетанол.

Біодизель — це суміш метилових (етилових) ефірів жирних кислот, виробляється переетерифікацією різних видів олій і тваринних жирів. Біоетанол — це звичайнісінький етиловий спирт, який виробляється із зернових культур, цукрового буряку, цукрової тростини чи деревини.

Незважаючи на гучний гамір довкола біодизеля, його широкомасштабне індустріальне виробництво в нашій державі на сьогодні так і не налагоджено. Повномасштабне індустріальне виробництво біодизеля, як і біоетанолу, потребує перш за все стабільної сировинної бази. В Україні основні продуценти олії, такі як соняшник та озимий ріпак, з відомих причин, на жаль, не можна розглядати як джерела стабільної сировинної бази для виробництва біодизеля [2].

Водночас зернове виробництво в Україні є досить стабільним, із реальною перспективою нарощування і становить стабільну сировинну базу для виробництва біоетанолу. Крім того, в Україні постійною є потреба переробної промисловості в якісному харчовому етанолі із зернових культур, яка також виражається у значних обсягах зернового збіжжя для переробки на етанол.

На жаль, сьогодні як сировину для виробництва етанолу на спиртових заводах України використовують найдешевше фуражне зерно пшениці, тритикале, кукурудзи. Промисловий вихід етанолу з такого зернового збіжжя істотно нижчий, ніж із зерна сортів зернових культур, створених спеціально для спирто-дистилятного напрямку використання [3, 4].

Світова практика свідчить, що сорти зернових культур значно відрізняються між собою за ефективністю переробки збіжжя на етанол: один сорт дає з 1 т зерна 320—350 л чистого етанолу, тоді як інший — 380—420. Помноживши цю різницю на сотню тисяч тонн переробленого збіжжя, отримуємо цифру, що змусить поміркувати над ефективністю переробки зерна на етиловий спирт, яка насамперед істотно залежить від сорту зернової культури. Тому не випадково в провідних селекційних центрах розвинених країн ведеться селекція сортів (гібридів) зернових культур, призначених спеціально для виробництва біоетанолу та харчового етилового спирту [5].

Створення сортів зернових культур спирто-дистилятного напрямку технологічного використання зерна потребує:

а) спеціалізованих селекційних програм (добір пар для схрещування, робота з популяціями, випробування елітних ліній) створення сортів спирто-дистилятного напрямку використання зерна, спеціального генетичного матеріалу, що характеризується певними особливостями біохімічної структури крохмалю як основи для ефективної ферментативної конверсії крохмалю зерна в етанол;

б) використання спеціальних лабораторних процедур для характеристики структури крохмалю та визначення виходу етанолу з одиниці зернового збіжжя як методів оцінювання ферментабельності зерна селекційних ліній у процесі селекції.

Наша робота присвячена саме розробці ефективного методу оцінювання селекційного матеріалу зернових культур за ознакою ферментабельності.

### Методика

При розробці лабораторного методу ферментації зразків зерна за основу було взято галузевий стандарт ГСТУ 46.045-2003, змінений і доповнений численними власними модифікаціями.

Процедуру ферментації та дистиляції виконували з використанням сконструйованого й виготовленого в нашій лабораторії реакторо-ферментатора і стандартної спирто-дистиляційної установки.

ТАБЛИЦЯ 1. Дані для визначення вмісту абсолютного етанолу залежно від густини його розчину (Control Union tables\*, 2002)

wt%	Temperature (degC)				wt%	Temperature (degC)			
Ethanol	20	25	30	35	Ethanol	20	25	30	35
0	0.99823	0.99708	0.99568	0.99406	50	0.91384	0.90985	0.90580	0.90168
1	0.99636	0.9952	0.99379	0.99217	51	0.91160	0.90760	0.90353	0.89940
2	0.99453	0.99336	0.99194	0.99031	52	0.90936	0.90534	0.90125	0.89710
3	0.99275	0.99157	0.99014	0.98849	53	0.90711	0.90307	0.89896	0.89479
4	0.99103	0.98984	0.98839	0.98672	54	0.90485	0.90079	0.89667	0.89248
5	0.98938	0.98817	0.98679	0.98501	55	0.90258	0.89850	0.89437	0.89016
6	0.9878	0.98656	0.98507	0.98335	56	0.90031	0.89621	0.89206	0.88784
7	0.98627	0.98500	0.98347	0.98172	57	0.89803	0.89392	0.88975	0.88552
8	0.98478	0.98346	0.98189	0.98009	58	0.89574	0.89162	0.88744	0.88319
9	0.98331	0.98193	0.98031	0.97846	59	0.89344	0.88931	0.88512	0.88085
10	0.98187	0.98043	0.97875	0.97685	60	0.89113	0.88699	0.88278	0.87851
11	0.98047	0.97897	0.97723	0.97527	61	0.88882	0.88446	0.88044	0.87615
12	0.97910	0.97753	0.97573	0.97371	62	0.88650	0.88233	0.87809	0.87379
13	0.97775	0.97661	0.97424	0.97216	63	0.88417	0.87998	0.87574	0.87142
14	0.97643	0.97472	0.97278	0.97063	64	0.88183	0.87763	0.87337	0.86905
15	0.97514	0.97334	0.97133	0.96911	65	0.87948	0.87527	0.87100	0.86667
16	0.97387	0.97199	0.96990	0.9676	66	0.87713	0.87291	0.86863	0.86429
17	0.97259	0.97062	0.96844	0.96607	67	0.87477	0.87054	0.86625	0.86190
18	0.97129	0.96923	0.96697	0.96452	68	0.87241	0.86817	0.86387	0.85950
19	0.96997	0.96782	0.96547	0.96294	69	0.87004	0.86579	0.86148	0.85710
20	0.96864	0.96639	0.96395	0.96134	70	0.86766	0.86340	0.85908	0.85470
21	0.96729	0.96495	0.96242	0.96973	71	0.86527	0.86100	0.85667	0.85228
22	0.96592	0.96348	0.96087	0.95809	72	0.86287	0.85859	0.85426	0.84986
23	0.96453	0.96199	0.95929	0.95643	73	0.86047	0.85618	0.85184	0.84743
24	0.96312	0.96048	0.95769	0.95476	74	0.85806	0.85376	0.84941	0.84500
25	0.96168	0.95895	0.95607	0.95306	75	0.85564	0.85134	0.84698	0.84257
26	0.96020	0.95738	0.95442	0.95133	76	0.85322	0.84891	0.84455	0.84013
27	0.95867	0.95576	0.95272	0.94995	77	0.85079	0.84647	0.84211	0.83768
28	0.95710	0.95410	0.95098	0.95774	78	0.84835	0.84403	0.83966	0.83523
29	0.95548	0.95241	0.94922	0.94590	79	0.84590	0.84158	0.83720	0.83277
38	0.95382	0.95067	0.94741	0.94403	80	0.84344	0.83911	0.83473	0.83029
31	0.95212	0.94890	0.94557	0.94214	81	0.84096	0.83664	0.83224	0.82780
32	0.95038	0.94709	0.94370	0.94021	82	0.83848	0.83415	0.82974	0.82530

Закінчення табл. 1

33	0.94860	0.94525	0.94180	0.93825	83	0.83599	0.83164	0.82724	0.82279
34	0.94679	0.94337	0.93986	0.93626	84	0.83348	0.82913	0.82473	0.82027
35	0.94494	0.94146	0.93790	0.93425	85	0.83095	0.82660	0.82220	0.81774
36	0.94306	0.93952	0.93591	0.93221	86	0.82840	0.82405	0.81965	0.81519
37	0.94114	0.93756	0.93390	0.93016	87	0.82583	0.82148	0.81708	0.81262
38	0.93919	0.93556	0.93186	0.92808	88	0.82323	0.81888	0.81448	0.81003
39	0.93720	0.93353	0.92979	0.92597	89	0.82062	0.81626	0.81186	0.80742
48	0.93518	0.93148	0.92770	0.92385	90	0.81797	0.81362	0.80922	0.80478
41	0.93314	0.92940	0.92558	0.92170	91	0.81529	0.81094	0.80655	0.80211
42	0.93107	0.92729	0.92344	0.91952	92	0.81257	0.80823	0.80384	0.79941
43	0.92897	0.92516	0.92128	0.91733	93	0.80983	0.80549	0.80111	0.79669
44	0.92685	0.92301	0.91910	0.91513	94	0.80705	0.80272	0.79835	0.79393
45	0.92472	0.92085	0.91692	0.91291	95	0.80424	0.79991	0.79555	0.79114
46	0.92257	0.91868	0.91472	0.91069	96	0.80138	0.79706	0.79271	0.78831
47	0.92041	0.91649	0.91250	0.90845	97	0.79846	0.79415	0.78991	0.78542
48	0.91823	0.91426	0.91028	0.90621	98	0.79547	0.79117	0.78684	0.78247
49	0.91604	0.91208	0.90805	0.90396	99	0.79543	0.78814	0.78382	0.77946
					100	0.78934	0.78506	0.78075	0.77641

\*Ця таблиця для розрахунку концентрації етанолу використовується в лабораторній практиці компанії Peterson Control Union Group BV.

Концентрацію етанолу визначали за допомогою високоточних пікнометрів і спеціальної розрахункової таблиці (табл. 1).

*Сфера застосування методу.* Цей лабораторний метод пропонуємо застосовувати в селекційних програмах при створенні сортів і гібридів зернових культур спирто-дистилятного напряму використання. Він поширюється на всі види зерна, які підлягають переробці в спиртовій промисловості, виробництві харчового етанолу й біоетанолу, встановлює правила і порядок визначення виходу етанолу з масової одиниці зернового збіжжя та одиниці крохмалю, виходу діоксиду вуглецю, сухого забродженого залишку, коефіцієнта ферментабільності крохмалю.

*Суть методу.* Вихід етанолу з одиниці збіжжя визначали біологічним методом (метод бродильної проби). Крохмаль гідролізували до глюкози у дві фази:

1) фаза зрідження амілолітичним гідролізом нерозчинного крохмалю до розчинних декстринів під дією ферменту термостабільної альфа-амілази (КФ 3.2.1.1), джерело *Aspergillus oryzae*, виробник Sigma-Aldrich;

2) фаза оцукрювання проби зерна гідролізом декстринів до глюкози під дією ферменту глюкоамілази (амілоглюкозидази, КФ 3.2.1.3), джерело *Aspergillus niger*, виробник Sigma-Aldrich.

Глюкозу ферментували до етанолу за допомогою суспензії звичайних пресованих термофільних хлібопекарських дріжджів.

Концентрацію етилового спирту визначали пікнометричним методом. Вихід етанолу з одиниці крохмалю, вихід діоксиду вуглецю і сухого забродженого залишку визначали шляхом розрахунків.

Коефіцієнт ферментабільності крохмалю встановлювали за часткою не конвертованого в етанол крохмалю у сухому забродженому

залишку за відношенням до вмісту крохмалю у вихідній пробі, взятій для аналізу.

*Реактиви, обладнання, матеріали*

1. Ваги лабораторні загального призначення з можливістю зважування 100, 500 і 1000 г із допустимою похибкою  $\pm 0,01$  г.

2. Термометри скляні з діапазоном вимірювань від 0 до 100 °С з ціною поділки 0,1 та 1,0 °С.

3. Колби скляні КН-750, колби круглодонні з двома горловинами під кутом зі шліфами, колби круглодонні місткістю 1000 мл зі шліфом.

4. Млин лабораторний будь-якого типу, що забезпечує високий ступінь подрібнення проби зерна (стан борошна).

5. Мірні циліндри, піпетки, дозатори необхідного об'єму.

6. Реактор-ферментатор — штатив зі скляними контейнерами чи колбами, поліхлорвінілові трубки для відведення CO<sub>2</sub> у процесі дріжджової ферментації сусла, затвор з водою (рис. 1).

7. Водяна баня, розміри якої дають змогу занурити реактор-ферментатор і яка підтримує два температурні режими — 50—55 і 90—95 °С (ліпше дві водяні бані з відповідними температурними режимами).

8. Дріжджі пресовані хлібопекарські термофільні стандартної активності.

9. Ферментні препарати: джерело  $\alpha$ -амілази (*Aspergillus oryzae*, виробник Sigma-Aldrich) і глюкоамілази (*Aspergillus niger*, виробник Sigma-Aldrich).

10. Термостат для бродіння й дозрівання браги місткістю, достатньою щонайменше для одного реактора-ферментатора.

11. Дистиляційний апарат для відгонки етанолу з дозрілої браги (рис. 2).

12. Високоточний пікнометр із відомим об'ємом і термометром (рекомендований тип — пікнометр Жолмса (Jaulmes)) (рис. 3).

*Відбір проб.* Проби зернових культур відбирали за ГОСТ 13586.3.

*Взяття наважок для аналізу.* Із середньої проби зерна, взятої за ГОСТ 13586.3, виділяли по дві паралельні наважки зерна масами по 200 г, видаляли сміттєву домішку, згідно з ГОСТ 30483, та домішки,

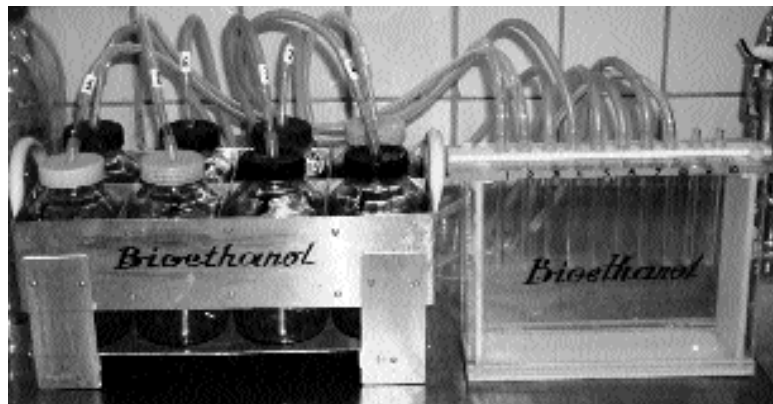


Рис. 1. Реактор-ферментатор власної конструкції авторів на вісім проб для дріжджової ферментації



Рис. 2. Лабораторна дистиляційна установка



Рис. 3. Високо-точний пікнометр Jaulmes на 50 мл

які не містили крохмалю. Для визначення вмісту вологи брали наважку зерна масою 50 г, для визначення вмісту крохмалю — теж 50 г, для ферментації й визначення виходу етанолу, сухого забродженого залишку, продуктів бродіння — наважку зерна масою 120 г.

*Визначення вологості зерна.* Вологість зерна визначали в наважці без вилучення з неї домішок, які не містили крохмалю. Вологість усіх видів зерна крім кукурудзи визначали за ГОСТ 13586.5, вологість кукурудзи — за ГОСТ 29305—92.

*Визначення вмісту крохмалю в зерні.* Вміст крохмалю в зерні визначали за ГОСТ 10845.

*Підготовка проби до аналізу.* Зерно, звільнене від сміттєвої домішки й домішок, які не містили крохмалю, розмелювали на лабораторному млині так, щоб при просіюванні весь отриманий помел пройшов крізь сито з діаметром отворів 1—1,2 мм. Зерно, вологість якого перевищувала 16 %, перед помелом висушували на повітрі або з використанням лабораторного сушильного обладнання (термостат, сушильна шафа), але за температури, не вищої за 50 °С, до остаточної вологості 14 %.

Розмелене зерно (помел) розміщували на рівній гладенькій поверхні і двома плоскими совками перемішували й розрівнювали тонким шаром завтовшки не більш як 5 мм. Відбирали совком не менш як із 10 різних місць шару помелу дві паралельні наважки масами по  $5,0 \pm 0,1$  г для визначення вологості зерна та дві паралельні наважки масами  $5,0 \pm 0,1$  г для визначення вмісту крохмалю в зерні. Для визначення виходу абсолютного етанолу відбирали дві паралельні наважки масами по  $100 \pm 0,1$  г. Активність ферментних препаратів визначали за ГОСТ 20264.4.

**Проведення аналізу.**

1. У сухий скляний посуд (8 банок у блок-штативі: 7 проб + 1 стандарт) місткістю по 1000 мл вміщували по 100 г розмеленого зерна.

2. Доливали по 300 мл охолодженої до 50 °С кип'яченої проточної води, ретельно перемішували помел із водою скляним шпателем до утворення однорідної маси.

3. Блок-штатив із банками вміщували у водяну баню за температури 50—55 °С, від моменту, коли температура водно-борошняної суспензії в банках досягала цього значення, їх витримували упродовж 20 хв.

4. У кожному банку для розрідження крохмалю додавали розчин ферментного препарату альфа-амілазної дії з розрахунку приблизно 2 одиниці активності на 1 г крохмалю, який містила наважка.

5. Далі температуру водяної бані підвищували так, щоб температура реакційної суміші досягла 70—95 °С (залежно від виду зерна) і за ретельного й постійного перемішування витримували при відповідній постійній температурі протягом 3 год.

6. Після проведення процесу розрідження крохмалю зерна реакційну суміш охолоджували до температури 58—60 °С, у кожному банку вносили необхідну кількість оцукрувального ферментного препарату з розрахунку 6 одиниць активності на 1 г крохмалю. Вміст кожної банки ретельно перемішували з розчином ферментного препарату і витримували за температури 56—58 °С протягом 1 год.

7. Отримане оцукрене сушло охолоджували до температури 30 °С і додавали в кожному банку по 10 мл дріжджової суспензії, в якій було розчинено 3 г дріжджів (брикети). Кожну банку з реакційною сумішшю зважували з точністю до  $\pm 0,01$  г.

8. Банки з реакційною сумішшю вміщували у термостат при температурі  $30 \pm 2$  °С і витримували під водяним затвором упродовж 72 год для проходження процесу анаеробного спиртового зброджування. Маса банок з реакційною сумішшю за час бродіння зменшувалась унаслідок емісії діоксиду вуглецю. Припинення виділення бульбашок газу у водяному затворі свідчило про закінчення процесу зброджування.

9. Банки виймали з термостата, зважували з точністю до  $\pm 0,01$  г, дозрілу брагу переливали у перегінну колбу дистиляційного апарата, залишок сушла змивали дистильованою водою об'ємом 125 мл і також зливали у перегінну колбу.

10. Дистиляцію етанолу проводили за температури 78,3 °С. Дистилят етанолу збирали в приймальну мірну колбу місткістю 200 мл до заповнення її на 85—95 % об'єму.

11. Отриманий об'єм дистиляту етанолу доводили дистильованою водою до 200 мл, за допомогою пікнометрів вимірювали густину етанолу (перерахунок на 20 °С) і за табл. 1 визначали концентрацію етанолу.

12. Залишок браги після перегонки зливали у центрифужний стакан, споліскували посуд мінімальною кількістю проточної води, яку також зливали у цей стакан, і центрифугували протягом 10—15 хв при 1500 об/хв.

13. Надосадову рідину зливали, отриманий заброджений залишок висушували до сталої маси і зважували.

### *Аналіз продуктів бродіння*

*Визначення кількості виділеного діоксиду вуглецю.* Після завершення бродіння банки з дозрілою брагою зважували й обчислювали масу виділеного діоксиду вуглецю ( $m \text{CO}_2$ ) за формулою

$$m \text{CO}_2 = m P_1 - m P_2,$$

де  $m P_1$  — маса резервуара з брагою до бродіння, г;  $m P_2$  — маса резервуара з брагою після бродіння, г.

*Визначення концентрації етанолу.* Густина отриманого водно-спиртового розчину визначали за допомогою пікнометра Jaulmes на 50 мл згідно зі стандартом ISO 6883, концентрацію етанолу розраховували за даними табл. 1.

*Визначення виходу сухого забродженого залишку (DDGS).* Відцентрифугований заброджений залишок висушували за температури 103 °С до сталої маси. Сухий заброджений залишок зважували й визначали його вихід у відсотках до маси взятої для випробування наважки зерна. Вміст білка в сухому забродженому залишку і в зерні визначали за методом К'ельдаля згідно з ISO 20483:2013.

*Визначення коефіцієнта ферментабельності крохмалю.* Коефіцієнт ферментабельності у відсотках обчислювали за формулою

$$\text{КФ} = (\text{ВК}_1 - \text{ВК}_2) \cdot 100 / \text{ВК}_1,$$

де  $\text{ВК}_1$  — вміст крохмалю у вихідній наважці зерна, г;  $\text{ВК}_2$  — вміст крохмалю в сухому забродженому залишку, г.

Вміст крохмалю в сухому забродженому залишку визначали за ГОСТ 10845.

*Визначення емісії умовного діоксиду вуглецю після бродіння.* Емісію діоксиду вуглецю ( $V_{\text{CO}_2}$ ) (в літрах) розраховували за формулою

$$V_{\text{CO}_2} = (M_1 - M_2) / 44 \cdot 22,4,$$

де  $M_1$  — маса реакційної суміші до бродіння, г;  $M_2$  — маса реакційної суміші після бродіння, г; 22,4 л — об'єм, що його займає 1 г-моль  $\text{CO}_2$  за нормальних умов — 1 г-моль  $\text{CO}_2 = 12 + 32 = 44 \text{ г} \rightarrow 22,4 \text{ л}$ .

Розрахована кількість емісії  $\text{CO}_2$  є умовною, оскільки в ній не враховано вологість  $\text{CO}_2$ , який у процесі дріжджового бродіння виділяється разом з певною кількістю водяної пари. За потреби визначення точної кількості емісії  $\text{CO}_2$  необхідно внести поправку на його вологість.

За даними літератури, ефективність запропонованого нами методу оцінювання ферментабельності зерна злаків можна поліпшити використанням на стадії оцукрення ферменту пулюланизи (pullulanase, КФ 3.2.1.41) у комбінації з глюкоамілазою. Пулюланиза ефективна саме як гідролаза 1,6-глюкозидних зв'язків, що ініціюють молекулярні бічні відгалуження полімерних ланцюгів амілопектину в крохмалі, і сприяє вищій ефективності трансформації мальтодекстринів до кінцевого продукту — глюкози [6].

Для демонстрації результатів використання запропонованого методу оцінювання ферментабельності в табл. 2 наведено параметри ферментації зразків зерна селекційних ліній озимої пшениці з крохмалем ваксі та озимої екстрам'якозерної пшениці сорту Оксана порівняно зі стандартом — сортом озимої пшениці Куяльник. Пшениця з крохмалем ваксі й пшениця з екстрам'яким ендоспермом (extra-soft), за



ТАБЛИЦА 2. Параметры ферментативного гидролиза зерна селекционных линий озимой пшеницы вакси

№ з/п	Сорт, линия	Вміст вологи, %	ЧП*, с	Твердість зерна, Infamatic 8611	Емісія CO <sub>2</sub>		Вміст крохмалю, %		Вміст білка, %		Вихід етанолу, л	
					г	л	до ферментації	після ферментації	до ферментації	після ферментації	з 1 т зерна	з 1 т крохмало
Стандарт	Оксана	12,4	408	-51	33,0	16,80	70,7	3,0	11,0	33,0	441,8	547,4
Стандарт	Кузальник	11,5	449	30	31,0	15,80	69,5	4,6	12,5	36,3	438,2	540,7
1	8419	11,2	68	10	31,5	16,04	67,0	2,4	13,3	37,5	429,5	569,3
2	8421	10,2	70	1	33,0	16,80	66,5	2,8	12,3	36,6	443,4	598,8
3	8423	11,8	104	-31	32,0	16,29	68,0	2,8	10,7	32,3	459,9	596,5
4	8426	11,3	102	-43	32,5	16,55	67,1	2,8	12,1	36,2	442,6	585,1
5	8428	11,5	71	4	32,5	16,55	67,7	1,9	14,0	39,0	431,0	563,4
6	8429	11,3	92	-5	32,0	16,29	68,6	2,4	13,5	38,9	434,3	561,5
7	8431	11,1	83	-16	32,5	16,55	68,0	2,7	13,6	38,2	440,9	576,5
8	8433	10,3	85	-15	33,5	17,05	67,4	2,5	12,8	38,2	439,7	585,2
9	8436	12,2	67	-38	33,5	17,05	69,2	3,0	12,3	35,0	440,8	559,2
Середнє			145,4				68,2	2,8				571,2
t факт			74,14**				6,09**	12,86**				7,32**
							t табл 05 – 2,26					
							t табл 01 – 3,25					

ЧП\* — число падіння, с.

результатами наших спостережень та інших авторів, є перспективним вихідним матеріалом для створення сортів пшениці спирто-дистилятного напрямку використання. Перша характеризується істотно зміщеним співвідношенням амілоза/амілопектин у бік майже 100 % вмісту амілопектину, який ферментується значно ефективніше, ніж амілоза [7, 8]. Друга має перевагу за спирто-дистилятними характеристиками над твердозерними пшеницями у зв'язку зі специфічними структурою і біохімічними властивостями крохмальних гранул, їх більшою загальною активною поверхнею й нижчим вмістом білка в зерні [9].

З наведених у табл. 2 даних привертає увагу перш за все висока ферментабельність крохмалю ліній пшениці з крохмалем ваксі. Всі досліджені селекційні лінії ваксі давали достовірно вищий вихід абсолютного етанолу з 1 т крохмалю порівняно із сортом Куяльник зі звичайним типом крохмалю. За цією характеристикою сорт екстрим'якозерної пшениці Оксана також переважає сорт Куяльник. За виходом етанолу з 1 т зерна не всі лінії ваксі переважали сорт Куяльник, оскільки не всі вони мали достатньо високий вміст крохмалю у зв'язку з підвищеним вмістом у зерні білка, крім того, вони потребують селекційного поліпшення за зерновою продуктивністю та виводом зерна. Однак, згідно з даними табл. 2, за ефективністю конверсії крохмалю в етанол лінії пшениці ваксі безумовно є перспективним селекційним матеріалом для створення сортів спирто-дистилятного напрямку використання.

Отже, в результаті виконаної роботи розроблено оригінальний лабораторний метод визначення ферментабельності зразків зернових культур, який дає можливість оцінити вихід абсолютного етанолу з одиниці маси зернового збіжжя після завершення ферментації та дистиляції, визначити вихід етанолу на одиницю маси крохмалю, вихід сухого забродженого залишку та коефіцієнт ферментабельності. Цей метод широко й успішно ми апробували на різноманітному селекційному матеріалі, зокрема на сортах і лініях пшениці, тритикале, проса, кукурудзи, ячменю. Пропонуємо застосовувати його в селекційних програмах для оцінювання селекційного матеріалу за ознакою ферментабельності при створенні сортів зернових культур спирто-дистилятного напрямку використання.

Робота виконана за рахунок коштів бюджетної програми «Підтримка розвитку пріоритетних напрямів наукових досліджень» (КПКВК 65411230).

#### REFERENCES

1. Central Intelligence Agency. (2018). The Fact Book. Energy. Fossil fuel reserve and consumption data.
2. Samoyienko, A.G. (2008). Prospects for the production of biodiesel in Ukraine. *Ekonomika APK*, 4, pp.72-77 [in Ukrainian].
3. Prishlyak, V.M. & Prishlyak, N.V. (2013). Technical-economic and economic aspects of bioethanol production in Ukraine. *Nauk. pratsi Inst. bioenerhetychnykh kultur i tsukr. buryakiv*, 19, pp. 219-226 [in Ukrainian].
4. Polygalina, V.G. (1999). *Technochemical control of alcohol and distillery production*. Moscow: Kolos, 334 [in Russian].

5. Au, F., McKeown, L., McAllister, T. & Chavesa, A. (2010). Fermentation characteristics of corn-, triticale-, and wheat-based dried distillers' grains with solubles in barley-based diets determined using continuous and batch culture systems. *J. Sci. Food Agric.*, 90, pp. 2074-2082.
6. Malakar, R., Tiwari, A. & Malviya, S. (2010). Pullulanase: a potential enzyme for industrial application. *Int. J. Biomed. Res.*, 1, No. 2, pp. 10-20.
7. Gago, F., Horvathova, V., Ondas, V. & Sturdik, E. (2014). Assessment of waxy and non-waxy corn and wheat cultivars as starch substrates for ethanol fermentation. *Chemical Papers*, 68 (3), pp. 300-307. <https://doi.org/10.2478/s11696-013-0454-1>
8. Zhao, R., Wu, X., Seabourn, B., Bean, S., Guan, L., Shi, Y.-C., Wilson, J., Madl, R. & Wang, D. (2009). Comparison of waxy vs. nonwaxy wheats in fuel ethanol fermentation. *Cereal Chem.*, 86, No. 2, pp. 145-156.
9. Agu, R., Swanston, J., Walker, J., Pearson, S., Bringham, T., Brosnan, J. & Jack, F. (2009). Predicting alcohol yield from UK soft winter wheat for grain distilling: combined influence of hardness and nitrogen measurements. *Publ. Inst. Brew. Dist.*, 115, No. 3, pp. 183-190.

Received 08.04.2019

ЛАБОРАТОРНЫЙ МЕТОД ОЦЕНКИ ФЕРМЕНТАБИЛЬНОСТИ ЗЕРНА ДЛЯ СЕЛЕКЦИИ ЗЕРНОВЫХ КУЛЬТУР СПИРТО-ДИСТИЛЛЯТНОГО НАПРАВЛЕНИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

*А.И. Рыбалка<sup>1,2</sup>, М.В. Червонис<sup>1</sup>, С.С. Полищук<sup>1</sup>, И.А. Сурженко<sup>1</sup>, Б.В. Моргун<sup>2,3</sup>, О.В. Дубровная<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Селекционно-генетический институт—Национальный центр семеноведения и сортоизучения Национальной академии аграрных наук Украины, Одесса

<sup>2</sup>Институт физиологии растений и генетики Национальной академии наук Украины, Киев

<sup>3</sup>Институт клеточной биологии и генетической инженерии Национальной академии наук Украины, Киев

Селекция сортов зерновых крахмалсодержащих культур спирто-дистиллятного направления использования для производства пищевого спирта и технического биоэтанола невозможна без лабораторной оценки ферментативности зерна селекционных линий, определения выхода этанола и побочных продуктов ферментации. Для оценки ферментативности зерна селекционного материала предлагаем разработанную и апробированную нами лабораторную процедуру. При разработке лабораторного метода ферментации образцов зерна в качестве основы был взят отраслевой стандарт ГСТУ 46.045—2003, измененный и дополненный множеством собственных модификаций. Разработанный лабораторный метод оценки ферментативности включает этапы подготовки проб для анализа, размол зерна, определение его влажности и исходных параметров, таких как содержание в зерне крахмала и белка. В отдельных случаях определяется качество крахмала, а именно, соотношение амилоза/амилопектин и консистенция эндосперма (твердость зерна). Собственно сама лабораторная процедура включает фазы желатинизации крахмала, ферментативного разжижения водной суспензии муки, ферментативного осахаривания крахмала, дрожжевого сбраживания, дистилляции этанола, определения выхода этанола и побочных продуктов ферментативного гидролиза зерна. Приведены примеры определения ферментативности зерна селекционных линий пшеницы с крахмалом типа вакси и экстрамягкозерной пшеницы. Метод предлагается для применения в селекционных программах создания сортов и гибридов зерновых культур спирто-дистиллятного направления использования.

*Ключевые слова:* сорта злаков, селекция, крахмал, ферментативность, дистилляция, пищевой этанол, биоэтанол, амилаза, глюкоамилаза.

LABORATORY PROTOCOL FOR GRAIN FERMENTABILITY EVALUATION OF CEREAL CROPS IN BREEDING FOR DISTILLING END-USE

*O.I. Rybalka<sup>1,2</sup>, M.V. Chervonis<sup>1</sup>, S.S. Polyshchuk<sup>1</sup>, I.O. Surzhenko<sup>1</sup>, B.V. Morgun<sup>2,3</sup>, O.V. Dubrovna<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Plant Breeding and Genetics Institute—National Center of Seed and Cultivars Investigation, National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine  
3 Ovidiopolska Road, Odesa, 65036, Ukraine

<sup>2</sup>Institute of Plant Physiology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine  
31/17 Vasylkivska St., Kyiv, 03022, Ukraine

<sup>3</sup>Institute of Cell Biology and Genetic Engineering, National Academy of Sciences of Ukraine

148 Akademika Zabolotnogo St., Kyiv, 03143, Ukraine

e-mail: molgen@icbge.org.ua

Cereal varieties breeding for distilling end-use for edible ethanol and bioethanol production is impossible without laboratory evaluation of breeding lines grain fermentability, determination of ethanol extraction and other fermentation derived by-products. For a purpose of breeding material fermentability evaluation laboratory procedure was developed, tested and proposed for use. As a base for grain fermentability laboratory protocol development the industrial Ukrainian standard GSTU 46.045—2003 changed and applied with numerous own modifications was used. Developed laboratory method for grain fermentability evaluation includes several steps of grain probe for analyses preparation, sample milling, humidity testing, and initial sample parameters determination such as starch and crude protein content. In particular cases starch quality parameter such as amylose/amylopectin ratio, and endosperm texture (grain hardness) are needed to be tested. The laboratory protocol itself includes phases of starch gelatinization, enzymatic liquefaction of water/flour suspension, enzymatic starch saccharification and yeast fermentation, ethanol distilling and ethanol extraction evaluation, fermentative hydrolysis by-products determination. Examples of grain fermentability evaluation in wheat breeding lines possessing waxy type starch and extra-soft endosperm were presented. Developed laboratory protocol proposed for application in breeding programs aimed on development of cereal crop varieties for distilling end-use.

*Key words:* cereal varieties, breeding, starch, fermentability, distilling, edible ethanol, bioethanol, amylase, glucoamylase.