

FERMENTACJA ALKOHOLOWA GĘSTYCH ZACIERÓW KUKURYDZIANYCH

Ewelina Sapińska, Maria Balcerek, Maciej Stanisław

Zakład Technologii Spirytusu i Drożdży, Wydział Biotechnologii i Nauk o Żywności
Politechnika Łódzka
ul. Wólczańska 171/173, 90-924 Łódź
e-mail: ewelina.sapinska@dokt.p.lodz.pl

Streszczenie. W pracy oceniano wpływ ekstraktu zacierów kukurydzianych (około 20, 23 i 25% w/w), przygotowanych metodą bezciśnieniowego uwalniania skrobi (BUS), na ich skład fizyko-chemiczny, własności reologiczne oraz wskaźniki fermentacji. Fermentację prowadzono systemem trzydobowym w temperaturze 28-30°C, z udziałem suszonych drożdży gorzelniczych *Saccharomyces cerevisiae*, rasy As4. Okresowo pobierano próby zacierów w celu monitorowania zmian ich parametrów. Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono istotny wpływ ekstraktu ~~gęstości~~ na własności reologiczne i skład fizyko-chemiczny, zarówno zacierów słodkich (ekstrakt, cukry redukujące, dekstryny, lepkość), jak i odfermentowanych (ekstrakt pozorny, ekstrakt rzeczywisty, alkohol, cukry redukujące, dekstryny, lepkość). Prowadzenie fermentacji zacierów kukurydzianych o ekstrakcie początkowym ok. 20% w/w pozwoliło na ich pełne odfermentowanie w systemie 3-dobowym (ekstrakt pozorny wynosił 0% w/w). Podwyższenie ekstraktu zacierów do około 23 i 25% w/w wpłynęło na wzrost ich lepkości oraz stężenia substratów cukrowych. Zaobserwowano również niepełne odfermentowanie tych zacierów (ekstrakt pozorny wynosił odpowiednio 2,4±0,1% w/w oraz 4,4±0,1% w/w), obniżenie wydajności procesu (odpowiednio o 16% oraz 21,4%) oraz niższy stopień wykorzystania cukrów (o 6,9% oraz 9,3%) w porównaniu z próbą o ekstrakcie 20% w/w.

Słowa kluczowe: fermentacja, bezciśnieniowe uwalnianie skrobi (BUS), kukurydza

WSTĘP

Ogólnoświatowe tendencje poszukiwania bardziej efektywnych, ekologicznych i ekonomicznych technologii produkcji spirytusu spowodowały ponowne zainteresowanie energooszczędną metodą bezciśnieniowego uwalniania skrobi (BUS), stanowiącą alternatywę dla stosowanej przez długie lata, kosztownej metody ciśnieniowo-termicznej (Grzybowski i Stecka 1998, Kirin 1994, Oliveira i in. 1999). Metoda BUS daje możliwość regulacji ostatecznego ekstraktu zacieru,

poprzez odpowiednie proporcje wody i surowca, dzięki czemu można uzyskiwać zacieru o podwyższonych ekstraktach. Ekstrakt zacieru i skorelowana z nim zawartość cukrów fermentujących, jest jednym z najważniejszych parametrów fermentacji, który determinuje efektywność procesu (Srichuwonga i in. 2009, Kłosowski i in. 2009, Czupryński i in. 1998, Miecznikowski i in. 1996).

W ostatnich latach wzrosło zainteresowanie kukurydzą, która jest jednym z najbardziej energetycznych surowców gorzelnicznych. Duża zawartość skrobi w ziarnie pozwala uzyskać wysokie wydajności alkoholu w porównaniu z innymi zbożami (Bortkun 2003, Kawa-Rygielska 2007, Kłosowski i in. 2001, Lipski 2003). Wśród pozostałych zalet kukurydzy, jako surowca w gorzelnictwie, wyróżnić można między innymi: wysokie plonowanie, przydatność do zagospodarowania odłogów, dwukrotnie większe plony niż innych zbóż na glebach słabych, możliwość zagospodarowania ziarna gorszej jakości (charakteryzuje się wysoką wydajnością gorzelniczną) oraz wysoka wartość paszowa wywarów (Michalski 2002, 2007).

METODYKA BADAŃ

W badaniach wykorzystano ziarna kukurydzy odmiany Oldham. Analizę kukurydzy przeprowadzono metodami zalecanymi w przemyśle rolno-spożywczym (Jakubczyk i Haber 1981, Krełowska-Kułas 1993). Obejmowała ona oznaczenie zawartości (AOAC 1995): suchej substancji, skrobi, białka i związków mineralnych (popiołu), cukrów redukujących (Schoorl i Regenbogen 1917).

Analiza zacierów została wykonana według metod zalecanych w gorzelnictwie (Krełowska-Kułas 1993). W zacierach słodkich oznaczano ekstrakt ogólny za pomocą areometru wyskalowanego w % w/w, stężenie cukrów redukujących, dekstryn oraz lepkość, z wykorzystaniem wiskozymetru Höpplera (Ładoński i Gospodarek 1986). W zacierach odfermentowanych oznaczano: ekstrakt pozorny (w obecności alkoholu), ekstrakt rzeczywisty, zawartość etanolu i stężenie cukrów pozostałych po fermentacji.

Analizę statystyczną (odchylenie standardowe, analizę wariancji, korelację, test t Studenta na poziomie istotności $\alpha = 0,05$) przeprowadzono z wykorzystaniem programu komputerowego Origin 7.5. Wszystkie eksperymenty wykonano w trzech powtórzeniach.

Proces upłynniania i scukrzania skrobi metodą beciśnieniową był prowadzony w zbiorniku, umieszczonym w łaźni wodnej, wyposażonym w mieszadło laboratoryjne oraz termometr. Zmielone ziarno kukurydzy, zostało zmieszane z wodą wodociągową o temperaturze około 50°C, w proporcjach ustalonych dla uzyskania założonych ekstraktów zacierów i dodano preparat upłynniający Termamyl SC (α -amylaza) w dawce 0,13 ml na 1 kg skrobi. Aby zapewnić optymalne warunki upłynniania, mieszaninę ogrzano (jednocześnie mieszając) do temperatury

90°C i przetrzymywano w tych warunkach przez około 30 minut. Po upłynięciu zacier schłodzono do temperatury około 65°C i dodano preparat scukrzający SAN Extra (glukoamylaza) w dawce 0,6 ml na 1 kg skrobi. Zacier ochłodzono do temperatury 30°C w celu prowadzenia jednoczesnego procesu scukrzania oraz fermentacji oraz wyregulowano pH do wartości ok 4,8 za pomocą roztworu kwasu siarkowego 30% w/w.

Do fermentacji zacierów kukurydzianych używano suszonych drożdży gorzelniczych *Saccharomyces cerevisiae*, rasy As4. Wprowadzono je do zacieru w ilości 0,3 g·dm⁻³ zacieru po uprzednim uwodnieniu i odkażeniu. W tym celu zakwaszono wodną zawiesinę drożdży w w. roztworem kwasu siarkowego do pH około 2,5 i pozostawiono w temperaturze pokojowej przez 15 minut. Zabieg ten miał na celu wyeliminowanie słabszych komórek drożdżowych oraz zniszczenie mikroflory bakteryjnej. Tak przygotowane mleczko drożdżowe, bez zobojętniania, wprowadzano do zacierów słodkich i dokładnie wymieszano. Jako pożywkę dla drożdży zastosowano fosforan diamonu (NH₄)₂HPO₄ w postaci wodnego roztworu, w ilości 0,4 g·dm⁻³ zacieru.

Zaciera poddano 3-dobowej fermentacji, w temperaturze 28-30°C. Przebieg procesu kontrolowano poprzez monitoring najważniejszych parametrów procesu fermentacji (pomiar odfermentowania pozornego i rzeczywistego, stężenia alkoholu etylowego, asymilacji cukrów).

Wydzielenie alkoholu etylowego z odfermentowanych zacierów prowadzono w zestawie do destylacji prostej, do całkowitego oddestylowania alkoholu, kontrolując refraktometrycznie zmiany zawartości etanolu w odbieranym destylacie.

WYNIKI

Charakterystykę składu chemicznego kukurydzy przedstawiono w tabeli 1. Zawartość suchej substancji oraz wilgotność kształtowały się na poziomie odpowiednio 89,0±2,35% oraz 11,0±2,35%, co wynika z odpowiedniego przechowywania ziarna. Wykorzystywane w pracy ziarno kukurydzy odznaczało się wysoką zawartością skrobi, na poziomie 75,59±2,17 % (wobec 60-67% według danych literaturowych), co jest korzystne dla celów fermentacyjnych. Duża zawartość cukrów potwierdza dobrą jakość ziarna oraz pozwala na osiągnięcie wyższej wydajności produkowanego alkoholu etylowego. Największe różnice dotyczyły stężenia cukrów redukujących i popiołu, które były odpowiednio: 4- i 10-krotnie niższe niż wartości podawane w piśmiennictwie fachowym (Chaber i Jakubczyk 1981, Sikorski 1994, Świetlikowska 1995).

Tabela 1. Skład chemiczny ziarna kukurydzy
Table 1. Chemical composition of maize grain

Składniki – Components	Zawartość – Content
Wilgotność – Moisture (%)	11,0 (±2,35)
Sucha substancja – Solid substance (%)	89,0 (±2,35)
Skrobia – Starch (%)	75,59 (±2,17)
Cukry redukujące – Reducing sugars (%)	0,78 (±0,05)
Białko – Protein (%)	11,24 (±0,41)
Popiół – Ash (%)	0,13 (±0,01)

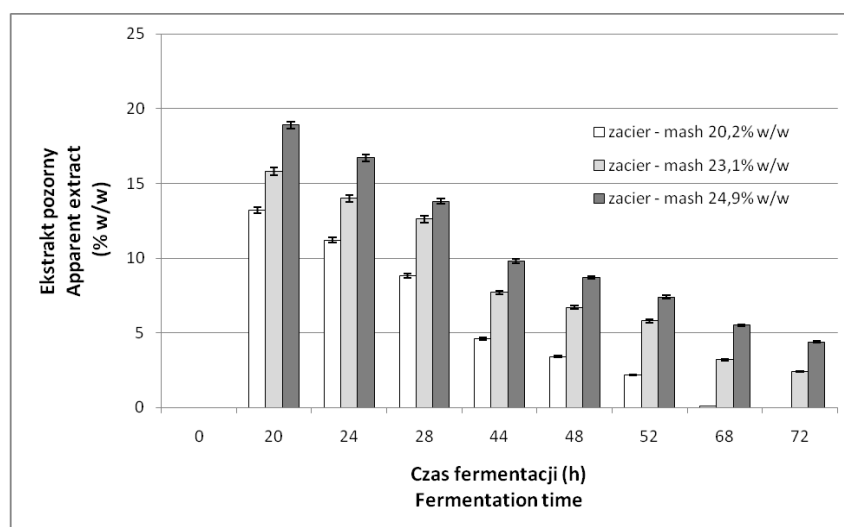
Przygotowane metodą beciśnieniowego uwalniania skrobi zacieru słodkie, o ekstrakcie 20,2, 23,1 oraz 24,9% w/w, poddano 3-dobowej fermentacji. Podczas prowadzenia procesu, w wybranych godzinach pobierano próby i oznaczano: ekstrakt pozorny oraz rzeczywisty, stężenie alkoholu, cukry redukujące, dekstryny oraz lepkość. Otrzymane wyniki analiz przedstawiono na poniższych rysunkach.

Na rysunku 1 przedstawiono zmiany ekstraktu pozornego dla wszystkich wariantów fermentacji. Oceniając zmiany odfermentowania pozornego badanych zacierów zaobserwowano najbardziej dynamiczny jego spadek w przypadku zacieru o ekstrakcie 20,2% w/w ($p < 0,03$). Tylko w tym przypadku w 72 godzinie fermentacji wartość ta osiągnęła 0% w/w ($p < 5,7 \cdot 10^{-4}$). Obserwując zmiany ekstraktu pozornego w zacierze o ekstrakcie początkowym 24,9% w/w, po zakończeniu procesu parametr ten osiągnął najwyższą wartość $4,4 \pm 0,2\%$ w/w ($p < 4 \cdot 10^{-4}$). Było to spowodowane podwyższonym ciśnieniem osmotycznym, w wyniku którego nastąpiło niepełne odfermentowanie zacieru.

Kolejnym ocenianym parametrem była zawartość alkoholu etylowego (rys. 2). Stężenie etanolu w badanych próbach w 72 godzinie fermentacji zawierało się w przedziale 11,4-11,8% obj. ($0,013 < p < 0,062$). Zawartość etanolu była najwyższa dla wariantu, którego ekstrakt początkowy wynosił 20,2% w/w ($p < 0,019$). Wynika to z całkowitego odfermentowania zacieru, poprzez wykorzystanie dostępnej puli substratów cukrowych przez drożdże oraz efektywnej i niezakłóconej biosyntezy etanolu.

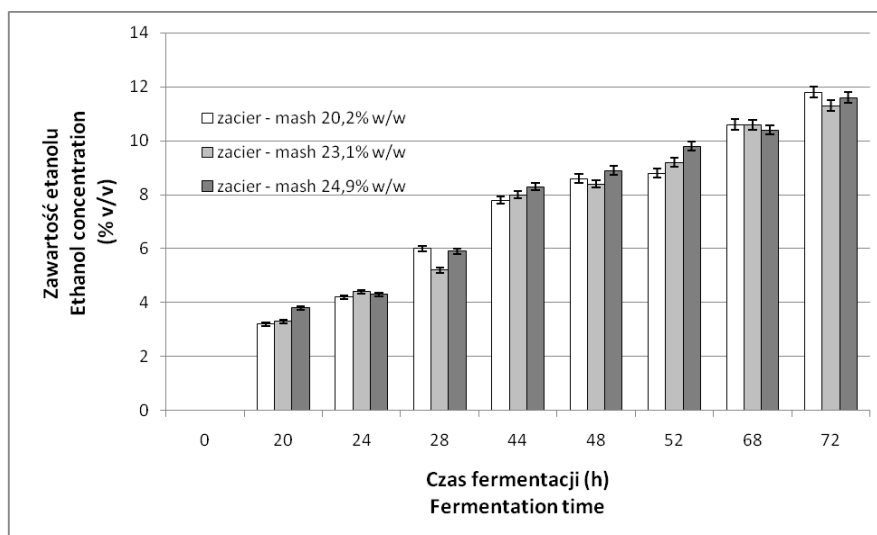
Oceniając zmiany zawartości ekstraktu rzeczywistego badanych zacierów zaobserwowano, że najniższą wartość $2,4 \pm 0,2\%$ w/w ($p < 1,7 \cdot 10^{-5}$) osiągnął w zacierze, którego ekstrakt początkowy był najniższy i wynosił 20,2% w/w (rys. 3). Natomiast po zakończeniu fermentacji zacierów o ekstrakcie początkowym 23,1 oraz

24,9% w/w, osiągnęło ono odpowiednio wartość $6,0 \pm 0,1$ oraz $8,6 \pm 0,2\%$ w/w ($p < 3 \cdot 10^{-4}$), co wskazuje na niepełne odfermentowanie zacierów.



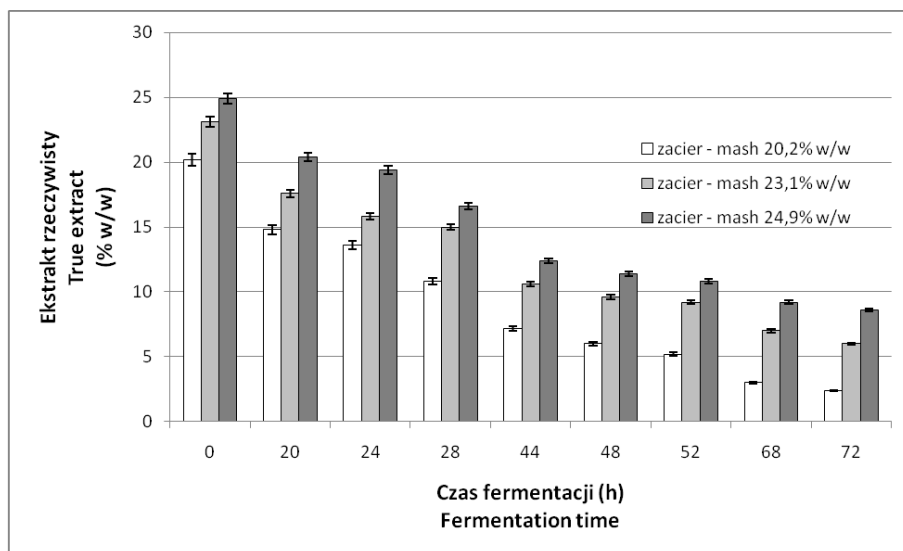
Rys. 1. Zmiany ekstraktu pozornego zacierów podczas fermentacji (z odchyleniem standardowym)

Fig. 1. Changes in apparent extract of mashes during fermentation (with standard deviation)

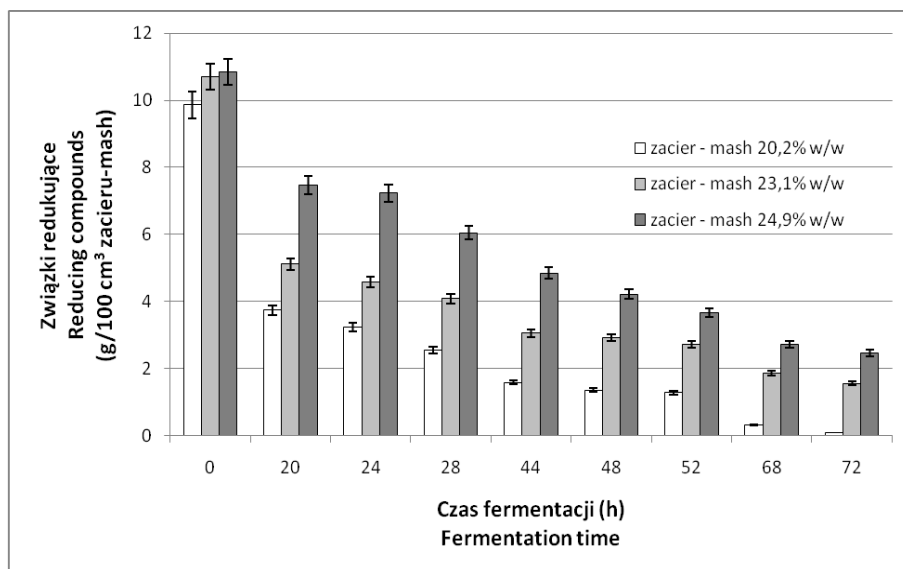


Rys. 2. Zmiany zawartości alkoholu etylowego w zacierach podczas fermentacji (z odchyleniem standardowym)

Fig. 2. Changes in ethanol concentration in mashes during fermentation (with standard deviation)



Rys. 3. Zmiany ekstraktu rzeczywistego zacierów podczas fermentacji (z odchyleniem standardowym)
Fig. 3. Changes in true extract of mashes during fermentation (with standard deviation)

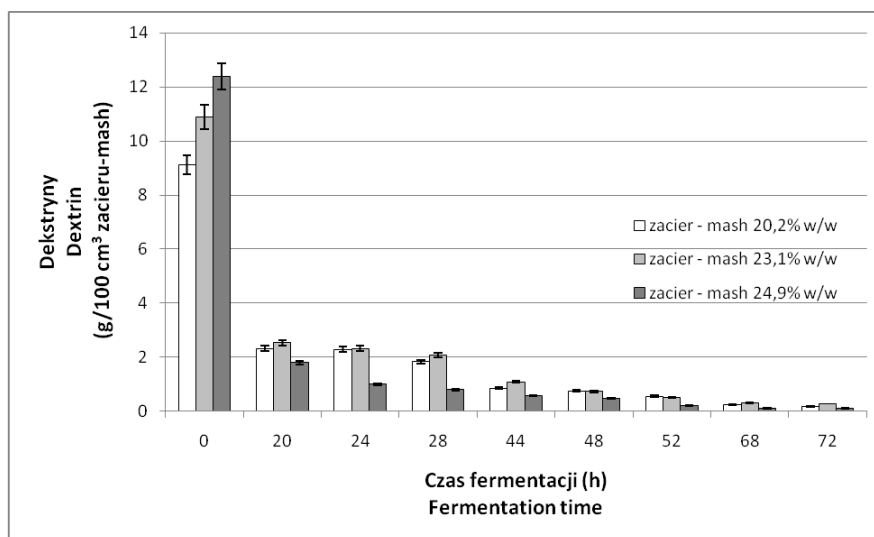


Rys. 4. Zmiany zawartości związków redukujących w zacierach podczas fermentacji (z odchyleniem standardowym)
Fig. 4. Changes in content of reducing compounds in mashes during fermentation (with standard deviation)

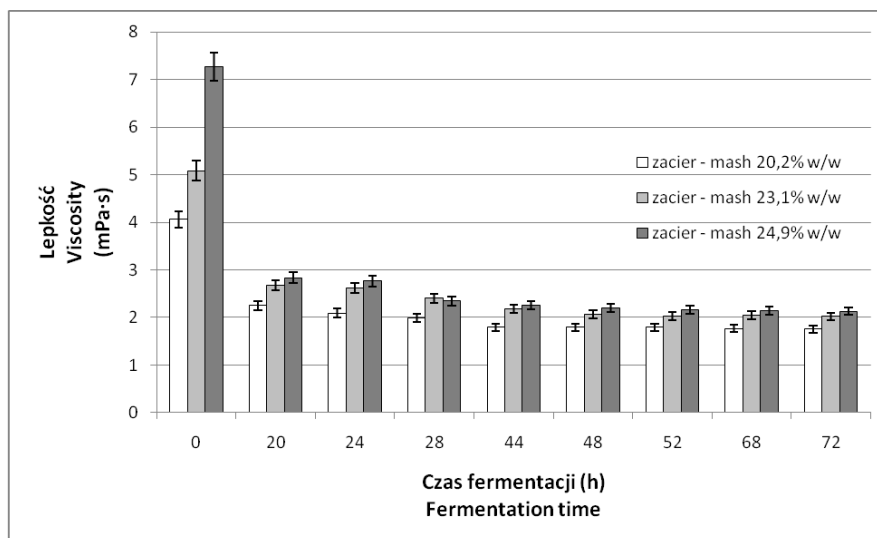
Obserwując zmiany stężenia cukrów zauważono, iż we wszystkich wariantach fermentacji pierwszy etap adaptacyjny procesu charakteryzował się znacznym ubytkiem substancji redukujących, m. in. cukrów (rys. 4). Było to spowodowane intensywnym namnażaniem drożdży, wykorzystujących substraty cukrowe na procesy anaboliczne, zachodzące w ich komórkach. Po zakończeniu procesu, najmniejsza zawartość związków redukujących ($0,1 \pm 0,006 \text{ g} \cdot 100 \text{ cm}^{-3}$ zacieru) ($p < 4,3 \cdot 10^{-4}$) odnotowano w próbie fermentacyjnej o ekstrakcie początkowym około 20% w/w. Duże wykorzystanie dostępnych cukrów przekłada się na najwyższą zawartość alkoholu dla tego wariantu.

Obserwując zmiany zawartości dekstryn (rys. 5), w poszczególnych wariantach fermentacji zauważono, że po 72 godzinach fermentacji ich zawartość wynosiła $0,182 - 0,266 \text{ g} \cdot 100 \text{ cm}^{-3}$ zacieru ($4,3 \cdot 10^{-4} < p < 1,4 \cdot 10^{-3}$). Etap adaptacyjny fermentacji charakteryzował się znacznym ubytkiem dekstryn dla wszystkich prób, niezależnie od ekstraktu początkowego. Było to spowodowane intensywnym działaniem glukoamylazy, katalizującej hydrolizę tych substratów.

Własności reologiczne omawianych zacierów przedstawiono na rysunku 6. Największe obniżenie lepkości zaobserwowano w początkowym etapie fermentacji we wszystkich próbach zacierów. W kolejnych godzinach procesu zmiany tego parametru były nieznaczne i po 72 godzinach najwyższą wartość ($2,13 \pm 0,09 \text{ mPa} \cdot \text{s}$) odnotowano w zacierze o najwyższym ekstrakcie – 24,9% w/w ($p < 0,251$).

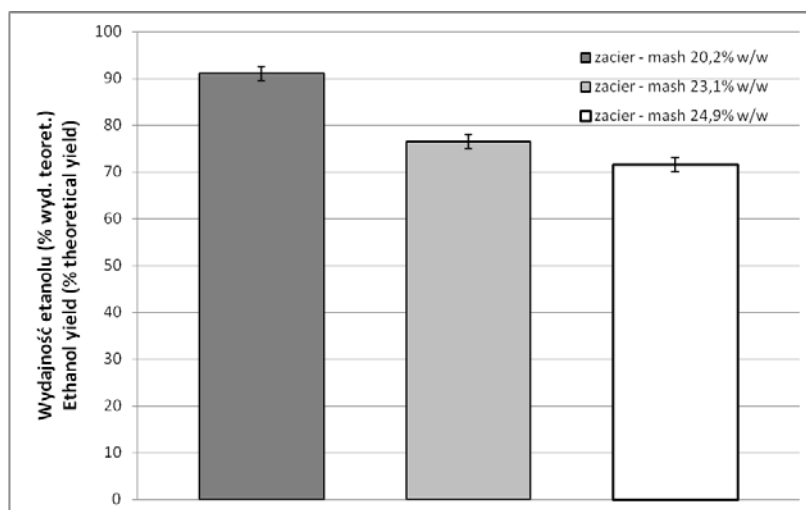


Rys. 5. Zmiany zawartości dekstryn w zacierach podczas fermentacji (z odchyleniem standardowym)
Fig. 5. Changes in content of dextrin in mashes during fermentation (with standard deviation)

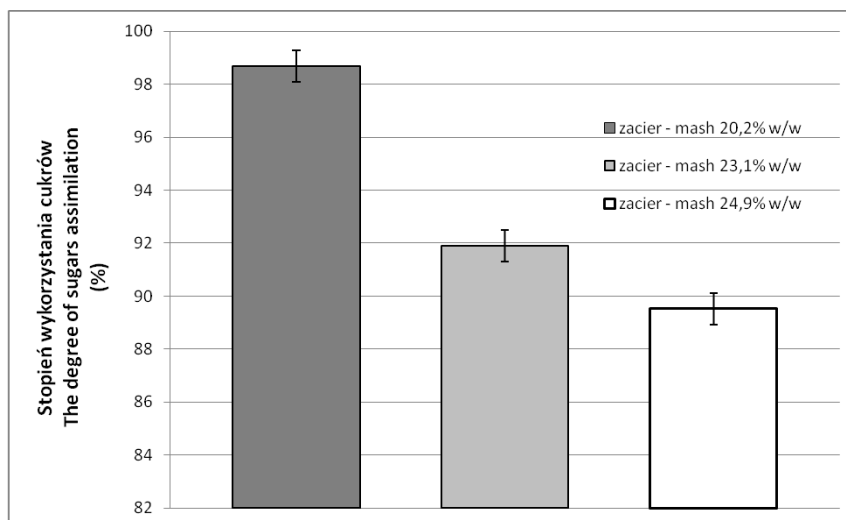


Rys. 6. Zmiany lepkości zacierów podczas fermentacji (z odchyleniem standardowym)
Fig. 6. Changes in viscosity of mashes during fermentation (with standard deviation)

Na rysunkach 7 oraz 8 przedstawiono porównanie wskaźników procesu fermentacji, tj. wydajność alkoholu oraz stopień wykorzystania cukrów dla wszystkich zastosowanych wariantów. Największą wydajność alkoholu ($91,05 \pm 1,5\%$



Rys. 7. Wydajność procesu fermentacji w % wyd. teoretycznej (z odchyleniem standardowym)
Fig. 7. Yield of fermentation process in % of theoretical yield (with standard deviation)



Rys. 8. Stopień wykorzystania cukrów w zacierach (z odchyleniem standardowym)
Fig. 8. Degree of sugar assimilation in mashes (with standard deviation)

wydajności teoretycznej) ($p < 2,9 \cdot 10^{-4}$) oraz najwyższy stopień wykorzystania cukrów ($98,68 \pm 0,6\%$) ($p < 1,6 \cdot 10^{-4}$) odnotowano w zacierze 20,2% w/w. Natomiast najniższą wydajnością alkoholu etylowego ($71,59 \pm 1,5\%$ wydajności teoretycznej) ($p < 1,6 \cdot 10^{-2}$) oraz najniższym stopniem wykorzystania cukrów ($89,52 \pm 0,6\%$) ($p < 8,4 \cdot 10^{-3}$) charakteryzował się zacier o najwyższym ekstrakcie – 24,9% w/w. Obniżenie efektywności fermentacji w przypadku zacierów o wyższych ekstraktach było spowodowane podwyższonym ciśnieniem osmotycznym, działającym inhibująco na enzymy katalizujące hydrolizę skrobi, co znajdowało odzwierciedlenie w wolniejszym scukrzaniu zacierów. Ponadto, następowało hamowanie aktywności fermentacyjnej drożdży, co w konsekwencji doprowadziło do niepełnego odfermentowania zacieru.

WNIOSKI

1. Stwierdzono istotny wpływ ekstraktu na własności reologiczne i skład fizyko-chemiczny, zarówno zacierów słodkich (ekstrakt, cukry redukujące, dekstryny, lepkość), jak i odfermentowanych (ekstrakt pozorny, ekstrakt rzeczywisty, alkohol, cukry redukujące, dekstryny, lepkość).

2. Prowadzenie fermentacji zacierów kukurydzianych o ekstrakcie początkowym około 20% w/w pozwala na ich pełne odfermentowanie w systemie 3-dobowym (ekstrakt pozorny wynosił 0% w/w).

3. Podwyższenie ekstraktu zacierów do ok. 23 i 25% w/w powoduje wzrost ich lepkości oraz stężenia substratów cukrowych. Zaobserwowano również niepełne odfermentowanie tych zacierów, obniżenie wydajności procesu oraz niższy stopień wykorzystania cukrów w porównaniu z próbą o gęstości 20% w/w.

4. Rezultaty fermentacji zacierów o podwyższonych ekstraktach (23-25% w/w) wskazują na potrzebę wydłużenia czasu procesu, bądź zastosowania dodatku enzymów wspomagających.

PIŚMIENNICTWO

- AOAC, 1995. Official methods of analysis of AOAC international, 16th edn. Methods: 925.10, 945.37, 960.52, 923.03. AOAC International, Maryland, USA.
- Bortkun O., 2003. Wykorzystanie wysokoenergetycznych odmian kukurydzy do produkcji biopaliw. *Przem. Ferm. i Owoc.-Warz.*, 11, 19.
- Chaber T., Jakubczyk T., 1981. Analiza zbóż i przetworów zbożowych. Wyd. SGGW-AR, Warszawa.
- Czupryński B., Trzcńska M., Kłosowski G., Sieliwanowicz B., 1998. Application of β -glucosidase in pressureless mashing of rye. *Pol J Food Nutr Sci*, 7, 48, 3, 447-453.
- Grzybowski R. A., Stecka M. K., 1998. Zadania dla polskiego gorzelnictwa w obliczu perspektywy-zjednoczenia z UE. *Przem. Ferm. i Owoc.-Warz.*, 3, 5-7.
- Jakubczyk T., Haber T., 1993. Analiza zbóż i przetworów zbożowych. Wyd. SGGW-AR. Warszawa.
- Kawa-Rygielska J., 2007. Bioetanol z kukurydzy – czy warto produkować. *Przem. Ferm. Owoc.-Warz.*, 5, 38-39.
- Kirin B., 1994. Ester flavor – reduced spirit production. *Biotechnol. Abs.*, 14, 1, 27.
- Kłosowski G., Czupryński B., Sieliwanowicz B., Kotarska K., Wolska M., 2001. Monitoring of sugar substrates utilization by D2 and As4 yeast and kinetics of by-products formation during alcoholic fermentation of rye and corn mashes. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 10/51, 2, 19-24.
- Kłosowski G., Mikulski D., Czupryński B., Kotarska K., 2009. Characterisation of fermentation of high-gravity maize mashes with the application of pullulanase, proteolytic enzymes and enzymes degrading non-starch polysaccharides. *J. Biosci. Bioeng.*, 109, 5, 466-471.
- Krełowska-Kułas M., 1993. Badanie jakości produktów spożywczych. PWE, Warszawa.
- Lipski S., 2003. Kukurydza surowcem do produkcji etanolu jako komponentu biopaliw – zalety, możliwości, perspektywy. *Przem. Ferm. Owoc.-Warz.*, 2, 40-41.
- Ładoński W., Gospodarek T., 1986. Podstawowe metody analityczne produktów spożywczych. PWN Warszawa-Wrocław.
- Michalski T., 2002. Kukurydza źródłem surowca dla różnych gałęzi przemysłu. *Wieś Jutra*, 6, 47, 53-55.
- Michalski T., 2007. Kukurydza - doskonały surowiec do produkcji biopaliw. *Kukurydza nowe możliwości*. Wyd. AGRO SERWIS, 3-9.
- Miecznikowski A., Milewski J., Stecka K., 1996. Energooszczędna technologia produkcji spirytusu surowego. *Przem. Ferm. Owoc.-Warz.*, 10, 15-18.
- Oliveira S. C., De – Castro H. F., Visconti A. E. S., Giudici R., 1999. Continuous ethanol process performance, kinetics parameters and model predictions. *Bioprocess – Eng.*, 20, 6, 525-530.
- Schoorl N, Regenbogen A (1917) *Z Anal. Chem.*, 56, 191.
- Sikorski Z. E., 1994. Chemiczne i funkcjonalne właściwości składników żywności. WNT. Warszawa.

Srichuwonga S., Fujiwara M., Wanga X., Seyama T., Shiroma R., Arakane M., Mukojima N., Tokuyasu K., 2009. Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of very high gravity (VHG) potato mash for the production of ethanol. *Biomass Bioenerg.*, 33, 890-898.

Świetlikowska U., 1995. *Surowce spożywcze*. Wyd. SGGW, Warszawa.

ALCOHOLIC FERMENTATION OF HIGH-GRAVITY CORN MASHES

Ewelina Sapińska, Maria Balcerek, Maciej Stanisław

Department of Spirit and Yeast Technology, Faculty of Biotechnology and Food Sciences

Technical University of Łódź

ul. Wólczanska 171/173, 90-924 Łódź

e-mail: ewelina.sapinska@dokt.p.lodz.pl

Abstract. The paper presents the physicochemical composition, rheological properties and results of fermentation of high-gravity corn mashes (extract content of about 20, 23 and 25% w/w) prepared by pressureless liberation of starch (PLS). Fermentation was conducted for 3 days at 28-30°C, by using dried distillery yeast strain As4 (*Saccharomyces cerevisiae*). Periodically, samples of mashes were collected in order to monitor fermentation parameters (measurement of apparent and true extract, ethanol concentration, loss of sugars). The obtained results showed a significant effect of corn mashes extract on their rheological properties and physicochemical composition, both of sweet mashes (extract, reducing sugars, dextrins, viscosity) and mashes after fermentation (apparent extract, true extract, ethanol content, reducing sugars, dextrins, viscosity). Fermentation of corn mash with the initial extract of about 20% w/w in the 3-daily system resulted in its apparent extract on the level of 0% w/w. Increasing the mashes density to 23 and 25% w/w resulted in an increase of their viscosity and concentration of sugar substrates. Their apparent extract after completion of the process amounted to $2.4 \pm 0.1\%$ w/w and $4.4 \pm 0.1\%$ w/w, respectively. Moreover, lower yields of fermentation process (by 16% and 21.4%) and lower degree of sugar assimilation (by 6.9% and 9.3%) compared to the sample with the extract of 20% w/w were observed.

Key words: fermentation, pressureless liberation of starch (PLS), corn