

Bogusław CZUPRYŃSKI, Katarzyna KOTARSKA

e-mail: czuprynski@spg-ibprs.pl

Samodzielna Pracownia Gorzelnicza w Bydgoszczy, Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego, Warszawa

Wpływ preparatów enzymatycznych na przebieg fermentacji alkoholowej

Wstęp

Oplącalność produkcji (efekt ekonomiczny) gorzelnicy rolniczej związana jest z modyfikacją aktualnych technologii. Celem tych modyfikacji jest maksymalne obniżenie kosztów produkcji, przy zachowaniu bardzo dobrej jakości otrzymywanego spirytusu surowego. Jedną z metod tej modyfikacji jest stosowanie w procesach technologicznych nowoczesnych preparatów enzymatycznych.

Enzymy te elastycznie dostosowują się do wymogów procesu, co skutkuje uzyskaniem maksymalnych wydajności, przy równoczesnym ograniczeniu kosztów produkcji spirytusu. Stosowanie tych enzymów powoduje ponadto skrócenie czasu fermentacji, mniejsze prawdopodobieństwo wystąpienia zakażeń bakteryjnych i mniejszy wpływ *pH* zacieru na wydajność procesu. Uzyskuje się także polepszenie jakości spirytusu surowego (destylatu rolniczego) [1, 2]. Stosowanie nowoczesnych enzymów zmniejszających lepkość zacierów stwarza możliwości sporządzania w praktyce gorzelniczej wysokich gęstości zacierów (ok. 20 °Błg), [3, 4].

Celem prezentowanych badań jest określenie wpływu zastosowania nowoczesnych preparatów enzymatycznych na wydajność i jakość otrzymanego żytniego spirytusu surowego (destylatu rolniczego). W badaniach wykorzystano preparaty enzymatyczne *Termamyl S.C.*, *San Extra L*, *Promozyme 400L*, i *Viscozyme L*, produkcji firmy *Novozymes*.

Materiały i metody badań

Materiały do badań

Do badań użyto ziarna żyta odmiany *Dańkowskie Diament*, które charakteryzowało się średnią wielkością (poniżej 1,2 mm), barwą beżową oraz dobrą jakością (nie zanieczyszczone), pochodzące z jednej partii. Wilgotność użytego do badań surowca wynosiła 13,7% (wagosuszarka *Medicat T 108*), zawartość skrobi kształtował się na poziomie 57,1% (metoda polarymetryczna).

Metody mikrobiologiczne

Fermentację prowadzono przy użyciu suszonych drożdży gorzelnicznych rasy D-2. Drożdże D-2 w ilości 5 g poddano dehydratacji i dezynfekcji w 50 cm³ wodnego roztworu stężonego kwasu siarkowego (*d* = 1,84 g/cm³) w proporcji 1:200 w temp. 30°C. Otrzymane mleczko drożdżowe było mieszane na mieszadle magnetycznym (*Elektromagnetic Stirrer type ES 21H*) przy prędkości 500 obr./min (przez 10 minut), a następnie dodawane w ilości 1 cm³/0,3 dm³ (5 cm³/1,5 dm³) do gotowego zacieru.

Proces dehydratacji i odkażania roztworem kwasu siarkowego powoduje obumarzenie od 10% do 20% najsłabszych komórek (próba z błękitem metylenowym). Pozostałe komórki drożdży cechowały się dobrą żywotnością i aktywnością fermentacyjną, były praktycznie wolne od niepożądanego mikroflory.

Metody technologiczne

Żyto przygotowano do fermentacji metodą bezciśnieniowego uwalniania skrobi (BUS). Ziarno rozdrobiono mechanicznie na tarczowym młynku laboratoryjnym (Typ *SEMg 71-2B*, produkcji ZBPP w Bydgoszczy). Następnie ziarno mieszano z wodą o temperaturze 25°C w proporcji 370 cm³ wody na każde 100g ziarna. Do otrzymanego zacieru dodano enzym upłynniający *Termamyl S.C.* w dawce 150 cm³/

Mg skrobi, w temperaturze 90°C oraz enzymy scukrzające skrobię, tj.: *San Extra L* – w dawce 600 cm³/Mg skrobi w temp. 55°C i *Promozyme 400 L* – w dawce 30 cm³/Mg surowca [5]. Dodatkowo do wybranych zacierów dodano enzym *Viscozyme L*, powodujący obniżenie lepkości zacierów [1]. Preparat ten zastosowano w dawce 150 cm³/Mg surowca, w temp. 55°C. Dawki preparatów zastosowanych w doświadczeniach przedstawiono w tab. 1. Zacier słodki schłodzony do temperatury 34°C rozlano do kolb fermentacyjnych (*V* = 0,5 dm³) w ilości 300 cm³.

Tab. 1. Rodzaje i dawki preparatów enzymatycznych stosowanych w badaniach

Lp.	Wariant doświadczenia	Preparaty enzymatyczne [cm ³]			
		<i>Termamyl S.C.</i>	<i>San Extra L</i>	<i>Promozyme 400L</i>	<i>Viscozyme L</i>
1	I	0,53	2,1	0,00	0,00
2	II	0,53	2,1	0,11	0,00
3	III	0,53	2,1	0,00	0,61
4	IV	0,53	2,1	0,11	0,61

Zaciera szczepiono drożdżami rasy D-2 i po zamknięciu kolb korkami z rurkami fermentacyjnymi poddano 72-godzinnej fermentacji w temperaturze 38°C.

Dodatkowo w kolbach fermentacyjnych (*V* = 2 dm³) nastawiono po 1,5 dm³ zacieru i poddano fermentacji alkoholowej w ww. warunkach, w celu późniejszego przeprowadzenia destylacji i oznaczenia produktów ubocznych w otrzymanym spirytusie surowym.

Metody analityczne

W trakcie fermentacji, po każdej 24, 48 i 72 godzinie prowadzonego procesu wykonano pomiary i oznaczenia (według standartowych metod stosowanych do oceny prawidłowości przebiegu procesu fermentacji) [6, 7]. Oznaczono m.in.: gęstość pozorną i rzeczywistą zacieru fermentującego i odfermentowanego w °Błg (areometr), stężenie alkoholu w % v/v (refraktometr zanurzeniowego), *pH* zacieru fermentującego i odfermentowanego (pehametr cyfrowy *N-517 Mera-Elwro*), cukry redukujące w wywarach w czasie prowadzonego procesu fermentacji i po jego zakończeniu w % (metoda *Lane-Eynona*).

Średnie wyniki pomiarów i oznaczeń służyły do obliczenia wskaźników biotechnologicznych procesu fermentacji, między innymi takich jak: wydajność uzyskanego alkoholu [dm³ A₁₀₀/100 kg skrobi]. W celu oznaczenia zanieczyszczeń w spirytusie odfermentowane zacieru poddano destylacji na specjalnie skonstruowanym szklanym zestawie, ze szklaną kolumną destylacyjną wyposażoną w 26 półek przelewowych typu kapslowego. Analizę spirytusu surowego wykonano metodą kapilarnej chromatografii gazowej, przy użyciu chromatografu gazowego *Hewlett Packard 6890*.

Wyniki i ich omówienie

W tab. 2 przedstawiono charakterystykę zacierów słodkich sporządzonych z żyta. Gęstość tych zacierów dla wszystkich doświadczeń była prawie na jednakowym poziomie i wynosiła od 21°Błg (wariant III) do 21,2°Błg (wariant II). Wartość *pH* tych zacierów była dla wszystkich doświadczeń równa i wynosiła 5,6. Uzyskane prawie równe wartości gęstości zacierów słodkich umożliwiają porównanie procesu fermentacji alkoholowej z wykorzystaniem różnych enzymów.

Stwierdzono różnice w przebiegu fermentacji zacierów żytnich. Związane to jest z rodzajem zastosowanych enzymów. Po 72 godzinach fermentacji najniższe odfermentowanie pozorne (2,3^oBlg) stwierdzono w IV wariantcie doświadczalnym. Wydajność fermentacji odnosząca się do 100 kg skrobi przyjmowała różne wartości, w zależności od rodzaju enzymu stosowanego w doświadczeniach. W wariantcie I, w którym użyto tylko preparat enzymatyczny *Termamyl S.C.* (enzym upłynniający) i *San Extra L* (enzym scukrzający) – wydajność wynosiła 66,16 dm³ A₁₀₀/100 kg skrobi.

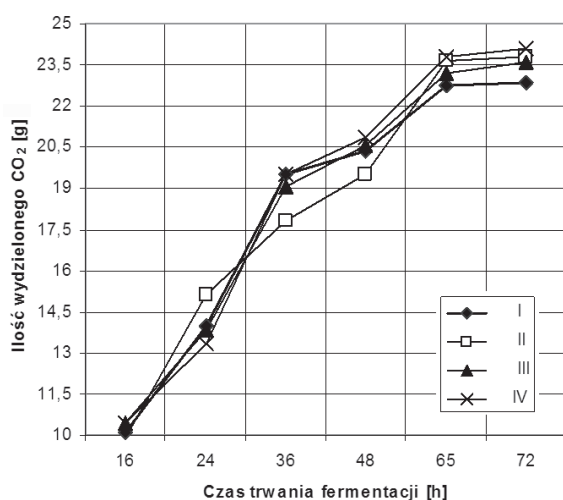
Tab. 2. Charakterystyka badanych zacierów słodkich

Lp.	Wariant doświadczalnia	Parametry fermentacji		
		Ekstrakt rzeczywisty [°Blg]	pH zacieru	Objętość zacieru [dm ³]
1.	I	21,1	5,6	1,5
2.	II	21,2	5,6	1,5
3.	III	21,0	5,6	1,5
4.	IV	21,1	5,6	1,5

Wzrost wydajności w stosunku do wariantu I stwierdzono w przypadku użycia dodatkowo enzymu *Promozyme 400L*, tj. 68,27 dm³ A₁₀₀/100 kg skrobi (wariant II), enzymu *Viscozyme L*, tj. 67,82 dm³ A₁₀₀/100 kg skrobi (wariant III) oraz obydwu enzymów (*Promozyme 400L*, *Viscozyme L*), tj. 69,10 dm³ A₁₀₀/100 kg skrobi (wariant IV). Największą wydajność alkoholu uzyskano w ostatnim wymienionym wariantcie. W czasie fermentacji nie stwierdzono zakażeń.

Po 72 godzinach fermentacji stężenie alkoholu w zacierach osiągnęło ponad 10% v/v. Najwyższe stężenie 10,49% v/v alkoholu w zacierze odfermentowanym stwierdzono w doświadczeniu IV, do sporządzenia którego wykorzystano enzym *Termamyl S.C.*, *San Extra L*, *Promozyme 400 L* i *Viscozyme L*.

Energia fermentacji zacierów dla wszystkich czterech wariantów wynosiła 100%. Miarą przebiegu fermentacji jest ilość wydzielonego w czasie jej trwania ditlenku węgla (ubytek CO₂). W miarę wzrostu czasu trwania fermentacji ilość wydzielonego CO₂ zwiększała się (Rys. 1). Po zakończeniu fermentacji ubytek CO₂ wynosił odpowiednio 22,9 g (wariant I), 23,5 g (wariant II), 23,8 g (wariant III), 24,1 g (wariant IV).

Rys. 1. Zależność ilości wydzielonego w trakcie fermentacji CO₂ od czasu trwania fermentacji

Po 72 godzinach fermentacji zacierów (sporządzonych przy udziale różnych preparatów enzymatycznych) odnotowano w wywarach zawar-

tość cukrów fermentujących na poziomie odpowiednio: 1,14^oBlg (*Termamyl S.C.*, *San Super Extra L*); 0,32^oBlg (*Termamyl S.C.*, *San Super Extra L*, *Promozyme 400 L*); 0,41^oBlg (*Termamyl S.C.*, *San Super Extra L*, *Viscozyme L*); 0,30^oBlg (*Termamyl S.C.*, *San Super Extra L*, *Promozyme 400 L*, *Viscozyme L*). Niewielkie ilości substancji redukujących w wywarach w wariantach II, III i IV świadczą o bardzo dobrym wykorzystaniu cukrów w czasie fermentacji.

Po zakończeniu fermentacji z badanych zacierów oddestylowano alkohol etylowy w celu oznaczenia zawartości zanieczyszczeń chemicznych w nim występujących. Zawartość aldehydów w spirytusach otrzymanych z czterech wariantów doświadczalnych kształtowała się na niskim poziomie, tj. poniżej *Polskiej Normy* (0,1 g/dm³ A₁₀₀). Najniższe wartości związków karbonylowych, tj. 0,034 g/dm³ A₁₀₀, stwierdzono w IV wariantcie badań. Również w tym wariantcie odnotowano najniższą ilość alkoholi wyższych, tj.: 3,899 g/dm³ A₁₀₀. Zawartość estrów na niskim poziomie, tj.: 0,044 g/dm³ A₁₀₀ odnotowano także w spirytusach otrzymanych z zacierów żytnich, poddanych działaniu czterech enzymów (Tab. 3).

Tab. 3. Skład zanieczyszczeń chemicznych spirytusów surowych

Lp.	Zanieczyszczenia chemiczne	Wariant doświadczalnia			
		I	II	III	IV
1	Aldehydy [g/dm ³]	0,091	0,031	0,071	0,034
2	Metanol [g/100 cm ³ A ₁₀₀]	0,151	0,012	0,164	0,012
3	Alkohole wyższe (fuzle) [g/dm ³ A ₁₀₀]	7,211	5,870	10,723	3,899
4	Estry [g/dm ³ A ₁₀₀]	0,097	0,068	0,136	0,044

Podsumowanie

Preparat enzymatyczny *Promozyme 400L* zastosowany w badaniach spełniał rolę dodatkowego czynnika amylolytycznego zawierającego pullulanazę. Jego wspomagające działanie polega na przyspieszonym uzyskiwaniu liniowych dekstryn w procesie degradacji enzymatycznej frakcji amylopektyny. Wykorzystanie tego preparatu do sporządzenia zacierów żytnich skutkowało m.in.: zwiększoną wydajnością do 68,27 dm³ A₁₀₀/100 kg skrobi i mniejszą ilością cukrów redukujących pozostałych w wywarze (0,32%), w stosunku do wariantu I (wydajność: 66,16 dm³ A₁₀₀/100 kg skrobi i cukry redukujące: 1,14%), gdzie użyto dwóch preparatów enzymatycznych, tj. *Termamyl S.C.* i *San Extra L*.

Najlepsze wskaźniki technologiczne uzyskano, gdy zastosowano *Termamyl S.C.*, *San Extra*, *Promozyme 400 L* i dodatkowo preparat obniżający lepkość zacierów *Viscozyme L*.

Dodatek preparatu *Viscozyme L* spowodował obniżenie lepkości zacierów żytnich. Oddziaływanie tego preparatu na struktury ścian komórkowych surowca zwiększa możliwości działania enzymów amylolytycznych, co przyspiesza proces degradacji skrobi i skutkuje zwiększonym stopniem jej wykorzystania.

LITERATURA

- [1] T. Kapela: Aktualne problemy gorzelnictwa rolniczego – red. B. Czupryński. Bydgoszcz, PM LOGO, 97-105, 2004.
- [2] P. Nigam, D. Singh: *Enzyme Microb. Technol.*, 17, 770 (1995).
- [3] G. Klosowski, D. Mikulski, B. Czupryński, K. Kotarska: *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 109, nr 5, 466 (2010).
- [4] M. Balcerek, K. Pielch-Przybylska: *Eur. Food Res. Technol.* 229, 141 (2009).
- [5] M. Kujawski, R. Ziobro, H. Gambus: *Acta Scientiarum Polonorum-Technologia Alimentaria*, 1, 2, 31 (2002).
- [6] K. Jarosz, J. Jarociński: *Gorzelnictwo i drożdżownictwo*, WSiP, Warszawa, 1994.
- [7] A. Salek: *Zesz. Nauk. ART Olsztyn, Techn. Alimentorum* 22 (1989).