

Edyta Lipińska, Sylwia Bonin, Rafał Leoniuk, Elżbieta Hać-Szymańczuk

WPŁYW SKŁADU PODŁOŻA FERMENTACYJNEGO I ZASTOSOWANYCH SZCZEPÓW DROŻDŻY NA PRZEBIEG FERMENTACJI ALKOHOLOWEJ ORAZ JAKOŚĆ SPIRYTUSU SUROWEGO

Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Oceny Żywności
Wydziału Nauk o Żywności Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
Kierownik: dr hab. M. Gniewosz, prof. SGGW

*Celem pracy była ocena wpływu składu podłoża fermentacyjnego i zastosowanych kultur drożdży *Saccharomyces cerevisiae* O₁₁ i *Kluyveromyces fragilis* na przebieg fermentacji alkoholowej i jakość spirytusu surowego.*

Do badań przygotowano sześć różnych podłoży fermentacyjnych: cztery z nich były mieszankami melasy i serwatki, a dwa pozostałe wykonano na bazie samej melasy oraz samej serwatki. Fermentację alkoholową prowadzono przez 7 dni w temperaturze 28°C, a następnie oznaczano ilość otrzymanego alkoholu.

Ilościową analizę składu zanieczyszczeń wykonano na chromatografie gazowym sprzężonym ze spektrometrią mas (GC/MS).

*Porównując końcową zawartość alkoholu w odfermentowanych podłożach mieszanych zaobserwowano, że zastąpienie wody wodociągowej serwatką w dawkach nie przekraczających 45g/100g zwiększa wydajność procesu. Warunkiem wykorzystania laktozy zawartej w serwatce jest dodatek do podłoża drożdży *Kluyveromyces fragilis*, które w przeciwieństwie do drożdży *S. cerevisiae* fermentują laktozę.*

Otrzymany spirytus surowy po fermentacji podłoży melasowych z dodatkiem serwatki, ze względu na dużą zawartość zanieczyszczeń nie nadaje się do produkcji wódek a jedynie może być wykorzystany do pozyskiwania biopaliw.

Hasła kluczowe: fermentacja alkoholowa, melasa, serwatka, zanieczyszczenia spirytusu.

Key words: an alcoholic fermentations, molasses, whey, pollutions in alcohol.

Przekształcenie cukrów w etanol zachodzi podczas fermentacji alkoholowej i jest procesem bardzo złożonym. Jest to ciąg wielu reakcji chemicznych przebiegających przy udziale odpowiednich enzymów wytwarzanych przez drożdże. Proces fermentacji alkoholowej rozpoczyna się od glikolizy (zwanej inaczej szlakiem *Embdena-Meyerhofa-Parnasa*). Powstały w glikolizie pirogronian jest transportowany do matriks mitochondrialnej przez przenośnik znajdujący się w błonie mitochondrialnej komórek drożdży. W matriks mitochondrialnej pirogronian jest oksydacyjnie dekarboksylowany przez kompleks enzymatyczny dehydrogenazy pirogronianowej do aldehydu octowego i CO₂. Z kolei aldehyd octowy jest przekształcany do alkoholu etylowego przy udziale enzymu dehydrogenazy alkoholowej (1).

W procesie fermentacji powstają także produkty uboczne fermentacji, takie jak: aldehydy, estry, kwasy organiczne i alkohole wyższe. Uważa się, że do spirytusu surowego przechodzi około połowy ogólnej ilości produktów ubocznych wytworzonych w czasie fermentacji (0,5% w stosunku do alkoholu etylowego zawartego w spiry图斯ie surowym) (2, 3).

W spiry图斯ie surowym stwierdzono występowanie około stu różnych związków chemicznych. Ilościowy i jakościowy skład tych zanieczyszczeń w dużym stopniu zależy od rodzaju surowców, z których wyprodukowano spirytus, rasy drożdży, oraz zastosowanej technologii przygotowania i fermentacji brzożki (2-5). Występowania ubocznych produktów fermentacji alkoholowej nie można uniknąć, ale często stosując właściwą technologię można znacznie ograniczyć ich ilość (6, 7).

Celem pracy była ocena wpływu składu podłoża fermentacyjnego i zastosowanych kultur drożdży *Saccharomyces cerevisiae* O₁₁ i *Kluyveromyces fragilis* na przebieg fermentacji alkoholowej i jakość spirytusu surowego.

MATERIAŁ I METODY

Do badań przygotowano 6 różnych podłoży fermentacyjnych o następującym składzie (tab. I.)

Tabela 1. Skład przygotowywanych do fermentacji podłoży

Table 1. Composition of the pre-fermentation substrates

Nr podłoża	Składniki [g/100g]		
	Melasa	Serwatka	Woda
1.	27	10	63
2.	27	23	50
3.	27	45	28
4.	27	73	0
5.	0	100	0
6.	27	0	73

Melasa charakteryzowała się ekstraktem 75°Błg oraz średnią zawartością sacharozy na poziomie 50%. Serwatkę (WSM „Ostrowia”) dodawano do podłoża fermentacyjnego jako roztwór sporządzony z 60g odwodnionej serwatki rozpuszczonej w litrze wody wodociągowej. Do badań wykorzystano dwa szczepy drożdży *Saccharomyces cerevisiae* O₁₁ i *Kluyveromyces fragilis* pochodzące z Muzeum Czystych Kultur Zakładu Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności.

Fermentację prowadzono przez 7 dni w temperaturze 28°C. Inokulum stanowiła 24h hodowla szczepów *Saccharomyces cerevisiae* O₁₁ i *Kluyveromyces fragilis* w ilości 5% (v/v). Aby stwierdzić, który wariant podłoża fermentacyjnego jest najkorzystniejszy do produkcji spirytusu po 7 dniach fermentacji oznaczano ilość otrzymanego alkoholu metodą areometryczną.

Do identyfikacji i ilościowej analizy związków chemicznych w uzyskanych próbkach spirytusu surowego wyrównano stężenie alkoholu za pomocą czystego spirytusu rektyfikowanego. Wydzielanie i koncentrację zawartych w destylatach związków chemicznych prowadzono w aparacie (Supelco, USA) z zastosowaniem mikroekstrakcji fazy stacjonarnej (SAME) oraz włókna ekstrakcyjnego (CAR/PDMS).

Po zakończeniu procesu wydzielania badanych związków chemicznych włókno przenoszono z kolbki z próbką do miejsca nastrzykowego chromatografu gazowego HP 6890, gdzie następowała termodesorpcja związków chemicznych a następnie ich rozdzielanie i detekcja w układzie GC/MS.

Identyfikację związków chemicznych przeprowadzono poprzez porównanie zarejestrowanych widm z widmami obecnymi w bazie danych NIST. Do identyfikacji wykorzystywano także czasy retencji zarejestrowanych związków.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Porównując końcową zawartość alkoholu w brzeczках pofermentacyjnych mieszanych zaobserwowano, że im więcej wody wodociągowej zostaje zastąpione serwatką, tym większa jest wydajność procesu, ale do pewnej granicy (tab. II).

Tabela II. Wyniki zawartości alkoholu dla różnych podłoży fermentacyjnych melasowych, melasowo-serwatkowych i serwatkowych

Table II. The results for the various alcoholic fermentation substrates molasses, molasses- whey and whey

Nr podłoża	Alkohol [%v/v]
1.	8,0
2.	9,0
3.	9,2
4.	2,2
5.	2,0
6.	7,9

Najwięcej alkoholu 9,0 i 9,2%(v/v) uzyskano z podłoża 3 i 4, czyli z dodatkiem 23g oraz 45g serwatki, natomiast dodatek 73g serwatki spowodował gwałtowny spadek do poziomu 2,2%(v/v). W przypadku podłoża przygotowanego tylko z serwatki odnotowano najmniejszą zawartość alkoholu 2,0%(v/v). Uzyskane wyniki potwierdzają spostrzeżenia *Tin* i *Mawson* (8), którzy stwierdzili, że produkcja etanolu z nie zagęszczonej serwatki nie jest ekonomicznie uzasadniona, ponieważ przy zawartości alkoholu w roztworze nie przekraczającej 2,0% destylacja jest zbyt kosztowna.

Kosikowski i *Wzorek* (9) stwierdzili, że podwyższenie stężenia serwatki, a tym samym stężenia laktozy przyczynia się do zwiększenia ilości otrzymanego alkoholu. Nie można jednak doprowadzić do zbyt dużego skoncentrowania cukrów.

Według *Wzorka* (10) badającego wykorzystanie serwatki do produkcji winiarskiej, nadmierne stężenie serwatki powoduje wzrost ciśnienia osmotycznego w podłożu fermentacyjnym i prowadzi do zahamowania aktywności drożdży.

Należy podkreślić, że warunkiem wykorzystania laktozy zawartej w serwatce jest dodatek do podłoża drożdży *Kluyveromyces fragilis*, które w przeciwieństwie do drożdży *S. cerevisiae* fermentują laktozę (9, 11).

W badanych próbkach zidentyfikowano od 15 do 25 związków chemicznych. W tabeli III przedstawiono zawartości ośmiu najczęściej występujących zanieczyszczeń spirytusu.

Tabela III. Charakterystyka uzyskanych destylatów ze względu na zawartość poszczególnych zanieczyszczeń

Table III. Characteristics of distillates obtained due to the content of individual pollutants

Zidentyfikowane związki chemiczne	Zawartość związku chemicznego [g/dm ³]					
	Próbka 1	Próbka 2	Próbka 3	Próbka 4	Próbka 5	Próbka 6
Aldehyd octowy	0,013	0,008	0,056	0,020	0,109	0,053
Alkohol fenylowo-etylowy	0,046	0,024	0,163	0,021	0,054	0,070
Octan etylu	0,492	0,343	0,068	0,219	0,300	0,160
Acetyl	0,038	0,097	0,044	0,026	0,226	0,075
3-metylo1-butanol	0,162	0,388	0,224	0,081	0,069	0,241
2-metylo1-butanol	0,066	0,052	0,104	0,009	0,208	0,143
Maślan etylu	0,120	0,079	0,326	0,621	0,014	0,231
Benzylonitryl	0,060	0,006	0,003	0,0008	0,017	0,024

Z przeprowadzonych badań wynika, iż skład chemiczny destylatów jest bardzo różnicowany w zależności od użytego podłoża w czasie fermentacji alkoholowej.

W badanych próbkach destylatów zaobserwowano przede wszystkim dużą zawartość fuzli, co stanowi poważne utrudnienie w otrzymywaniu spirytusu rektyfikowanego (tab. IV).

Tabela IV. Zestawienie zawartości głównych grup związków w spirytusie surowym uzyskanym z różnych podłoży

Table IV. Summary of the contents of the main groups of compounds in crude spirits derived from different substrates

Numer próbki	Zawartość aldehydów [g/dm ³]	Zawartość fuzli [g/dm ³]	Zawartość estrów [g/dm ³]
1.	0,051	0,701	0,226
2.	0,105	0,464	0,428
3.	0,100	0,491	0,397
4.	0,046	0,111	0,848
5.	0,335	0,137	0,331
6.	0,128	0,444	0,554

W próbkach nr 1, 2, 3 i 4 wynosiła ona ponad 0,4g/dm³. Najmniejszą ilość fuzli (0,111 i 0,137 g/dm³) ustalono w destylatach otrzymanych z procesu fermentacji podłoży nr 4 i 5, w których było najwięcej serwatki (73% i 100%),

a uzyskany alkohol nie przekroczył 2,2%(v/v). W porównaniu do ilości alkoholu, zawartość wyższych alkoholi w tych próbkach również była bardzo wysoka. Zatem można stwierdzić, że dodatek serwatki do podłoża melasowego prowadzi do wytworzenia większych ilości wyższych alkoholi określanych jako fuzle. Związane jest to ze zwiększoną zawartością białka (aminokwasów) w serwatce. Powstawanie alkoholi wyższych ma miejsce podczas metabolizmu drożdży, które odszczepiają z aminokwasów amoniak w celu syntezy własnego białka, a pozostałe reszty w postaci wyższych alkoholi są wydzielane z komórki np.: izobutanol tworzy się z alaniny, 3-metylobutanol z leucyny, 2-metylobutanol z izoleucyny (3).

Zawartość aldehydów w badanych destylatach mieściła się w przedziale od 0,046 do 0,335g/dm³. Według PN-74/A-79523 (12) zawartość aldehydów w spirytusie surowym nie może przekraczać 0,2 g/dm³. Wobec tego tylko próbka otrzymana z fermentacji podłoża 6 (100% serwatki) nie spełniała wymagań PN (12). W badaniach prowadzonych przez *Miecznikowskiego i Zielińską* (7) udowodniono, że poziom zawartości aldehydów w zacierze uzależniony jest od początkowego ekstraktu pozornego podłoża. W ramach niniejszej pracy taką tendencję zaobserwowano porównując ze sobą próbki 1, 2, 3 oraz 5 w których wraz ze wzrostem stężenia cukrów następował wzrost zawartości aldehydów.

Zawartość estrów w badanych spirytusach surowych była podobnie wysoka jak w przypadku fuzli i wynosiła od 0,226 do 0,848 g/dm³. Jednak nie stanowi to problemu, gdyż aldehydy i estry można łatwo usunąć, gdy stosuje się chemiczne metody oczyszczania za pomocą NaOH i KMnO₄. Poważny problem stanowią fuzle.

W procesie rektyfikacji usuwa się prawie 99% wyższych alkoholi. Jednak pozostawienie nawet 1% fuzli powoduje, iż taki alkohol nie nadaje się do celów spożywczych. Według PN-74/A-79523 (13) dopuszczalna zawartość fuzli w przeliczeniu na alkohol amyłowy powinna wynosić: nie więcej niż 0,005 g/dm³ (spirytus rektyfikowany zwykły), 0,002 g/dm³ (spirytus rektyfikowany wyborowy), 0,001 g/dm³ (spirytus rektyfikowany luksusowy). Ustalona w badanych próbkach spirytusu surowego ilość alkoholi wyższych nie gwarantuje właściwego oczyszczenia w procesie rektyfikacji.

WNIOSKI

1. Serwatka może być stosowana do produkcji spirytusu surowego jako surowiec do rozcieńczenia melasy.
2. Biorąc pod uwagę fakt, że jest ona trudnym do utylizacji produktem odpadowym przemysłu mleczarskiego wykorzystanie jej jest korzystne pod względem ekologicznym.
3. Otrzymany spirytus surowy po fermentacji podłoży melasowych z dodatkiem serwatki, ze względu na dużą zawartość zanieczyszczeń (przede wszystkim fuzli) nie nadaje się do produkcji wódek a jedynie może być wykorzystany do pozyskiwania biopaliw.

E. Lipińska, S. Bonin, R. Leoniuk, E. Hać-Szymańczuk

THE INFLUENCE OF FERMENT MEDIUM AND INVESTIGATED YEASTS FOR ALCOHOLIC FERMENTATIONS PROCESS AND QUALITY OF RAW ALCOHOL

Summary

The investigations of the influence of ferment medium and used yeast *Saccharomyces cerevisiae* O11, *Kluyveromyces fragilis* for an alcoholic fermentations and quality of raw alcohol were the aim of present work.

There were six different culture mediums: four of them were mixed molasses with whey, one of them was made based on isolated molasses and the second based on isolated whey. Alcoholic fermentation was carried out during 7 days at temperature of 28°C and then the amount of obtained alcohol was measured.

Quantitative analyses of pollution composition were made using a gas chromatograph coupled with spectroscopy of mass (GC/MS).

Comparing final content of alcohol in worts mixed obtained after fermentation it was investigated that replacement of particular water by whey when the dose does not exceed 45g/100g can increase productivity of the process. The condition using of lactose as a part of whey is added to molasses yeasts of *Kluyveromyces fragilis* which in opposition to *Saccharomyces cerevisiae* ferments to lactose.

The pure alcohol obtained after fermentation of molasses with addition of whey is not proper for vodka production because of too high content of pollutions. It could be used only for production of industrial alcohol and bio fuels.

PIŚMIENNICTWO

1. Schlegel H.G.: Mikrobiologia ogólna, Wydawnictwo Naukowe PWN, 1996; 337-343. - 2. Klosowski G., Czupryński B., Kotarska K., Wolska M.: Charakterystyka zanieczyszczeń chemicznych obniżających jakość spirytusu surowego (1), Przem. Ferm. i Owoc.-Warz., 2003; 47 (6): 20-21. - 3. Klosowski G., Czupryński B., Kotarska K., Wolska M.: Charakterystyka zanieczyszczeń chemicznych obniżających jakość spirytusu surowego (2), Przem. Ferm. i Owoc.-Warz., 2003; 47 (90): 37-38. - 4. Klosowski G., Czupryński B.: Kinetics of acetals and ester formation during alcoholic fermentation of various starchy raw materials with application of yeasts *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Food Engineering, 2006;72: 242-246. - 5. Czupryński B.: Wpływ rasy drożdży i enzymów na jakość żytniego spirytusu surowego i wywaru, Przem. Ferm. i Owoc.-Warz., 1994;(10): 17-21. - 6. Zielińska K., Miecznikowski A.: Wpływ wybranych etapów procesu technologicznego na zawartość ubocznych produktów fermentacji w spirytusie surowym. Przem. Ferm. i Owoc.-Warz., 1994; (7): 7-10. - 7. Miecznikowski A., Zielińska K.: Wpływ gęstości zacierów gorzelnicznych na jakość spirytusu surowego (2). Przem. Ferm. i Owoc.-Warz., 1997; 41 (6): 25-27. - 8. Tin C.S.F., Mawson A.J.: Ethanol production from whey in membrane recycle bioreactor. Process Biochem, 1993; 28:217-221. - 9. Kosikowski F.V., Wzorek W.: Whey wine from concentrates of reconstituted acid whey powder, Journal of Dairy Science, 1977; 60 (12):1982-1986. - 10. Wzorek W.: Badania nad fermentacyjnym wykorzystaniem koncentratu serwatki w technologii winiarskiej. Rozprawy Naukowe i Monografie, Wydawnictwo SGGW w Warszawie, 1981. - 11. Lachance M.A.: *Kluyveromyces* van der Walt mend. van der Walt. The yeast. A taxonomy study. Kurtzman C.P., Fell J.W., Elsevier, Amsterdam, 1998;233-235.- 12. PN-A-79523: 2002. Destylat rolniczy.-13.PN-A-79522:2001. Spirytus rektyfikowany.

Adres: 02-776 Warszawa, ul. Nowoursynowska 159c.