

Katarzyna KOTARSKA, Wojciech DZIEMIANOWICZ, Bogusław CZUPRYŃSKI

e-mail: katarzyna.kotarska@ibpr.s.pl

Zakład Technologii Gorzelnictwa i Odnawialnych Źródeł Energii, Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego, Bydgoszcz

## Wpływ dodatku stymulatorów na fermentację melasy oraz jakość uzyskiwanego spirytusu

### Wstęp

Melasa jako produkt uboczny, otrzymywany przy produkcji cukru z buraków cukrowych, jest surowcem stosunkowo tanim, łatwo dostępnym i może być wykorzystywana do produkcji etanolu. Fermentacji alkoholowej poddaje się melasę po jej rozcieńczeniu z uwagi na drożdże, którym należy zapewnić odpowiednie warunki do rozwoju. W trakcie procesu hydrolizy sacharoza zawarta w melasie rozkładana jest do monocukrów, które podlegają fermentacji alkoholowej. Proces ten odbywa się bez udziału preparatów enzymatycznych niezbędnych w przypadku surowców skrobiowych, w których skrobia zostaje rozłożona do cukrów fermentujących [Arshad i in., 2008].

Do prawidłowego rozwoju drożdży niezbędne są takie pierwiastki jak: azot, węgiel, fosfor, potas, magnez itp., w formie łatwo przyswajalnej, tzn. w takiej postaci, aby mogły one przejść przez błonę komórkową do jej wnętrza. Węglowodany znajdujące się w podłożu są nie tylko substratem w produkcji alkoholu, ale również stanowią źródło węgla do budowy nowych komórek drożdży.

Dodatek do podłoża stymulatorów w postaci związków mineralnych przyspiesza proces fermentacji alkoholowej oraz wpływa korzystnie na rozwój i rozmnażanie drożdży, poprzez dostarczenie im niezbędnej ilości pierwiastków.

Podczas fermentacji brzeczki melasowej obok etanolu, który jest głównym i pożądanym produktem końcowym powstaje również szereg produktów ubocznych spirytusu, tj. aldehydy, alkohole wyższe, estry, kwasy organiczne i inne [Eden i in., 2001; Shen i in., 2003]. Dodatek stymulatorów może wpłynąć na ograniczenie ich ilości.

Celem pracy było zbadanie wpływu dodatku wybranych stymulatorów na szybkość i wydajność procesu fermentacji brzeczek melasowych oraz jakość spirytusu uzyskiwanego z melasy.

### Materiał badań

**Surowiec:** do badań użyto melasy, która charakteryzowała się następującymi parametrami: pozorna zawartość suchej masy – 83,3°Bx, ciężar właściwy – 1,36 kg·dm<sup>-3</sup>, zawartość sacharozy – 49,22% oraz azot ogólny – 1,57%. Laboratoryjna wydajność alkoholu ze 100 kg surowca wyniosła 30 dm<sup>3</sup>·100 kg<sup>-1</sup>.

**Mikroorganizmy:** W procesie fermentacji alkoholowej zastosowano drożdże gorzelnicze rasy D<sub>2</sub> w postaci płynnej, przygotowane z czystych kultur na podłożu YPG z 2%-owym dodatkiem glukozy w ilości 250 cm<sup>3</sup>. Drożdże te znajdują się w kolekcji Zakładu Technologii Gorzelnictwa i Odnawialnych Źródeł Energii Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego w Bydgoszczy.

### Metody badań

Przygotowanie melasy do badań polegało na sporządzeniu brzeczki melasowej o gęstości 20°B<sub>lg</sub>. Po przeprowadzeniu pasteryzacji, brzeczkę schładzano i rozlewano do kolb fermentacyjnych. Podczas studzenia, ustalono wartość pH, za pomocą stężonego kwasu siarkowego, do poziomu 5,4÷5,6. Podczas hydrolizy nie stosowano żadnych preparatów enzymatycznych. Brzeczki melasową zaszczepiano drożdżami gorzelnicznymi D<sub>2</sub> oraz wzbogacano podłoże fermentacyjne związkami mineralnymi tj. siarczanem amonu (sa), siarczanem magnezu (sm), fosforanem amonu (fa) i pantotenianem wapnia (pw). Stymulatory procesu fermentacji dodawane do brzeczki aplikowano w formie pojedynczej – fosforan amonu (fa) lub jako mieszaninę związków mineralnych tj.

siarczanu amonu i fosforanu amonu (sa+fa) oraz siarczanu magnezu, fosforanu amonu i pantotenianu wapnia (sm+fa+pw). Proces fermentacji prowadzony był w temp. 38°C, przez 72 h.

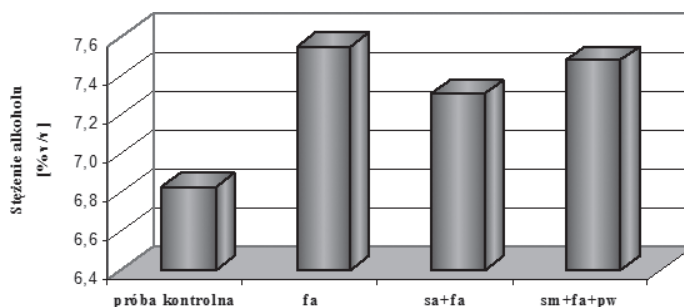
W trakcie oraz po zakończeniu procesu fermentacji, wykonywane były pomiary i oznaczenia stosowane powszechnie w przemyśle gorzelniczym, tj. określano: zawartość sacharozy w melasie, zawartość ekstraktu pozornego i rzeczywistego, pH, stężenie etanolu, zawartość cukrów bezpośrednio redukujących w wywarach. Średnie wyniki pomiarów i oznaczeń posłużyły do obliczenia wskaźników biotechnologicznych procesu fermentacji, m.in.: wydajności uzyskanego alkoholu (dm<sup>3</sup> A<sub>100</sub>/100 kg sacharozy).

Odfementowane zacierzy poddano destylacji na specjalnie skonstruowanym szklanym zestawie, ze szklaną kolumną destylacyjną wyposażoną w 26 półek przelewowych typu kapslowego. Analizę spirytusu surowego wykonano metodą kapilarną chromatografii gazowej przy użyciu chromatografu gazowego Hewlett Packard (HP 6890) z układem EPC, detektorem płomieniowo-jonizacyjnym FID i polarną kolumną kapilarną CP-WAX 57-CB (high polarity polyethylene glycol) firmy Chrompack o wymiarach 50 m/320 µm/0,20 µm.

### Wyniki i ich omówienie

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że poddanie fermentacji brzeczek melasowych, przy udziale drożdży D<sub>2</sub> oraz wybranych stymulatorów, przyczyniło się do uzyskania lepszych parametrów fermentacji – w porównaniu z próbą, w której nie zastosowano stymulatorów.

Analizując stężenia alkoholu stwierdzono, że dodatek symulatorów dał efekt uzyskania wyższych ilości alkoholu w porównaniu z próbą kontrolną (Rys. 1). Najwyższą wartość osiągnięto w próbie, w której zastosowano dodatek fosforan amonu (fa). Była ona wyższa o 10,5% – w stosunku do próby kontrolnej (Rys. 1). Natomiast przy zastosowaniu mieszaniny: siarczanu amonu i fosforanu amonu oraz siarczanu magnezu, fosforanu amonu i pantotenianu wapnia otrzymano wyższy poziom alkoholu odpowiednio o: 7,0% (sa+fa) oraz 9,5% (sm+fa+pw).



Rys. 1. Stężenie alkoholu po 72 h procesu fermentacji dla poszczególnych wariantów (fa – fosforan amonu; sa – siarczan amonu; pw – pantotenian wapnia)

Wzrostowi poziomu alkoholu w próbach (Tab. 1) przy zastosowaniu dodatku stymulatorów towarzyszyła wyższa o ok. 7÷11% sprawność procesu fermentacji, w stosunku do próby kontrolnej (83,97%) .

W tab. 1 zaprezentowano wszystkie wskaźniki biotechnologiczne fermentacji brzeczek melasowych. Analizując uzyskane wyniki można zaobserwować wpływ dodatku stymulatorów m.in. na wydajność alkoholu z sacharozy, która po 72 godzinach procesu kształtowała się na poziomie 61,15÷63,16 dm<sup>3</sup> A<sub>100</sub>/100 kg sacharozy, co stanowi wzrost

o 7÷10,5% – w stosunku do próby kontrolnej (57,14 dm<sup>3</sup> A<sub>100</sub>/100 kg sacharozy).

Tab. 1. Wskaźniki biotechnologiczne fermentacji alkoholowej brzeczki melasowych z dodatkiem oraz bez stymulatorów

Wskaźniki fermentacji	Godziny fermentacji, h	Rodzaj stymulatora			
		próba kontrolna	fa	sa+fa	sm+fa+pw
Wydajność alkoholu z sacharozy, dm <sup>3</sup> A <sub>100</sub> /100 kg sacharozy	24	18,65	16,73	17,99	17,99
	48	35,64	30,95	36,31	36,31
	72	<b>57,14</b>	<b>63,16</b>	<b>61,15</b>	<b>62,57</b>
Szybkość właściwa fermentacji, cm <sup>3</sup> A <sub>100</sub> /kg gluk. × h	24	7,38	6,62	7,12	7,12
	48	7,05	6,12	7,18	7,18
	72	<b>7,54</b>	<b>11,32</b>	<b>8,07</b>	<b>8,25</b>
Produktywność fermentacji, cm <sup>3</sup> A <sub>100</sub> /dm <sup>3</sup> brzeczki × h	24	0,93	0,83	0,90	0,90
	48	0,89	0,77	0,90	0,90
	72	<b>0,95</b>	<b>1,05</b>	<b>1,02</b>	<b>1,04</b>
Sprawność Fermentacji, %	72	<b>83,97</b>	<b>92,83</b>	<b>89,87</b>	<b>91,96</b>

Najwyższy wzrost wydajności alkoholu odnotowano w przypadku zastosowania fosforanu amonu (fa).

Również w przypadku pozostałych wskaźników biotechnologicznych fermentacji, tj., szybkości właściwej wytwarzania etanolu oraz produktywności fermentacji, zastosowanie stymulatorów wpłynęło na uzyskanie wyższych ich wartości po 72 h prowadzonego procesu, w stosunku do próby kontrolnej, tabela 1.

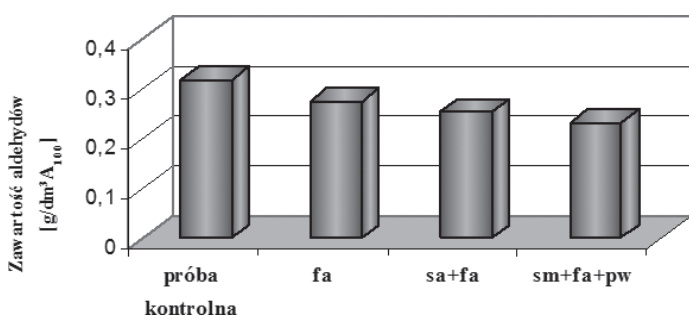
Korzystny wpływ oddziaływania stymulatorów na proces fermentacji przedstawiają też inni autorzy. Między innymi Jones i in., [1994] w badaniach swoich stwierdzili, iż dodatek stymulatorów do zacieru ma wpływ zarówno na wzrost komórek drożdży, jak i fermentację alkoholową, poprawiając tempo fermentacji i produkcję alkoholu.

### Analiza jakości otrzymanego spirytusu

Po zakończeniu fermentacji z doświadczalnych zacierów oddestyloowano alkohol, w celu oznaczenia produktów ubocznych w uzyskanym spirytusie.

Jednym z najważniejszych efektów jakie osiągnięto w tych badaniach był wpływ stymulatorów na poprawę jakości otrzymywanego spirytusu surowego.

Ilość aldehydów dopuszczalna przez Polską Normę dla spirytusów melasowych wynosi 0,3 g/dm<sup>3</sup> A<sub>100</sub> i jest trzykrotnie wyższa w stosunku do wymagań dla spirytusów zbożowych i ziemniaczanych. Zawartość aldehydów w spirytusie, uzyskanym z fermentacji brzeczki melasowych przy udziale drożdży D<sub>2</sub> oraz dodatku stymulatorów, kształtowała się na poziomie 0,235÷0,278 g·dm<sup>-3</sup> A<sub>100</sub>. (Rys. 2). We wszystkich trzech wariantach odnotowano obniżenie ilości związków karbonylowych w stosunku do próby kontrolnej, spełniając tym samym wymogi Polskiej Normy. W próbie doświadczalnej, w której zastosowano dodatek siarczanu magnezu, fosforanu amonu i pantotenianu wapnia (sm+fa+pw) stwierdzono niższą zawartość aldehydów o 26%, w stosunku do próby kontrolnej (0,319 g·dm<sup>-3</sup> A<sub>100</sub>).



Rys. 2. Zawartość aldehydów w uzyskanym spirytusie dla poszczególnych wariantów (fa – fosforan diamonu; sa – siarczan amonu; pw – pantotenian wapnia)

Potwierdzeniem wpływu, jaki wywierają aktywatory fermentacji na ograniczenie ilości aldehydów są badania Lafona-Lafourcade i in., [1984], w których udowodniono, że aktywatory zwiększają wykorzystanie aldehydu octowego, przez co następuje obniżenie ich stężenia w środowisku fermentacyjnym.

Ilość powstających alkoholi wyższych w przebadanych próbach była niska i wahała się w granicach 1,014÷2,314 g·dm<sup>-3</sup> A<sub>100</sub>. Dodatek stymulatorów do brzeczki melasowej spowodował zmniejszenie ilości alkoholi wyższych w spirytusie surowym o: 53% – w przypadku zastosowania mieszaniny siarczanu amonu i fosforanu amonu (sa+fa) i 37% – w przypadku mieszaniny siarczanu magnezu, fosforanu amonu i pantotenianu wapnia (sm+fa+pw).

Ilość tworzących się alkoholi wyższych jest bardzo istotna przy produkcji bioetanolu, gdyż wymagania jakościowe dla biokomponentów ściśle określają zakres występowania fuzli, tj. nie mogą przekraczać 2% [v/v]. Obniżenie ich zawartości w spirytusie surowym ma zatem ogromne znaczenie.

W żadnym z przebadanych spirytusów nie stwierdzono obecności akroleiny, co świadczy o dobrej jakości surowca oraz czystości mikrobiologicznej przygotowanych brzeczki. Zawartość estrów była niska i kształtowała się na poziomie: 0,019÷0,043 g·dm<sup>-3</sup> A<sub>100</sub>.

Kwasowość analizowanych spirytusów zawierała się w granicach 0,02÷0,07 g·dm<sup>-3</sup> A<sub>100</sub>. Moc kształtowała się na poziomie od 91,3÷92,9%.

### Wnioski

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że dodatek do brzeczki melasowej stymulatorów w postaci fosforanu amonu oraz mieszanin: siarczanu amonu i fosforanu amonu oraz siarczanu magnezu, fosforanu amonu i pantotenianu wapnia, wpłynął na intensyfikację fermentacji alkoholowej oraz uzyskanie lepszej jakości spirytusu surowego.

Najlepsze parametry oraz wskaźniki biotechnologiczne procesu fermentacji uzyskano w przypadku dodatku do brzeczki melasowej fosforanu amonu.

Dodatek stymulatorów do podłoża fermentacyjnego spowodował powstanie mniejszych ilości aldehydów w uzyskanym spirytusie, w stosunku do próby kontrolnej. Zawartość związków karbonylowych w porównaniu z próbą kontrolną zmniejszyła się o (13÷26)%, spełniając wymogi Polskiej Normy dla spirytusów melasowych.

Zastosowanie do brzeczki melasowej mieszaniny siarczanu amonu i fosforanu amonu oraz siarczanu magnezu, fosforanu amonu i pantotenianu wapnia było powodem powstania mniejszej ilości alkoholi wyższych w uzyskanym spirytusie o (37÷53)%, w porównaniu z próbą kontrolną.

### LITERATURA

- Arshad M., Chan Z.M., Khalil-ur-Rehman, Szach F.A., Rajoka M.I., 2008. Optimization of process variables for minimization of byproduct formation during fermentation of blackstrap molasses to ethanol at industrial scale. *Let. Appl. Microbiol.*, **47**, nr 5, 410-414. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2008.02446.x
- Eden A.L., Nederveld V., Drukker M., Benvenisty N. i Debourg A., 2001. Involvement of branched chain amino acid aminotransferases in the production of fusel alcohols during fermentation in yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **55**, 296-300. DOI: 1007/s002530000506
- Jones A.M., Ingledew W.M., 1994. Fuel alcohol production: appraisal of nitrogenous yeast foods for very high gravity wheat mash fermentation. *Process Biochemistry*, **29**, nr 6, 483-488. DOI: 10.1016/0032-9592(94)85017-8
- Jones A.M., Thomas K.C., Ingledew W.M., 1994. Ethanol fermentation of blackstrap molasses and sugarcane juice using very high gravity technology. *J. Agric. Food Chem.* **42**, nr 5, 1242-1246. DOI: 10.1021/jf00041a037
- Lafon-Lafourcade S., Geneix C., Ribereau-Gayon P., 1984. Inhibition of alcoholic fermentation of grape must by fatty acids produced by yeasts and their elimination by yeast ghosts. *Appl. Envir. Microb.* **47**, nr 6, 1246-1249.
- Shen H.Y., Moonjai N., Verstrepen K.J. i Delvaux F.R., 2003. Impact of attachment immobilization on yeast physiology and fermentation performance. *J. Am. Soc. of Brew. Chem.*, **61**, nr 2, 79-87. DOI: 10.1094/ASBCJ-61-0079