

EWELINA STRĄK, MARIA BALCEREK

## SŁODY JAKO ŹRÓDŁO ENZYMÓW AMYLOLITYCZNYCH W PROCESIE ENZYMATYCZNEJ HYDROLIZY SKROBI

### Streszczenie

Celem pracy było określenie: efektywności scukrzania skrobi zbożowej z wykorzystaniem słodów jako źródła amylaz oraz wydajności fermentacji alkoholowej z zastosowaniem drożdży rasy Ethanol Red. Zaciery gorzelnicze przygotowano metodą bezciśnieniowego uwalniania skrobi (BUS) z ziarna żyta niesłodowanego odmiany Dańkowskie Diament z 30-procentowym udziałem słodów – pszenicznego, żytniego i jęczmiennego. Dla porównania przeprowadzono fermentacje zacierów z żyta niesłodowanego, przygotowanych metodą BUS z zastosowaniem preparatów enzymatycznych pochodzenia mikrobiologicznego.

Na podstawie wyników badań stwierdzono, że enzymy słodowe umożliwiły uzyskanie zacierów słodkich o zawartości ekstraktu i cukrów ogółem zbliżonych do zacierów sporządzonych metodą BUS z udziałem  $\alpha$ -amylazy i glukoamylazy, obecnych w preparatach komercyjnych. Zaciery żytnie przygotowane z udziałem słodów pszenicznego i jęczmiennego odznaczały się wyższym stopniem scukrzania w porównaniu z próbami przygotowanymi wyłącznie z surowca niesłodowanego, jak i z udziałem siodu żytniego. Największą wydajność biosyntezy etanolu ( $83,6 \pm 91,95$  % wydajności teoretycznej) stwierdzono w zacierach żytnich scukrzanych słodem pszenicznym.

**Słowa kluczowe:** słody,  $\alpha$ -amylaza,  $\beta$ -amylaza, glukoamylaza, bezciśnieniowe uwalnianie skrobi (BUS), fermentacja

### Wprowadzenie

Ziarno zbóż może być dla przemysłu gorzelniczego zarówno surowcem podstawowym (głównym źródłem węglowodanów – skrobi), jak i pomocniczym w postaci siodu. Słód to skiełkowane ziarno zbóż stanowiące naturalne źródło enzymów amylolitycznych [13], reprezentowanych przez  $\alpha$ -amylazę – enzym upłynniający, dekstrynuujący i  $\beta$ -amylazę – enzym scukrzający, maltogenny. Enzymy te są niezbędne do prze-

---

*Mgr inż. E. Strąk, dr hab. inż. M. Balcerek, Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii, Wydz. Biotechnologii i Nauk o Żywności, Politechnika Łódzka, ul. Wólczańska 171/173, 90-924 Łódź.  
Kontakt: ewelina.strak@dokt.p.lodz.pl*

przewodzenia hydrolizy skrobi w trakcie procesu tzw. zacierania do cukrów podlegających fermentacji.

W Polsce zacieranie z wykorzystaniem słodu gorzelniczego pozyskiwanego z ziarna jęczmienia było powszechnie stosowane w praktyce gorzelniczej do lat 80. XX wieku. W czasie tego procesu składniki surowca zacieranego i słodu podlegają konwersji do form przyswajalnych przez drożdże – skrobia zostaje zhydrolizowana do cukrów (maltozy i glukozy) podlegających fermentacji, białka ulegają hydrolizie do peptydów i aminokwasów [11].

Rozwój biotechnologii umożliwił wprowadzenie preparatów handlowych zawierających enzymy amylolityczne pochodzenia mikrobiologicznego w zastępstwie słodu. Należą do nich  $\alpha$ -amylazy bakteryjne (*Bacillus licheniformis*, *Bacillus stearothermophilus*) oraz glukoamylazy pleśniowe (*Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*). Wśród najistotniejszych zalet stosowania preparatów enzymatycznych w procesie produkcji spirytusu wymienia się: kilkudziesięciokrotnie wyższą i stabilną aktywność enzymatyczną w porównaniu ze sładem, czystość mikrobiologiczną, termostabilność  $\alpha$ -amylazy bakteryjnej oraz odporność amyloglukozydazy na niskie pH zacierów, co umożliwia głębsze odfermentowanie zacierów [7]. Wiele z wymienionych cech enzymów amylolitycznych pochodzenia mikrobiologicznego to konsekwencja wykorzystywania do ich pozyskania mikroorganizmów zmodyfikowanych genetycznie. Jest to podejście przeciwne do promowanej w ostatnich latach produkcji ekologicznej, rozumianej jako system zarządzania gospodarstwem i produkcją żywności, uwzględniający najkorzystniejsze dla środowiska praktyki, ochronę zasobów naturalnych i metody produkcji odpowiadające wymaganiom konsumentów preferujących wyroby wytwarzane przy użyciu naturalnych substancji i procesów [22]. Przetwórstwo oraz dalsze etapy postępowania z ekoproduktami mają na celu zachowanie w jak największym stopniu pierwotnej jakości ekologicznych płodów rolnych. W przetwórstwie zakazane jest wykorzystywanie mikroorganizmów zmodyfikowanych genetycznie, jak i produktów otrzymywanych z ich udziałem [20].

Wymagania stawiane produktom ekologicznym w kontekście produkcji spirytusu i wyrobów spirytusowych skłaniają do przekonania, że wskazane jest wykorzystanie do scukrzania skrobi enzymów amylolitycznych, wytworzonych jednak bez udziału mikroorganizmów zmodyfikowanych genetycznie. Zasadne jest wytwarzanie ekologicznych wyrobów spirytusowych, co wskazuje na potrzebę powrotu do zacierania skrobi z wykorzystaniem sładów. Taki kierunek przetwórstwa umożliwi wytwarzanie nowych, oryginalnych trunków o charakterze regionalnym [19].

Celem pracy było określenie efektywności scukrzania skrobi zbożowej z wykorzystaniem sładów jako źródła enzymów amylolitycznych oraz ocena wydajności fermentacji i składu chemicznego otrzymanych destylatów rolniczych.

## Material i metody badań

W badaniach wykorzystano żyto odmiany Dańkowskie Diament („Danko” Hodowla Roślin Sp. z o.o., Chorynia) oraz trzy rodzaje sładów: jęczmienny (Abbey Malt®), pszeniczny jasny (Distillery Wheat Malt) oraz żytni (Rye Malt; Weyermann Malt, Niemcy). Według deklaracji producenta słody cechowała następująca siła diastatyczna: pszeniczny – powyżej 250 WK, żytni – 200 ÷ 250 WK oraz jęczmienny – poniżej 100 WK [10]. Skala Windisha-Kolbacha (WK) wyraża wytworzenie 1 g maltozy z roztworu skrobi przez enzymy zawarte w 100 g badanego sładku w warunkach określonych metodą [17]. Ponadto producent zapewniał, że słody nie pochodziły z surowców genetycznie zmodyfikowanych i były zgodne z normami EC (EG) nr 1829/2003 [27], 1830/2003 [28], 49/2000 [29] i 50/2000 [30]. Wszystkie surowce zostały przebadane pod względem zawartości pestycydów, mikotoksyn i metali szkodliwych (spełniały wymagania norm: EC (EG) 165/2010 [31] i 369/2005[32]).

Do przygotowania zacierów słodkich z żyta niesłodowanego z udziałem sładów zbożowych wykorzystano cylindryczny zbiornik umieszczony w łaźni wodnej, wyposażony w termometr i mieszadło. Upřednio surowce zmielono za pomocą młynka Fidibus XL (KoMo, Niemcy) wyposażonego w żarna korundowo-ceramiczne, pozwalające na uzyskanie śruty o wielkości cząstek nieprzekraczającej 1,5 mm [11]. Zmielone ziarno żyta (70 % m/m) oraz słody zbożowe (30 % m/m) mieszano z wodą (3,5 l wody na 1 kg śruty zbożowej) i ogrzewano do temp. 60 °C. Po uzyskaniu założonej temperatury warunki te utrzymywano przez 60 min w celu upłynnienia i scukrzenia skrobi. Następnie zacier schładzano do temp. 30 °C oraz dokonywano korekty pH do wartości 4,5 przy użyciu roztworu kwasu siarkowego(VI) (25 % m/m).

W przypadku zacierania z wykorzystaniem preparatów enzymatycznych zmielone ziarno żyta niesłodowanego mieszano z wodą w proporcjach analogicznych jak wyżej, po czym mieszaninę ogrzewano do temp. 90 °C. Po jej osiągnięciu dodawano preparat upłynniający Termamyl S.C (termostabilna  $\alpha$ -amylaza, *Bacillus licheniformis*) w dawce 0,13 ml/kg skrobi. Warunki te utrzymywano przez 60 min. Następnie medium schładzano do temp. 60 °C i dodawano preparat scukrzający San Extra L. (glukoamylaza, *Aspergillus niger*) w ilości 0,6 ml/kg skrobi.

Do fermentacji zacierów stosowano suszone drożdże gorzelnicze *Saccharomyces cerevisiae* rasy Ethanol Red (Lesaffre, Francja) w ilości 0,3 g/dm<sup>3</sup>. Po wstępnym uwodnieniu i dezynfekcji (zakwaszenie wodnej zawiesiny drożdży roztworem kwasu siarkowego(VI) o stężeniu 25 % m/m do pH 2,0 i pozostawienie przez 15 min w temp. 20±2 °C) mleczko drożdżowe dodawano do zacierów słodkich. Zacier wzbogacano dodatkiem wodnego roztworu (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,2 g/dm<sup>3</sup> zacieru) jako źródła azotu i fosforu dla drożdży [23], po czym dokładnie mieszano. Fermentacje prowadzono systemem 3-dobowym w temp. 28 ÷ 30 °C, dokonując okresowego mieszania zacierów. Próby fermentacyjne przeprowadzono w dwóch powtórzeniach.

Przebieg procesu kontrolowano przez pomiar odfermentowania pozornego i rzeczywistego stężenia alkoholu etylowego oraz cukrów i dekstryn pozostałych po fermentacji.

Wydzielenie alkoholu etylowego z odfermentowanych zacierów prowadzono za pomocą zestawu laboratoryjnego składającego się z czaszy grzejnej, kolby destylacyjnej, chłodnicy Liebiga, termometru i odbieralnika. Destylację prowadzono do całkowitego wydzielenia alkoholu, kontrolując moc destylatu za pomocą refraktometru cyfrowego PET-109 (Atago, Japonia). Analizę surowców i zacierów wykonywano według metod zalecanych w gorzelnictwie [14]. W zacierach słodkich oznaczano: ekstrakt ogólny za pomocą areometru wyskalowanego w procentach (m/m) sacharozy, kwasowość wyrażoną w stopniach Delbrücka (1 °D odpowiada 1 ml 1 mol/l roztworu NaOH zużytego do zmiareczkowania 20 ml przesączonego zacieru), stężenie cukrów redukujących i dekstryn oraz stopień scukrzenia. Stopień scukrzenia zacierów słodkich oznaczano jako stosunek zawartości cukrów redukujących do cukrów ogółem, czyli oznaczonych po hydrolizie kwasowej.

W zacierach odfermentowanych oznaczano: ekstrakt pozorny (w obecności alkoholu), ekstrakt rzeczywisty, zawartość etanolu oraz stężenie cukrów i dekstryn pozostałych po fermentacji.

Analizę składu chemicznego otrzymanych destylatów obejmującą oznaczenie stężenia aldehydu octowego oraz metanolu wykonywano przy użyciu chromatografu gazowego (Agilent 7890A, USA) wyposażonego w detektor płomieniowo-jonizacyjny (FID), z zastosowaniem kolumny HP-Innowax (60 m × 0,32 mm × 0,5 μm), sprzężonego ze spektrometrem mas (Agilent MSD 5975C, USA) z pojedynczym kwadrupolem i kolumną kapilarną HP-5 MS (30 m × 0,25 mm × 0,25 μm).

Wyniki badań poddano ocenie statystycznej przy użyciu programu Origin 7.5. Zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji (ANOVA). Istotność różnic pomiędzy wartościami średnimi weryfikowano testem t-Studenta na poziomie istotności  $p = 0,05$ .

## Wyniki i dyskusja

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że słody użyte w doświadczeniu odznaczały się zbliżoną zawartością suchej masy w granicach 95,00 ÷ 95,60 % (tab. 1) Dopuszczalna ich wilgotność nie powinna przekraczać 5 % [5], zatem słody spełniały ten warunek. W przypadku ziarna żyta odmiany Dańkowskie Diament zawartość suchej masy wynosiła średnio 91,20 %. Uzyskane wyniki świadczą o małej wilgotności surowców (zarówno słodów, jak i ziarna), co pozwala na ich bezpieczne magazynowanie.

Tabela 1. Charakterystyka chemiczna surowców

Table 1. Chemical profile of raw material

Wyszczególnienie Itemization	Surowiec / Raw material			
	Żyto Dań- kowskie Diament Dańkowskie Diament rye cv.	Słód pszeniczny Wheat malt	Słód żytni Rye malt	Słód jęczmienny Barley malt
Sucha masa Dry mass [%]	91,20 <sup>a</sup> ± 0,10	95,00 <sup>b</sup> ± 0,15	95,30 <sup>bc</sup> ± 0,23	95,60 <sup>c</sup> ± 0,31
Białko ogółem* [% s.s.] Total protein* [% d.m.]	10,35 <sup>c</sup> ± 0,22	10,05 <sup>c</sup> ± 0,28	8,45 <sup>a</sup> ± 0,09	9,38 <sup>b</sup> ± 0,13
Cukry redukujące [g glukozy/100 g surowca] / Reducing sugars [g glucose/100 g of raw material]	1,47 <sup>a</sup> ± 0,03	18,89 <sup>d</sup> ± 0,07	17,61 <sup>c</sup> ± 0,07	16,57 <sup>b</sup> ± 0,02
Skrobiowość [g/100 g surowca] Starch content [g/100 g of raw material]	62,10 <sup>d</sup> ± 0,42	50,50 <sup>a</sup> ± 0,36	54,27 <sup>c</sup> ± 0,86	52,92 <sup>b</sup> ± 0,72

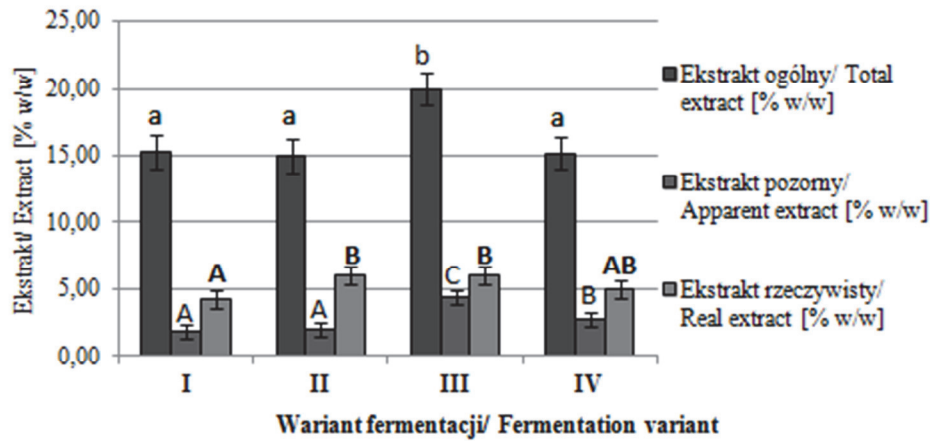
Objaśnienia / Explanatory notes:

Współczynniki przeliczeniowe azotu na białko: / Nitrogen-to-protein conversion factors: 6,25 – słód jęczmienny / barley malt; 5,7 – żyto niesłodowane / unmalted rye; 6,25 – słód żytni i pszeniczny / rye malt and wheat malt.

W tabeli przedstawiono wartości średnie ± odchylenia standardowe / Table shows mean values ± standard deviations; a, b, c – wartości średnie oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie przy  $p < 0,05$  / mean values denoted with different letters differ statistically significantly at  $p < 0.05$ .

Ziarno żyta odmiany Dańkowskie Diament odznaczało się większą zawartością białka w porównaniu ze słodami. Przyczyną tego jest wykorzystywanie w fazie kiełkowania części białka zawartego w surowcu, z którego został wyprodukowany słód, na rozwój korzonków zarodkowych [24]. W przypadku słodów wykazano, że zawartość białka pozytywnie wpływa na siłę diastatyczną słodu [6]. Z uwagi jednak na proces gorzelniczy duża zawartość białka w ziarnie zbóż nie jest pożądana, gdyż powoduje nadmierne pienienie zacierów [11, 12].

Stwierdzono istotną ( $p < 0,05$ ) różnicę między średnią zawartością cukrów redukujących w słodach ( $16,57 \div 18,89$  g/100 g) i w życie niesłodowanym ( $1,47 \div 1,47$  g/100 g). Według danych literaturowych [15] podczas procesu słodowania ziarna zawartość cukrów wzrasta kilkukrotnie, co jest efektem działania amylaz w nich zawartych. We wszystkich badanych surowcach zbożowych skrobiowość kształtowała się na wysokim poziomie ( $50,50 \div 62,10$  g/100 g), spełniającym wymagania stawiane surowcom gorzelniczym.



Objaśnienia / Explanatory notes:

I – żyto Diament / Diament rye cv.; II – żyto Diament (70 %) + słód pszeniczny (30 %) / Diament rye cv. (70 %) + wheat malt (30 %); III – żyto Diament (70 %) + słód żytni (30 %) / Diament rye cv. (70 %) + rye malt (30 %); IV – żyto Diament (70 %) + słód jęczmienny (30 %) / Diament rye cv. (70 %) + barley malt (30 %); Na rysunku przedstawiono wartości średnie (w postaci słupków) i odchylenia standardowe (w postaci odcinków) / Figure shows mean values (bars) and standard deviations (line segments);

a, b, c – wartości średnie ekstraktu ogólnego oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie przy  $p < 0,05$  / mean values of total extract denoted with different letters differ statistically significantly at  $p < 0.05$ ; A, B, C – wartości średnie ekstraktu pozornego oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie przy  $p < 0,05$  / mean values of apparent extract denoted with different letters differ statistically significantly at  $p < 0.05$ ; A, B, C – wartości średnie ekstraktu rzeczywistego oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie przy  $p < 0,05$  / mean values of real extract denoted with different letters differ statistically significantly at  $p < 0.05$ .

Rys. 1. Ekstrakty zacierów słodkich i odfermentowanych

Fig. 1. Extracts of sweet and fermented mashes

Ekstrakt zacierów z żyta odmiany Diament z 30-procentowym udziałem słodów pszenicznego i jęczmiennego był zbliżony do ekstraktu zacieru sporządzonego wyłącznie z żyta niesłodowanego ( $p < 0,05$ ). Znacznie bardziej ekstraktywne okazały się zacierzy żytnie z 30-procentowym udziałem słodu żytniego (średnio 20,00 %, m/m) – rys. 1. Poziom ekstraktu może być warunkowany zawartością suchej masy słodu, gdyż po porównaniu jej z zawartością skrobi oraz białka może być również wskaźnikiem zawartości substancji niepodlegających fermentacji czy utrudniających prowadzenie procesu, jak np. polisacharydy nieskrobiowe [4]. Konsekwencją zwiększenia gęstości zacierów był wzrost stężenia cukrów.

Tabela 2. Właściwości fizykochemiczne zacierów słodkich

Table 2. Physical-chemical properties of sweet mashes

Surowiec Raw material		Kwasowość Acidity [°D]	Zawartość cukrów redukujących Content of reducing sugars [g glukozy* lub maltozy**/100 ml zacieru / [g of glucose* or maltose**/100 ml of mash]	Zawartość dekstryn Content of dextrins [g /100 ml zacieru] [g/100 ml of mash]	Stopień scukrzenia Saccharification degree [%]
Żyto Diament Diament rye cv.		0,43 <sup>a</sup> ± 0,01	5,62 <sup>a</sup> ± 0,18 *	6,49 <sup>c</sup> ± 0,25	43,80 <sup>a</sup> ± 0,75
70% Żyto Diament i 30% Słód 70% of Diament rye cv. and 30% of malt	Słód pszeniczny Wheat Malt	0,46 <sup>a</sup> ± 0,03	11,22 <sup>c</sup> ± 0,44 **	1,32 <sup>a</sup> ± 0,05	84,49 <sup>c</sup> ± 0,53
	Słód żytni Rye malt	0,68 <sup>b</sup> ± 0,03	10,04 <sup>b</sup> ± 0,35 **	4,44 <sup>b</sup> ± 0,18	64,77 <sup>b</sup> ± 0,29
	Słód jęczmienny Barley malt	0,67 <sup>b</sup> ± 0,01	10,76 <sup>bc</sup> ± 0,35 **	1,37 <sup>a</sup> ± 0,04	83,74 <sup>c</sup> ± 0,55

Objaśnienia / Explanatory notes:

W tabeli przedstawiono wartości średnie ± odchylenia standardowe / Table shows mean values ± standard deviations; a, b, c – wartości średnie oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie przy  $p < 0,05$  / mean values denoted with different letters differ statistically significantly at  $p < 0.05$ .

Zawartość cukrów redukujących powstających podczas zacierania słodami (10,04 ÷ 11,22 g maltozy/100 ml zacieru) była ponad 2-krotnie i istotnie ( $p < 0,05$ ) większa od średniej zawartości tych cukrów w zacierze z samego żyta (5,62 g glukozy/100 ml zacieru). Zacierzy z udziałem słodów pszenicznego i jęczmiennego odznaczały się wyższym stopniem scukrzenia (83,74 ÷ 84,49 %) w porównaniu z zacierem ze słodem żytnim (64,77 %). Najmniejszym stopniem scukrzenia (43,80 %) charakteryzował się zacier z żyta niesłodowanego (tab. 2).

Zacierzy słodkie odznaczały się zróżnicowaną kwasowością w granicach od 0,43 °D w zacierze żytnim scukrzonym preparatami enzymatycznymi do 0,68 °D w zacierze sporządzonym z mieszanki żyta niesłodowanego (70 %) i słodu żytniego (30 %) – tab. 2.

Zacier odfermentowany z żyta Dańkowskie Diament (przygotowany z udziałem preparatów enzymatycznych) charakteryzował się ekstraktem pozornym na poziomie 1,85 % (m/m). Z kolei w próbkach z udziałem słodów wartości tego parametru zawierały się w przedziale 2,00 ÷ 4,40 % (m/m) – rys. 1. Wzrost ten może być związany z powstaniem produktów ubocznych fermentacji. O obecności związków innych niż cukry i etanol może świadczyć zmiana kwasowości spowodowana np. wydzielającym

się podczas fermentacji ditlenkiem węgla, obecnością bakterii kwaszących bądź wydzieleniem przez drożdże związków kwasowych, będących produktami ubocznymi ich metabolizmu. Wzrost kwasowości zacierów wraz ze wzrostem stężenia etanolu powoduje powolne hamowanie fermentacji [26].

Tabela 3. Właściwości fizykochemiczne zacierów odfermentowanych

Table 3. Physical-chemical properties of mashes after fermentation

Surowiec Raw material		Kwasowość Acidity [°D]	Zawartość cukrów redukujących Content of reducing sugars [g glukozy* lub maltozy**/100 ml zacieru / [g of glucose* or maltose**/100 ml of mash]	Zawartość dekstryn Content of dextrins [g /100 ml zacieru] [g/100 ml of mash]	Stopień scukrzenia Saccharification degree [%]
Żyto Diament / Rye Diament cv.		1,05 <sup>a</sup> ± 0,02	6,20 <sup>a</sup> ± 0,04 *	0,17 <sup>a</sup> ± 0,07	0,52 <sup>a</sup> ± 0,07
70% Żyto Diament I 30% Słód 70% of Diament_rye cv. and 30% of malt	Słód pszeniczny Wheat Malt	1,22 <sup>b</sup> ± 0,05	7,20 <sup>d</sup> ± 0,04 **	0,23 <sup>a</sup> ± 0,05	0,80 <sup>b</sup> ± 0,04
	Słód żytni Rye malt	1,62 <sup>c</sup> ± 0,07	6,60 <sup>b</sup> ± 0,01**	0,43 <sup>c</sup> ± 0,03	1,47 <sup>c</sup> ± 0,02
	Słód jęczmienny Barley malt	1,28 <sup>b</sup> ± 0,03	7,10 ± 0,04c**	0,34 <sup>b</sup> ± 0,02	1,58 <sup>d</sup> ± 0,01

Objaśnienia jak pod tab. 2. / Explanatory notes as in Tab. 2.

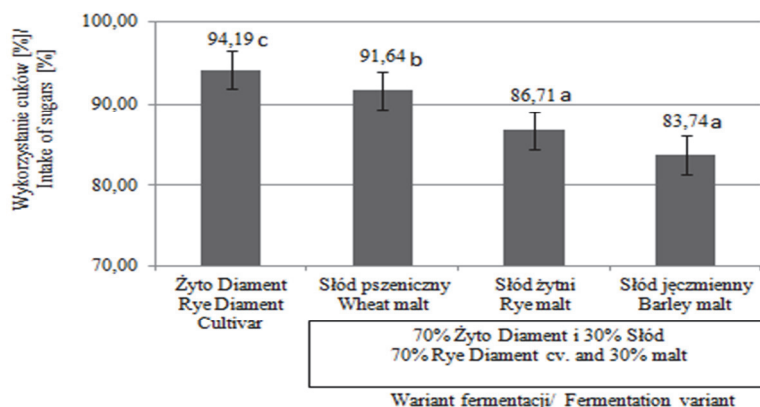
Stwierdzono ok. 5-krotnie niższe stężenie cukrów redukujących w zacierach odfermentowanych w porównaniu z zacierami słodkimi. Świadczy to o prawidłowym przebiegu procesu. Najmniejszym stężeniem cukrów redukujących i dekstryn odznaczał się zacier z żyta niesłodowanego, scukrzanego preparatami amylolytycznymi (tab. 3). Wyższe stężenia dekstryn pozostałych w zacierach fermentowanych z udziałem słodów to najprawdopodobniej efekt hamowania aktywności amylaz przez relatywnie wysokie stężenia cukrów w zacierach słodkich [2].

Wykazano, że spośród zacierów odfermentowanych najwięcej etanolu zawierały zacierze scukrzane słodem pszenicznym i jęczmiennym, a najmniej – próba przygotowana z żyta bez udziału słodów.

Największe wykorzystanie cukrów w przypadku zacierów z dodatkiem słodów zaobserwowano w zacierach sporządzonych z udziałem słodu pszenicznego (91,64 %) i było ono zbliżone ( $p < 0,05$ ) do wykorzystania cukrów w zacierze z surowca niesłodowanego (94,19 %). W pozostałych próbkach fermentacyjnych wskaźnik ten wynosił od 83,74 % w zacierze z udziałem słodu jęczmiennego do 91,64 % w zacierze z dodatkiem słodu żytniego (rys. 2). Uzyskane wyniki potwierdzają wcześniejsze obserwacje



autorów dotyczące wykorzystania sładów jako źródła enzymów w procesie otrzymywania destylatów zbożowych [1].



Objaśnienia: / Explanatory notes:

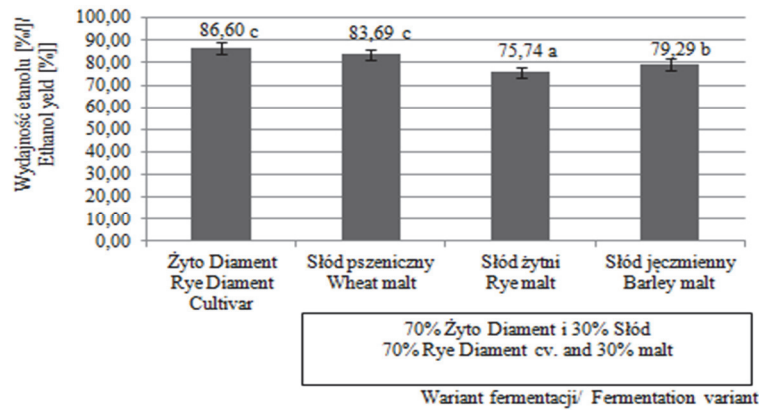
Na rysunku przedstawiono wartości średnie (w postaci słupków) i odchylenia standardowe (w postaci odcinków) / Figure shows mean values (bars) and standard deviations (line segments); a, b, c - wartości średnie oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie przy  $p < 0,05$ / mean values denoted with different letters differ statistically significantly at  $p < 0.05$ .

Rys. 2. Wykorzystanie cukrów w procesie fermentacji zacierów zbożowych

Fig. 2. Intake of sugars during fermentation process of cereal mashes

Wydajność biosyntezy etanolu kształtowała się od 75,74 % w zacierze z 30-procentowym udziałem sładów żytniego do 83,69 % wydajności teoretycznej w zacierze z dodatkiem sładów pszenicznego. Zaobserwowano, że próby fermentacyjne przygotowane z udziałem sładów pszenicznego osiągały największą wydajność etanolu w stosunku do pozostałych prób fermentacyjnych ( $p > 0,05$ ) i nieznacznie odbiegały od wydajności tego alkoholu w zacierze z surowca niesłodowanego. Najmniejszą wydajność fermentacji zaobserwowano w przypadku zacieru z dodatkiem sładów żytniego (rys. 3). Uzyskane wyniki są zgodne z naszymi wcześniejszymi obserwacjami autorów dotyczącymi przydatności tych sładów do otrzymywania destylatów rolniczych [2].

Ocena wskaźników fermentacji prowadzi do obserwacji, że w zacierze z udziałem sładów żytniego, mimo stosunkowo niskiej wydajności etanolu (75,74 %), nastąpiło duże wykorzystanie cukrów (86,71 %). Przyczyną tego zjawiska może być obecność w sładzie żytnim związków hamujących aktywność fermentacyjną drożdży, a tym samym oddziałujących niekorzystnie na przebieg fermentacji mimo wysokiej aktywności enzymatycznej tego sładów [9].



Objaśnienia jak pod rys. 2. / Explanatory notes as in Fig. 2.

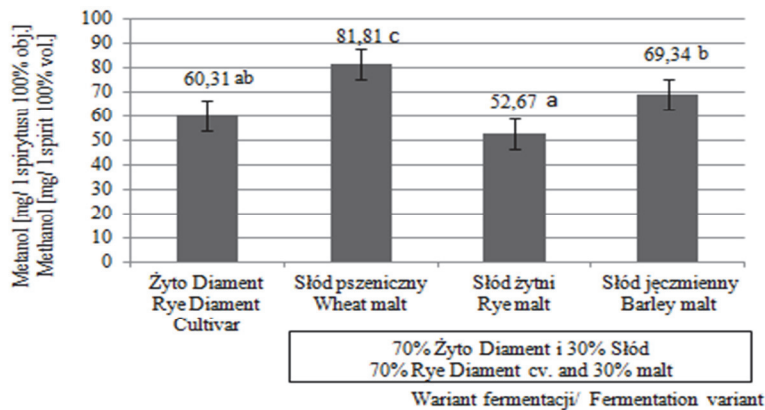
Rys. 3. Wydajność biosyntezy etanolu w procesie fermentacji zacierów zbożowych

Fig. 3. Efficiency of ethanol biosynthesis during fermentation process of cereals mashes

W przypadku wykorzystania do zacierania skrobi żytniej słodowanego ziarna jęczmienia, które ma okrywę nasienną powodującą trudności w procesie fermentacji zacierów i destylacji [16], wydajność etanolu różniła się statystycznie istotnie ( $p < 0,05$ ) od uzyskanej z samego żyta, jak i z żyta z dodatkiem słodu pszenicznego. Prawdopodobnie jest to także efekt relatywnie niskiej aktywności słodu jęczmiennego [10].

Postęp w rozwoju biotechnologii umożliwił poszerzenie oferty handlowej słodów o tzw. słody diastatyczne, charakteryzujące się wyższą aktywnością enzymatyczną, co skłania do prowadzenia dalszych badań w celu oceny zarówno wydajności procesu fermentacji alkoholowej, jak i jakości destylatów.

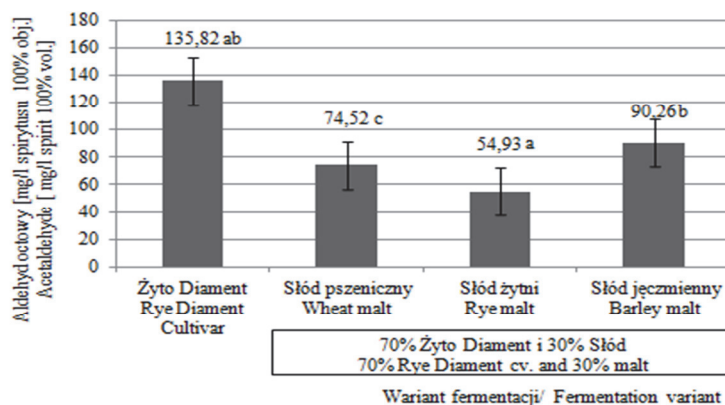
Na jakość destylatu wpływ ma ilość produktów ubocznych fermentacji w nim zawarta. W analizach destylatów najczęściej oznaczanymi produktami ubocznymi są metanol i aldehyd octowy [3]. Metanol jest obecny we wszystkich destylatach rolniczych z wyjątkiem spirytusu wytwarzanego z melasy. Największa zawartość metanolu cechuje spirytusy owocowe, natomiast w zbożowych jego ilość jest śladowa. Związane jest to z zawartością substancji pektynowych w owocach, z których ten związek powstaje [25]. Zawartość metanolu w destylatach do produkcji okowit zbożowych nie powinna przekraczać 200 g/hl spirytusu o stężeniu 100 % obj. Istnieją jednak różnice w dopuszczalnych stężeniach metanolu w zależności od gatunku surowca [21].



Objaśnienia jak pod rys. 2. / Explanatory notes as in Fig. 2.

Rys. 4. Zawartość metanolu w otrzymanych destylatach zbożowych

Fig. 4. Content of methanol in cereal distillates produced



Objaśnienia jak pod rys. 2. / Explanatory notes as in Fig. 2.

Rys. 5. Zawartość aldehydu octowego w otrzymanych destylatach zbożowych

Fig. 5. Content of acetaldehyde in cereal distillates produced

W próbach otrzymanych destylatów największą zawartością metanolu (81,81 mg/l spirytusu o stężeniu 100 % obj.) odznaczał się spirytus uzyskany z zacieru sporządzonego z udziałem 30-procentowego słodu pszenicznego. Najmniej alkoholu metylowego (52,67 mg/l spirytusu o stężeniu 100 % obj.) zawierał destylat otrzymany po fermentacji zacieru o składzie: 70 % żyta niesłodowanego i 30 % słodu żytniego (rys. 4). Mimo statystycznie istotnych różnic pod względem zawartości tego związku

w badanych spirytusach surowych, wszystkie spełniały wymagania dotyczące destylatów zbożowych [20].

Związkiem, którego nadmierne stężenie może wpływać negatywnie na smak i zapach spirytusu, jest aldehyd octowy. Stężenie aldehydów w spirytusach uzależnione jest od rodzaju i jakości surowca oraz warunków prowadzenia fermentacji, takich jak: temperatura, pH oraz stężenie cukrów, które wpływają na przemianę aldehydu octowego w etanol [1, 8]. Zawartość aldehydów w spirytusach surowych podawana jest w przeliczeniu na aldehyd octowy i według wymagań normatywnych [18] nie powinna przekraczać 0,1 g/l spirytusu o stężeniu 100 % obj. Spośród uzyskanych destylatów największą zawartość aldehydu octowego (135,82 mg/l spirytusu o stężeniu 100 % obj.) oznaczono w spirytusie otrzymanym po fermentacji zacieru scukrzanego preparatami enzymatycznymi. Wszystkie destylaty otrzymane z prób fermentacyjnych z dodatkiem sładów zawierały mniejsze, aczkolwiek zróżnicowane ( $p < 0,05$ ), stężenia tego związku. Najmniejszą zawartość aldehydu octowego (54,93 mg/l spirytusu o stężeniu 100 % obj.) oznaczono w destylacie pochodzącym z zacieru sporządzonego z dodatkiem sładu żytniego, zaś największą (90,26 mg/l spirytusu o stężeniu 100% obj.) – w spirytusie z zacieru zawierającego sład jęczmienny (rys. 5).

## Wnioski

1. Zastosowane słody zbożowe, ze szczególnym uwzględnieniem pszenicznego, zapewniły prawidłowe przeprowadzenie hydrolizy enzymatycznej skrobi.
2. Największą wydajność biosyntezy etanolu uzyskano po fermentacji zacierów z dodatkiem sładu pszenicznego (83,69 % wydajności teoretycznej).
3. Zastosowanie sładów zbożowych jako źródła enzymów amylolitycznych i skrobi podczas przygotowywania zacierów gorzelnicznych wpłynęło na zmniejszenie zawartości produktów ubocznych, takich jak metanol oraz aldehyd octowy, których obecność obniża jakość destylatu.
4. Wytwarzanie oryginalnych destylatów zbożowych z wykorzystaniem sładów zbożowych stwarza możliwość poszerzenia oferty handlowej i zwiększenia konkurencyjności polskich gorzelni.

*Badania zrealizowano w ramach projektu badawczego nr PBS2/B8/9/2013, finansowanego przez Narodowe Centrum Badań i Rozwoju.*

## Literatura

- [1] Balcerek M.: Carbonyl compounds in aronia spirits. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 2010, **60** (3), 243-249.
- [2] Balcerek M., Pielech-Przybylska K., Strąk E., Patelski P., Dziekońska U.: Comparison of fermentation results and quality of the agricultural distillates obtained by application of commercial amylolytic preparations and cereal malts. *Eur. Food Res. Technol.*, 2015, **242** (3), 321-335.

- [3] Biernacka P., Wardecki W.: Volatile composition of raw spirits of different botanical origin. *J. Inst. Brew.*, 2012, **118**, 393-40.
- [4] Bledzki A.K., Mamun A.A., Volk J.: Physical, chemical and surface properties of wheat husk, rye husk and soft wood and their polypropylene composites. *Composites: Part A*, 2010, **41**, 480-488.
- [5] Blümelhuber G.: Cereals, malts and hops. *Brauwelt Int.*, 2012, **2**, 75-83.
- [6] Boros D., Gołębiewski D., Myszka K.: Wstępne badania ziarna wybranych rodów hodowlanych pszenicy jako surowca do słodowania. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2014, **3 (94)**, 151-164.
- [7] Czupryński B., Kotarska K.: Wpływ preparatów enzymatycznych na przebieg fermentacji alkoholowej. *Inż. Ap. Chem.*, 2011, **50 (3)**, 16-17.
- [8] Czupryński B., Kotarska K.: Zanieczyszczenia chemiczne spirytusów surowych związkami karbonylowymi. *Inż. Ap. Chem.*, 2009, **48 (2)**, 31-32.
- [9] Dominikiewicz M.: *Gorzelnictwo*. Wyd. Księgarnia Ludwika Fiszer, Warszawa 1923.
- [10] Heinz Weyermann® GmbH, Mich. Weyermann® GmbH & Co. KG, Weyermann Specialty Malting Company: *Aromatische Malze und Malzextrakte für die Spirituosenindustrie*. Niemcy 2013 [online] Dostęp w Internecie [30.09.2016]: [http://www.weyermann.de/downloads/ger/br/Weyermann\\_Produktbrosch%C3%BCre\\_Spirituosen\\_09\\_2013.pdf](http://www.weyermann.de/downloads/ger/br/Weyermann_Produktbrosch%C3%BCre_Spirituosen_09_2013.pdf)
- [11] Jarosz K., Jarociński J.: *Gorzelnictwo i drożdżownictwo*. Wyd. WSIP, Warszawa 1994.
- [12] Jarosz K., Jarociński J.: *Technologia gorzelnictwa*. Wyd. WPLiS, Warszawa 1994.
- [13] Kaukovirta-Norja A., Wilhelmson A., Poutanen K.: Germination: a means to improve the functionality of oat. *Agric. Food Sci.*, 2004, **13**, 100-112.
- [14] Krełowska-Kułas M.: *Badanie jakości produktów spożywczych*. PWE, Warszawa 1993.
- [15] Kunze W.: *Technologia piwa i słodu*. Wyd. Piwo-Chmiel, Warszawa 1999.
- [16] Łączyński B.: *Skrócony kurs gorzelnictwa rolniczego*. Wyd. Sigma NOT 1992, s. 3.
- [17] Osman A.M.: The advantages of using natural substrate – based methods in assessing the roles and synergistic and competitive interactions of barley malt starch-degrading enzymes. *J. Inst. Brew.*, 2002, **108 (2)**, 204-214.
- [18] PN-A-79523:2002. *Destylat rolniczy*.
- [19] Poel P., Gosepa S., Kroes W., Kruis G., Berkhout B., de Wit W.: *The contribution of the spirits industry to the EU economy. A report commissioned by The European Spirits Companies Liaison Group in coordination with The European Spirits Organisation – CEPS and conducted by Ernst & Young Tax Advisors and Regioplan Policy Research*, Amsterdam 2010.
- [20] Rozporządzenie Komisji (WE) nr 889/2008 z 5 września 2008 r. ustanawiające szczegółowe zasady wdrażania rozporządzenia Rady (WE) nr 834/2007 w sprawie produkcji ekologicznej i znakowania produktów ekologicznych w odniesieniu do produkcji ekologicznej, znakowania i kontroli. *Dz. U. L* 250 z 18.09.2008, str. 1.
- [21] Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 110/2008 z dnia 15 stycznia 2008 r. w sprawie definicji, opisu, prezentacji, etykietowania i ochrony oznaczeń geograficznych napojów spirytusowych oraz uchylające rozporządzenie Rady (EWG) nr 1576/89. *Dz. U. L* 39 z 13.02.2008, s. 16.
- [22] Rozporządzenie Rady (WE) nr 834/2007 z dnia 28 czerwca 2007 r. w sprawie produkcji ekologicznej i znakowania produktów ekologicznych. *Dz. U. L* 189 z 20.07.2007 r., s.1.
- [23] Russell I.: *Understanding yeast fundamentals*. In: *The alcohol textbook*. 4<sup>th</sup> ed. Eds. K.A. Jacques, T.P. Lyons, D.R. Kelsall. Nottingham University, Nottingham 2003.
- [24] Szwed Ł., Błazewicz J., Zembold-Guła A., Pelak M., Dawidowicz A.: Wpływ frakcjonowania i czasu słodowania ziarna jęczmienia na liczbę Kolbacha sładów oraz zawartość wolnego azotu alfa-aminokwasowego w brzezcach. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2009, **6 (67)**, 119-128.
- [25] Śliwińska M., Wiśniewska P., Dymerski T., Wardencki W., Namieśnik J.: The flavour of fruit spirits and fruit liqueurs: A review. *Flavour Fragr. J.*, 2015, **30 (3)**, 197-207.
- [26] Thomas K.C., Hynes S.H., Ingledew W.M.: Effect of *Lactobacilli* on yeast growth, viability and batch and semi-continuous alcoholic fermentation of corn mash. *J. Appl. Microbiol.*, 2001, **90 (5)**, 819-828.

- [27] Rozporządzenie (WE) nr 1829/2003 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 22 września 2003 r. w sprawie genetycznie zmodyfikowanej żywności i paszy.
- [28] Rozporządzenie (WE) nr 1830/2003 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 22 września 2003 r. dotyczące możliwości śledzenia i etykietowania organizmów zmodyfikowanych genetycznie oraz możliwości śledzenia żywności i produktów paszowych wyprodukowanych z organizmów zmodyfikowanych genetycznie i zmieniające dyrektywę 2001/18/WE.
- [29] Rozporządzenie Komisji (WE) nr 49/2000 z dnia 10 stycznia 2000 r. zmieniające rozporządzenie Rady (WE) nr 1139/98 dotyczące obowiązkowego oznaczania na etykietach umieszczonych na niektórych środkach spożywczych wyprodukowanych z organizmów zmodyfikowanych genetycznie innych danych niż przewidziane w dyrektywie 79/112/EWG.
- [30] Rozporządzenie Komisji (WE) nr 50/2000 z dnia 10 stycznia 2000 r. w sprawie etykietowania środków spożywczych oraz składników żywności zawierających dodatki oraz środki aromatyzujące, które zostały zmodyfikowane genetycznie lub zostały wyprodukowane z organizmów genetycznie zmodyfikowanych.
- [31] Rozporządzenie Komisji (UE) nr 165/2010 z dnia 26 lutego 2010 r. zmieniające rozporządzenie (WE) nr 1881/2006 ustalające najwyższe dopuszczalne poziomy niektórych zanieczyszczeń w środkach spożywczych w odniesieniu do aflatoksyn (Tekst mający znaczenie dla EOG).
- [32] Rozporządzenie Komisji (WE) Nr 369/2005 z dnia 3 marca 2005 r. w sprawie przekazanych ofert na wywóz owsa w ramach przetargu, o którym mowa w rozporządzeniu (WE) nr 1565/2004.

#### MALTS AS SOURCE OF AMYLOLYTIC ENZYMES IN ENZYMATIC HYDROLYSIS PROCESS OF STARCH

##### S u m m a r y

The objective of the research study was to determine the effectiveness of saccharification of cereal starch using malts as a source of amylases and the efficiency of alcoholic fermentation with the Ethanol Red yeast strain. Distillery mashes were prepared by a method of pressure-less liberation of starch (PLS) from unmalted rye of the Dańkowskie Diament cultivar with 30 % of wheat, rye, and barley malts added. For comparison, the unmalted rye mashes were fermented by the PLS method using enzyme preparations of microbial origin.

Based on the research results, it was concluded that the malts enzymes made it possible to produce sweet mashes with a content of extract and total sugars similar to that in the rye mashes made by the PLS method with the use of  $\alpha$ -amylase and glucoamylase present in commercial preparations. The mashes made of wheat and barley malts had a higher degree of saccharification comparing to the preparations made exclusively of unmalted grains and to the preparations with added rye malt. The highest efficiency of ethanol biosynthesis ( $83.69 \pm 1.95$  % of theoretical yield) was reported in the case of rye mashes saccharified with the wheat malt.

**Key words:** cereal malts,  $\alpha$ -amylase,  $\beta$ -amylase, glucoamylase, fermentation, pressure-less liberation of starch (PLS), fermentation ☒