

KATARZYNA KOTARSKA, WOJCIECH DZIEMIANOWICZ

## WPLYW RÓŻNYCH WARUNKÓW FERMENTACJI ALKOHOLOWEJ MELASY NA JEJ INTENSYFIKACJĘ I JAKOŚĆ OTRZYMANEGO SPIRYTUSU

### Streszczenie

Celem pracy było określenie wpływu różnych szczepów drożdży gorzelnicznych oraz dodatku stymulatorów (związków mineralnych) na szybkość i wydajność procesu alkoholowej fermentacji melasy. Oceniono także jakość otrzymywanego spirytusu surowego.

Wykazano, że rodzaj użytego szczepu drożdży gorzelnicznych oraz dodatek stymulatorów był istotny. Przy zastosowaniu drożdży rasy O<sub>11</sub>, po 72 h fermentacji uzyskano stężenie alkoholu na poziomie 8,04 % (v/v). Było ono o 15 % większe od stężenia alkoholu uzyskanego przy użyciu drożdży D-2 oraz o 3 % większe – w przypadku drożdży As-4. Dodatek stymulatorów w postaci związków mineralnych wpłynął na zwiększenie tempa namnażania drożdży gorzelnicznych, a tym samym na wzrost wydajności fermentacji alkoholowej. Największą wydajność alkoholu uzyskano w przypadku zastosowania stymulatorów w postaci mieszaniny: siarczanu(VI) magnezu, fosforanu(V) amonu oraz pantotenianu wapnia (sm+fa+pw). W tym wariantcie po 72 h procesu wydajność alkoholu z sacharozy zawartej w melasie kształtowała się na poziomie 63,16 dm<sup>3</sup> A<sub>100</sub>·100 kg<sup>-1</sup> (przy sprawności fermentacji 92,83 %) i była większa o 5 % w stosunku do próby kontrolnej (60,07 dm<sup>3</sup> A<sub>100</sub>·100 kg<sup>-1</sup> sacharozy).

Najważniejszym efektem, jaki osiągnięto przy zastosowaniu stymulatorów fermentacji, była poprawa jakości spirytusu surowego. Uzyskano zawartość aldehydów mniejszą o 69 % w stosunku do próby kontrolnej.

**Słowa kluczowe:** melasa, związki mineralne, drożdże gorzelniczne, fermentacja alkoholowa, jakość surowego spirytusu

### Wprowadzenie

Melasa jest produktem ubocznym w procesie otrzymywania cukru z buraków cukrowych [9]. Wykorzystywana jest jako pożywka w przemyśle drożdżowym do otrzy-

---

*Dr inż. K. Kotarska, mgr inż. W. Dziemianowicz, Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. Wacława Dąbrowskiego, Zakład Technologii Gorzelnictwa i Odnawialnych Źródeł Energii, ul. Powstańców Wielkopolskich 17, 85-090 Bydgoszcz. Kontakt: kotarska@ibprs.pl*

mywania drożdży piekarskich lub paszowych [15]. Może być również stosowana do biosyntezy kwasów organicznych, np. kwasu cytrynowego, metodą powierzchniową lub węglaną, względnie jako źródło węgla do produkcji  $\beta$ -karotenu [18].

Ze względów ekonomicznych melasa jest dobrym surowcem do produkcji etanolu, gdyż zawiera dużo cukrów ulegających bezpośrednio fermentacji alkoholowej. Dzięki temu w procesie technologicznym nie ma konieczności stosowania parowania oraz używania preparatów enzymatycznych, niezbędnych w przypadku fermentacji surowców skrobiowych [1].

Do prawidłowego rozwoju drożdży niezbędne są m.in. pierwiastki, takie jak: azot, węgiel, fosfor, potas, magnez w formie łatwo przyswajalnej. Niekorzystny skład związków mineralnych w melasie wyraża się zbyt małą ilością fosforanów i nieprzyswajalnością 2/3 substancji azotowych [7]. Dodatek do podłoża stymulatorów w postaci związków mineralnych pozwala na przyspieszenie rozwoju i wzrostu liczby komórek drożdży, a tym samym na zwiększenie wydajności biomasy oraz produkcji etanolu [3, 7].

Podczas fermentacji brzezki melasowej oprócz etanolu powstają związki o charakterze lotnym, przechodzące w trakcie destylacji do spirytusu i powodujące jego zanieczyszczenie. Ze względu na budowę i właściwości chemiczne można je sklasyfikować jako: związki karbonylowe (aldehydy, ketony), wyższe alkohole, estry, kwasy organiczne i inne [5]. Ilościowy i jakościowy skład tych zanieczyszczeń w dużym stopniu zależy od jakości i czystości melasy, przebiegu procesu fermentacji brzezki oraz od występowania w środowisku związków żelaza w przypadku korozji zbiorników fermentacyjnych i magazynowych [13, 14].

Celem pracy było określenie wpływu różnych szczepów drożdży gorzelnicznych oraz dodatku stymulatorów (związków mineralnych) na szybkość i wydajność procesu alkoholowej fermentacji melasy. Oceniono także jakość otrzymanego spirytusu surowego.

### **Material i metody badań**

Melasa użyta do badań pochodziła z Gorzelnii w Chełmży. Charakteryzowała się laboratoryjną wydajnością alkoholu ze 100 kg surowca na poziomie 30 dm<sup>3</sup> oraz suchą masą wynoszącą 83,3 %. Pozostałe parametry fizykochemiczne surowca wynosiły: gęstość – 1,36 kg·dm<sup>-3</sup>, zawartość sacharozy – 49,22 %, azot ogólny – 1,57 %.

Do przeprowadzenia fermentacji alkoholowej użyto trzech szczepów drożdży gorzelnicznych *Saccharomyces cerevisiae*: D-2, As-4 i O<sub>11</sub>. Drożdże D-2 są tetraploidalnym szczepem otrzymanym po zastosowaniu metody „szoku alkoholowego”. Natomiast szczep As-4 otrzymany został drogą hybrydyzacji płciowej. Szczepy te charakteryzują się podwyższoną odpornością na końcowe stężenie alkoholu (12 ÷ 14 % v/v) i tolerancją na podwyższone ciśnienie osmotyczne środowiska fermentacji

(do 24 °Błg). Drożdże o symbolu As-4 i D-2 są termofilne (optymalna temperatura fermentacji wynosi 38 ÷ 39 °C), natomiast drożdże O<sub>11</sub> są mezofilne (30 °C). Wszystkie szczepy drożdży pochodziły z kolekcji Zakładu Technologii Gorzelnictwa i Odnawialnych Źródeł Energii Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego w Bydgoszczy.

Drożdże hodowano na podłożu płynnym YPG. Hodowlę prowadzono przez 24 h w termostacie w temp. 38 °C (szczepy D-2, As-4) oraz w temp. 30 °C (szczep O<sub>11</sub>).

Brzeczkę melasową o gęstości 20 °Błg poddawano pasteryzacji, a następnie podczas ochładzania doprowadzano pH do poziomu 5,4 ÷ 5,6 za pomocą stężonego kwasu siarkowego. Podczas przygotowywania brzeczek melasowej nie stosowano żadnych preparatów enzymatycznych.

Brzeczkę melasową zaszczipiano drożdżami gorzelnicznymi oraz, w zależności od wariantu badań, wzbogacano stymulatorami procesu fermentacji alkoholowej, tj. siarczanem(VI) amonu (1 g·dm<sup>-3</sup> brzeczek), siarczanem(VI) magnezu (1 g·dm<sup>-3</sup>), fosforanem(V) amonu (0,5 g·dm<sup>-3</sup>) i pantotenianem wapnia (0,5 g·dm<sup>-3</sup>). Dawka użytych stymulatorów została ustalona na podstawie prac badawczych realizowanych wcześniej w Zakładzie Technologii Gorzelnictwa i Odnawialnych Źródeł Energii [10 - 12]. Związki mineralne dodawano do brzeczek w formie pojedynczego związku – fosforan(V) amonu (fa) lub w postaci mieszanin, tj. siarczanu(VI) amonu i fosforanu(V) amonu (sa+fa) oraz siarczanu(VI) magnezu, fosforanu(V) amonu i pantotenianu wapnia (sm+fa+pw). Próbę kontrolną stanowił wariant bez dodatku wymienionych stymulatorów. Proces fermentacji prowadzono przez 72 h w inkubatorze, w temp. 38 °C (drożdże termofilne) i 30 °C (drożdże mezofilne).

Fermentację kontrolowano w trakcie jej trwania i po zakończeniu, aby ocenić prawidłowość przebiegu procesu technologicznego. Oznaczano: 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, takich jak: wydajność alkoholu, szybkość właściwa fermentacji, produktywność procesu, sprawność fermentacji.

Po 72 h fermentacji przeprowadzano destylację przefermentowanych brzeczek melasowych w laboratoryjnej kolumnie szklanej, wyposażonej w 26 półek przelewowych typu kapslowego. Zestaw ten umożliwiał otrzymywanie spirytusów o mocy 89,9 ÷ 93,9 % (v/v) podczas jednorazowej destylacji. Analizę spirytusu surowego wykonywano metodą kapilarnej chromatografii gazowej przy użyciu chromatografu gazowego Hewlett Packard (HP 6890) z układem EPC (elektroniczna regulacja pneumatyki), 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.

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej. Obliczono wartości średnie z trzech powtórzeń i odchylenia standardowe. Do szacowania różnic między wartościami średnimi w grupach zastosowano test Tukeya ( $p \leq 0,05$ ). Obliczenia wykonano za pomocą pakietu statystycznego Statistica 7.1 (StatSoft).

## Wyniki i dyskusja

### *Wpływ szczepu drożdży na przebieg fermentacji alkoholowej brzeczek melasowych*

Fermentacja alkoholowa przebiegała bez zakłóceń. Po 72 h procesu uzyskano ekstrakt pozorny na poziomie:  $6,0 \div 7,8$  °Błg. Do fermentacji brzeczek melasowych najskuteczniejsze były drożdże gorzelnicze As-4 i O<sub>11</sub>. W wariantach tych stwierdzono najmniejsze wartości ekstraktu rzeczywistego, który wynosił odpowiednio: 8,6 i 8,9 °Błg (tab. 1).

Tabela 1. Przebieg 3-dobowej fermentacji brzeczek melasowej o gęstości 20 °Błg, przy zastosowaniu różnych szczepów drożdży gorzelniczych

Table 1. 3-day process of fermenting molasses wort of 20 °Błg density with the use of different strains of distillery yeasts

Parametry procesu fermentacji alkoholowej Parameters of alcoholic fermentation process	Czas trwania fermentacji [h] Duration of fermentation [h]	Szczep drożdży gorzelniczych Strain of distillery yeasts		
		D-2	As-4	O <sub>11</sub>
Ekstrakt pozorny Apparent extract [°Błg]	24	16,4 <sup>a</sup> ± 0,1	15,0 <sup>b</sup> ± 0,0	14,4 <sup>c</sup> ± 0,1
	48	10,9 <sup>a</sup> ± 0,0	9,0 <sup>b</sup> ± 0,1	7,1 <sup>c</sup> ± 0,0
	72	7,8 <sup>a</sup> ± 0,2	6,0 <sup>b</sup> ± 0,0	6,1 <sup>b</sup> ± 0,0
pH	24	5,5 <sup>a</sup> ± 0,1	4,7 <sup>b</sup> ± 0,0	4,8 <sup>b</sup> ± 0,0
	48	5,2 <sup>a</sup> ± 0,0	4,7 <sup>b</sup> ± 0,0	4,8 <sup>b</sup> ± 0,1
	72	5,2 <sup>a</sup> ± 0,0	4,7 <sup>b</sup> ± 0,1	4,8 <sup>b</sup> ± 0,0
Stężenie alkoholu Alcoholic strength [% (v/v)]	24	2,23 <sup>c</sup> ± 0,08	3,01 <sup>b</sup> ± 0,03	3,85 <sup>a</sup> ± 0,02
	48	4,26 <sup>c</sup> ± 0,12	6,23 <sup>b</sup> ± 0,04	7,91 <sup>a</sup> ± 0,01
	72	6,83 <sup>c</sup> ± 0,05	7,78 <sup>b</sup> ± 0,02	8,04 <sup>a</sup> ± 0,08
Ekstrakt rzeczywisty Actual extract [°Błg]	24	16,8 <sup>a</sup> ± 0,2	15,4 <sup>b</sup> ± 0,1	15,5 <sup>b</sup> ± 0,2
	48	12,2 <sup>a</sup> ± 0,0	11,1 <sup>b</sup> ± 0,0	9,0 <sup>c</sup> ± 0,0
	72	10,5 <sup>a</sup> ± 0,0	8,6 <sup>b</sup> ± 0,0	8,9 <sup>b</sup> ± 0,1
Cukry redukujące [%] Reducing sugars [%]	72	1,62 <sup>a</sup> ± 0,02	0,46 <sup>b</sup> ± 0,02	0,53 <sup>b</sup> ± 0,01

Objaśnienia: / Explanatory notes:

W tabeli przedstawiono wartości średnie ± odchylenia standardowe / Table shows mean values and standard deviations; a - c – wartości średnie w rzędach oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie ( $p \leq 0,05$ ) / mean values in rows and denoted using various letter differ statistically significantly ( $p \leq 0.05$ ); n = 3.

Największe stężenie alkoholu po 72 h fermentacji uzyskano przy użyciu drożdży O<sub>11</sub> – 8,04 % (v/v). W stosunku do pozostałych szczepów było ono większe o 15 % (D-2) i o 3 % (As-4).

Przy zastosowaniu drożdży O<sub>11</sub> i As-4 zawartość cukrów redukujących w wywarze melasowym wynosiła 0,46 ÷ 0,53 %. W przypadku użycia drożdży D-2 zawartość cukrów redukujących była większa i wynosiła 1,62 %.

Z przeprowadzonych badań wynika, że rodzaj użytego szczepu drożdży gorzelnicznych wpłynął na przebieg fermentacji alkoholowej oraz na końcową wydajność alkoholu. Szczepy drożdży często wykazują odmienną tolerancję na podwyższone ciśnienie osmotyczne. Potwierdzają to El-Abyad i wsp. [6], którzy przeanalizowali dwadzieścia dwa szczepy drożdży. Ocenie poddana została ich skuteczność prowadzenia fermentacji alkoholowej melasy buraczanej. Jednym z najlepszych okazał się szczep *Saccharomyces cerevisiae* Y-7, który osiągnął największą wydajność fermentacji. Zayed i Foley [19] badali wpływ zastosowanych szczepów drożdży na produkcję etanolu z melasy. Stwierdzili, że sposób wykorzystania cukrów obecnych w surowcu zależy od szczepu drożdży, co powoduje uzyskanie odmiennej końcowej wydajności alkoholu.

#### *Wpływ dodatku stymulatorów na przebieg fermentacji alkoholowej brzeczek melasowych*

Do przebadania wpływu stymulatorów dodawanych do brzeczek melasowych poddanych fermentacji zastosowano drożdże gorzelnicze As-4. Podłożem doświadczalnym była brzeczką melasowa o gęstości 20 °Błg. Stwierdzono, że stymulatory użyte w badaniach wpłynęły na poprawę parametrów i wskaźników biotechnologicznych procesu fermentacji. Zaobserwowano zwiększenie wydajności alkoholu z sacharozy we wszystkich przebadanych wariantach doświadczalnych, w porównaniu z próbą kontrolną (tab. 2).

Po 72 h fermentacji brzeczek melasowych pH wynosiło 4,7, co świadczyło o prawidłowo prowadzonym procesie oraz o braku zanieczyszczeń bakteryjnych. Zanieczyszczenie brzeczek melasowych bakteriami powoduje bowiem zwiększenie ilości jonów wodorowych, co skutkuje zmniejszeniem pH nawet do poziomu 3,5. Zayed i Foley [18] stwierdzili, że optymalne pH w trakcie produkcji etanolu z melasy wynosi 4,5. Jednocześnie zaobserwowali zmniejszenie wydajności alkoholu przy pH 5,5. Spowodowane to było zwiększoną produkcją glicerolu, który jest wytwarzany przez drożdże w warunkach podwyższonego pH. El-Abyad i wsp. [6] ustalili natomiast, że fermentacja alkoholowa melasy przebiega najlepiej przy pH = 5,0.

Zawartość cukrów redukujących w wywarze po 72 h była zbliżona we wszystkich wariantach doświadczalnych i wahała się od 0,41 do 0,49 %. Mała zawartość substancji redukujących wskazuje na całkowite wykorzystanie cukrów z podłoża fermentacyjnego

Tabela 2. Parametry i wskaźniki biotechnologiczne fermentacji alkoholowej brzożek melasowych z dodatkiem stymulatorów, prowadzonej przy udziale drożdży As-4

Table 2. Parameters and biotechnological indices of alcoholic fermentation of molasses worts with added stimulants, conducted using As-4 yeasts

Wariant doświadczalny Experimental variant	Wydajność alkoholu z sacharozy po h [dm <sup>3</sup> A <sub>100</sub> ·100 kg <sup>-1</sup> sacharozy] Alcohol yield from sucrose after h [dm <sup>3</sup> EtOH·100 kg <sup>-1</sup> sucrose]			Szybkość właściwa fermentacji po h [cm <sup>3</sup> A <sub>100</sub> ·kg <sup>-1</sup> glukozy × h <sup>-1</sup> ] Specific fermentation rate after h [cm <sup>3</sup> EtOH·kg <sup>-1</sup> glucose × h <sup>-1</sup> ]			Produktywność fermentacji po h [cm <sup>3</sup> A <sub>100</sub> dm <sup>-3</sup> brzożki × h <sup>-1</sup> ] Fermentation productivity after h [cm <sup>3</sup> EtOH·dm <sup>-3</sup> × h <sup>-1</sup> ]			Energia fermentacji po h [%] Fermentation energy [%] after h			Cukry redukujące Reducing sugars [%]
	24	48	72	24	48	72	24	48	72	24	48	72	
Próba kontrolna Control sample	23,24 <sup>b</sup> ± 1,12	48,10 <sup>b</sup> ± 0,42	60,07 <sup>b</sup> ± 1,04	9,20 <sup>b</sup> ± 0,47	9,52 <sup>b</sup> ± 0,20	7,92 <sup>b</sup> ± 0,10	1,25 <sup>b</sup> ± 0,03	1,30 <sup>b</sup> ± 0,00	1,08 <sup>c</sup> ± 0,02	29,37 <sup>a</sup> ± 0,22	76,73 <sup>a</sup> ± 1,24	100	0,53 <sup>a</sup>
fa	21,16 <sup>c</sup> ± 0,37	47,25 <sup>b</sup> ± 1,15	61,07 <sup>b</sup> ± 0,21	8,37 <sup>c</sup> ± 0,31	9,35 <sup>b</sup> ± 0,19	8,06 <sup>ab</sup> ± 0,05	1,14 <sup>c</sup> ± 0,07	1,28 <sup>b</sup> ± 0,01	1,10 <sup>bc</sup> ± 0,03	26,23 <sup>c</sup> ± 0,54	74,81 <sup>a</sup> ± 0,68	100	0,49 <sup>b</sup>
sa+fa	25,63 <sup>a</sup> ± 0,97	52,43 <sup>a</sup> ± 0,31	62,93 <sup>a</sup> ± 1,01	10,14 <sup>a</sup> ± 0,41	10,37 <sup>a</sup> ± 0,17	8,30 <sup>a</sup> ± 0,20	1,38 <sup>ab</sup> ± 0,01	1,41 <sup>a</sup> ± 0,01	1,13 <sup>ab</sup> ± 0,01	29,69 <sup>a</sup> ± 0,13	73,91 <sup>a</sup> ± 0,21	100	0,43 <sup>c</sup>
sm+fa+pw	26,17 <sup>a</sup> ± 0,78	53,20 <sup>a</sup> ± 0,19	63,16 <sup>a</sup> ± 0,47	10,36 <sup>a</sup> ± 0,29	10,53 <sup>a</sup> ± 0,12	8,33 <sup>a</sup> ± 0,05	1,41 <sup>a</sup> ± 0,05	1,44 <sup>a</sup> ± 0,02	1,14 <sup>a</sup> ± 0,01	27,80 <sup>b</sup> ± 0,68	67,07 <sup>b</sup> ± 1,10	100	0,41 <sup>c</sup>

Objaśnienia: / Explanatory notes:

fa – fosforan(V) amonu / ammonium phosphate(V); sa – siarczan(VI) amonu / ammonium sulphate (VI); sm – siarczan(VI) magnezu / magnesium sulphate (VI); pw – pantotenian wapnia / calcium pantothenate; W tabeli przedstawiono wartości średnie ± odchylenia standardowe / Table shows mean values and standard deviations; a - c – wartości średnie w kolumnach oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie (p ≤ 0,05) / mean values in columns and denoted using various letters differ statistically significantly (p ≤ 0,05); n = 3

przez drożdże gorzelnicze. Według Beltrana i wsp. [2] dodatek azotu do podłoża fermentacyjnego może wpłynąć na zwiększenie produkcji biomasy mikroorganizmów lub na zwiększenie stopnia wykorzystania cukrów zawartych w surowcu. Podobne wnioski przedstawili Irvali i wsp. [8] oraz Kotarska i wsp. [10]. Stwierdzili oni, że wprowadzenie do zacieru gorzelniczego azotu w postaci związków mineralnych lub aminokwasów powoduje przyrost biomasy drożdżowej bez ubytku białka z przerabianego surowca.

Po 72 h procesu wydajność alkoholu z sacharozy zawartej w melasie kształtowała się na poziomie  $61,07 \div 63,16 \text{ dm}^3 \text{ A}_{100} \cdot 100 \text{ kg}^{-1}$  sacharozy (przy sprawności fermentacji  $89,76 \div 92,83 \%$ ), co stanowiło wzrost o  $2 \div 5 \%$  w stosunku do próby kontrolnej ( $60,07 \text{ dm}^3 \text{ A}_{100} \cdot 100 \text{ kg}^{-1}$  sacharozy) – tab. 2. Największą, statystycznie istotną różnicę ( $p \leq 0,05$ ), w porównaniu z próbą kontrolną, osiągnięto w wariancie, w którym zastosowano dodatek mieszaniny siarczanu(VI) magnezu, fosforanu(V) amonu i pantotenianu wapnia (sm+fa+pw). W wariantach ze stymulatorami dynamika tworzenia etanolu była wyższa w stosunku do próby kontrolnej. Największą szybkością właściwą wytwarzania etanolu oraz produktywnością fermentacji charakteryzowały się warianty z dodatkiem mieszanin: siarczanu(VI) amonu i fosforanu(V) amonu (sa+fa) oraz siarczanu(VI) magnezu, fosforanu(V) amonu oraz pantotenianu wapnia (sm+fa+pw). Szybkość właściwa tworzenia etanolu po zakończeniu procesu wynosiła w tych wariantach odpowiednio:  $8,30$  i  $8,33 \text{ cm}^3 \text{ A}_{100} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ glukozy} \times \text{h}^{-1}$  i była większa w porównaniu z próbą kontrolną ( $7,92 \text{ cm}^3 \text{ A}_{100} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ glukozy} \times \text{h}^{-1}$ ). Natomiast produktywność fermentacji kształtowała się na poziomie  $1,13 \div 1,14 \text{ cm}^3 \text{ A}_{100} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ brzeczki} \times \text{h}^{-1}$  (tab. 2).

#### *Wpływ dodatku stymulatorów na jakość uzyskiwanego spirytusu surowego*

Najważniejszym efektem badań było podwyższenie jakości spirytusu surowego przy zastosowaniu stymulatorów fermentacji. Wyniki zawartości aldehydów, estrów, alkoholi wyższych oraz metanolu w uzyskanych spirytusach przedstawiono w tab. 3.

W próbach, w których zastosowano dodatek stymulatorów, stwierdzono zmniejszenie zawartości związków karbonylowych, w stosunku do próby kontrolnej. Zawartość aldehydów w spirytusach melasowych może wynosić  $0,3 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ A}_{100}$  według Polskiej Normy [17] i jest trzykrotnie większa niż określona dla spirytusów zbożowych i ziemniaczanych. W spirytusie surowym uzyskanym z fermentacji brzeczki melasowej z dodatkiem mieszaniny siarczanu(VI) magnezu, fosforanu(V) amonu i pantotenianu wapnia (sm+fa+pw) stwierdzono mniejszą o 69 % ( $0,121 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ A}_{100}$ ) zawartość aldehydów w stosunku do próby kontrolnej ( $0,389 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3} \text{ A}_{100}$ ). Po zastosowaniu do brzeczki dodatku fosforanu(V) amonu (fa) oraz mieszaniny siarczanu(VI) amonu i fosforanu(V) amonu (sa+fa) uzyskano mniejszą zawartość związków karbonylowych odpowiednio o: 62 i 28 %. Według Lafona-Lafourcade'a i wsp. [16] stymulatory zwiększają wykorzystanie aldehydu octowego, przez co następuje zmniejszenie jego stężenia w środowisku fermentacyjnym.



Tabela 3. Zawartość lotnych produktów ubocznych w spirytusie otrzymanym z fermentacji brzeczki melasowych z dodatkiem stymulatorów

Table 3. Content of volatile by-products in spirit produced during fermentation of molasses worts with stimulants added

Produkty uboczne fermentacji By-products of fermentation	Wariant doświadczalny / Experimental variant			
	Próba kontrolna Control sample	fa	sa+fa	sm+fa+pw
Aldehydy [ $\text{g}\cdot\text{dm}^{-3} A_{100}$ ] Aldehydes [ $\text{g}\cdot\text{dm}^{-3} \text{EtOH}$ ]	$0,389^a \pm 0,030$	$0,147^c \pm 0,015$	$0,280^b \pm 0,022$	$0,121^d \pm 0,010$
Kwasy [ $\text{g}\cdot\text{dm}^{-3} A_{100}$ ] Acids [ $\text{g}\cdot\text{dm}^{-3} \text{EtOH}$ ]	$0,021^c \pm 0,003$	$0,031^a \pm 0,006$	$0,032^a \pm 0,002$	$0,028^b \pm 0,003$
Estry [ $\text{g}\cdot\text{dm}^{-3} A_{100}$ ] Esters [ $\text{g}\cdot\text{dm}^{-3} \text{EtOH}$ ]	$0,258^a \pm 0,008$	$0,298^a \pm 0,007$	$0,138^b \pm 0,005$	$0,064^c \pm 0,005$
Metanol [ $\text{g}\cdot 100 \text{ cm}^{-3} \text{EtOH}$ ] Methanol [ $\text{g}\cdot 100 \text{ cm}^{-3} \text{EtOH}$ ]	$0,003^a \pm 0,001$	$0,001^b \pm 0,000$	$0,001^b \pm 0,000$	$0,003^a \pm 0,001$
Alkohole wyższe [ $\text{g}\cdot\text{dm}^{-3} A_{100}$ ] Higher alcohols [ $\text{g}\cdot\text{dm}^{-3} \text{EtOH}$ ]	$3,460^a \pm 0,039$	$1,523^b \pm 0,042$	$1,149^{bc} \pm 0,094$	$0,855^c \pm 0,036$

Objaśnienia: / Explanatory notes:

W tabeli przedstawiono wartości średnie  $\pm$  odchylenia standardowe / Table shows mean values and standard deviations; a - c – wartości średnie w rzędach oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie ( $p \leq 0,05$ ) / mean values in rows and denoted using various letters differ statistically significantly ( $p \leq 0.05$ );  $n = 3$ .

Ilość powstających alkoholi wyższych w przebadanych próbkach była mała i wahała się w granicach  $0,855 \div 1,523 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3} A_{100}$ . W spirytusach stwierdzono mniej fuzli: o 56 % w wariacie fa, o 67 % w wariacie sa+fa oraz o 75 % w wariacie sm+fa+pw.

Zawartość zanieczyszczeń chemicznych w spirytusach surowych jest bardzo istotna przy produkcji bioetanolu, gdyż wymagania jakościowe dotyczące biokomponentów ściśle określają zakres występowania poszczególnych grup związków chemicznych. Ilość tworzących się alkoholi wyższych nie może przekraczać 2 % (v/v). W przypadku zbyt dużej zawartości może wystąpić zjawisko dezaktywacji katalizatorów podczas wytwarzania eteru etylo-tert-butyłowego (EETB) [4, 11].

Najmniejszą zawartość estrów stwierdzono w spirytusie surowym otrzymanym z fermentacji alkoholowej brzeczki z dodatkiem mieszaniny: siarczanu(VI) magnezu, fosforanu(V) amonu i pantotenianu wapnia (sm+fa+pw). Wynosiła ona  $0,064 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3} A_{100}$  i w stosunku do próby kontrolnej była mniejsza o 75 %. Natomiast w pozostałych wariantach zawartość estrów kształtowała się na poziomie  $0,138 \div 0,298 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3} A_{100}$ .

We wszystkich próbach stwierdzono bardzo niski poziom alkoholu metylowego, tj.  $0,001 \div 0,003 \text{ g}\cdot 100 \text{ cm}^{-3} A_{100}$ .



## Wnioski

1. Na przebieg fermentacji oraz końcową wydajność alkoholu (72 h) wpływ miał rodzaj zastosowanego szczepu drożdży gorzelnicznych oraz wzbogacenie podłoża fermentacyjnego stymulatorami.
2. Stwierdzono, że do fermentacji brzeczek melasowych najkorzystniejsze było zastosowanie szczepów drożdży gorzelnicznych: O<sub>11</sub> i As-4.
3. Dodatek stymulatorów do brzeczek melasowych wpłynął na intensyfikację procesu fermentacji alkoholowej. Dodatek mieszaniny: siarczanu(VI) magnezu, fosforanu(V) amonu oraz pantotenianu wapnia (sm+fa+pw) do brzeczek melasowych przyczynił się do uzyskania wzrostu wydajności alkoholu o 5 % w stosunku do próby kontrolnej.
4. Podwyższenie jakości spirytusu surowego poprzez zastosowanie stymulatorów fermentacji było najważniejszym efektem, jaki osiągnięto w badaniach. W uzyskanych spirytusach stwierdzono ograniczenie zawartości aldehydów o ok. 28 ÷ 69 % w stosunku do próby kontrolnej.

## Literatura

- [1] Arshad M., Chan Z.M., Khalil-ur-Rehman M., Szach F.A., Rajoka M.I.: Optimization of process variables for minimization of byproduct formation during fermentation of blackstrap molasses to ethanol at industrial scale. *Lett. Appl. Microbiol.*, 2008, **47** (5), 410-414.
- [2] Beltran G., Esteve-Zarzoso B., Rozés N., Mas A., Guillamón J.M.: Influence of the timing of nitrogen additions during synthetic grape must fermentations on fermentation kinetics and nitrogen consumption. *J. Agric. Food Chem.*, 2005, **53** (4), 996-1002.
- [3] Bonin S., Stanisławczyk M.: Wpływ pierwiastków magnezu i wapnia na proces fermentacji winiarskiej. *Przem. Ferm. Owoc. Warz.*, 2011, **5**, 16-17.
- [4] Burnus Z., Jędrzychowska S., Kopydłowski A., Wieczorek A.: Przegląd metod analitycznych stosowanych w oznaczaniu właściwości bioetanolu. *Nafta-Gaz*, 2011, **6**, 410-416.
- [5] Eden A.L., Nederveld V., Drukker M., Benvenisty N., Debourg A.: Involvement of branched chain amino acid aminotransferases in the production of fusel alcohols during fermentation in yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2001, **55** (3), 296-300.
- [6] El-Abyad M.S., El-Diwany A.I., Sallam L.A., Reda F.: Some physiological parameters for ethanol production from beet molasses by *Saccharomyces cerevisiae* Y-7. *Bioresour. Technol.*, 1992, **42** (3), 183-189.
- [7] Ergun M., Mutlu S.F.: Application of a statistical technique to the production of ethanol from sugar beet molasses by *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresour. Technol.*, 2000, **73** (3), 251-255.
- [8] Irvani N., Bärwald G., Windish S.: Einfluß der Stickstoffquelle auf die Leistung und Regenerierung der Hefe unter anaeroben Bedingungen. *Die Branntweinwirtschaft*, 1986, **5**, 10-73.
- [9] Kopsahelis N., Agouridis N., Bekatorou A., Kanellaki M.: Comparative study of spent grains and delignified spent grains as yeast supports for alcohol production from molasses. *Bioresour. Technol.*, 2007, **98** (7), 1440-1447.
- [10] Kotarska K., Czupryński B., Kłosowski G.: Effect of various activators on the course of alcoholic fermentation. *J. Food Eng.*, 2006, **77** (4), 965-971.

- [11] Kotarska K., Dziemianowicz W., Czupryński B.: Wpływ dodatku stymulatorów na fermentację melasy oraz jakość uzyskiwanego spirytusu. Inż. Aparat. Chem., 2013, **52** (2), 54-56.
- [12] Kotarska K., Czupryński B., Wolska M.: Wpływ pantotenianu wapnia z tiaminą oraz wybranych związków mineralnych na przebieg fermentacji alkoholowej żytnich zacierów gorzelnicznych (1). Przem. Ferm. Owoc. Warz., 2005, **49** (4), 35-36.
- [13] Kotarska K., Żakowicz A., Czupryński B.: Ocena zawartości produktów ubocznych weryfikująca jakość spirytusu surowego. Inż. Aparat. Chem., 2011, **50** (3), 41-42.
- [14] Kłosowski G., Czupryński B., Kotarska K., Wolska M.: Charakterystyka zanieczyszczeń chemicznych obniżających jakość spirytusu surowego (1). Przem. Ferm. Owoc. Warz., 2003, **47** (6), 20-21.
- [15] Kurtanek Z.: Principal component ANN for modeling and control of baker's yeast production. J. Biotechnol., 1998, **65** (1), 23-25.
- [16] Lafon-Lafourcade S., Genex C., Ribereau-Gayon P.: Inhibition of alcoholic fermentation of grape must by fatty acids produced by yeasts and their elimination by yeast ghosts. Appl. Envir. Microbiol., 1984, **47** (6), 1246-1249.
- [17] PN-A-79523:2002. Destylat rolniczy.
- [18] Toğrul H., Arslan N.: Mathematical model for prediction of apparent viscosity of molasses. J. Food Eng., 2004, **62** (3), 281-289.
- [19] Zayed G.Z.A., Foley J.: The influence of fermentation conditions on ethanol yields from sugar beet molasses and fodder beet juice using *Saccharomyces cerevisiae* strains. Irish J. Food Sci. Technol., 1987, **11** (2), 119-133.

#### EFFECT OF DIFFERENT CONDITIONS OF ALCOHOLIC FERMENTATION OF MOLASSES ON ITS INTENSIFICATION AND QUALITY OF PRODUCED SPIRIT

##### Summary

The objective of the research study was to determine the effect of various distillery yeast strains and the addition of stimulants (mineral compounds) on the rate and efficiency of alcoholic fermentation process of molasses. Furthermore, the quality of the raw spirit produced was assessed.

It was proved that the type of distillery yeast strains and the addition of stimulants were significant. Upon the application of O<sub>11</sub> species of yeasts, after 72 hours of the fermentation process, the alcoholic strength level was 8.04 % (v/v). It was 15 % higher than the alcoholic strength level of alcohol produced using D-2 yeasts and 3 % higher when using As-4 yeasts. The addition of stimulants in the form of mineral compounds caused the growth rate of distillery yeasts to increase and, consequently, the efficiency of alcoholic fermentation to increase. The highest alcohol yield was reported when using stimulants in the form of a mixture of: magnesium sulphate (VI), ammonium phosphate (V), and calcium pantothenate (sm+fa+pw). In that variant, after 72 hours of the process, the alcohol yield from sucrose contained in the molasses was 63.16 dm<sup>3</sup> EtOH·100·kg<sup>-1</sup> (and the fermentation efficiency was 92.83 %), and it was 5 % higher compared to the control sample (60.07 dm<sup>3</sup> EtOH·100 kg<sup>-1</sup> of sucrose).

The most important effect of the use of fermentation stimulants was the improvement of raw spirit quality. Compared to the control sample, the obtained content of aldehydes was 69 % lower.

**Key words:** molasses, mineral compounds, distillery yeasts, alcoholic fermentation, quality of raw spirit

