

## CHARAKTERIZÁCIA BOČNÝCH PRODUKTOV V PROCESE SIMULTÁNEJ SACHARIFIKÁCIE A FERMENTÁCIE VYBRANÝCH PŠENIČNÝCH ODRÔD

VIERA HORVÁTHOVÁ, FRANTIŠEK GAGO,  
LUCIA CÍBIKOVÁ a ERNEST ŠTURDÍK

*Katedra biotechnológií, Fakulta prírodných vied Univerzity sv. Cyrila a Metoda v Trnave, J. Herdu 2, 917 01 Trnava*

*viera.horvathova@ucm.sk, frantisek.gago@gmail.com*

Došlo 13.11.12, prijaté 13.3.13.

Kľúčové slová: pšenica, škrob, bioetanol, liehovarnické výpalky

### Úvod

Súčasný svet čelí energetickej kríze. Zatiaľ čo v minulosti boli fosílné palivá lacné, jednoducho dostupné, v súčasnosti sme svedkami neustále zvyšujúcich sa cien ropy a rastúcej nestability jej dodávok. Riešenie tohto problému spočíva vo využívaní obnoviteľných zdrojov energie.

V tejto súvislosti je cereálna biomasa jednou z najvýznamnejších komodít. Predstavuje komplexný substrát, z ktorého sa však fermentačne na palivo (etanol) spracováva len zrno. Hlavnými bočnými produktmi etanolovej fermentácie cereálií sú oxid uhličitý a liehovarnické výpalky. Ich vlastnosti a zloženie sú veľmi variabilné a závisia od suroviny a výrobného procesu<sup>1</sup>. Sú bohaté na proteíny, vlákninu, lipidy a kvasničnú biomasu<sup>2</sup>. Ich využitie je rôzne, po vhodnej úprave je možné ich použiť aj v humánnej výžive, pretože do určitej koncentrácie nemeňia chuť jedla a sú bohaté na vlákninu a proteíny<sup>3</sup>. V koncentráciách 10–50 % sa môžu pridávať do ciest na výrobu cestovín alebo pečených výrobkov, ako sú napr. sušienky, keksy alebo chlieb<sup>4</sup>.

Práca je zameraná na prípravu a charakterizáciu bočných produktov simultánneho scukovania a fermentácie vybraných pšeničných odrôd, pričom ich separácia bola realizovaná v troch rôznych fázach SSF (po predscukrení, fermentácii alebo destilácii).

### Experimentálna časť

#### Materiál

Substrátom v experimentoch bola pšenica letná forma ozimná (*Triticum aestivum* L. ssp. *aestivum*) odrôd Stanislava, Venistar, Klaudia, Torysa a Šarlota. Vzorky boli

získané z Výskumného a šľachtiteľského ústavu Selekt Bučany (SK) v roku 2011. Zrná boli zošrotované na kladivovom mlyne Nosen (D) na frakcie s veľkosťou 1 mm a následne skladované v suchu a tme pri laboratórnej teplote.

Komerčné enzymatické prípravky pre hydrolýzu škrobu – Termamyl® SC (s termostabilnou  $\alpha$ -amylázou; E.C.3.2.1.1, dávkovanie 0,3 ml kg<sup>-1</sup> škrobu), AMG® 300L (s glukamylázou; E.C.3.2.1.3, dávkovanie 0,8 ml kg<sup>-1</sup> škrobu) a Promozyme® D2 (s pululanázou; E.C.3.2.1.41, dávkovanie 0,8 ml kg<sup>-1</sup> škrobu) boli z firmy Novozymes (DK).

Na fermentáciu boli použité kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* CCY-11-3 zo Zbierky kvasinkových mikroorganizmov Chemického ústavu SAV v Bratislave (SK).

Pre fermentáciu bolo použité médium na prípravu dvojstupňového inokula (inokulačné a propagačné médium) a médium pre SSF (fermentačné médium). Zloženie jednotlivých médií je uvedené nižšie, koncentrácia živín je v g l<sup>-1</sup>.

Inokulačné médium: glukóza 10,0; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5,0; kvasničný autolyzát 3,0; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,0; MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O 1,0; CaCl<sub>2</sub> 0,1; NaCl 0,1 (pH 5,0), propagačné médium: glukóza 50,0; kvasničný autolyzát 5,0; peptón 10,0 (pH 5,0). Médiá boli sterilizované pri 120 °C (20 min), naočkované kultúrou *S. cerevisiae* a inkubované pri 28 °C (24 h, 100 rpm). Fermentačné médium: hydrolyzát pripravený enzymatickou hydrolýzou vzorky, koncentrácia glukózy 20,2–39,8 (tab. II); (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5,0; kvasničný autolyzát 5,0; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2,0; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2,0; CaCl<sub>2</sub> 0,5; NaCl 0,5 (pH 6,0). 100 ml média sa inokulovalo 5 ml propagačného média.

#### Metódy

##### Príprava pšeničného hydrolyzátu pre SSF

Z pšeničného šrotu bolo pripravených 250 ml suspenzie pšeničného šrotu s 10% obsahom škrobu (w/v). pH sa upravilo na 5,3. Po zahriatí na 40 °C sa v dvoch krokoch pridalo Termamyl® SC a uskutočnilo sa tlakové stekutenie (120 °C, 200 kPa). Potom sa suspenzia ochladila na 60 °C, pH sa upravilo na 4,2 a pridala sa zmes Promozyme® D2 a AMG® 300L vo vzájomnom objemovom pomere 9:1 (v/v). Proces predscukrenia bol realizovaný pri 60 °C počas 30 min, predscukrený hydrolyzát bol substrátom pre SSF. V niektorých experimentoch sa po predscukrení izoloval tuhý podiel.

##### SSF so separáciou bočného produktu

Do predscukreného hydrolyzátu sa pridalo inokulum kvasiniek v množstve 5 % (v/v) a SSF prebiehala 72 h pri teplote 28 °C za občasného premiešania. Bočný produkt SSF bol separovaný po fermentácii alebo až po destilácii. Separácia sa uskutočnila 10min centrifugáciou pri 9000 rpm. Bočné produkty boli sušené pri teplote 105 °C do konštantnej hmotnosti, zhomogenizované a uschované pri laboratórnej teplote.

*Analytické metódy*

Na stanovenie obsahu vybraných zložiek v pšeničných šrotoch a separovaných bočných produktoch boli použité rozličné metódy. Celkový obsah škrobu bol stanovený polarimetricky podľa Ewersa (ISO 10520:1997), amyloza spektrofotometricky (ISO 6647-1:2007), proteíny metódou podľa Kjeldahla (ISO 20483:2006), vlákna kitom Total Dietary Fibre (Megazyme<sup>®</sup>, Ir). Lipidy boli extrahované a gravimetricky stanovené podľa Soxhleta<sup>5</sup>. Celkový obsah redukujúcich sacharidov bol stanovený metódou podľa Millera<sup>6</sup>, na stanovenie glukózy bol použitý Biola Test – Glucose God 1500 (Pliva-Lachema, ČR). Obsah etanolu sa stanovil GC/FID plynovou chromatografiou (Perkin Elmer Autosystem XL s kolónou Super Q-Plot column).

**Výsledky a diskusia**

V súčasnosti je snaha spracovávať cereálie, ktoré na jednej strane uspokojia ekonomickú stránku výroby a na strane druhej produkcia etanolu nebude v rozpore s potrebou ich spracovania na potraviny<sup>7, 8</sup>. V práci boli využité typické slovenské pšeničné odrody<sup>9</sup> s rôznymi

obsahmi základných nutričných a biochemických zložiek (tab. I). Tieto spolu s reakčnými podmienkami (pH, čas, teplota, dávka enzýmov) ovplyvňujú etanolovú produkciu z rastlinného materiálu.

Za najdôležitejšie zložky zrna ovplyvňujúce etanolovú produkciu sa považuje obsah škrobu, amylozy a proteínov<sup>10, 11</sup>. Podľa Tichého<sup>10</sup> pre efektívnu produkciu etanolu je vhodné, aby zrnó obsahovalo minimálne 65 % škrobu a nie viac ako 11 % proteínov. Smith a spol.<sup>12</sup> uvádzajú, že 1 % bielkovín korenšponduje s poklesom etanolového výťažku o 7,36 l/tonu pšenice. Kritérium 65 % obsahu škrobu spĺňala iba odroda Torysa, v ostatných bol škrob v šrote od 59,0 % do 63,3 % (tab. I). Podiel bielkovín varíroval v rozmedzí 12,1 % (Šarlota) až 15,1 % (Stanislava), čo predstavuje vyššie hodnoty v porovnaní s odporúčanými. Proces stekutenia, predscukrenia ako aj médium po fermentácii boli monitorované stanovením obsahu redukujúcich sacharidov a glukózy (tab. II).

Z koncentrácie glukózy bol vypočítaný dextrózový ekvivalent (DE), ktorý sa po stekutení pohyboval v intervale 5–8 %, po predscukrení to bolo 18–36 %. Pripravený hydrolyzát bol použitý na SSF, v niektorých experimentoch bol centrifugáciou zbavený tuhého cereálneho zvyšku (bočného produktu) a teda SSF sa realizovala len

Tabuľka I

Chemické zloženie pšeničných odrôd (%; w/w). Výsledky predstavujú priemerné hodnoty štyroch meraní s priemernou smerodajnou odchýlkou SD  $\leq 5\%$

Pšeničná odroda	Sušina [%]	Popol [%]	Škrob <sup>a</sup> [%]	Amylóza <sup>b</sup> [%]	Proteíny <sup>a</sup> [%]	Vlákna <sup>a</sup> [%]	Lipidy <sup>a</sup> [%]
Stanislava	87,2	1,9	60,9	26,6	15,1	12,5	2,5
Venistar	87,6	0,9	60,9	28,5	12,4	14,7	1,3
Klaudia	87,9	1,0	63,3	27,9	12,3	13,4	1,9
Torysa	87,6	1,5	65,8	29,1	13,1	12,9	1,8
Šarlota	87,6	1,3	59,0	31,6	12,1	14,6	3,4

<sup>a</sup> Percentá sú vyjadrené na obsah sušiny pšeničného šrotu, <sup>b</sup> percentuálny obsah amylozy je vyjadrený na obsah škrobu

Tabuľka II

Koncentrácia redukujúcich sacharidov po stekutení, predscukrení a fermentácii pšeničných hydrolyzátov v procese SSF. Výsledky predstavujú priemerné hodnoty štyroch meraní s priemernou smerodajnou odchýlkou SD  $\leq 5\%$

Odroda pšenice	Redukujúce sacharidy/glukóza [mg ml <sup>-1</sup> hydrolyzátu]					
	po stekutení		po predscukrení		po fermentácii	
	redukujúce sacharidy	glukóza	redukujúce sacharidy	glukóza	redukujúce sacharidy	glukóza
Stanislava	62,5	7,4	96,9	20,2	5,7	1,4
Venistar	50,0	9,8	75,0	39,1	4,8	0,5
Klaudia	62,6	9,9	93,8	39,8	3,7	0,1
Torysa	62,0	7,3	92,2	22,2	9,2	0,9
Šarlota	59,9	9,9	89,8	35,8	5,1	0,5

Tabuľka III

Analýza tuhých frakcií oddelených po predscukrení, fermentácii a po destilácii v procese SSF. Výsledky predstavujú priemerné hodnoty štyroch meraní s priemernou smerodajnou odchýlkou  $SD \leq 5\%$

Pšeničná odroda	Frakcia	Sušina [%]	Popol [%]	Škrob <sup>a</sup> [%]	Proteíny <sup>a</sup> [%]	Lipidy <sup>a</sup> [%]
Stanislava	po predscukrení	97,34	3,51	27,12	27,25	2,59
	po fermentácii	98,64	6,00	3,43	34,90	2,94
	po destilácii	98,89	10,53	0,06	41,04	3,14
Venistar	po predscukrení	97,53	1,82	30,03	24,26	1,39
	po fermentácii	96,06	6,00	4,17	38,82	1,88
	po destilácii	97,85	11,65	0,06	38,37	2,47
Klaudia	po predscukrení	96,24	1,85	39,16	20,41	2,08
	po fermentácii	94,07	4,76	10,82	30,91	2,42
	po destilácii	97,54	12,38	0,06	42,14	3,14
Torysa	po predscukrení	96,00	2,89	27,79	17,84	1,86
	po fermentácii	95,70	4,95	4,13	29,21	2,46
	po destilácii	98,45	13,46	0,06	33,19	3,01
Šarlota	po predscukrení	96,26	1,94	24,49	22,55	3,42
	po fermentácii	95,89	5,77	2,76	39,14	3,79
	po destilácii	97,39	11,43	0,03	37,63	4,62

<sup>a</sup> Percentá meraných parametrov škrobu, proteínov a lipidov sú vyjadrené vzhľadom na obsah sušiny pšeničného šrotu

z jeho tekutej časti. Vo fermentovanom médiu z tejto série experimentov bola priemerná hodnota etanolu  $1,3 \pm 0,2$  g/100 ml, čo je v porovnaní s experimentmi, kde nebol tuhý podiel odseparovaný po predscukrení, výrazne nižšia. Tento výsledok korešponduje s relatívne vysokým obsahom škrobu v odseparovanom bočnom produkte (tab. III) a tiež v oddelení aj časti lipidov, ktoré podľa viacerých autorov môžu hrať vo fermentačnom procese kvasinkami významnú úlohu<sup>13, 14</sup>. V prípade oddelenia bočného produktu po fermentácii resp. po destilácii boli stanovené zodpovedajúce koncentrácie etanolu s priemernou hodnotou 5,2 g etanolu na 100 ml. V tab. III sú sumarizované výsledky chemickej analýzy separovaných bočných podielov po ich vysušení a homogenizácii.

Z výsledkov prezentovaných v tab. III je zrejmé, že najvyšší podiel škrobu bol stanovený vo frakciách oddelených po predscukrení, čo však malo negatívny dopad na produkciu etanolu. Množstvo škrobu stanovené v bočných produktoch oddelených po fermentácii resp. po destilácii bolo nízke a svedčí o jeho účinnej sacharifikácii. Obsah proteínov narastal v smere podiel po predscukrení – po fermentácii – po destilácii. Tento nárast je dôsledkom obohatovania fermentačného média kvasničnou biomasou. Podobné výsledky boli pozorované aj u lipidov.

## Záver

Z výsledkov vyplýva, že z pohľadu produkcie etanolu nie je výhodné separovať bočný produkt po predscukrení, pretože dochádza k oddeleniu aj podstatnej časti nezhydrolyzovaného škrobu, ktorá sa už nemôže zúčastniť SSF. Avšak v súvislosti s možnou aplikáciou bočných produktov v potravinárstve je separácia výhodná po predscukrení resp. po fermentácii. Izolovať bočný produkt až po destilácii (ako sa to robí v súčasných priemyselných liehovaroch) je menej výhodné, pretože nutričné komponenty, najmä proteíny, môžu byť denaturované.

*Práca vznikla za finančnej podpory projektu APVV LPP- 0251-07.*

## LITERATÚRA

1. Pejin D., Mojović L., Grujić O., Pejin J., Rakin M.: Chem. Ind. Chem. Eng. Q. 1, 49 (2009).
2. Monceaux D. A., Kuehner D., v knihe: *The Alcohol Textbook* (Ingledew W. M., Kelsall D. R., Austin G. D., Kluhspies C., ed.), str. 303, University Press, Nottingham 2009.
3. Krishnan P.: Ethanol co-product boosts nutrition in Asian flatbread 2010. <http://www.physorg.com/news192181297.html>, stiahnuté 13.01.2012.
4. Bonnardeaux J.: Potential uses for distillers grains

2007. <http://www.agric.wa.gov.au/content/sust/biofuel/potentialusesgrains042007.pdf>, stiahnuté 09.12.2011.
5. Soxhlet F.: Polytech. J. 232, 461 (1879).
  6. Miller G. L.: Anal. Chem. 31, 426 (1959).
  7. Suresh K., Kiransree N., Venkateswer Rae L.: Biores. Technol. 6X, 301 (1999).
  8. Neves M. A., Kimura T., Shimizu N., Shiiba K.: Braz. Arch. Biol. Technol. 49, 481 (2006).
  9. List of the certified agricultural varies 2010. [www.uksup.sk/download/odrody/20100920\\_lro\\_2010.pdf](http://www.uksup.sk/download/odrody/20100920_lro_2010.pdf), stiahnuté 05.02.2012.
  10. Tichý F.: *Zemědělské informace ÚZPI, 5/2001: Pěstební technologie a úprava zrna pšenice ozimné pro výrobu etanolu.* Ústav zemědělských a potravinářských informací, Praha 2001.
  11. Zhao R., Wu X., Seabourn B. W., Bean S. R., Guan L., Shi Y.-C., Wilson J. D., Madl R., Wang D.: Cereal Chem. 86, 145 (2009).
  12. Smith T. C., Kindred D. R., Brosnan J. M., Weightman R. M., Shepherd M., Sylvester-Bradley R.: *Wheat as a feedstock for alcohol production.* The Home-Grown Cereals Authority (HGCA), London 2006.
  13. Ondáš V., Horváthová V., Šturdík E.: Biologia 66, 1 (2011).
  14. Kearsley M. W., Dziedzic S. Z. (ed.): *Handbook of Starch Hydrolysis Products and Their Derivates.* Springer, London 1995.

**V. Horváthová, F. Gago, L. Cibíková, and E. Šturdík** (*Department of Biotechnology, University of St. Cyril and St. Methodius, Trnava, Slovakia*): **Characterization of By-products Simultaneous Saccharification and Fermentation of Selected Wheat Varieties**

The work is focused on the characterization of solid side products within the process of simultaneous saccharification and fermentation of selected wheat varieties. An average of 5.2 mg/100 ml ethanol was obtained by the process (*Saccharomyces cerevisiae* CCY-11-3, 28 °C, 72 h) after presaccharification, fermentation and distillation. The amount of nutritionally significant components (mainly proteins, fibre) in the side products increased in comparison with their amount in the scrap. It was also found out that for the efficient production of ethanol and further application of the side product, it is appropriate to finish the separation right after the fermentation.