

KATARZYNA KOTARSKA, WOJCIECH DZIEMIANOWICZ,  
ANNA ŚWIERCZYŃSKA

## IDENTYFIKACJA CHEMICZNYCH ZANIECZYSZCZEŃ ETANOLU UZYSKANEGO Z ZIARNA RÓŻNYCH ODMIAN KUKURYDZY

### Streszczenie

Celem pracy była identyfikacja związków chemicznych stanowiących zanieczyszczenia etanolu uzyskanego w procesie fermentacji alkoholowej różnych odmian kukurydzy. Opisano przyczyny powstawania w procesie fermentacji kukurydzy takich związków, które obniżają jakość wytwarzanego etanolu. Przeprowadzono identyfikację jakościową i ilościową produktów ubocznych w spirytusach po zakończonym procesie fermentacji. Obejmowała ona grupy związków: estry, aldehydy, alkohole wyższe oraz metanol. Badania jakości etanolu wykonano metodą chromatografii gazowej.

Zawartość związków karbonylowych w etanolu przeznaczonym na cele spożywcze jest normowana i nie może przekraczać wartości  $0,1 \text{ g/dm}^3 A_{100}$ . W badanych próbkach zawierała się w zakresie  $0,022 \div 0,087 \text{ g/dm}^3 A_{100}$ . Największą ilość związków karbonylowych stwierdzono w pierwszym etapie fermentacji, w czasie powstawania największych ilości etanolu. W ciągu następnych godzin fermentacji etanolowej ilość aldehydów sukcesywnie malała, przy czym największy ich ubytek obserwowano między 16. a 48. godziną. W żadnym z uzyskanych spirytusów nie stwierdzono obecności akroleiny, która ma właściwości kancerogenne. Ilość alkoholi wyższych zawierała się w dość szerokich granicach, tj.  $0,855 \div 3,553 \text{ g/dm}^3 A_{100}$ . Na ich poziom wpływ miała ilość n-propanolu, izobutanolu, n-butanolu oraz 2-metylo-1-butanolu. Wydajność alkoholu ze 100 kg ziarna różnych odmian kukurydzy kształtowała się w zakresie  $37,5 \div 43,3 \text{ dm}^3$ . Największą wydajność spirytusu uzyskano z ziarna kukurydzy odmian Euralis ES Runway oraz Euralis ES Hattric.

**Słowa kluczowe:** kukurydza, skrobia, fermentacja alkoholowa, produkty uboczne fermentacji, zanieczyszczenia chemiczne etanolu

### Wprowadzenie

Kukurydza jest jednym z najważniejszych surowców roślinnych w przemyśle spożywczym (w tym młynarskim i gorzelnicznym) oraz paszowym, jak również

---

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

w przemyśle papierniczym czy chemicznym [9]. W gorzelnictwie najważniejsza jest zawartość węglowodanów w ziarnie kukurydzy, która w największym stopniu zależy od genotypu rośliny. Decyduje ona o wydajności alkoholu etylowego w procesie fermentacji ziarna. Skrobia zawarta w ziarnie jest rozkładana w procesie hydrolizy enzymatycznej do węglowodanów ulegających bezpośrednio fermentacji etanolowej.

Ziarno kukurydzy uznawane jest za najbardziej efektywny pod względem energetycznym i ekonomicznym surowiec do przerobu na etanol. Argumenty potwierdzające powyższe stwierdzenie to: najwyższa wydajność alkoholu z 1 tony surowca spośród gatunków uprawianych w Polsce – ok.  $36 \div 43 \text{ dm}^3/100 \text{ kg}$  ziarna, duża zawartość skrobi podlegającej rozkładowi do glukozy i fermentacji – ok.  $55 \div 70 \%$ , ponadto niskie koszty przerobu surowca, możliwość uprawy w monokulturze, możliwość uprawy kukurydzy na różnych kompleksach glebowych, wysoki potencjał plonotwórczy [8, 18].

Odmiany kukurydzy różnią się między sobą z uwagi na: długość okresu wegetacji (wczesne, średnio wczesne, średnio późne i późne), kształt ziarniaka (kulisty, owalny, kanciasty, klinowaty), barwę, budowę wewnętrzną ziarniaka (pastewne, zwykłe, cukrowe, skrobiowe, pękające, woskowe, oplewione, skrobiowo-cukrowe), zawartość skrobi oraz jej skład. Większość odmian kukurydzy zawiera w ziarnie skrobię, która składa się z amylopektyny ( $65 \div 85 \%$ ) i amylozy ( $15 \div 35 \%$ ) [15].

Obecnie uprawiane odmiany kukurydzy wywodzą się głównie od dwóch typów – kukurydzy szklistej (flint) oraz końskiego zęba (dent). Ziarno typu dent jest wydłużone i spłaszczone, z zagłębieniem na szczycie. Charakteryzuje się dużą zawartością mączystego bielma. Taki typ ziarna jest szczególnie przydatny dla przemysłu skrobiowego i gorzelniczego. W ziarnie kukurydzy typu flint dominuje natomiast bielmo szkliste, dlatego przydatne jest ono do produkcji kasz i mąki oraz jako pasza treściwa w żywieniu bydła mlecznego [16].

Ocenę możliwości wykorzystania danej odmiany kukurydzy w produkcji etanolu przeprowadza się poprzez wykonanie prób fermentacyjnych, a następnie obliczenie wydajności etanolu z surowca. Jak podają Kawa-Rygielska [5] i Liszewski [6], najefektywniejsze pod tym względem są późniejsze odmiany kukurydzy, które charakteryzują się nie tylko wysokim poziomem wydajności etanolu w procesie fermentacji, ale także dużym potencjałem plonowania.

Podczas procesu fermentacji oprócz etanolu powstaje szereg związków lotnych, przechodzących w trakcie destylacji do spirytusu i powodujących jego zanieczyszczenie. Związki te tworzą się podczas procesów biochemicznych lub są wynikiem aktywności metabolicznej niepożądanego mikroflory. Wyróżnia się wśród nich: metanol, estry, aldehydy, wyższe alkohole oraz kwasy organiczne [3, 7, 11]. Poszczególne substancje należące do wymienionych grup zanieczyszczeń różnią się w sposób istotny progiem wyczuwalności sensorycznej. Niektóre z nich w niewielkich ilościach wpływają na

zmianę cech sensorycznych spirytusów. Inne nawet w ilościach śladowych mogą zdecydowanie negatywnie zmieniać smak i zapach spirytusów [1].

Celem pracy była identyfikacja związków chemicznych stanowiących zanieczyszczenia etanolu uzyskanego w procesie fermentacji alkoholowej ziarna różnych odmian kukurydzy dostępnych na polskim rynku.

### **Material i metody badań**

Do badań użyto ziarna 8 odmian kukurydzy:

- SY Talisman (ziarno typu flint), SY Pandoras (ziarno typu flint) – Syngenta, Szwajcaria,
- P8329 (ziarno o typie pośrednim zbliżonym do dent), P8821 (ziarno o typie pośrednim flint/dent) i P8307 (ziarno o typie pośrednim flint/dent) – Pioneer, USA,
- ES Palladium (ziarno typu flint), ES Runway (ziarno typu dent) oraz ES Hatrick (ziarno typu dent) – Euralis, Francja.

Ziarno wymienionych odmian kukurydzy rozdrabniano w młynie tarczowym, typ SEMg 71-2B (ZBPP, Bydgoszcz), do uzyskania jednorodnych próbek o wielkości cząstek < 0,25 mm.

W próbkach rozdrobnionego surowca oznaczano wilgotność metodą wagową według PN-ISO 6496:2002 [19] oraz zawartość skrobi polarymetryczną metodą Ewersa według PN-EN ISO 10520:2002 [20].

Z rozdrobnionego surowca sporządzano zacierę metodą BUS w warunkach laboratoryjnych i każdorazowo w dniu rozpoczęcia fermentacji.

Wydajność etanolu określano na podstawie prób fermentacyjnych zgodnie z procedurą określania wydajności etanolu z surowców gorzelnicznych [13]. Stężenie etanolu oznaczano za pomocą refraktometru zanurzeniowego (Carl Zeiss Jena VEB, Niemcy), a wynik [% (v/v)] odczytywano z tablic Wagnera. Uzyskany wynik wskazuje na maksymalną możliwą do uzyskania w warunkach przemysłowych wydajność etanolu ze 100 kg surowca.

Jakość etanolu badano po przeprowadzeniu prób fermentacyjnych. Stosowano w nich proporcje ziarna do wody zgodne z zaleceniami obowiązującymi w gorzelniach przy przerobieniu surowców skrobiowych metodą BUS, na poziomie gęstości ok. 17,5 °Błg, tzn. na każde 100 g ziarna używano ok. 400 cm<sup>3</sup> wody.

Uwodnioną masę zawierającą skrobię poddawano hydrolizie przy użyciu preparatów enzymatycznych pochodzenia mikrobiologicznego firmy Novozymes. Były to: Termamyl 120L<sup>®</sup> ( $\alpha$ -amylaza) – enzym upłynniający skrobię, w dawce standardowej, tj. 140 ml/t skrobi, przy której aktywność preparatu wynosi 120 KNU/g oraz SAN Extra<sup>®</sup> L (glukoamylaza) – enzym hydrolizujący wiązania 1-4 i 1-6 glukozydowe w upłynnionej skrobi i dekstrynach, w dawkach zalecanych przez producenta, tj. 600 ml/t skrobi. Enzymy dodawano w warunkach zalecanych przez producenta, tj.

$\alpha$ -amylazę – temp. aktywacji enzymu 85 °C, czas aktywności 20 min; glukoamylazę – temp. aktywacji enzymu 65 °C, pH 5,4, czas aktywności 20 min. Podczas hydrolizy mieszano i podgrzewano substraty zgodnie z wymienionymi zaleceniami producenta preparatów enzymatycznych w celu przeprowadzenia głębokiej hydrolizy oraz stosowano regulację pH stężonym kwasem siarkowym. W wyniku hydrolizy uzyskiwano zacier, w którym oznaczano zawartość ekstraktu [°Błg] areometrycznie.

Do zacierów sporządzanych z ziarna badanych odmian kukurydzy dodawano drożdże *Saccharomyces cerevisiae* (szcep D-2), które pochodziły z kolekcji Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego w Warszawie. Charakterystyczne cechy szczepu *S. cerevisiae* D-2 to: acidofilność (zdolność przystosowania się do silnie ukwaszonego środowiska, pH 3), termofilność (38 ÷ 39 °C), osmoofilność (do 24 °Błg) oraz alkoholoodporność (do 14 % v/v alkoholu). Szczep D-2 stosowano w postaci mlecza drożdżowego, które przygotowywano z suchego preparatu. Odważano 5 g drożdży i poddawano rehydratacji z jednoczesnym odkażaniem, mającym na celu eliminację uszkodzonych komórek drożdży (10 ÷ 20 %) powstałych w wyniku suszenia oraz ewentualnej mikroflory bakteryjnej. Do odkażania stosowano 50 cm<sup>3</sup> wodnego roztworu stężonego kwasu siarkowego (proporcja kwasu do wody 1 : 200) do pH ok. 2, w temp. 30 °C. Mleczko drożdżowe mieszano przy użyciu mieszadła magnetycznego Electromagnetic Stirrer, typ ES 21H (WIGO, Polska), przy prędkości 500 obr./min przez 10 min. Drożdże stosowano do zacierów w temp. 30 °C, przy pH 5,4 (poziom uzyskany po procesie upłynnienia i scukrzenia zacierów). W teście z błękitem metylenowym potwierdzono, że komórki drożdży cechowały się dobrą żywotnością i aktywnością fermentacyjną.

Zaciera kukurydziane szczepiono mleczkiem drożdżowym w ilości 30 ml na 1500 ml nastawu, kolby zamykano korkami gumowymi zakończonymi rurkami fermentacyjnymi wypełnionymi gliceryną i umieszczano w termostacie w temp. 38 °C na trzydobową fermentację. Dane termiczne i inne parametry fermentacji etanolowej odzwierciedlały technologiczne warunki stosowane w gorzelniach rolniczych, dzięki czemu uzyskane wyniki można odnosić do warunków przemysłowych, zarówno w zakresie wydajności etanolu, jak i jego jakości.

Po zakończeniu fermentacji prowadzono destylację odfermentowanych zacierów w specjalnie skonstruowanym szklanym zestawie. W jego skład wchodziły: szklana kolumna destylacyjna wyposażona w 25 półek przelewowych typu kapslowego, kolba destylacyjna o pojemności 2 dm<sup>3</sup>, deflegmator z płaszczem wodnym wyposażonym w termometr kontaktowy do pomiaru temperatury par spirytusowych, chłodnica prosta Liebiga z płaszczem wodnym oraz elektryczny płaszcz grzejny zasilany przez elektroniczny regulator mocy. W deflegmatorze utrzymywano temperaturę na stałym poziomie 80 ÷ 81 °C. Uzyskiwano destylaty o mocy 88 ÷ 92 % v/v etanolu.

W celu określenia dynamiki zmian tworzenia związków karbonylowych próbki destylatu pobierano po 16, 24, 36, 48, 65 i 72 h fermentacji etanolowej i oznaczano w nich zawartość aldehydów.

Analizę destylatów wykonywano przy użyciu chromatografu gazowego HP6890 serii GC System (Hewlett Packard, USA) z detektorem płomieniowo-jonizacyjny FID, zoptymalizowanym dla kolumn kapilarnych z układem EPC. Port nastrzykowy pracował w temp. 210 °C, ze stosunkiem podziału – 1 : 25, przy stałym przepływie gazu nośnego (hel o ciśnieniu 0,98 bara) wynoszącym 2,1 ml·min<sup>-1</sup>. Do rozdzielania analizowanych składników stanowiących zanieczyszczenia etanolu używano kolumny Varian Capillary Kolumn typu – CP-WAX 57CB ze związaną fazą stacjonarną typu PEG (*high polarity polyethylene glycol*) o wymiarach 50 m × 0,32 mm × 0,20 μm (Agilent Technologies, USA). Program temperaturowy kolumny chromatograficznej przedstawiał się następująco: temp. 40 °C przez 2 min → wzrost temp. do 80 °C z prędkością 7 °C·min<sup>-1</sup> → temp. 80 °C przez 3 min → wzrost temp. do 160 °C z prędkością 10 °C·min<sup>-1</sup> → temp. 160 °C przez 4 min. Warunki pracy detektora FID były następujące: temp. – 240 °C, przepływ wodoru – 25 ml·min<sup>-1</sup>, przepływ powietrza 280 ml·min<sup>-1</sup> oraz przepływ gazu nośnego w trybie ciągłym – 30,0 ml·min<sup>-1</sup>. Parametry integracji sygnału i raportowania danych zostały zoptymalizowane przez komputerową stację analityczną wyposażoną w oprogramowanie ChemStation (G2070AA rev. A.05.02).

Kwasowość spirytusów oznaczano metodą miareczkową zgodnie z PN-A-79528-7:2001 [21].

Wszystkie analizy wykonywano w trzech powtórzeniach. Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej. Obliczano wartości średnie 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 12,0 (StatSoft).

## Wyniki i dyskusja

W tab. 1. przedstawiono charakterystykę ziarna różnych odmian kukurydzy, pozyskanego od różnych producentów.

Wilgotność surowca kształtowała się na poziomie 9,44 ÷ 12,21 %. Najmniejszą wilgotność stwierdzono w ziarnach kukurydzy odmian typu dent, tj. ES Runway – 9,45 %, ES Hattrick – 9,56 % i odmian typu pośredniego flint/dent, tj. P8329 – 9,44 %, P8821 – 9,58 % (tab. 1). Odmiany typu flint są wcześniejsze, o grubej warstwie bielma szklatego, ale trudniej oddają wodę z ziarna. Wilgotność ziarna tego typu jest na ogół o 2 ÷ 3 % większa w porównaniu z ziarnem typu dent [16]. Największą wilgotność zaobserwowano jednak w ziarnie odmiany P8307 (12,21 %) typu pośredniego flint/dent.

Tabela 1. Charakterystyka fizykochemiczna ziarna badanych odmian kukurydzy

Table 1. Physical-chemical profile of grain of maize varieties

| Producent<br>Producer | Odmiana kukurydzy<br>Maize variety | Wilgotność<br>Moisture<br>[%] | Zawartość skrobi<br>Content of starch<br>[%] | Wydajność<br>etanolu<br>Ethanol yield<br>[dm <sup>3</sup> /100 kg<br>surowca / raw<br>material] |
|-----------------------|------------------------------------|-------------------------------|--|---|
| Syngenta              | SY Talisman (flint)                | 10,42 <sup>d</sup> ± 0,02     | 57,70 <sup>a</sup> ± 0,62                    | 37,48 <sup>a</sup> ± 0,23   |
|                       | SY Pandoras (flint)                | 10,40 <sup>d</sup> ± 0,01     | 56,15 <sup>a</sup> ± 0,51                    | 36,49 <sup>a</sup> ± 0,19   |
| Pioneer               | P8329 (~dent)                      | 9,44 <sup>a</sup> ± 0,01      | 61,69 <sup>b</sup> ± 0,72                    | 40,14 <sup>b</sup> ± 0,34   |
|                       | P8821 (flint/dent)                 | 9,58 <sup>b</sup> ± 0,01      | 64,46 <sup>cd</sup> ± 0,97                   | 41,92 <sup>cd</sup> ± 0,47  |
|                       | P8307 (flint/dent)                 | 12,21 <sup>e</sup> ± 0,03     | 62,46 <sup>c</sup> ± 0,44                    | 40,62 <sup>c</sup> ± 0,17   |
| Euralis               | ES Palladium (flint)               | 9,78 <sup>c</sup> ± 0,02      | 65,08 <sup>d</sup> ± 0,60                    | 42,33 <sup>d</sup> ± 0,22   |
|                       | ES Runway (dent)                   | 9,45 <sup>a</sup> ± 0,01      | 66,62 <sup>d</sup> ± 0,78                    | 43,25 <sup>e</sup> ± 0,36   |
|                       | ES Hattrick (dent)                 | 9,56 <sup>b</sup> ± 0,01      | 66,62 <sup>d</sup> ± 0,81                    | 43,30 <sup>e</sup> ± 0,39   |

Objaśnienia / Explanatory notes:

W tabeli przedstawiono wartości średnie ± odchylenia standardowe / Table shows mean values ± standard deviations; a - e – wartości średnie w kolumnach oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie istotnie ( $p \leq 0,05$ ) / mean values in columns denoted by different letters differ statistically significantly ( $p \leq 0,05$ ); n = 3.

W przebadanej grupie odmian kukurydzy największą zawartość skrobi odnotowano w ziarnie pochodzącym od producenta Euralis, tj. ES Palladium, ES Runway oraz ES Hattrick – 65,08 ÷ 66,62 % (tab. 1). Duża zawartość skrobi, która na drodze dwustopniowej hydrolizy enzymatycznej została rozłożona do cukrów redukujących, miała wpływ na wyniki wydajności etanolu. W przypadku odmian Euralis – ES Runway oraz ES Hattrick – wydajność etanolu ze 100 kg surowca była największa i wynosiła 43,3 dm<sup>3</sup>. Na równie wysokim poziomie plasowały się odmiany ES Palladium (42,3 dm<sup>3</sup>) oraz Pioneer P8821 (41,9 dm<sup>3</sup>). W przypadku pozostałych odmian kukurydzy wydajność etanolu ze 100 kg ziarna zawierała się w granicach 36,5 ÷ 40,6 dm<sup>3</sup> (tab. 1).

W spirytusach otrzymanych w wyniku destylacji zacierów odfermentowanych oznaczono alkohole wyższe, metanol, estry, aldehydy, w tym akroleinę oraz kwasowość i moc. Większość produktów ubocznych fermentacji alkoholowej tworzy z wodą mieszaniny azeotropowe, których temperatury wrzenia są niższe niż temperatury wrzenia czystych składników, dlatego podczas procesu destylacji do spirytusu dostawały się także produkty należące do wysokowrzących substancji chemicznych [10].

W spirytusach zawartość związków karbonylowych wynosiła od 0,022 g/dm<sup>3</sup> A<sub>100</sub> (Pioneer 8307) do 0,087 g/dm<sup>3</sup> A<sub>100</sub> (Syngenta SY Talisman) – tab. 2, czyli była dużo poniżej wartości normatywnej. Zgodnie z Polską Normą [12] dopuszczalna zawartość

aldehydów w spirytusach zbożowych przeznaczonych na cele spożywcze wynosi bowiem  $0,1 \text{ g/dm}^3 \text{ A}_{100}$ . Na ogólną sumę aldehydów składały się: aldehyd octowy i aldehyd propionowy.

Tabela 2. Zawartość aldehydów, estrów oraz kwasowość w spirytusach uzyskanych z ziarna różnych odmian kukurydzy po 72 h fermentacji etanolowej

Table 2. Content of aldehydes in, esters in and acidity of spirits produced from grain of different maize varieties after 72 h of ethanol fermentation

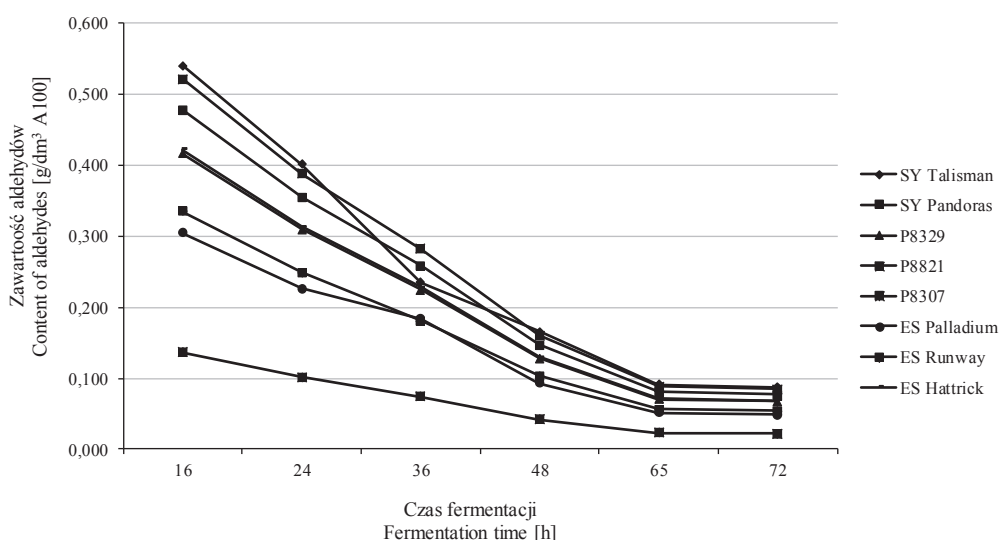
| Producent<br>Producer | Odmiana kukurydzy<br>Maize variety | Aldehydy<br>[g/dm <sup>3</sup> A <sub>100</sub> ]<br>Aldehydes<br>[g/dm <sup>3</sup> EtOH] | Estry<br>[g/dm <sup>3</sup> A <sub>100</sub> ]<br>Esters<br>[g/dm <sup>3</sup> EtOH] | Kwasowość<br>[g/dm <sup>3</sup> A <sub>100</sub> ]<br>Acidity<br>[g/dm <sup>3</sup> EtOH] |
|-----------------------|------------------------------------|--|--|---|
| Syngenta              | SY Talisman (flint)                | 0,087 <sup>b</sup> ± 0,013   | 0,015 <sup>d</sup> ± 0,001   | 0,020 <sup>a</sup> ± 0,003  |
|                       | SY Pandoras (flint)                | 0,077 <sup>b</sup> ± 0,011   | 0,008 <sup>c</sup> ± 0,001   | 0,056 <sup>ab</sup> ± 0,009   |
| Pioneer               | P8329 (~dent)                      | 0,067 <sup>ab</sup> ± 0,014  | 0,043 <sup>c</sup> ± 0,003   | 0,059 <sup>b</sup> ± 0,012  |
|                       | P8821 (flint/dent)                 | 0,084 <sup>b</sup> ± 0,180   | 0,012 <sup>cd</sup> ± 0,001  | 0,036 <sup>ab</sup> ± 0,080   |
|                       | P8307 (flint/dent)                 | 0,022 <sup>a</sup> ± 0,008   | 0,004 <sup>ab</sup> ± 0,000  | 0,033 <sup>ab</sup> ± 0,011   |
| Euralis               | ES Palladium (flint)               | 0,049 <sup>ab</sup> ± 0,004  | 0,005 <sup>b</sup> ± 0,000   | 0,047 <sup>b</sup> ± 0,014  |
|                       | ES Runway (dent)                   | 0,054 <sup>ab</sup> ± 0,011  | 0,001 <sup>a</sup> ± 0,000   | 0,020 <sup>a</sup> ± 0,005  |
|                       | ES Hatrick (dent)                  | 0,068 <sup>ab</sup> ± 0,017  | 0,003 <sup>ab</sup> ± 0,000  | 0,036 <sup>ab</sup> ± 0,004   |

Objaśnienia jak pod tab. 1. / Explanatory notes as in Tab. 1.

Przemiany biochemiczne podczas fermentacji alkoholowej zachodzą bardzo dynamicznie, m.in. kwas pirogronowy podlega nieoksydacyjnej dekarboksylacji, polegającej na odszczepieniu CO<sub>2</sub> przy udziale enzymu dekarboksylazy pirogronowej współdziałającej z pirofosforanem tiaminy DPT i jonami magnezu. Powstały aldehyd octowy staje się akceptorem atomów wodoru z uwodorowanego NAD<sup>+</sup>, w wyniku czego przy udziale dehydrogenazy alkoholowej następuje przeniesienie tych atomów i utworzenie alkoholu etylowego [2, 4, 17]. Najwięcej tworzącego się aldehydu octowego, który jest dominującym alifatycznym związkiem karbonylowym [1], zaobserwowano w pierwszym etapie fermentacji. Redukcja aldehydu octowego w szlaku metabolicznym do alkoholu etylowego przy udziale dehydrogenazy alkoholowej nie nadążała początkowo za jego produkcją. Dopiero w kolejnych godzinach fermentacji nagromadzony aldehyd octowy był wykorzystywany jako akceptor wodoru i redukowany sukcesywnie do alkoholu etylowego, co skutkowało stopniowym zmniejszaniem jego stężenia w środowisku fermentacyjnym i przyrostem ilości etanolu. Tak więc największa ilość aldehydu octowego, jak również aldehydu propionowego, wytwarzana była w pierwszych 16 h fermentacji (rys. 1). W tym okresie stężenie związków karbonylowych w destylatach w zależności od odmiany kukurydzy zawierało się w zakresie  $0,137 \div 0,540 \text{ g/dm}^3 \text{ A}_{100}$ . W ciągu następnych godzin fermentacji etanolowej (16 ÷ 65 h) ilość aldehydów sukce-

sywnie malała, jednak największy ich ubytek obserwowano między 16. a 48. godziną. W końcowym okresie po dofermentowaniu (72 h) osiągnano minimalny poziom aldehydów, charakterystyczny dla danego surowca i odmiany. Ubytek związków karbonylowych między 16. a 72. godziną fermentacji wynosił ok. 82 ÷ 85 %.

W żadnym z przebadanych spirytusów nie stwierdzono obecności akroleiny, która ma właściwości kancerogenne. Akroleina to aldehyd akrylowy, którego niewielka ilość w spirytusie powoduje wyczuwalne pogorszenie jego walorów zapachowych – próg wyczuwalności sensorycznej wynosi 10 mg/dm<sup>3</sup>.



Rys. 1. Zawartość aldehydów w spirytusach uzyskanych z ziarna różnych odmian kukurydzy w zależności od czasu fermentacji etanolowej

Fig. 1. Content of aldehydes in spirits produced from grain of different maize varieties depending on ethanol fermentation duration

Związki, które mają decydujący wpływ na zapach spirytusu, to estry. Ich obecność jest częściowo spowodowana aktywnością esterazy drożdżowej, która w znacznym stopniu zależy od stężenia glukozy i fazy wzrostu drożdży. Niewielką ilość tych związków odnotowano w spirytusach z ziarna kukurydzy producenta Euralis, tj. ES Runway – 0,001 g/dm<sup>3</sup> A<sub>100</sub> oraz ES Hattrick – 0,003 g/dm<sup>3</sup> A<sub>100</sub>. Większą (choć nieznaczącą) ilość estrów stwierdzono w spirytusie z ziarna P8329 producenta Pioneer – 0,043 g/dm<sup>3</sup> A<sub>100</sub>, (tab. 2).

Produktami ubocznymi, które występują w zacierach, są także kwas octowy oraz kwasy nieorganiczne zastosowane do regulacji pH zacieru podczas hydrolizy skrobi oraz podłoża hodowlanego dla drożdży. Kwasowość wszystkich analizowanych spirytusów była niewielka i zawierała się w granicach 0,020 ÷ 0,059 g/dm<sup>3</sup> A<sub>100</sub>, przy czym



według Polskiej Normy [12] kwasowość spirytusu zbożowego nie może przekroczyć  $0,08 \text{ g/dm}^3 A_{100}$ .

Tabela 3. Zawartość alkoholi wyższych w spirytusach uzyskanych z ziarna różnych odmian kukurydzy po 72 h fermentacji etanolowej

Table 3. Content of higher alcohols in spirits produced from grain of different maize varieties after 72 h of ethanol fermentation

| Producent<br>Producer | Odmiana kukurydzy<br>Maize variety | Alkohole wyższe [ $\text{g/dm}^3 A_{100}$ ]<br>Higher alcohols [ $\text{g/dm}^3 \text{EtOH}$ ] |                               |                                |  |                               |
|-----------------------|------------------------------------|--|-------------------------------|--------------------------------|--|-------------------------------|
|                       |                                    | n-propanol   | izo-butanol<br>isobutanol     | n-butanol                      | 2-metylo-<br>1-butanol<br>2-methyl-<br>1-butanol | Suma<br>Total                 |
| Syngenta              | SY Talisman<br>(flint)             | 0,854 <sup>c</sup><br>± 0,021  | 1,614 <sup>d</sup><br>± 0,087 | 0,010 <sup>d</sup><br>± 0,000  | 0,708 <sup>c</sup><br>± 0,023                    | 3,186 <sup>d</sup><br>± 0,041 |
|                       | SY Pandoras<br>(flint)             | 0,909 <sup>c</sup><br>± 0,027  | 1,609 <sup>d</sup><br>± 0,094 | 0,009 <sup>cd</sup><br>± 0,000 | 0,746 <sup>d</sup><br>± 0,030                    | 3,273 <sup>d</sup><br>± 0,021 |
| Pioneer               | P8329<br>(~dent)                   | 1,335 <sup>d</sup><br>± 0,015  | 0,808 <sup>b</sup><br>± 0,028 | 0,017 <sup>e</sup><br>± 0,001  | 0,246 <sup>a</sup><br>± 0,009                    | 2,406 <sup>c</sup><br>± 0,040 |
|                       | P8821<br>(flint/dent)              | 0,836 <sup>c</sup><br>± 0,017  | 1,746 <sup>d</sup><br>± 0,046 | 0,010 <sup>d</sup><br>± 0,000  | 0,844 <sup>de</sup><br>± 0,049                   | 3,436 <sup>e</sup><br>± 0,013 |
|                       | P8307<br>(flint/dent)              | 0,821 <sup>c</sup><br>± 0,080  | 1,785 <sup>d</sup><br>± 0,055 | 0,008 <sup>c</sup><br>± 0,000  | 0,872 <sup>e</sup><br>± 0,042                    | 3,486 <sup>e</sup><br>± 0,044 |
| Euralis               | ES Palladium<br>(flint)            | 0,849 <sup>c</sup><br>± 0,069  | 1,768 <sup>d</sup><br>± 0,047 | 0,010 <sup>d</sup><br>± 0,001  | 0,926 <sup>e</sup><br>± 0,031                    | 3,553 <sup>e</sup><br>± 0,024 |
|                       | ES Runway<br>(dent)                | 0,379 <sup>b</sup><br>± 0,021  | 1,134 <sup>c</sup><br>± 0,038 | 0,006 <sup>b</sup><br>± 0,000  | 0,479 <sup>b</sup><br>± 0,024                    | 1,998 <sup>b</sup><br>± 0,021 |
|                       | ES Hattrick<br>(dent)              | 0,216 <sup>a</sup><br>± 0,011  | 0,418 <sup>a</sup><br>± 0,017 | 0,002 <sup>a</sup><br>± 0,000  | 0,219 <sup>a</sup><br>± 0,015                    | 0,855 <sup>a</sup><br>± 0,019 |

Objaśnienia jak pod tab. 1. / Explanatory notes as in Tab. 1.

Metanol występował we wszystkich badanych spirytusach w niewielkiej ilości  $0,001 \text{ g/100 cm}^3 A_{100}$ . W procesie fermentacji alkoholowej oprócz metanolu i etanolu tworzą się również alkohole wyższe, tzw. oleje fuzlowe. Dowiedzono kilku dróg powstawania alkoholi wyższych. Związki te powstają w wyniku dezaminacji aminokwasów, głównie izoleucyny, leucyny i waliny. Drożdże, wykorzystując odszczepiony z aminokwasów amoniak, syntetyzują własne białko. Aminokwasy ulegają przy tym dezaminacji i dekarboksylacji, a powstałe alkohole wyższe wydzielane są z komórki. Tworzy się w ten sposób izobutanol z waliny, 3-metylobutanol z leucyny, 2-metylobutanol z izoleucyny itd. [14]. Ilość alkoholi wyższych w otrzymanych spirytusach zawierała się w dość szerokich granicach  $0,855 \div 3,553 \text{ g/dm}^3 A_{100}$ , przy czym najniższe ich stężenie odnotowano w spiry图斯ie wytworzonym z ziarna Euralis ES

Hattrick (tab. 3). Na poziom fuzli wpływ miała ilość n-propanolu, izobutanolu, n-butanolu oraz 2-metylo-1-butanolu.

### Wnioski

1. Wydajność etanolu możliwa do uzyskania ze 100 kg surowca powinna decydować o wyborze ziarna kukurydzy przeznaczonego do produkcji spirytusu. W przeprowadzonych badaniach największą wydajność etanolu uzyskano z ziarna odmian Euralis: ES Runway oraz ES Hattrick – 43,3 dm<sup>3</sup>/100 kg surowca.
2. Zawartość związków karbonylowych (tj. aldehydu octowego i propionowego) w destylatach uzyskanych z ziarna różnych odmian kukurydzy zawierała się w przedziale 0,022 ÷ 0,087 g/dm<sup>3</sup>·A<sub>100</sub> i nie przekraczała dopuszczalnej ilości aldehydów w spirytusach zbożowych przeznaczonych na cele spożywcze.
3. Największą zawartość związków karbonylowych w destylatach stwierdzono w pierwszych godzinach fermentacji. W kolejnych godzinach aldehydy były redukowane do etanolu, co skutkowało stopniowym zmniejszaniem ich stężenia w środowisku fermentacyjnym. Wartości minimalne odnotowano między 65. a 72. godziną procesu.
4. Stwierdzono, że na ogólną sumę alkoholi wyższych składały się: n-propanol, izobutanol, n-butanol oraz 2-metylo-1-butanol. Najwyższe stężenie fuzli (3,553 g/dm<sup>3</sup>·A<sub>100</sub>) odnotowano w spirytusie uzyskanym z ziarna odmiany Euralis ES Palladium, a najniższe (0,855 g/dm<sup>3</sup>·A<sub>100</sub>) – Euralis ES Hattrick.

### Literatura

- [1] Balcerek M., Pielech-Przybylska K., Strąg 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.*, 2016, 242, 321-335.
- [2] Cheraiti N., Guezenc S., Salmon J.M.: Very early acetaldehyde production by industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains: A new intrinsic character. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2010, 86, 693-700.
- [3] Dragone G., Mussatto S.I., Oliveira J.M., Teixeira J.A.: Characterisation of volatile compounds in an alcoholic beverage produced by whey fermentation. *Food Chem.*, 2009, 4 (112), 929-935.
- [4] Jamróz J., Jankowski D.: Characteristic of producing ethyl alcohol. *Technical Transactions*, 2018, 3 (115), 53-66.
- [5] Kawa-Rygielska J.: Bioetanol z kukurydzy – czy warto produkować? *Przem. Ferm. Owoc.-Warz.*, 2007, 5 (51), 38-39.
- [6] Liszewski M.: Kukurydza: kierunek użytkowania a cechy odmian. [on line]. Dostęp w Internecie [05.02.2020]: <https://www.agropolska.pl/uprawa/kukurydza/kukurydza-kierunek-uzytowania-a-cechy-odmian,66.html>
- [7] Kłosowski G., Mikulski D., Macko D., Mikłaszewska B., Kotarska K., Czupryński B.: Influence of various yeast strains and selected starchy raw materials on production of higher alcohols during the alcoholic fermentation process. *Eur. Food Res. Technol.*, 2014, 240 (1), 233-242.

- [8] Michalski T.: Z pola dla przemysłu. W: Kukurydza rośliną przyszłości. Wyd. III. Specjalny dodatek do dwutygodnika "Agro Serwis", Warszawa 2005.
- [9] Niedziółka I., Szymanek M.: Przemysłowe i energetyczne wykorzystanie ziarna kukurydzy. Motrol. Motoryzacja i Energetyka Rolnictwa, 2003, 05, 115-121.
- [10] Onuki S., Koziel J.A., Jenks W., Cai L., Grewell D., van Leeuwen J.H.: Taking ethanol quality beyond fuel grade: A review. J. Inst. Brew., 2016, 122, 588-598.
- [11] Pielech-Przybylska K., Balcerek M., Ciepeliowski G., Pacholczyk-Sienicka B., Albrecht Ł., Dziekońska-Kubczak U., Bonikowski R., Patelski P.: Effect of co-inoculation with *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria on the content of propan-2-ol, acetaldehyde and weak acids in fermented distillery mashes. Int. J. Mol. Sci., 2019, 20 (7), #1659.
- [12] PN-A-79523:2002. Destylat rolniczy.
- [13] PB-ZG/09. Wyd. II z dn. 08.12.2014 r.: Wydajność alkoholu z węglowodanów zawartych w surowcach gorzelniczych po hydrolizie enzymatycznej.
- [14] Ribéreau-Gayon P., Dubourdieu D., Donèche B., Lonvaud A.: Handbook of Enology. Vol. 2. The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments. 2<sup>nd</sup> ed. John Wiley and Sons Ltd, Chichester 2006.
- [15] Strąk-Graczyk E., Balcerek M., Przybylska K., Żyżelewicz D.: Simultaneous saccharification and fermentation of native rye, wheat and triticale starch. J. Sci. Food Agric., 2019, 99, 4904-4912.
- [16] Waligóra H., Skrzypczak W.: Kukurydza flint i dent – różnice i wykorzystanie. Hodowca Bydła, 2015, 7-8.
- [17] Zhou M., Zhou J., Tan M., Du J., Yan B., Wong J.W.C., Zhang Y.: Enhanced carboxylic acids production by decreasing hydrogen partial pressure during acidogenic fermentation of glucose. Biore-sour. Technol., 2017, 245, 44-51.
- [18] Zielonka R., Jarosławski L., Słomińska L., Radke J.: Wpływ fizycznej i amylolicznej modyfikacji ziarna kukurydzy i produktów przemiału na zawartość wybranych składników. Acta Agrophysica, 2012, 19 (1), 215-225.
- [19] PN-ISO 6496:2002. Pasze. Oznaczanie wilgotności i zawartości innych substancji lotnych.
- [20] PN-EN ISO 10520:2002. Skrobia naturalna. Oznaczanie zawartości skrobi. Metoda polarymetryczna Ewersa.
- [21] PN-A-79528-7:2001. Spirytus (alkohol etylowy). Metody badań. Oznaczanie kwasowości.

## IDENTIFICATION OF CHEMICAL IMPURITIES IN ETHANOL PRODUCED FROM GRAIN OF VARIOUS MAIZE VARIETIES

### S u m m a r y

The objective of the research study was to identify chemical compounds that are impurities in ethanol obtained in the process of alcoholic fermentation of various maize varieties. There were described reasons for the formation of such compounds in the fermentation process of maize, which reduce the quality of ethanol produced. There was carried out a qualitative and quantitative identification of by-products in the spirits after the completed fermentation process was carried out. It included the following groups of compounds: esters, aldehydes, higher alcohols and methanol. The quality analysis of ethanol was performed using a gas chromatography method.

The content of carbonyl compounds in the ethanol intended for food purposes is regulated by standards and cannot exceed the value of 0.1 g/dm<sup>3</sup> of EtOH. In the samples analysed it ranged 0.022 ÷ 0.087 g/dm<sup>3</sup> of EtOH. The highest amount of carbonyl compounds was found during the first stage of fermentation, when the highest quantities of ethanol were formed. During the subsequent hours of ethanol

fermentation the amount of aldehydes gradually decreased, with the highest decrease observed between the 16<sup>th</sup> and 48<sup>th</sup> hour. In any of the spirits produced there was not found acrolein, which has carcinogenic properties. The amount of higher alcohols was within the fairly wide limits, i.e. 0.855 ÷ 3.553 g/dm<sup>3</sup> of EtOH. Their level was impacted by the amount of n-propanol, isobutanol, n-butanol and 2-methyl-1-butanol. The yield of alcohol produced from 100 kg of grain of various maize varieties ranged 37.5 ÷ 43.3 dm<sup>3</sup>. The highest yield of spirit was reported in the case of the Euralis ES Runway and Euralis ES Hattric varieties.

**Key words:** maize, starch, alcoholic fermentation, by-products of fermentation, chemical impurities of ethanol 