

## VYUŽITÍ KMENE KVASINEK I-7-43 PŘIPRAVENÉHO FÚZÍ BUNĚK *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* A *SACCHAROMYCES DIASTATICUS* V ZEMĚDĚLSKÉM LIHOVARU

### STUDIES ON UTILIZATION OF THE YEAST STRAIN I-7-43 – FUSANT BETWEEN *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* AND *SACCHAROMYCES DIASTATICUS* IN AGRICULTURAL DISTILLERY

MAŁGORZATA WOLSKA, BOGUSŁAW CZUPRYŃSKI, GRZEGORZ KŁOSOWSKI, KATARZYNA KOTARSKA, Nezávislá lihovarská laboratoř, Institut biotechnologie potravinářského průmyslu a zemědělství, Bydgoszcz, Polsko / Independent Distillery Laboratory, Institute of Biotechnology of the Agricultural and Food Industry, Bydgoszcz  
e-mail: kotarska@ibprs.pl

**Wolska, M. – Czupryński, B. – Kłosowski, G. – Kotarska, K.: Využití kmene kvasinek I-7-43 připraveného fúzí buněk *Saccharomyces cerevisiae* a *Saccharomyces diastaticus* v zemědělském lihovaru.** Kvasny Prum. 50, 2004, č. 9, s. 254–260.

Cílem studie bylo prověřit vhodnost kmene kvasinek I-7-43, získaného fúzí protoplastů a charakterizovaného jak fermentační aktivitou, tak i schopností hydrolyzovat škrob, pro zkvašování zápar, a to v provozním měřítku za běžných technických podmínek zemědělského lihovaru.

Rýžové zápary byly fermentovány s přidavkem obvyklých a snížených dávek (90%, 80% a 70%) enzymového preparátu s obsahem glukoamylasy. Kontrolní fermentace byly prováděny se standardně používaným kmenem As-4.

V provozních podmínkách lihovaru vykazoval kvasničný kmen I-7-43 vysokou fermentační aktivitu a dynamiku produkce ethanolu, srovnatelnou s hodnotami získanými v případě standardního kmene As-4.

Nezávisle na dávkování enzymového preparátu byl výtěžek ethanolu ze škrobu přiměřený, tj. 61,7–61,8 dm<sup>3</sup>/100 kg. Po prvním dni fermentace bylo vytvořeno 70–80 % z celkového množství alkoholu a po dvou dnech fermentace 95–97 % z celkového množství.

Naše studie ukazují, že díky amylolytickým schopnostem kmene I-7-43 může být v provozních podmínkách ušetřeno 30 % dávky cukrůjícího přípravku, aniž by se zhoršily technologické podmínky výroby lihu. Obsahy aldehydů, methanolu a kyselin v surovém lihu z rýže byly nižší, než jsou hodnoty přípustné polskou normou.

Pozitivní výsledky ověření fermentační aktivity a amylolytických schopností kvasničného kmene I-7-43 za provozních podmínek předsurčují tento kmen k použití v provozní praxi lihovaru.

**Wolska, M. – Czupryński, B. – Kłosowski, G. – Kotarska, K.: Studies on utilization of the yeast strain I-7-43 – fusant between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces diastaticus* in agricultural distillery.** Kvasny Prum. 50, 2004, No. 9, p. 254–260.

The aim of our study was to determine the usefulness (in full-production scale under common technical conditions of agricultural distillery) of the agricultural yeast strain I-7-43 obtained by electrofusion of protoplasts and characterized by both the fermentative activity and ability to hydrolysis of starch.

The fermentations of rye mashes were carried out with application of standard and limited to 90 %, 80 % and 70 % doses of saccharifying preparation i.e. glucoamylase San-Super 240 L (Novo-Nordisk). The control fermentations were carried out with application of the standard agricultural distillery strain As-4.

It was found that under distillery conditions, the yeast strain I-7-43 was characterized by the high fermentative activity and dynamics of ethanol production comparable with the values obtained in the case of the standard strain As-4. Independently of the glucoamylase dose applied, the ethanol yield from starch was appropriate i.e. 61,7–61,8 dm<sup>3</sup>/100 kg; after I day of fermentation 70–80 % of total alcohol quantity was produced and after II days 95–97 %, respectively. Our studies show that thanks to amylolytic abilities of fusant I-7-43, 30% of dose of saccharifying preparation can be saved under full-production conditions without detriment to technological effects of the spirit production process. The contents of aldehydes, methanol and acids in raw rye spirits were lower than the values permissible by Polish Standard.

The positive results of verification of the fermentative activity and amylolytic abilities of the yeast strain I-7-43 in full-production scale empower us to implement it into the distillery practice.

**Wolska, M. – Czupryński, B. – Kłosowski, G. – Kotarska, K.: Die Ausnutzung des Hefestammes I-7-43, der durch eine Fusion von *Saccharomyces cerevisiae* und *Saccharomyces diastaticus* zelle vorbereitet wurde, in einer Landwirtschaftsbrennerei.** Kvasny Prum. 50, 2004, Nr. 9, S. 254–260.

Der Zielpunkt dieser Arbeit wurde eine Eignungsprüfung des Hefestammes I-7-43 (der durch eine Fusion von Protoplasten erworben wurde und durch eine Fermentationsaktivität und Stärkehydrolysenfähigkeit charakterisiert wird) für eine Maischenvergärung unter herkömmlichen technischen Bedingungen und Betriebsgrösse in einer Landwirtschaftsbrennerei.

Die Reismaische wurde unter Zugabe der herkömmlichen und reduzierten (90%, 80% und 70%) Enzymendosen mit Glukoamylasen-inhalt fermentiert. Die Blindfermentationen wurden mit dem üblichen Hefestamm As-4 durchgeführt.

Unter Betriebsbedingungen einer Brennerei wies der Hefestamm I-7-43 eine hohe Fermentationsaktivität der Ethanolproduktionsdynamik aus, diese Parameter waren mit den aus den Versuchen mit einem Standardhefestamm As-4 erworbenen Resultaten vergleichbar. Auf der Enzymenpreparatdosierung unabhängig blieb die Ethanolsausbeute aus der Stärke als adäquat beim Wert 61,7–61,8 dm<sup>3</sup>/100 kg. Nach dem Verlauf des ersten Fermentationstages wurde 70–80 % und nach dem zweiten Tag schon 95–97 % der gesamten Ethanolmenge hergestellt. Aus dieser Forschung geht hervor, dass Dank den amylolytischen Hefestammeneigenschaften I-7-43 kann unter Betriebsbedingungen bis zu 30 % Verzuckerungsmittel eingespart werden ohne die technische Bedingungen der Ethanolproduktion negativ zu beeinflussen. Die Aldehyds-, Methanols- und Säureinhalts im aus dem Reis hergestellten Rohspiritus liegen unter den durch eine polnische Standards festgestellte Werten.

Die positive Ergebnisse der Fermentationsaktivitäts- und Amylolytischenfähigkeiten beglaubigung des Hefestammes I-7-43 unter Betriebsbedingungen zeichnen ihn zur Betriebsanwendung vor.

**Волска, М. – Цзупрыньски, Б. – Клосовски, Г. – Котарска К.: Использование штамма дрожжей I-7-43 подготовленного соединением клеток *Saccharomyces cerevisiae* и *Saccharomyces diastaticus* в сельскохозяйственном спиртовом заводе.** Kvasny Prum. 50, 2004, No. 9, стр. 254–260.

Целью изучения являлось, как подходит штамм дрожжей I-7-43, полученный путем соединения протопластов, у которого гидролизовать крахмал, для ферментации затора в производственном масштабе при обыкновенных технических условиях сельскохозяйственного спиртового завода.

Было выполнено сбраживание рисовых заторов с добавлением обыкновенных и пониженных доз (90 %, 80 % и 70 %) ферментативного препарата с содержанием глюкамылазы. Контрольное ферментирование проводилось с использованием стандартного штамма As-4.

В производственных условиях спиртового завода отличался штамм I-7-43 высокой ферментативной активностью и динамикой продукции этилового спирта, сравнимой с величинами полученными при использовании стандартного штамма As-4.

Независимо от доз энзимного препарата был выход этилового спирта из крахмала соразмерный, т.е. 61,7–61,8 dm<sup>3</sup>/100 кг. После первого дня ферментирования было получено 70–80 % общего количества алкоголя и после двух дней ферментирования 95–97 % общего количества.

Было доказано, что благодаря амилолитическим свойствам штамма I-7-43 можно в производственных условиях сэкономить 30 % дозы осаживающего средства, не ухудшая технологические условия производства спирта. Содержания альдегидов, метилового спирта и кислот в спирте-сырце из риса находились ниже величин допускаемых польскими стандартами.

Положительные результаты проверки ферментативной активности амилолитических свойств дрожжевого штамма I-7-43 в производственных условиях предназначают этот штамм для использования на производственной практике спиртового завода.

**Klíčová slova:** amylolytické kvasinky, glukoamylasa, fermentace rýžových zápar, výtěžek a dynamika produkce ethanolu

**Keywords:** amylolytic yeasts, glucoamylase, fermentation of rye mashes, yield and dynamics of ethanol production

## 1 ÚVOD

Schopnost biosyntézy amylolytických enzymů je vítanou vlastností provozních kvasinek pro fermentaci zápar ze škrobnatých surovin, protože to má vliv na snižování nákladů při výrobě lihu.

Kmeny kvasinek – mezofilní B4, termofilní Bc16a, termofilní rezistentní vůči alkoholu a osmofilní kmeny D-2 a As-4 [1, 2, 3], běžně používané v polských lihovarech, jsou charakterizovány vysokou energií a produktivitou fermentace a vysokou dynamikou tvorby ethanolu, nemají však amylolytické schopnosti.

Přeměna škrobu na mono- a disacharidy probíhá výhradně hydrolyzou pomocí amylolytických přípravků získávaných z plísni nebo bakterií. V lihovarském průmyslu by použití vhodných kmenů kvasinek, schopných fermentace a současně hydrolyzy škrobu, mohlo vést ke zlepšení ekonomiky výroby lihu díky snížení dávky přípravků z cukrů škrob a dextriny.

V posledních letech jsou ve výzkumných centrech v Polsku i ve světě prováděny studie přípravy a aplikace kvasinkových kmenů pro zemědělské lihovary, charakterizovaných stabilními výše uvedenými vlastnostmi [4, 5, 6, 7].

V Institutu biotechnologie potravinářského průmyslu a zemědělství byla provedena elektrofúze protoplastů kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* x *Saccharomyces diastaticus* a byl získán kmen kvasinek I-7-43, charakterizovaný zvýšenou amylolytickou aktivitou a vyšší schopností tvorby alkoholu, než tomu bylo původně u rodičovských kmenů.

Nový kmen I-7-43, spojující vlastnosti obou rodičovských kmenů, byl podroben technologickým zkouškám v laboratorních podmínkách [8].

Pozitivní hodnocení nového kmene s ohledem na jeho amylolytické a fermentační schopnosti nás podpořila v přenesení studií z laboratorního do průmyslového měřítka ve standardních podmínkách zemědělského lihovaru. Cílem bylo stanovit možné snížení dávek amylolytického přípravku, aplikovaného pro zcukřování zápar, za předpokladu, že výtěžek alkoholu by byl srovnatelný s výtěžkem při aplikaci celých dávek tohoto enzymu. Pokusy byly provedeny v zemědělském lihovaru Zalesie poblíž Szubina v kraji Kujawsko-Pomorskie v Polsku.

## 2 METODY

### 2.1 Mikroorganismy

V našich zkouškách byly použity dva typy kmenů kvasinek:

- I-7-43 – připravený fúzí kmenů *S. cerevisiae* (As-4) a *S. diastaticus* ve formě čisté kultury na agarové pěstě,
- As-4 – běžně používaný v polských zemědělských lihovarech v sušené formě, v našich studiích byl zároveň aplikován jako jeden z rodičovských kmenů pro kontrolní fermentace [3].

#### 2.1.1 Kultivace a příprava kvasnic pro inokulaci lihovarských zápar

*Kmen I-7-43*

Pro přípravu kmene k aplikaci v lihovaru byla reaktivována a namnožena čistá kultura ve třech stupních: stupeň I a II probíhal v laboratoři (tekutá půda YPG 2%, pH 5,0, inkubace 24 hodin při teplotě 38 °C), III. fáze propagace pak v provozních podmínkách v lihovaru (sladká zápara v rozkvasné kádi, pH 3,1, teplota 32 °C, inkubace 24 h).

Celý objem namnožených kvasnic byl přidán do prvního podílu zápar v zapařovací kádi. Po promíchání byla část masy přečerpána do rozkvasné kádě a zbytek do fermentační kádě. Obsah v rozkvasné kádi byl použit pro inokulaci zápar další dny (v opakovaných cyklech, dokud neskončily pokusné fermentace).

*Kmen As-4 – kontrolní*

Kontrolní kmen As-4 byl aplikován v sušené formě v biotechnologické korporaci Lesaffre (Maszewo Łęborskie, Polsko) v posledních třech fermentačních cyklech pokusů. Sušené aktivní kvasinky (po rehydrataci a dezinfekci) byly přidány do sladké zápary v rozkvasné kádi (při teplotě a pH uvedených výše) v množství 10 g na každých 100 cm<sup>3</sup> zápar. Po inkubaci trvající 24 hodin byly technicky zralé kvasnice přidány do první zápary v zapařovací kádi. Další postup byl analogický s postupy uvedenými výše.

### 2.2 Technologické postupy

Celkem bylo provedeno pět sérií pokusných fermentací rýžových zápar připravených aplikací různých dávek glukoamylasy. Čtyři fer-

## 1 INTRODUCTION

The desired feature of agricultural yeasts for fermentation of mashes from starchy raw materials is their ability to biosynthesis of amylolytic enzymes since it has an effect on the cost reduction in spirit production. The yeast strains: mesophilic B4, thermophilic Bc16a as well as thermophilic, alcohol-resistant and osmophilic strains D-2 and As-4 [1, 2, 3], commonly applied in Polish distilleries, are characterized by a very high energy and productivity of fermentation and high dynamics of ethanol formation, however, they have not amylolytic abilities. Starch conversion into mono- and disaccharides must proceed exclusively by its hydrolysis with application of amylolytic preparations of mould or bacterial origin. In distillery industry, application of the appropriate yeast strains which would couple the fermentative activity with ability to hydrolysis of starch can result in improvement of the economy of spirit production thanks to reduction of the dose of preparations saccharifying the starch and dextrins.

At the last years, the studies on preparation and application in agricultural distilleries the yeast strains characterized by the stable features mentioned above are carried out in research centers in Poland and in the world [4, 5, 6, 7].

As a result of electrofusion of protoplasts between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces diastaticus* realized in Institute of Biotechnology of Food and Agricultural Industry, the yeast strain I-7-43 characterized by the increased amylolytic activity and higher ability to alcohol production than that of parent strains was obtained.

The new yeast strain I-7-43 joining the features of both the parent strains was put to the technological tests under the laboratory conditions i.e. simulated industrial production of alcohol [8].

The positive laboratory evaluation of the new yeast strain with respect to amylolytic and fermentative abilities encouraged us to continue the studies on the industrial scale in standard conditions of agricultural distillery. The expected effect of our studies was determination of the possibly reduced doses of amylolytic preparation applied for saccharification of mashes, under assumption that the alcohol yield was comparable with that obtained while applying the full doses of this enzyme. The experiments were carried out in agricultural distillery in Zalesie near Szubin in Kujawsko-Pomorskie province.

## 2 METHODS

### 2.1 Microorganisms

Two distillery yeast strains were applied in our tests:

- I-7-43 – fusant between *S. cerevisiae* (As-4) and *S. diastaticus* in the form of pure culture on agar bed,
- As-4 – commonly applied in Polish agricultural distillery in the form of dry preparation in our studies it was applied as a parent strain for control fermentations [3].

#### 2.1.1 Cultivation and preparation of yeasts for inoculation of distillery mashes

*Strain I-7-43*

In order to prepare the fusant for application in distillery, the pure strain culture was revived and grown in three stages: I and II stages in laboratory (fluidal bed YPG 2 %, pH = 5.0, incubation 24 h in temperature of 38 °C), III stage in distillery (sweet mash in yeast vat, pH = 3.1, temperature 32 °C, incubation 24 h).

The whole portion of mature yeasts was introduced into the first mash in mashing vat. After mixing, a portion of mass was pumped into yeast vat and the rest into fermenting vat. The content of yeast vat was used for inoculating the mashes in the next day (in repeated cycles until the experimental fermentations were finished).

*Strain As-4 – control strain*

The control strain As-4 was applied in the form of dry preparation in Lesaffre bio-corporation (Maszewo Łęborskie), in the last three fermenting cycles of experiments. Dry yeasts (after rehydration and disinfection) were introduced into sweet mash in yeast vat (at temperature and pH given above) in amount of 10 g for each 100 cm<sup>3</sup> of mash. After incubation lasting for 24 h, the technically mature yeasts were introduced into the first mash in mashing vat. The next procedures were analogous to the given above.

mentace byly provedeny za použití studovaného kmene I-7-43 (100 %, 90 %, 80 % a 70 % dávky zcukřujícího přípravku) a jedna fermentace byla provedena pomocí kontrolního kmene As-4 (celá dávka zcukřujícího přípravku). Každá z pokusných sérií byla opakována třikrát (celkem bylo provedeno 15 fermentací trvajících 3 dny).

### 2.2.1 Příprava sladkých zápar v lihovaru

Pro každý cyklus pokusných fermentací byly připraveny vždy tři zápary. Pro přípravu zápary v každém cyklu bylo použito 1000 kg rýže (celkem 3000 kg). Byla vybrána zrna dobré kvality z jedné partie. Na základě laboratorní analýzy výtěžku alkoholu ze 100 kg suroviny byl stanoven obsah škrobu (51,9 %).

Destrukce buněčné struktury, umožňující uvolnění škrobu, byla provedena pomocí Henzeho pařákové (tlakové) metody, tj. pařením při teplotě 150 °C a tlaku vodní páry 0,4 MPa.

Propařené dilo bylo vystaveno působení amylolytických enzymů (Novo-Nordisk, Dánsko). Ve všech případech byla pro ztekucení škrobu použita  $\alpha$ -amylasa Termamyl 120 L ve standardních dávkách (140–200 cm<sup>3</sup>/t škrobu). Pro každou ze tří zápar bylo aplikováno 90 cm<sup>3</sup>  $\alpha$ -amylasy při teplotě 90 °C. Po prodlevě 10 minut byla zápara ochlazená na 55 °C a přidán zcukřující přípravek s obsahem enzymu glucoamylasy San-Super 240 L (pro jednoduchost je v dalším textu uváděno dávkování jako „glukoamylasa“). V případě zápar určených pro fermentaci s aplikací studovaného kmene I-7-43 byly použity různé dávky glucoamylasy od 100 % do 70 % standardní dávky, podle následujících 4 variant:

- 100 % dávky – 520 cm<sup>3</sup>/4,4 m<sup>3</sup> zápary,
- 90 % dávky – 470 cm<sup>3</sup>/4,4 m<sup>3</sup> zápary,
- 80 % dávky – 420 cm<sup>3</sup>/4,4 m<sup>3</sup> zápary,
- 70 % dávky – 360 cm<sup>3</sup>/4,4 m<sup>3</sup> zápary.

V případě zápar fermentovaných pomocí kontrolního kmene kvasinek As-4 byla aplikována standardní dávka glucoamylasy (100 %) v množství 520 cm<sup>3</sup>/4,4 m<sup>3</sup> zápary.

Počáteční obsah extraktu v připravených záparách se pohyboval v rozmezí od 17,1 do 18,3 % hm., počáteční hodnota pH byla 5,2–5,4. Průměrný obsah redukujících cukrů v nultě hodině fermentace se pohyboval v rozmezí od 13,01 do 13,97 (obr. 2):

- 13,97 % – 100% dávka glucoamylasy,
- 13,77 % – 90% dávka glucoamylasy,
- 13,23 % – 80% dávka glucoamylasy,
- 13,01 % – 70% dávka glucoamylasy.

### 2.3 Technické a analytické metody

V průběhu technologických zkoušek byl proces každý den vyhodnocován na základě výsledků následujících stanovení:

- obsah zdánlivého a skutečného extraktu – hustoměrem, v % hm., po filtraci,
- pH zakvašených a technicky zralých kvasnic, sladkých, kvasících a prokvašených zápar – pomocí pH-metru,
- objem sladké zápary – dm<sup>3</sup>, pomocí měrné tyče,
- stupeň zcukření škrobu v kvasících a prokvašených záparách – pomocí jódové zkoušky nebo mikroskopicky,
- teplota zakvašených a technicky zralých kvasnic, sladkých, kvasících a prokvašených zápar,
- množství vyprodukovaného lihu – dm<sup>3</sup>, v jímači.

Pokusy prováděné v lihovaru byly doloženy laboratorní analýzou:

- pro kvasící a prokvašené zápary byly stanoveny následující parametry:
  - koncentrace alkoholu v % obj., za použití imerzního refraktometru, po destilaci 100 cm<sup>3</sup> filtrované zápary, po 24, 48 a 72 h. Střední hodnoty výsledků stanovení byly použity pro výpočet výtěžku alkoholu ze škrobu (dm<sup>3</sup> A<sub>100</sub>/100 kg), skutečné rychlosti produkce ethanolu (cm<sup>3</sup> A<sub>100</sub>/kg glukózy x h) a účinnosti fermentace (% teoretického výtěžku),
  - obsah redukujících látek v %, přímo pomocí Lane-Eynonovy metody,
- pro surový líh: obsahy kyselin a esterů [3], aldehydů (počítáno na acetaldehyd), methanolu, vyšších alkoholů a akroleinu byly stanoveny kapilární plynovou chromatografií (GC).

## 3 DISKUSE A VÝSLEDKY

### 3.1 Výsledky fermentací vedených s použitím kmene I-7-43

Výsledky studií průběhu a technologických účinků fermentací vedených za použití kmene I-7-43 po aplikaci celé dávky a omezených dávek zcukřujícího přípravku jsou uvedeny v tab. 1 a 2.

### 2.2 Technological methods

Totally, five series of the experimental fermentations of rye mashe prepared by application of various glucoamylase doses were carried out; four of them were carried out by using the studied fusant I-7-43 (100%, 90%, 80% and 70% of saccharifying preparation dose) and one fermentation was conducted by the control strain As-4 (full dose of saccharifying preparation). Each of the experimental series was repeated three times (totally – 15 fermentations lasting 3 days).

#### 2.2.1 Preparation of sweet mashe in distillery

Each time, 3 mashe were prepared for each cycle of experimental fermentations; for mash preparation in each cycle, 10 q of rye (totally 30 q – 3000 kg of grain) were used. The good quality rye grain originated from one part were used for experiments. On the basis of laboratory analysis of the alcohol yield from 100 kg of raw material, the starch content (51.9 %) was determined.

Destruction of the cell structure allowing for liberation of starch was carried out by Henze's thermal method, i.e. by evaporation at temperature of 150 °C and under the pressure of water vapour equal to 0.4 MPa.

The vaporized mass was subjected to the action of amylolytic enzymes (Novo-Nordisk). In the case of each mash,  $\alpha$ -amylase Termamyl 120 L in standard doses (140–200 cm<sup>3</sup>/t of starch) was applied for liquefaction of starch. For each from 3 mashe, 90 cm<sup>3</sup> of  $\alpha$ -amylase at temperature of 90 °C was applied. After 10 minutes lasting break, mash was cooled to 55 °C and saccharifying enzyme – glucoamylase San-Super 240 L was added. In the case of mashe designed for fermentation with application of the studied fusant I-7-43, the various doses of glucoamylase were used i.e. from 100% to 70% with respect to standard dose, according to 4 following variants:

- 100% of dose – 520 cm<sup>3</sup>/4,4 m<sup>3</sup> of mash,
- 90% of dose – 470 cm<sup>3</sup>/4,4 m<sup>3</sup> of mash,
- 80% of dose – 420 cm<sup>3</sup>/4,4 m<sup>3</sup> of mash,
- 70% of dose – 360 cm<sup>3</sup>/4,4 m<sup>3</sup> of mash.

In the case of mashe fermented by control yeasts As-4, the standard dose of glucoamylase (100%), in amount of 520 cm<sup>3</sup>/4,4 m<sup>3</sup> of mash was applied.

The initial contents of extracts in mashe prepared were within the range from 17.1 to 18.3 °B<sub>g</sub>, initial pH value was 5.2–5.4. The mean content of reducing sugars in the 0 h of fermentation was within the range from 13.01 to 13.97% (Fig. 2):

- 13.97 % – 100% of glucoamylase dose,
- 13.77 % – 90% of glucoamylase dose,
- 13.23 % – 80% of glucoamylase dose,
- 13.01 % – 70% of glucoamylase dose.

### 2.3 Technical and analytical methods

Everyday, during leading the technological tests, the process was evaluated on the basis of the results of the following determinations:

- content of apparent and real extract – by densimeter, in °B<sub>g</sub>, after filtration,
- pH of pitched and technically mature yeasts as well as sweet, fermenting and attenuated mashe – by pH-meter,
- volume of sweet mash – dm<sup>3</sup>, by measure rod,
- degree of starch saccharification in fermenting and attenuated mashe – by iodine test or microscopically,
- temperature of pitched and technically mature yeasts as well as sweet, fermenting and attenuated mashe,
- quantity of the spirit produced – dm<sup>3</sup>, in receiver.

Experiments carried out in distillery were completed by the laboratory analysis:

- for fermenting and attenuated mashe the following quantities were determined:
  - concentration of alcohol in % v/v, using immersion refractometer, after distillation of 100 cm<sup>3</sup> of filtrated mash, after 24, 48 and 72 h; mean results of determinations were used for calculating the biotechnological indexes of fermentation: alcohol yield from starch (dm<sup>3</sup> A<sub>100</sub>/100 kg), real rate of ethanol production (cm<sup>3</sup> A<sub>100</sub>/kg of glucose x h) and efficiency of fermentation (% of theoretical yield),
  - content of reducing substances, in %, directly by Lane-Eynon method.
- for high wines: content of acids and esters [9], aldehydes (calculated to acetaldehyde), methanol, higher alcohols and acroleine were determined by capillary gas chromatography (GC).

Účinky dávky zcukřujícího přípravku na dynamiku tvorby ethanolu v průběhu fermentace, dynamiku změn obsahu redukujících cukrů a výtěžek alkoholu v po sobě jdoucích dnech fermentace v kvasicích a prokvašených záparách (počítáno na 100 kg škrobu) jsou uvedeny v obr. 1, 2 a 3.

Na základě získaných výsledků bylo zjištěno, že všechny fermentace rýžových zápar zcukřených dávkami glukoamylasy redukovanými na 90 %, 80 % a 70 % za účasti studovaného kmene I-7-43 byly charakterizovány stejnými nebo podobnými výtěžky alkoholu ze škrobu v porovnání jak s paralelními fermentacemi po aplikaci celé dávky glukoamylasy, tak s kontrolními vzorky s kvasnicemi As-4 (tab. 2, obr. 3).

Tedy,

- v kontrolních fermentacích (zákvasy 13–15) a ve fermentacích zápar zcukřených pomocí 100% dávky glukoamylasy s aplikací kmene I-7-43 (zákvasy 1–3) byla střední hodnota výtěžku alkoholu po 72 hodinách 61,9 a 61,8 dm<sup>3</sup> A<sub>100</sub>/100 kg škrobu, bylo možné získat výtěžek 100,2 a 100,1 % alkoholu za podmínek v tomto lihovaru (ukazatel výtěžku na 100 kg škrobu pro lihovar – 61,75 %).

### 3 DISCUSSION AND RESULTS

#### 3.1 Technological effects of fermentations led with application of I-7-43 fusant

The results of studies on the course and technological effects of fermentations led by I-7-43 fusant, after application of full and limited to 90, 80 and 70% doses of saccharifying preparation are presented in Tables 1 and 2.

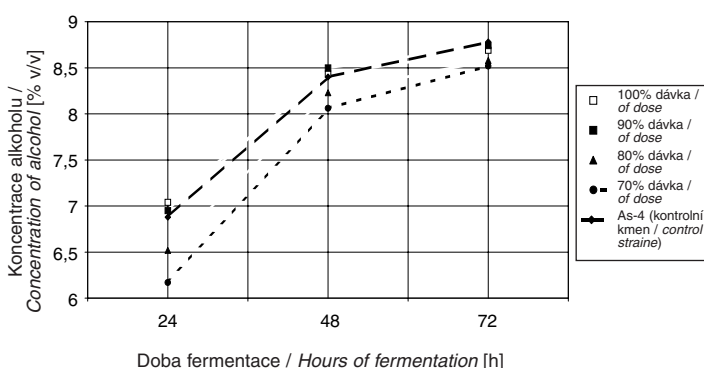
The effects of saccharifying preparation dose on: dynamics of alcohol increase during fermentation, dynamics of reducing sugars content changes and alcohol yield in successive days of fermentation in fermenting and attenuated mashes calculated to 100 kg of starch were presented in Figures 1, 2 and 3.

On the basis of technological results obtained, it was found that all the fermentations of rye mashes saccharified by glucoamylase doses reduced to 90%, 80% and 70% with participation of the studied fusant I-7-43 were characterized by analogical or similar final alcohol yield from starch in comparison with both parallel fermentations after applying full dose of glucoamylase and control samples with As-4 yeasts (Tab. 2, Fig. 3).

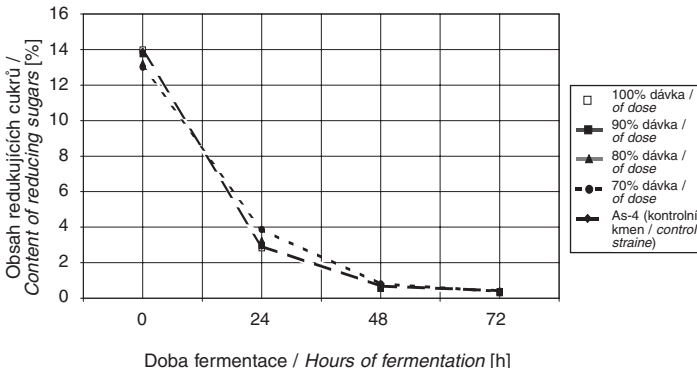
Tab. 1 Průběh fermentace vedené kmenem I-7-43 s aplikací úplných a snížených dávek glukoamylasy / The course of fermentation led by fusant I-7-43 with application of full and limited doses of glucoamylase

Číslo zákvasu (fermen- tace) / No. of pitch (fermen- tation)	Dávka glukoamylasy /Dose of glucoamylase [%]	Nejvyšší teplota fermentace /The highest temp. of fermenta- tion [°C]	Teplota v den ukončení fermentace /Temp. in the day of expelling [°C]	Prokvas / Apparent attenuation [% hm./m/m]			pH / pH			Koncentrace alkoholu / Concentration of alcohol h [% obj./v/v]			Redukující cukry ve výpalcích / Reducing sugars in slops [%]	Zcukření a ztekucení škrobu /Sacchari- fication and lique- faction of starch		Výtěžek líhu / Yield of spirit [dm <sup>3</sup> ]
				24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h		48 h	72 h	
1.	100	36	30	4,1	1,4	1,3	4,5	4,5	4,2	7,02	8,38	8,78	0,40	++	++	1150
2.	100	36	32	4,2	1,5	1,3	4,6	4,4	4,4	6,95	8,52	8,65	0,32	++	++	1160
3.	100	37	33	3,8	1,5	1,3	4,4	4,5	4,4	7,16	8,38	8,65	0,39	++	++	1180
4.	90	38	31	4,2	1,5	1,2	4,6	4,6	4,5	7,02	8,58	8,85	0,38	++	++	1180
5.	90	37	31	4,3	1,4	1,2	4,6	4,6	4,5	6,82	8,65	8,78	0,31	++	++	1190
6.	90	37	32	3,7	1,3	1,1	4,6	4,6	4,5	7,02	8,28	8,58	0,27	++	++	1180
7.	80	38	32	4,2	1,6	1,3	4,6	4,6	4,6	6,89	8,18	8,65	0,40	+	++	1170
8.	80	38	28	4,8	1,6	1,3	4,6	4,6	4,6	6,61	8,45	8,65	0,39	+	++	1170
9.	80	35	31	4,8	1,6	1,2	4,6	4,6	4,6	6,08	8,05	8,65	0,32	+	++	1170
10.	70	36	30	5,1	1,6	1,1	4,6	4,6	4,6	6,19	7,98	8,45	0,31	+	++	1160
11.	70	36	32	5,3	1,6	1,1	4,6	4,6	4,6	6,26	8,05	8,52	0,46	+	++	1160
12.	70	36	31	5,3	1,6	1,0	4,6	4,6	4,6	6,05	8,11	8,58	0,38	+	++	1170
13.	kontrolní fer- mentace s As-4 Contr. ferment. with As-4	100	33	4,2	1,5	1,4	4,4	4,3	4,3	7,00	8,58	9,05	0,43	++	++	1160
14.		100	35	4,1	1,6	1,3	4,5	4,4	4,4	6,83	8,25	8,58	0,40	++	++	1160
15.		100	35	4,2	1,6	1,3	4,4	4,5	4,3	6,83	8,38	8,72	0,44	++	++	1180

Poznámky: stupeň zcukření a ztekucení škrobu: ++ – velmi dobrý, + – dobrý / Notes: degree of starch saccharification and liquefaction: ++ – very good, + – good



Obr. 1 / Fig. 1 Dynamika tvorby alkoholu v průběhu fermentací s kmenem I-7-43 po aplikaci plné dávky a snížených dávek glukoamylázy / Dynamics of the increase of alcohol content during fermentations led by fusant I-7-43 after application of full and limited doses of glucoamylase



Obr. 2 / Fig. 2 Dynamika změn obsahu redukujících cukrů v průběhu fermentace kmenem I-7-43 při aplikaci úplné a snížených dávek glukoamylasy / Dynamics of changes of reducing sugars content during fermentations led by fusant I-7-43 after application of full and limited doses of glucoamylase

Tab. 2 Biotechnologické ukazatele fermentací vedených kmenem I-7-43 po aplikaci celé a snížených dávek glukoamylasy / Biotechnological indexes of fermentations led by fusant I-7-43 after application of full and limited doses of glucoamylase

Dávka glukoamylasy / Dose of glucoamylase	Výtěžek ethanolu ze škrobu / Ethanol yield from starch [dm <sup>3</sup> A <sub>100</sub> / 100 kg]			Specifická rychlost tvorby ethanolu / Specific rate of ethanol formation [cm <sup>3</sup> A <sub>100</sub> / kg gluk. x h]			Produktivita fermentace / Productivity of fermentation [cm <sup>3</sup> A <sub>100</sub> / dm <sup>3</sup> záparý/mash x h]			Účinnost fermentace / Efficiency of fermentation [%]
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	
100 %	50,0	59,9	61,8	18,8	11,2	7,7	2,9	1,7	1,2	86,1
90 %	49,1	60,1	61,7	18,4	11,3	7,7	2,9	1,8	1,2	86,0
80 %	47,0	59,2	61,8	17,6	11,1	7,7	2,7	1,7	1,2	86,1
70 %	44,7	58,3	61,7	16,8	10,9	7,7	2,6	1,7	1,2	86,0
100 % As-4 kontrolní fermentace	49,0	59,1	61,9	18,2	11,2	7,7	2,8	1,7	1,2	86,2

Poznámky / Notes: Každý výsledek je průměrem ze tří zákrasů (fermentací). / Each result is the mean from three pitches (fermentations).

Účinnost fermentace – % teoretického výtěžku alkoholu ze 100 kg škrobu. / Efficiency of fermentation – % of the theoretical yield of alcohol from 100 kg of starch.

- ve fermentacích zápar zcukřených sníženými dávkami enzymu (zákrasy 4–12) byl výtěžek fermentace přibližně 61,7–61,8 dm<sup>3</sup> A<sub>100</sub>/100 kg škrobu, což bylo 99,9–100,1 % výtěžku akceptovaného lihovarem.

Výtěžek ethanolu ze škrobu ve všech fermentacích činil přibližně 86 % teoretického výtěžku (účinnost fermentace v lihovaru je 84–88 %).

Další biotechnologické ukazatele fermentace, tj. specifická rychlost produkce ethanolu a produktivita procesu (tab. 2), byly nezávisle na aplikované dávce glukoamylasy ve všech pokusech se studovaným kmenem analogické, stejně jako příslušné ukazatele získané v průběhu kontrolních fermentací. Jejich hodnoty byly 7,7 cm<sup>3</sup> A<sub>100</sub>/100 kg gluk. x h a 1,2 cm<sup>3</sup> A<sub>100</sub>/100 kg záparý x h.

Z údajů uvedených v tab. 1 a 2 vyplývá, že při fermentacích kmenem I-7-43 v záparách zcukřených 70% a 80% dávkou enzymu byla účinnost a dynamika procesu výrazně nižší v porovnání s ostatními fermentacemi v prvním dni procesu.

V průběhu prvních 24 hodin těchto fermentací kmen I-7-43 produkoval menší množství alkoholu v kvasících záparách (přibližně 6,17 % obj. a 6,52 % obj.) v porovnání se záparami zcukřenými pomocí plné a 90% dávky (přibližně 6,95 % a 7,04 % obj.). To se projevilo ve viditelně horší fermentaci zápar – např. v případě 70% dávky glukoamylasy byl prokvas vyšší než 5 % hm., zatímco v případě 100% a 90% dávky byl o 1 % hm. nižší (při stejných počátečních hustotách sladkých zápar).

Popsanou skutečnost potvrdily rovněž hodnoty biotechnologických ukazatelů, použitých pro vyhodnocování: fermentace zápar zcukřených pomocí 70% a 80% dávky glukoamylasy po prvním dnu fermentace byly charakterizovány nižšími hodnotami výtěžku alkoholu ze škrobu, specifickou rychlostí produkce ethanolu a produktivitou procesu, tj. 44,7 a 47,0 dm<sup>3</sup> A<sub>100</sub>/100 kg škrobu, 16,8 a 17,6 A<sub>100</sub>/100 kg gluk. x h a 2,6 a 2,7 cm<sup>3</sup> A<sub>100</sub>/100 kg záparý x h.

Analogické biotechnologické ukazatele v ostatních fermentacích se nacházely v rozmezích 49,0–50,0 dm<sup>3</sup> A<sub>100</sub>/100 kg škrobu, 18,2–18,8 cm<sup>3</sup> A<sub>100</sub>/100 kg gluk. x h a 2,8–2,9 cm<sup>3</sup> A<sub>100</sub>/100 kg záparý x h.

V průběhu další fermentace zápar (dávka glukoamylasy 70% a 80%) byla rychlost procesu výrazně urychlena a po dvou dnech bylo prokvašení zápar, koncentrace ethanolu, výtěžek alkoholu ze škrobu, specifická rychlost a produktivita procesu podobné či stejné jako ukazatele v případě ostatních fermentovaných zápar.

Celkově bylo zjištěno, že snížení standardních dávek zcukřujícího přípravku na 80 % a 70 % mělo nepříznivý vliv na účinnost fermentace vedené za použití kmene I-7-43 pouze v prvním dnu procesu.

Později se rychlost procesu začala vyrovnávat a konečné technologické parametry fermentace byly analogické s parametry získanými u zápar zcukřených pomocí 90% a 100% dávky enzymu a byly srovnatelné rovněž s výsledky kontrolních fermentací vedených za použití kmene As-4.

Mělo by být zdůrazněno, že nezávisle na různých počátečních rychlostech fermentace zápar obsahujících různé dávky glukoamylasy aplikované v průběhu jejich zcukřování byl kvasničný kmen I-7-43 charakterizován dobrou dynamikou produkce ethanolu, protože po prvním dnu fermentace kmen vyprodukoval přibližně 72–81 % a po dvou dnech přibližně 95–97 % z celkového množství ethanolu.

Přes počáteční neúplné zcukření zápar byl kmen I-7-43 ve všech

Thus,

- in control fermentations (pitches 13–15) and in fermentations of mashes saccharified by 100% dose of glucoamylase with application of I-7-43 strain (pitches 1–3), the mean alcohol yield after 72 hours was 61.9 and 61.8 dm<sup>3</sup> A<sub>100</sub>/100 kg starch, respectively; it was 100.2 and 100.1% of the alcohol yield possible to obtain under conditions of this distillery (index of alcohol efficiency from 100 kg of starch under distillery conditions is 61.75)
- in fermentations of mashes saccharified by the limited doses of enzyme (pitches 4–12) the fermentation yield was approximately 61.7–61.8 dm<sup>3</sup> A<sub>100</sub>/100 kg of starch what was 99.9–100.1 % of the yield accepted by the distillery.

The ethanol yield from the starch in all the fermentations was approximately 86% of the theoretical one (correct effectiveness of fermentation in distillery is 84–88%).

Other final biotechnological indexes of fermentation i.e. specific rate of ethanol production and productivity of process (Tab. 2), were analogical in all fermentations with participation of the studied fusant independently of the glucoamylase dose applied; they were also analogical to the respective indexes obtained during control fermentations with As-4 strain; their values were equal to 7.7 cm<sup>3</sup> A<sub>100</sub>/100 kg of gluc. x h and 1.2 cm<sup>3</sup> A<sub>100</sub>/100 kg of mash x h.

On the basis of data presented in Tables 1 and 2, it was found that in case of fermentation led by the strain I-7-43 in mashes saccharified by 70 and 80% of enzyme dose, the effectiveness and dynamics of process was significantly lower in comparison with other fermentations in the first day of process.

During the first 24 h of these fermentations, the strain I-7-43 produced smaller amounts of alcohol in fermenting mashes (approx. 6.17 % v/v and 6.52 % v/v) as compared to the mash samples saccharified by 90% and full doses (approx. 6.95 % v/v and 7.04 % v/v). It resulted from the visible worse fermentation of mashes – for example in the case of the limited dose of glucoamylase i.e. 70% after the first day of process, it was over 5 °B<sub>g</sub> while in the case of 90% and 100% doses, it was lower by approximately 1 °B<sub>g</sub> and it was (at analogical initial densities of sweet mashes) 4.1–2.3 on the average. It was confirmed by the values of biotechnological indexes applied for the process evaluation. Fermentations of mashes saccharified by 70 and 80% dose of glucoamylase after I day of fermentation were characterized by lower values of ethanol yield from starch, specific rate of ethanol production and productivity of process i.e. 44.7 and 47.0 dm<sup>3</sup> A<sub>100</sub>/100 kg of starch, 16.8 and 17.6 cm<sup>3</sup> A<sub>100</sub>/100 kg of gluc. x h and 2.6 and 2.7 cm<sup>3</sup> A<sub>100</sub>/100 kg of mash x h, respectively. The analogical biotechnological indexes in other fermentations were within the ranges: 49.0–50.0 dm<sup>3</sup> A<sub>100</sub>/100 kg of starch, 18.2–18.8 cm<sup>3</sup> A<sub>100</sub>/100 kg of gluc. x h and 2.8–2.9 cm<sup>3</sup> A<sub>100</sub>/100 kg of mash x h, respectively.

During fermentation of the mashes (70% and 80% of glucoamylase dose) the rate of process was considerably accelerated and as soon as after II days of fermentation: attenuation of mashes, concentration of ethanol, alcohol yield from starch, specific rate and productivity of process were similar or the same as the biotechnological indexes in the case of other fermented mashes. Summarizing, it

případech, kdy byla použita nižší dávka glukoamylasy (zejména v případě 80 % a 70 %), schopen dostatečně vyrovnat hladinu zkvasitelných cukrů použitelných pro kvasnice (tvorbou vlastní glukoamylasy).

Jak vyplývá z údajů uvedených na obr. 1 a 2, došlo k tomu po 48 hodinách fermentace, protože nezávisle na způsobu zcukření byly v individuálních případech jak koncentrace alkoholu, tak obsah redukujících cukrů v záparách na podobné hladině, tj. 8,1–8,5 % resp. 0,6–0,8 %.

Správnost průběhu všech fermentací vedených za použití kmene I-7-43 je také prokázána výsledky následujících měření a pozorování (tab. 2):

- konečné zdánlivé prokvašení – na hladině odpovídající rýžovým záparám, tj. 1,0–1,4 % hm. v závislosti na počátečním extraktu sladkých zápar,
- pH prokvašených zápar – na správné hladině, tj. 4,2–4,6,
- koncentrace ethanolu v prokvašené zápaře – s ohledem na počáteční extrakt sladkých zápar v rozmezí od 17–18 % hm. – byla správná, tj. 8,6–9,1 % obj.,
- stupeň zcukření a ztekucení škrobu – velmi dobrý (100 % a 90 % dávky glukoamylasy) a dobrý (80 % a 70 % dávky glukoamylasy) po 48 hodinách fermentace. V případě všech fermentovaných zápar bylo pozorováno velmi dobré zcukření a ztekucení škrobu (nezávisle na aplikované dávce enzymu) po skončení fermentace,
- množství zbytkových redukujících látek činilo 0,27–0,46 %, což prokázalo dobré využití cukrů kmenem I-7-43.

Kvašení pokusných zápar za použití jak kmene I-7-43 (nezávisle na dávce aplikované glukoamylasy), tak i kontrolního kmene As-4 probíhalo intenzivně a dynamicky, byl pozorován ustálený vlnivý pohyb hladiny bez tvorby pěny. Rychlost rozkvašování zápar obsahujících kmen I-7-43 byla obvykle velmi vysoká a srovnatelná s aktivitou kontrolního kmene As-4 (4–6 hodin).

### 3.2 Kvalita surových lihů získaných z fermentací vedených za použití kmene I-7-43

Laboratorní analýza získaných lihů (tab. 3) prokázala vliv kvasničného kmene I-7-43, aplikovaného v technologických procesech, na

was found that – in distillery – limitation to 80% and 70% of standard glucoamylase doses applied for saccharifying the mash led to the unfavourable effect on effectiveness of fermentation led by fusant I-7-43 only in the first day of process. Later, the rate of process became equalized and the final technological parameters of fermentation were analogical to those obtained while applying the mash saccharified by 90% and 100% doses of enzyme and they were also comparable to the results of control fermentations led with the strain As-4.

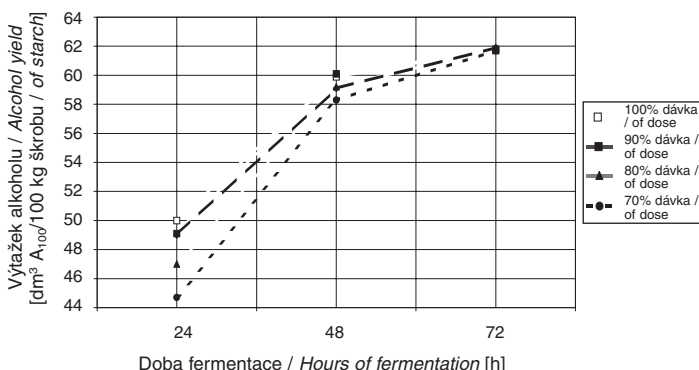
It should be emphasised that independently of the various initial rates of fermentation of mash containing various glucoamylase doses applied during their saccharification, the yeast strain I-7-43 was characterized by good dynamics of ethanol production since after the first day of fermentation, it produced approximately 72–81 % and after two days about 95–97 % of the total ethanol amount. Despite the initial incomplete saccharification of mash, the fusant strain I-7-43, in each case of glucoamylase dose limitation (especially to 80 % and 70 %) was able to equalize sufficiently (by production of its own glucoamylase) the level of fermenting sugars accessible for yeasts. It results from the data presented in Figures 1 and 2 that it occurred in 48 h of fermentation since independently of the variant of saccharification, both the ethanol concentration in mash and content of the reducing sugars in mash were in the individual cases on the similar level i.e. 8.1–8.5 % v/v and 0.6–0.8 %, respectively.

The correctness of the course of all fermentations led with application of fusant I-7-43 is also proved by the results of the following measurements and observations (Table 2);

- final apparent attenuation – on the level correct for rye mash i.e. 1.0–1.4 °B<sub>g</sub> depending on the initial extract of sweet mash,
- pH of attenuated mash – on the correct level i.e. 4.2–4.6,
- ethanol concentration in attenuated mash – having respect to the initial extract of sweet mash within the range from 17–18 °B<sub>g</sub>, it was correct i.e. 8.6–9.1 % v/v,
- degree of starch saccharification and liquefaction – very good (100%

Tab. 3 Obsah vedlejších produktů v destilátech získaných fermentací za použití kmene I-7-43 s aplikací celé dávky a snížených dávek glukoamylasy / Content of by-products in alcoholic distillates obtained by fermentations led by fusant I-7-43 with application of full and limited doses of glucoamylase

Dávka glukoamylasy / Doses of glucoamylase	Ethanol / Proof [% obj.]	Aldehydy / Aldehydes [g/ dm <sup>3</sup> A <sub>100</sub> ]	Kyseliny / Acids [g/ dm <sup>3</sup> A <sub>100</sub> ]	Estery / Esters [g/dm <sup>3</sup> A <sub>100</sub> ]	Methanol [g/100cm <sup>3</sup> A <sub>100</sub> ]	Vyšší alkoholy / Higher alcohols [g/dm <sup>3</sup> A <sub>100</sub> ]				
						1-propanol / n-propanole	2-methyl-1-propanol / isobutanol	1-butanol / n-butanol	pentanol / amyl alcohols	Σ
100 %	90,3	0,010	0,04	0,11	0,01	0,383	1,526	0,013	8,375	10,303
90 %	91,5	0,009	0,03	0,10	0,01	0,435	1,820	0,012	6,366	8,635
80 %	91,5	0,012	0,04	0,17	0,02	0,416	1,472	0,006	6,375	8,269
70 %	89,9	0,020	0,05	0,17	0,01	0,519	2,492	0,018	9,355	12,386
100 % As-4	91,7	0,080	0,03	0,11	0,02	0,426	1,876	0,008	4,536	6,851



Obr. 3 / Fig. 3 Porovnání výtěžků alkoholu ze škrobu pro kmen I-7-43 po aplikaci různých dávek glukoamylasy / Comparison between alcohol yields from starch for the strain I-7-43 after application of various glucoamylase doses

and 90% of glucoamylase dose) and good (80% and 70% of glucoamylase dose) after 48 h of fermentation; very good saccharification and liquefaction of starch was observed for all fermented mash (independently of the enzyme dose applied) after fermentation had been finished,

- the amount of the residual reducing substances was 0.27–0.46 % what proved about good utilization of carbohydrates by the strain I-7-43.

Fermentations of the experimental mash led both with application of fusant I-7-43 (independently of the glucoamylase dose applied) and control strain As-4 run intensively and dynamically; a very steady wavy motion without foaming was observed. The rate of preliminary fermentation of the yeast starters and mash containing strain I-7-43 was usually very high and comparable with the activity of control strain As-4 (4–6 h).

### 3.2 Quality of high vines obtained from fermentations led by fusant I-7-43

The laboratory analysis of the spirits obtained (Table 3) showed an

jejich chemické složení. Bylo zjištěno, že ve všech vzorcích lihu odebraných z fermentací vedených za použití kmene I-7-43 (nezávisle na variantě zcukření zápar) byl celkový obsah aldehydů podstatně nižší v porovnání s kontrolním lihem získaným z fermentace za použití kmene As-4.

Vzorky lihu získaného z fermentace za použití kmene I-7-43 byly charakterizovány opakovaně nižší hladinou aldehydů, než povoluje polská norma ( $0,1 \text{ g/dm}^3 A_{100}$ ), jejich průměrný obsah činil  $0,01$  až  $0,02 \text{ g/dm}^3 A_{100}$ . Průměrný obsah aldehydů v kontrolním lihu činil  $0,08 \text{ g/dm}^3 A_{100}$ .

Jak vyplývá z údajů uvedených v tab. 3, lihy získané z fermentace za použití kmene I-7-43 obsahovaly vyšší koncentrace vyšších alkoholů v porovnání s kontrolním lihem. Koncentrace vyšších alkoholů v pokusných variantách byla v rozmezí  $8,3$  až  $12,4 \text{ g/dm}^3 A_{100}$  – zatímco v kontrolním vzorku lihu činila  $6,7 \text{ g/dm}^3 A_{100}$ .

Všeobecné zvýšení obsahu přibudliny ve zmíněných vzorcích lihu se vyskytovalo hlavně proto, že obsah pentanolů (3-methyl-1-butanolu a 2-methyl-1-butanolu) zde byl vyšší než v případě kontrolních vzorků.

Obsah reziduálních vedlejších produktů fermentace, tj. kyselin (přepočten na kyselinu octovou) a methylalkoholu byl výrazně pod hladinou povolenou polskou normou a jejich hodnoty byly podobné v pokusných a kontrolních vzorcích: kyseliny  $0,03$ – $0,05 \text{ g/dm}^3 A_{100}$ , methanol –  $0,01$ – $0,02 \text{ g/cm}^3 A_{100}$ . Průměrný obsah esterů činil  $0,10$ – $0,17 \text{ g/dm}^3 A_{100}$ . Akrylaldehyd nebyl nalezen v žádném ze vzorků.

#### 4 ZÁVĚRY

- 4.1 Technologická prospěšnost nového kvasničného kmene I-7-43, připraveného fúzí buněk *Saccharomyces cerevisiae* a *Saccharomyces diastaticus*, v provozních podmínkách byla vyhodnocena pozitivně.
- 4.2 Dobré účinky na fermentaci rýžových zápar (zápary zcukřené standardní dávkou přípravku s obsahem enzymu glukoamylasy San-Super 240 L a dávkami přípravku sníženými o 10–30 %) byly prokázány pomocí následujících výsledků dosažených pomocí studovaného kmene v třídenním procesu:
  - přesný výtěžek ethanolu z vneseného škrobu ( $61,7$ – $61,8 \text{ dm}^3 A_{100}/100 \text{ kg}$ ) – což odpovídalo maximálnímu možnému výtěžku, který lze získat v lihovaru, kde byly prováděny pokusy,
  - velmi dobré prokvasy zápar, úplné prokvašení zápar –  $1,0$ – $1,4 \text{ % hm.}$ ,
  - vysoké konečné koncentrace alkoholu v prokvašených záparách –  $8,6$ – $9,1 \text{ % obj.}$ ,
  - velmi nízká hladina zkvasitelných cukrů zbývajících v prokvašených záparách –  $0,27$ – $0,46 \text{ %}$ .
- 4.3 Kmen I-7-43 byl za podmínek lihovaru charakterizován vysokou kvasnou aktivitou a dynamikou tvorby alkoholu, protože po prvním dnu fermentace bylo vytvořeno  $70$ – $80 \text{ %}$  a po dvou dnech  $95$ – $97 \text{ %}$  z celkového množství alkoholu.
- 4.4 Díky amylytickým schopnostem kmene I-7-43 je možno ušetřit  $30 \text{ %}$  zcukřujícího přípravku aplikovaného pro přípravu zápar, aniž by došlo ke zhoršení technologických parametrů v procesu výroby lihu.
- 4.5 Bylo zjištěno, že surové lihy získané fermentací rýžových zápar za použití kmene I-7-43 obsahovaly opakovaně menší množství aldehydů, methylalkoholu a organických kyselin, než jsou množství povolená polskou normou.

#### Literatura / References

- [1] Satek, A. T., Arnold, W. M.: Construction of ethanol-resistant, osmophilic industrial strains of *Saccharomyces* sp. *Chemie, Mikrobiologie, Technologie Der Lebensmittel* 16, 1994, pp. 165–183.
- [2] Boettger, A.: Anmerkungen zur mikroskopischen Betriebskontrolle in der Getreide – und Kartoffelbrennerei. *Die Branntweinwirtschaft*, 1996, 136, 2–3.
- [3] Satek, A.: Studia nad amplifikacją cech technologicznych drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. *Rozprawa habilitacyjna. Zeszyty naukowe ART Olsztyn, Technologia Alimentorum* 22, Wyd. ART, 1989, (polsky).
- [4] Lalue, C., Mattoon, J. R.: Development of rapidly fermenting strains of *Saccharomyces diastaticus* for direct conversion of starch and dextrins to ethanol. *Appl. a. Environm. Microbiol.* 48, 1984, pp. 17–25.
- [5] Guiraud, J. P., Fontana, A.: Isolation and characterization of a flocculating mutant of *Saccharomyces diastaticus*. *Research in Microbiology*. 1992, 143 (1), 81.
- [6] Taosheng, L., Jing, L., Sbiti, Ch.: Reform of yeast cell by protoplast fusion. II. A study on fermentation biology of interspecific hybrid between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharo-*

effect of the yeast strain I-7-43, applied in technological process, on their chemical composition. It was found that in all the spirit samples taken from fermentations led by fusant I-7-43, independently of the variant of mash saccharification, the total content of aldehydes was considerably lower in comparison with control spirit obtained from fermentation with the strain As-4. The spirit samples obtained from fermentation with strain I-7-43 contained higher amounts of aldehydes than that permissible by Polish Standard ( $0,1 \text{ g/dm}^3 A_{100}$ ) their mean content was from  $0,01$  to  $0,02 \text{ g/dm}^3 A_{100}$ . The mean content of aldehydes in control spirit was  $0,08 \text{ g/dm}^3 A_{100}$ .

As it results from data presented in Table 3, the spirits obtained from fermentation with the strain I-7-43 contained higher amounts of higher alcohols in comparison with control spirit. Concentration of higher alcohols in all the experimental variants achieved a relatively high level i.e. within the limits from  $8,3$  to  $12,4 \text{ g/dm}^3 A_{100}$ , while it was  $6,7 \text{ g/dm}^3 A_{100}$  in control spirit.

The general increase of fusel content in the mentioned spirit samples occurred mainly for the reason that the content of amyl alcohols (including 3-methyl-1-butanol and 2-methyl-1-butanol) was there higher than in the case of control samples. The content of the residue by-products of fermentation i.e. acids (calculated to acetic acid) and methyl alcohol was significantly below the level permissible by Polish Standard and their values were similar in experimental and control samples: acids  $0,03$ – $0,05 \text{ g/dm}^3 A_{100}$  and methanol –  $0,01$ – $0,02 \text{ g/cm}^3 A_{100}$ . The mean ester content was  $0,10$ – $0,17 \text{ g/dm}^3 A_{100}$ . Acrylic aldehyde was not found in any distillate.

#### 4 CONCLUSIONS

- 4.1 The technological usefulness of the new yeast strain (fusant I-7-43) in full production scale was evaluated positively.
- 4.2 Good effects of rye mash fermentations (mashes saccharified by standard and limited by 10–30% doses of glucoamylase) were proved by the following results achieved by the studied strain in 3-days lasting process:
  - correct yield of ethanol from the introduced starch ( $61,7$ – $61,8 \text{ dm}^3 A_{100}/100 \text{ kg}$ ) – maximum yield possible to obtain in distillery where experiments were carried out,
  - very good, full attenuation of mashes –  $1,0$ – $1,4 \text{ °Blg}$ ,
  - high final concentrations of alcohol in attenuated mashes –  $8,6$ – $9,1 \text{ % v/v}$ ,
  - very low level of fermenting sugars remaining in decoction –  $0,27$ – $0,46$ .
- 4.3 Fusant I-7-43, under distillery conditions, was characterized by high fermentative activity and dynamics of ethanol formation since after I-day of process it formed  $70$ – $80 \text{ %}$  and after II-days  $95$ – $97 \text{ %}$  of total alcohol produced.
- 4.4 Thanks to the amylytic abilities of the I-7-43 strain, it is possible to economize  $30 \text{ %}$  of saccharifying agent applied for preparation of mashes without changing for the worse the technological effects of spirit production process.
- 4.5 It was found that raw spirits obtained from rye during fermentations with I-7-43 strain contained repeatedly lower amounts of aldehydes, methyl alcohol and acids than those permissible by Polish Standard.

*myces diastaticus*. *J. Hangzhou Univ. Natur. Sci. Ed.*, 14, 1987, pp. 335–342.

- [7] Seu, J. H., Kim, I. H., Jun, D. I., Lee, J. T.: A study on strain improvement by protoplast fusion between amylase secreting yeast and alcohol fermenting yeast. I. Isolation and characterization of fusant between *S. cerevisiae* and *S. diastaticus*. *Sanop. Misangmul. Hakhoecki* 14, 1986, pp. 305–310.
- [8] Wolska, M.: Ocena zdolności fermentacyjnych szczepu drożdży gorzelniczych I-7-43 – fuzanta *Saccharomyces cerevisiae* i *Saccharomyces diastaticus*. *Wydawnictwo PM „LOGO”, Bydgoszcz*, 2001, s. 27–32.
- [9] Kłosowski, G., Czupryński, B., Sieliwanowicz, B., Kotarska, K., Wolska, M.: Monitoring of sugar substrates utilization by D-2 and As-4 yeasts and kinetics of by-products formation during alcoholic fermentation of rye and corn mashes. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 2001., vol. 10/51 No 2, pp. 19–24.

Lektoroval doc. Ing. Karel Melzoch, CSc.  
Do redakce došlo 18.8. 2003