



Optymalizacja procesu jednoczesnej hydrolizy i fermentacji natywnej skrobi metodą powierzchni odpowiedzi

Wojciech Białas, Dorota Wojciechowska, Daria Szymanowska, Włodzimierz Grajek

Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności,
Uniwersytet Przyrodniczy, Poznań

Optimization of simultaneous saccharification and fermentation of the native starch by using response surface method

Summary

Ethanol production, by a simultaneous saccharification and fermentation process (SSF) of native starch from corn flour, has been performed by *Saccharomyces cerevisiae* (Ethanol Red) and granular starch hydrolyzing enzyme (STARGEN 001). The quantitative effects of mash concentration, enzyme dose and pH were investigated by the use a Box–Wilson central composite design protocol. It was found that for native corn starch, maximum ethanol concentration of 110,36 g/l was obtained using a mash concentration of 25%, which resulted in ethanol yield of 85,71%. The optimum conditions for the above yield were found for the enzyme dose of 2,05 ml/kg and pH of 5.0. These results indicated that by using the central composite design, it is possible to determine accurate values of the fermentation parameters for maximum ethanol production.

Key words:

bioethanol, native starch, simultaneous saccharification and fermentation, response surface method.

Adres do korespondencji

Wojciech Białas,
Katedra Biotechnologii
i Mikrobiologii Żywności,
Uniwersytet Przyrodniczy,
ul. Wojska Polskiego 48,
60-627 Poznań.

1. Wprowadzenie

Etanol uzyskiwany na drodze fermentacji biopolimerów takich jak skrobia i celuloza jest alternatywą dla paliw pochodzenia kopalnego. Główne zalety jakie płyną z wykorzystania tego

rodzaju substratów związane są z ograniczeniem emisji gazów cieplarnianych jak również aktywacją terenów wiejskich poprzez zwiększenie produkcji rolniczej na cele energetyczne oraz związane z tym tworzenie nowych miejsc pracy (1).

Fermentacja skrobi jest procesem znacznie bardziej złożonym aniżeli fermentacja cukrów takich jak glukoza czy sacharoza, bowiem skrobia musi zostać w pierwszym etapie przekształcona do cukrów fermentujących, które w kolejnych etapach są przekształcane do etanolu. W celu uzyskania praktycznie całkowitej konwersji skrobi do cukrów fermentujących wymagane jest zastosowanie termostabilnej α -amylazy oraz glukoamylazy (2). W przypadku technologii tradycyjnej surowiec skrobiowy jest na wstępie mieszany z wodą oraz termostabilną α -amylazą i podgrzewany do temp. 110°C. Źródłem ciepła jest para wodna wprowadzana bezpośrednio do surowca za pomocą strumienicy, co pozwala na jego dokładne wymieszanie i równomierne podgrzanie. Po upływie około 15 min mieszaninę chłodzi się do temp. 80-90°C i dodaje kolejną porcję α -amylazy. Wysoka temperatura oraz obecny w mieszaninie enzym powodują, że skrobia ulega jednocześnie procesowi kleikowania i upłynniania, czemu towarzyszy wyraźny spadek lepkości. Obserwowane zmiany są rezultatem hydrolizy skrobi głównie do maltozy, maltotriozy oraz dekstryn. W kolejnej fazie procesu, po schłodzeniu mieszaniny do temperatury około 60°C dodaje się glukoamylazę, co ma na celu konwersję wymienionych związków do glukozy i maltozy (3). W trzecim etapie do zacieru, po jego uprzednim schłodzeniu do temperatury około 30-32°C, wprowadza się zawiesinę drożdży gorzelnicznych stanowiących tzw. matkę drożdżową. Istotną wadą procesu prowadzonego zgodnie z technologią tradycyjną jest bardzo duże zużycie energii podczas etapu zacierania, co powoduje, że ostateczne koszty wytwarzania etanolu są znaczne. Według Lim i wsp., (4) zapotrzebowanie na energię w procesie zacierania sięga 30-40% całkowitej wartości energii wymaganej do wyprodukowania etanolu. Aby związek ten mógł konkurować z paliwami uzyskiwanymi na drodze przerobu surowców kopalnych wymagane jest znaczne obniżenie kosztów jego wytwarzania.

Istnieje kilka alternatywnych rozwiązań pozwalających na znaczne zmniejszenie zużycia energii podczas produkcji etanolu. Jedną z proponowanych metod jest zastosowanie enzymów amylolitycznych o całkowicie nowych właściwościach, pozwalających na hydrolizę natywnej skrobi, nie poddanej procesowi kleikowania. Stosowane dotychczas amylazy wykazywały wysoką aktywność hydrolityczną wyłącznie w stosunku do skleikowanej skrobi, jednak już w 1954 r. Sandsted i Gates (5) dowiedli, że istnieje możliwość hydrolizy natywnej skrobi, a stopień konwersji ziaren skrobiowych zależy zarówno od pochodzenia enzymu jaki i botanicznego pochodzenia samego substratu. W badaniach prowadzonych w kolejnych latach przez Ueda i wsp., (6), Miah i Ueda (7) oraz Mikami i wsp., (8) sugerowano, że źródłem tego rodzaju enzymów mogą być m.in. *Aspergillus awamori*, *Aspergillus oryzae* oraz *Aspergillus kawachi*. Dzięki postępowi jaki dokonał się w ostatnich latach w biologii molekularnej, na rynku pojawiły się dwa komercyjne preparaty enzymatyczne wykazujące aktywność amylolityczną w stosunku do natywnej skrobi, STARGEN 001,

opracowany przez firmę Genencor International oraz BPX opracowany przez firmę Nowozymes NA. Pierwszy z wymienionych preparatów stanowi kompleks dwóch enzymów: termostabilnej α -amylazy pochodzącej z *Aspergillus kawachi*, a produkowanej przez *Trichoderma reesei* oraz glukoamylazy izolowanej z *Aspergillus niger*. Zastosowanie tego preparatu umożliwia pominięcie energochłonnego etapu kleikowania i upłynniania skrobi prowadzonego na gorąco, co tym samym znacznie zmniejsza całkowite koszty procesu. Poza tym preparat ten nie wymaga stosowania dodatku aktywatora, którym w przypadku większości amylaz są jony wapnia. Warto dodać, że eliminacja procesu kleikowania pozwala ponadto na stosowanie zacierów o znacznie wyższych stężeniach, sięgających nawet 40% (ww.), zacierzy te mają bowiem znacznie niższą lepkość. Warto zauważyć, że eliminacja obróbki termicznej w pierwszej fazie procesu technologicznego może mieć jednak negatywne skutki dla wydajności fermentacji, zwiększa się bowiem ryzyko zakażenia mikrobiologicznego. Obróbka termiczna bowiem poza tym, że ma na celu skleikowanie surowca powoduje również inaktywację niepożądaną mikroflory bytującej na jego powierzchni. Według Nicols i wsp., (2006) wysoka temperatura sprzyja także uwalnianiu skrobi z jej połączeń z białkami oraz całkowicie eliminuje toksyczne działanie niektórych substancji zawartych w ziarnie zbóż, co tym samym pozwala na uzyskanie większej wydajności fermentacji.

Poza badaniami, mającymi na celu opracowanie nowych preparatów enzymatycznych dużo uwagi poświęca się także optymalizacji samego procesu fermentacji. Powszechnie wiadomo, że hydroliza skrobi katalizowana przez enzymy amylolityczne podlega silnej represji przez uwalniany w jej trakcie produkt. Jednym ze sposobów wyeliminowania tego zjawiska jest jednoczesna hydroliza i fermentacja (SSF, ang. *Simultaneous Saccharification and Fermentation*), podczas której glukoza jest na bieżąco metabolizowana przez komórki drożdży. Utrzymanie stosunkowo niskiego stężenia glukozy w czasie fermentacji pozwala także znacznie ograniczyć stres osmotyczny działający na komórki. W rezultacie większość reakcji przebiega z prędkością zbliżoną do maksymalnej, dzięki czemu możliwe jest skrócenie czasu trwania fermentacji. Poza tym produkcja etanolu oparta na technologii SSF pozwala znacznie zredukować koszty inwestycyjne, bowiem hydroliza i fermentacja prowadzone są w jednym bioreaktorze, wyposażonym w mieszadło oraz układ regulacji temperatury (10). Mimo wielu niezaprzeczalnych zalet technologia ta posiada także pewne wady, związane głównie z różnicami pomiędzy optymalnymi temperaturami dla działania enzymów i wzrostu komórek drożdży (11). W przypadku gluko- oraz α -amylazy temperatura ta wynosi około 60°C, podczas gdy dla większości ras drożdży gorzelnicznych optimum zawiera się w zakresie 30-32°C. Stąd też temperatura tego procesu oscyluje zwykle w okolicach 35°C, co stanowi kompromis pomiędzy optimum dla funkcjonowania enzymów i wzrostu drożdży. Według Philippidis i Smith (12) szybkość z jaką przebiega hydroliza decyduje o ostatecznej szybkości wytwarzania etanolu w SSF, dlatego też jedyną metodą utrzymania jej na odpowiednim poziomie jest podwyższenie temperatury dzięki zastosowaniu nowych ras drożdży

oraz szczepów bakterii. Tego rodzaju rozwiązanie zaproponował m.in. Wardi wsp., (13), który w procesie jednoczesnej hydrolizy i fermentacji skrobi prowadzonej w temperaturze 45°C wykorzystał mieszaną kulturę, w skład której wchodziły termotolerancyjne drożdże *Kluveromyces marxianus* oraz termofilne grzyby strzępkowe *Talaromyces emersonii*.

Proces jednoczesnej hydrolizy i fermentacji, zastosowany na szeroką skalę po raz pierwszy w latach siedemdziesiątych ubiegłego wieku jest stosunkowo dobrze poznany i opisany w literaturze przedmiotu, o czym świadczą liczne prace naukowe (14,15). Brak jednak informacji na temat optymalizacji jednoczesnej hydrolizy i fermentacji substratu jakim jest mąka kukurydziana przy użyciu enzymów hydrolizujących natywną skrobię. Dlatego też prezentowane badania miały na celu określenie optymalnych warunków jednoczesnej hydrolizy i fermentacji gęstych zacierów kukurydzianych nie poddanych wcześniej procesowi kleikowania przy użyciu enzymów hydrolizujących natywną skrobię i drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, rasy Ethanol Red.

2. Materiały i metody

2.1. Surowiec

Do badań optymalizacyjnych stosowano mąkę kukurydzianą (BIO CORN, Żębice, Polska). Surowiec zawierał 90,06% skrobi. Średnia granulacja surowca według danych producenta wynosiła 250 μm .

2.2. Drożdże

W badaniach stosowano liofilizowane drożdże gorzelnicze *Saccharomyces cerevisiae*, rasy Ethanol Red (Lesaffre, Francja), zawierające według danych producenta $\geq 20 \times 10^9$ jtk/g.

2.3. Enzymy

W badaniach wykorzystywano enzym STARGEN 001 zawierający α -amylazę pochodząca z *Aspergillus kawachi* produkowaną przez zmodyfikowany szczep *Trichoderma reesei* oraz glukoamylazę izolowaną z *Aspergillus niger* (Genencore International, USA). Aktywność enzymatyczna preparatu wynosiła ≥ 456 GSHU/g (ang. *Granular Starch Hydrolyzing Units*). Poza tym stosowano kwaśną proteazę GC 106 z *Aspergillus niger* (Genencore International, USA), co miało na celu hydrolizę białek obecnych

w mące i przez to zwiększenie dostępności skrobi dla enzymów amylolitycznych. Aktywność enzymatyczna preparatu wynosiła ≥ 1000 SAPU/g (ang. *Spectrophotometric Acid Protease Units*, 1SAPU odpowiada ilości enzymu, która uwalnia 1 μ mol tyrozyny w ciągu 1 min podczas hydrolizy kazeiny w określonych warunkach reakcji).

2.4. Pozostałe substancje chemiczne

Pozostałe substancje chemiczne wykorzystywane w trakcie badań zostały zakupione w firmie Sigma – Aldrich (Niemcy) oraz POCh (Polska). Wszystkie stosowane odczynniki miały czystość analityczną.

2.5. Statystyczne planowanie eksperymentu optymalizacyjnego

W badaniach wykorzystano trzyczynnikowy ($k = 3$), pięciopoziomowy centralny plan kompozycyjny (CCD). Jako zmienne niezależne w eksperymencie przyjęto stężenie mąki w zacierze (X_1), dawkę enzymów (X_2) oraz pH zacieru (X_3). Analizowanymi zmiennymi zależnymi było stężenie etanolu (Y_1 , g/L), całkowita wydajność procesu (Y_2 , % teoretycznej wydajności etanolu). W tabeli 1 pokazano, że zmienne w formie rzeczywistej X_i przekształcono do postaci kodowej x_i zgodnie z równaniem (1):

Tabela 1

Zakresy badanych zmiennych niezależnych

Czynnik	Zakres zmienności				
	-1.4	-1.0	0	+1.0	+1.4
X_1 – stężenie zacieru (% ww.)	23,0	25,0	30,0	35,0	37,0
X_2 – dawka enzymów (ml/kg s.m.)	0,30	1,875	0,75	3,00	3,45
X_3 – pH zacierów	3,20	3,50	4,25	5,00	5,30

$$x_i^{(+\alpha,+1,0,-1,-\alpha)} = \frac{2X_i - X_{(\min)i} - X_{(\max)i}}{X_{(\max)i} - X_{(\min)i}} \quad (1)$$

gdzie x_i stanowi wartość kodową określonej zmiennej niezależnej, X_i stanowi wartość rzeczywistą tej zmiennej, podczas gdy $X_{(\min)i}$, $X_{(\max)i}$ stanowią odpowiednio górną i dolną granicę przedziału zmienności badanego parametru. Zakresy badanych zmiennych ustalono na podstawie wyników badań wstępnych prowadzonych w warunkach opisanych.

Zastosowana metoda planowania pozwala na badanie nie tylko wpływu wybranych zmiennych występujących w formie liniowej, ale co istotne daje także możli-

wość badania efektów kwadratowych oraz wzajemnych interakcji pomiędzy czynnikami. Pozwala także na wyznaczenie optimum w przypadku jednoczesnego stosowania kilku różnych kryteriów odnoszących się do poszczególnych zmiennych zależnych. Całkowita liczba doświadczeń N realizowanych w ramach planu została wyznaczona na podstawie równania 2:

$$N = 2^k + 2k + n_0 = n_f + n_\alpha + n_0 \quad (2)$$

gdzie k stanowi liczbę badanych zmiennych niezależnych, n_0 jest liczbą punktów centralnych, n_f stanowi liczbę punktów czynnikowych, podczas gdy n_α jest liczbą punktów gwiazdnych. Plan doświadczenia zakładał wykonanie 20 doświadczeń, podzielonych na trzy bloki, gdzie 6 eksperymentów stanowiło punkty centralne o tych samych parametrach, co pozwala na wyznaczenie składnika błędu i tym samym daje możliwość oszacowania precyzji estymacji. Należy dodać, że wszystkie eksperymenty zostały wykonane w określonej kolejności, zgodnie z wygenerowanym planem, co miało na celu wykrycie wpływu ewentualnych zmiennych zakłócających, które mogły się pojawić w trakcie realizowania założonego planu. Plan eksperymentu przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 2

Centralny plan kompozycyjny: $2^3 + (2 \times 3) + 6 = 20$

Hodowla	Blok	Wartości rzeczywiste X_i			Wartości kodowe x_i		
		X_1	X_2	X_3	x_1	x_2	x_3
1	2	3	4	5	6	7	8
1	1	25,00	3,000	5,00	-1,0	1,0	1,0
2	1	30,00	1,875	4,25	0,0	0,0	0,0
3	1	35,00	3,000	3,50	1,0	1,0	-1,0
4	1	30,00	1,875	4,25	0,0	0,0	0,0
5	1	25,00	0,750	3,50	-1,0	-1,0	-1,0
6	1	35,00	0,750	5,00	1,0	-1,0	1,0
7	2	35,00	3,000	5,00	1,0	1,0	1,0
8	2	35,00	0,750	3,50	1,0	-1,0	-1,0
9	2	25,00	3,000	3,50	-1,0	1,0	-1,0
10	2	25,00	0,750	5,00	-1,0	-1,0	1,0
11	2	30,00	1,875	4,25	0,0	0,0	0,0
12	2	30,00	1,875	4,25	0,0	0,0	0,0
13	3	30,00	0,300	4,25	0,0	-1,4	0,0
14	3	37,00	1,875	4,25	1,4	0,0	0,0
15	3	30,00	1,875	4,25	0,0	0,0	0,0
16	3	23,00	1,875	4,25	-1,4	0,0	0,0

1	2	3	4	5	6	7	8
17	3	30,00	1,875	4,25	0,0	0,0	0,0
18	3	30,00	1,875	3,20	0,0	0,0	-1,4
19	3	30,00	1,875	5,30	0,0	0,0	1,4
20	3	30,00	3,450	4,25	0,0	1,4	0,0

W celu wyznaczenia modelu regresji opisującego wpływ poszczególnych zmiennych niezależnych zastosowano metody analizy regresji wielokrotnej. Analizy statystyczne zostały wykonane na danych przedstawionych w postaci kodowej, co ułatwiło ich późniejszą interpretację. Dla badanego układu trzyczynnikowego zastosowano następujące równanie regresji w postaci wielomianu drugiego stopnia:

$$Y_i = b_0 + b_1 \cdot x_1 + \dots + b_k \cdot x_k + b_{12} \cdot x_1 \cdot x_2 + \dots + b_{k-1,k} \cdot x_{k-1} \cdot x_k + b_{11} \cdot x_1^2 + \dots + b_{kk} \cdot x_k^2 \quad (3)$$

Poszczególne współczynniki w wielomianie oznaczają: b_0 wyraz wolny, b_k efekty liniowe, b_{kk} efekty kwadratowe, $b_{k-1,k}$ wpływ związany z pojawieniem się istotnych interakcji. Do oceny dokładności modelu zastosowano poprawiony współczynnik determinacji $Adj-R^2$, poziom istotności wartości F oraz wynik testu braku dopasowania (ang. *lack of fit*). Do analizy danych zastosowano program komputerowy STATISTICA 6.0 PL (StatSoft, Polska).

2.6. Fermentacja w kolbach

Całkowita objętość nastawianego zacieru wynosiła 200 ml. Do kolby Erlenmeyera o pojemności 250 ml naważano odpowiednią ilość mąki (w zależności od pożądanej gęstości zacieru, z uwzględnieniem wilgotności surowca) i stopniowo dodawano jałową wodę destylowaną o temperaturze pokojowej. Przygotowany zacier słodki poddawano regulacji pH do żądanej wartości, z użyciem 10% roztworu H_2SO_4 i 20% roztworu NaOH. Następnie dodawano antybiotyk (chloramfenikol) w ilości 50 $\mu g/ml$ zacieru oraz enzymy: STARGEN 001 i kwaśną proteazę GC 106 w ilościach założonych w eksperymencie. Po dokładnym wymieszaniu wymienionych składników do zacieru dodawano nieuwodnione drożdże liofilizowane w dawce 0,5 g/L, co odpowiadało stężeniu komórek po inokulacji wynoszącym około 1×10^7 jtk/ml. Tak przygotowane kolby z zacierami (zatkane korkami z rurkami fermentacyjnymi) inkubowano w temperaturze 35°C, na wytrząsarce (200 obr./min). Fermentację prowadzono przez 72 godziny, bez regulacji pH. Na początku oraz po zakończeniu procesu fermentacji pobierano próby do oznaczenia zawartości etanolu, skrobi oraz cukrów redukujących.

2.7. Eksperymenty walidacyjne

W celu przeprowadzenia walidacji wyznaczonych modeli regresji wykonano trzy eksperymenty fermentacyjne o losowo wybranych wartościach zmiennych X_1 , X_2 i X_3 (zawartych w badanym przedziale zmienności) oraz jeden eksperyment o parametrach optymalnych wskazanych na podstawie wspomnianych kryteriów. Następnie porównano uzyskane wyniki eksperymentalne z wartościami przewidywanymi przez modele regresji.

2.8. Analizy

Próby przed oznaczeniem stężenia glukozy oraz etanolu wirowano przy 4000 g przez 10 min w temperaturze 4°C (Multifuge 3SR, Niemcy), a następnie filtrowano przez filtry o porowatości 0,22 μm (Millex – GS, Millipore, USA). Oznaczenia wykonywano na chromatografie cieczowej (Merck Hitachi, Niemcy) wyposażonym w kolumnę Aminex HPX-87P (Bio-Rad, USA) oraz detektor refraktometryczny (Model L-7490, Merck Hitachi, Niemcy). Rozdział prowadzono w temperaturze 30°C, stosując w charakterze eluentu 5 mM H_2SO_4 , przy przepływie 0,6 ml/min. Stężenie skrobi oznaczano korzystając z metody enzymatycznej opracowanej przez Holm i wsp. (16). Ponadto do oznaczenia stężenia cukrów redukujących wykorzystano metodę z kwasem 3,5-dinitrosalicylowym (DNS) opracowaną przez Millera (17).

3. Wyniki i dyskusja

Proces jednoczesnej hydrolizy i fermentacji jest bardzo złożony, bowiem w tym samym czasie i środowisku mają miejsce różnego rodzaju wzajemnie ze sobą powiązane przemiany prowadzące w rezultacie do powstania produktu końcowego jakim jest etanol. O złożoności tego układu może świadczyć to, że zmniejszenie szybkości jednej z przemian powoduje zazwyczaj hamowanie kolejnej w skutek niedoboru substratu lub nagromadzenia jednego z pośrednich produktów. Dlatego też poszukiwanie optymalnych warunków dla prowadzenia tego rodzaju procesów klasyczną, jednowymiarową metodą, gdzie modyfikacji podlega tylko jeden z czynników, podczas gdy pozostałe przyjmują stałe wartości jest bardzo czasochłonne i kosztowne. Poza tym istotną wadą tego rodzaju podejścia do badań jest brak możliwości wykrycia ewentualnych interakcji jakie mogą występować pomiędzy poszczególnymi czynnikami. W takim przypadku alternatywą dla podejścia klasycznego jest metoda powierzchni odpowiedzi (ang. RSM, *Response Surface Method*) stanowiąca zestaw technik matematycznych i statystycznych szczególnie użytecznych, wówczas gdy badane zjawisko podlega wpływowi wielu czynników i gdy celem jest określenie optymalnych parametrów procesu spełniających założone na wstępie

kryteria (18). Z tego względu podjęto się wykonania badań z zastosowaniem tej metody, które miały na celu określenie optymalnych warunków jednoczesnej hydrolizy i fermentacji gęstych zacierów kukurydzianych nie poddanych wcześniej procesowi kleikowania przy użyciu enzymów hydrolizujących natywną skrobię i drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, rasy Ethanol Red. W tabeli 3 zestawione zostały uśrednione wyniki z 3 powtórzeń eksperymentu wykonanych wg centralnego planu kompozycyjnego, na podstawie których budowano modele regresji użyte następnie do optymalizacji procesu.

3.1. Model powierzchni odpowiedzi dla stężenia etanolu (Y_1)

Zgodnie z danymi zawartymi w tabeli 3 końcowe stężenia etanolu w zacierach odfermentowanych zawierało się w zakresie 79,09-120,02g/L. Maksymalne stężenie uzyskano w hodowli 10, w której stężenie zacieru wносиło 35%, podczas gdy dawka enzymu była równa 3 ml/kg s.m. mąki. Natomiast minimalne stężenie uzyskano w hodowli 13, o stężeniu zacieru równym 30% i dawce enzymu 0,3 ml/kg s.m. mąki. Na podstawie tych danych sugeruje się, że najsilniejszy wpływ na stężenie produktu miała dawka stosowanego preparatu enzymatycznego. W celu weryfikacji tej hipotezy wykonano analizę statystyczną metodą regresji wielokrotnej. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że modelem najlepiej dopasowanym do danych doświadczalnych był zredukowany model kwadratowy, dla którego $p < 0,0001$, a wielkość poprawionego współczynnika determinacji Adj. – R^2 wynosiła 0,841 (tab. 4). Ponadto wielkość prawdopodobieństwa wyznaczona dla testu braku dopasowania (ang. *Lack-of-fit*) była równa 0,117, co jednoznacznie potwierdziło, że przyjęty model regresji może być wykorzystany do predykcji badanej wielkości w przyjętym na wstępie zakresie zmienności czynników wejściowych.

Tabela 3

Wyniki doświadczeń wykonanych według centralnego planu kompozycyjnego

Hodowla	Blok	Wartości rzeczywiste X_i			Zmienne zależne Y_i	
		X_1	X_2	X_3	Y_1	Y_2
1	2	3	4	5	6	7
1	1	35,0	0,750	5,00	112,43	62,43
2	1	30,0	1,875	4,25	113,30	73,39
3	1	35,0	3,000	3,50	116,78	64,84
4	1	30,0	1,875	4,25	117,19	75,91
5	1	25,0	0,750	3,50	94,58	73,52
6	1	25,0	3,000	5,00	106,82	83,03
7	2	30,0	1,875	4,25	119,43	77,36

1	2	3	4	5	6	7
8	2	35,0	0,750	3,50	115,81	64,30
9	2	30,0	1,875	4,25	118,47	76,74
10	2	35,0	3,000	5,00	120,02	66,64
11	2	25,0	0,750	5,00	107,55	83,60
12	2	25,0	3,000	3,50	109,80	85,35
13	3	30,0	0,300	4,25	79,09	51,23
14	3	30,0	3,450	4,25	103,53	67,06
15	3	23,0	1,875	4,25	102,86	86,91
16	3	30,0	1,875	4,25	115,39	74,75
17	3	30,0	1,875	4,25	112,77	73,05
18	3	37,0	1,875	4,25	119,85	62,95
19	3	30,0	1,875	3,20	106,47	68,97
20	3	30,0	1,875	5,30	109,69	71,05

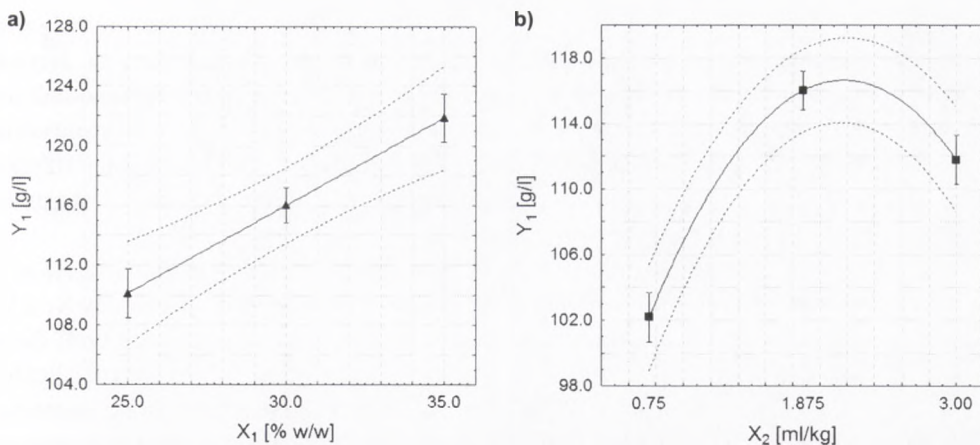
Tabela 4

Równania modeli regresji wyznaczone dla badanych zmiennych zależnych

Y_i	Zmienne	Równanie wielomianu	Adj-R ²	Lack-of-fit
Y_1	kodowe	$116,10 + 5,88X_1 + 4,81X_2 - 9,02X_2^2$	0,841	0,117
	rzeczywiste	$47,69 + 1,17X_1 + 31,02X_2 - 7,13X_2^2$		
Y_2	kodowe	$74,74 - 8,46X_1 + 3,20X_2 + 2,13X_1^2 - 5,91X_2^2$	0,913	0,092
	rzeczywiste	$180,63 - 6,81X_1 + 20,37X_2 + 0,08X_1^2 - 4,67X_2^2$		

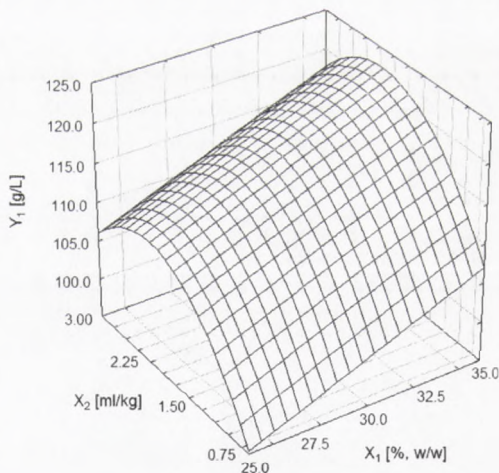
* – pierwotne dane eksperymentalne zostały przekształcone za pomocą równania: $Y_3 = \sqrt{(Y_3)}$

Zgodnie ze wspomnianym równaniem regresji stężenie etanolu (Y_1) było dodatnio skorelowane ze stężeniem zacieru (X_1), podczas gdy efekty kwadratowe uznano za nieistotne statystycznie. Oznacza to, że ze wzrostem stężenia zacieru wzrastała także końcowa zawartość etanolu, niezależnie od zastosowanej dawki enzymu (rys. 1a). Wpływ pH uznano natomiast za nieistotny statystycznie ($p > 0,05$) i dlatego też ten czynnik został usunięty z modelu. W przypadku dawki enzymu (X_2) za istotne statystycznie uznano zarówno efekty liniowe jak i kwadratowe, przez co zależność pomiędzy tym czynnikiem a zawartością etanolu miała kształt nieliniowy, z wyraźnie zaznaczonym maksimum odpowiadającym dawce równej 2,16 ml/kg s.m. mąki (rys. 1b). Warto zauważyć, że współczynniki regresji przedstawione w tabeli 4 potwierdziły hipotezę przyjętą na podstawie wstępnej analizy wyników, mówiącą o znacznie silniejszym wpływie dawki stosowanego enzymu. Zgodnie z wykresem powierzchni odpowiedzi wyznaczonej na podstawie przyjętego modelu regresji (rys. 2) maksymalne przewidywane stężenie etanolu w zacierze odfermentowanym



Rys. 1. Zmiany stężenia etanolu po procesie fermentacji (Y_1) w zależności od: 1a – stężenia zacieru (X_1) przy stałej dawce enzymu równej 1,875 ml/kg oraz 1b – dawki preparatu enzymatycznego (X_2) przy stałym stężeniu zacieru równym 30%. W obu przypadkach pH wynosiło 4,25. Symbole oznaczają: \blacktriangle – średnia, ----- – 95% przedział ufności, | – błąd standardowy średniej.

powinno wynosić $121,709 \pm 1,52$ g/L, przy stężeniu zacieru i dawce preparatu enzymatycznego wynoszącej odpowiednio 34,37% i 2,08 ml/kg. Podobne wyniki uzyskali Wang i wsp. (19), którzy porównywali ilość etanolu uzyskiwaną w technologii tradycyjnej z technologią opartą na zastosowaniu preparatu STARGEN 001. Stwierdzili oni, że istotnie różnił się jedynie profil cukrów w trakcie fermentacji. W technologii wykorzystującej preparat STARGEN 001 blisko trzykrotnie mniejsza była bowiem zawartość glukozy, maltozy i maltotriozy. Znacznie szybszy w porównaniu z technologią tradycyjną był także proces ich konwersji do etanolu, dzięki czemu jego maksymal-



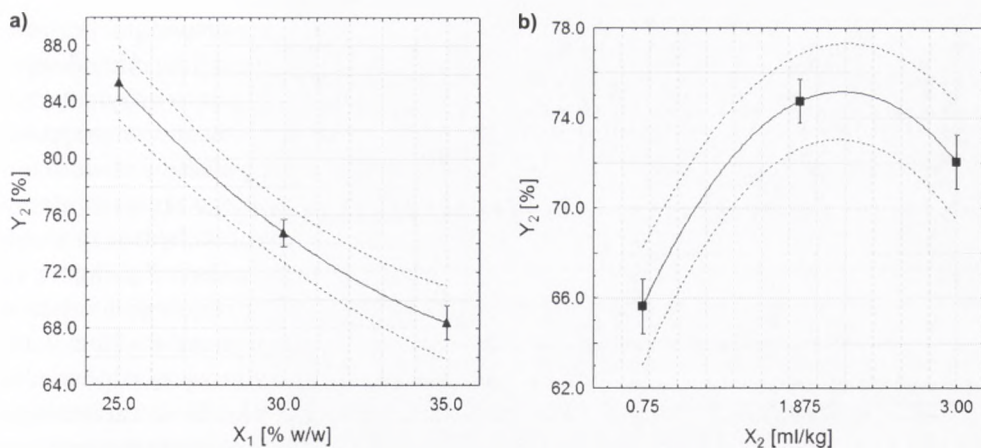
Rys. 2. Wykres powierzchni odpowiedzi przedstawiający wpływ stężenia zacieru (X_1) i dawki preparatu enzymatycznego (X_2) na stężenie etanolu po procesie fermentacji (Y_1) wyznaczony dla pH = 4,25.

malny poziom uzyskiwano już w 50. godzinie trwania fermentacji. Istotną rolę preparatu enzymatycznego STARGEN 001 w procesie otrzymywania etanolu metodą SSF potwierdzają także wyniki badań Suresh i wsp. (20). Jako substrat stosowali oni natywną skrobię pszeniczną oraz skrobię izolowaną z sorga. Enzymy amylolytyczne pochodziły natomiast z *Bacillus subtilis* VB2. W rezultacie po 96 h fermentacji uzyskano około 40 g/L etanolu, co stanowi blisko trzykrotnie niższe stężenie w stosunku do wyników prezentowanych w tej pracy.

Mając na uwadze wspomnianą liniową zależność pomiędzy wielkością X_1 a Y_1 można by sądzić, że podobnie powinna się kształtować zależność pomiędzy X_1 a Y_2 , czemu powinien towarzyszyć wysoki współczynnik korelacji r pomiędzy tymi dwiema zmiennymi zależnymi (Y_1 i Y_2). W praktyce okazało się jednak, że wartość liczbową tego współczynnika wynosi 0,22 ($p = 0,35$), co oznacza, że brak istotnego związku pomiędzy stężeniem etanolu i całkowitą wydajnością procesu wyznaczoną w stosunku do wydajności teoretycznej (Y_2). Dla wielu hodowli zaobserwowano ponadto, że zwiększaniu stężenia zacieru (X_1) towarzyszy wzrost końcowego stężenia etanolu, przy jednoczesnym znacznym spadku wydajności (tab. 3). W przypadku hodowli o optymalnych parametrach procesu, zapewniających maksymalne przewidywane modelem regresji stężenie etanolu, prognozowana wydajność powinna wynosić około 69,35%. Zakładając, że wydajność technologii tradycyjnej oscyluje zwykle w granicach 90-95%, uzyskana wartość jest stosunkowo niska i przyczynia się do zwiększenia strat substratu i tym samym wzrostu całkowitych kosztów procesu SSF. Potwierdza to także, że optymalizacja tego rodzaju procesu technologicznego bezwzględnie wymaga nie tylko uwzględnienia stężenia etanolu w zacierze odfermentowanym, ale także wzajemnych relacji jakie występują pomiędzy badanymi zmiennymi niezależnymi (X_1 , X_2 , X_3) a wydajnością (Y_2).

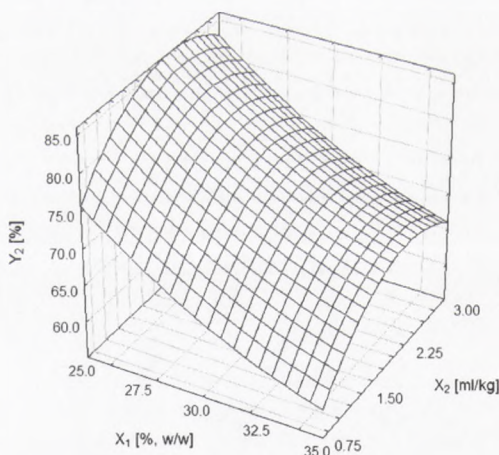
3.2. Model powierzchni odpowiedzi dla wydajności etanolu (Y_2)

Maksymalną wydajność procesu fermentacji Y_2 wynoszącą 86,91% uzyskano w hodowli o stężeniu zacieru równym 23% i dawce enzymu 1,875 ml/kg s.m. mąki, natomiast najniższą wydajność równą 51,23% zanotowano, gdy stężenie zacieru wynosiło 30%, a dawka enzymu była równa 0,3 ml/kg s.m. mąki. Na podstawie danych eksperymentalnych zawartych w tabeli 3 wyznaczono równanie regresji w postaci zredukowanego wielomianu drugiego stopnia (tab. 4). Wyznaczony model był wysoce istotny, o czym świadczyła wartość prawdopodobieństwa ($p < 0,0001$) oraz poprawionego współczynnika determinacji, $Adj. - R^2$ równa 0,913. Wynik testu braku dopasowania, podobnie jak w przypadku modelu wyznaczonego dla zmiennej Y_1 był statystycznie nieistotny ($p = 0,092$), co potwierdza, że równanie regresji może być z powodzeniem wykorzystane do przewidywania wydajności procesu jednoczesnej hydrolizy i fermentacji w badanym zakresie zmiennych niezależnych. Na podstawie danych przedstawionych w tabeli 4 wskazuje się, że wydajność procesu fermentacji



Rys. 3. Zmiany wydajności procesu fermentacji (Y_2) w zależności od: 3a – stężenia zacieru (X_1) przy stałej dawce enzymu równej 1,875 ml/kg oraz 3b – dawki preparatu enzymatycznego (X_2) przy stałym stężeniu zacieru równym 30%. W obu przypadkach pH wynosiło 4,25. Symbole oznaczają: \blacktriangle – średnia, ---- – 95% przedział ufności, 1 – błąd standardowy średniej.

(Y_2) była ujemnie skorelowana ze stężeniem zacieru X_1 , co oznacza, że wraz ze wzrostem wartości liczbowej tego czynnika obniżała się końcowa wydajność fermentacji (rys. 3a). Warto dodać, że poza wysoce istotnymi efektami liniowymi ($p < 0,0001$) ważne były również efekty kwadratowe ($p = 0,038$). Podobnie jak w przypadku zmiennej Y_1 , wpływ pH uznano za nieistotny statystycznie ($p > 0,05$) i dlatego też usunięto ten czynnik z modelu regresji. W przypadku dawki enzymu (X_2) za istotne statystycznie uznano zarówno efekty liniowe jak i kwadratowe, przez co zależność pomiędzy tym czynnikiem a wydajnością fermentacji miała kształt nieliniowy, z wyraźnie zaznaczonym maksimum odpowiadającym dawce równej



Rys. 4. Wykres powierzchni odpowiedzi przedstawiający wpływ stężenia zacieru (X_1) i dawki preparatu enzymatycznego (X_2) na wydajność fermentacji (Y_2) wyznaczony dla pH = 4,25.

2,16 ml/kg s.m. mąki (rys. 3b). Warto zauważyć, że zgodnie z wartościami liczbowymi współczynników regresji przedstawionymi w tabeli 4 zdecydowanie silniejszy wpływ na wydajność miało stężenie zacieru aniżeli dawka preparatu enzymatycznego. Jest to zatem odwrotna prawidłowość do tej, jaką zanotowano w przypadku analizy zmian stężenia etanolu. Na podstawie uzyskanych wyników potwierdzono tym samym, że czynnikiem decydującym o osiągnięciu wysokiego stężenia etanolu Y_1 jest dostępność cukrów fermentujących związana z szybkością hydrolizy skrobi, zależną z kolei od zastosowanej dawki preparatu enzymatycznego. Zgodnie z wykresem powierzchni odpowiedzi wyznaczonej na podstawie przyjętego modelu regresji (rys. 4) maksymalna przewidywana wydajność powinna wynosić $85,76 \pm 1,19\%$, przy stężeniu zacieru i dawce preparatu enzymatycznego wynoszącej odpowiednio 25,0% i 2,18 ml/kg. Wskazana jako optymalna zawartość skrobi w zacierze jest mniejsza od tej jaką wyznaczono biorąc pod uwagę wyłącznie zawartość etanolu po procesie fermentacji. Podobne rezultaty uzyskali Suresh i wsp. (20) we wspomnianym opracowaniu dotyczącym badań nad fermentacją zacierów zawierających skrobię z pszenicy i sorga o stężeniu 10-30%. Autorzy cytowanej pracy stwierdzili, że optymalny stopień konwersji cukrów do etanolu, przy jednoczesnym utrzymaniu wysokiej produkcji biomasy uzyskuje się w przypadku zacierów o stężeniu 25%. Sugeruje to, że podczas optymalizacji należy poszukiwać parametrów stanowiących kompromis pozwalający na uzyskanie wysokiej koncentracji etanolu w zacierze odfermentowanym oraz wysokiej wydajności przy możliwie minimalnej zawartości nieodfermentowanej skrobi oraz cukrów fermentujących.

4. Optymalizacja procesu jednoczesnej hydrolizy i fermentacji zacierów zawierających natywną skrobię

Celem prezentowanych badań była optymalizacja procesu otrzymywania etanolu z zastosowaniem metody jednoczesnej hydrolizy i fermentacji prowadzonej za pomocą enzymów hydrolizujących natywną skrobię i drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, rasy Etanol Red. Zwykle procedura prowadząca do rozwiązania tego problemu składa się z dwóch etapów: w pierwszym następuje wyznaczenie wartości przewidywanych badanej zmiennej poprzez dopasowanie odpowiednich równań regresji do uzyskanych w eksperymencie danych doświadczalnych. Następnie poszukuje się takich wartości zmiennych niezależnych, które pozwalają na możliwie najdokładniejsze spełnienie kryteriów optymalizacyjnych. Związek pomiędzy przewidywanymi odpowiedziami wielkości wyjściowej a użytecznością odpowiedzi, czyli stopniem spełnienia przyjętych kryteriów jest nazywany funkcją użyteczności (ang. *desirability function*). Procedurę służącą do określenia związku pomiędzy przewidywanymi odpowiedziami wielkości wyjściowej i użytecznością odpowiedzi opracowali Derringer i Suich (21).

Na podstawie prezentowanych w pracy wyników wskazuje się, że stężenie etanolu (Y_1 , g/L) oraz całkowita wydajność procesu (Y_2 , % teoretycznej wydajności eta-

nolu) są w głównej mierze funkcją zmiennych X_1 i X_2 . Dlatego też zastosowano następujące kryteria optymalizacji: stężenie zacieru (X_1), dawka preparatu enzymatycznego (X_2) oraz pH (X_3) przyjmowały wartości kodowe z całego badanego zakresu zmienności (od -1,0 do +1,0), podczas gdy zmienne zależne, stężenie etanolu i całkowita wydajność procesu powinny przyjmować wartości największe spośród przewidywanych. Należy dodać, że zastosowana procedura zakładała przekształcenie wartości każdej z czterech wielkości wyjściowych w wartości użyteczności, które mogą się zmieniać od 0,0 dla niepożądanych do 1,0 dla bardzo pożądaných. Dzięki temu jednoczesna optymalizacja dwóch wielkości wyjściowych uprościła się do znalezienia wartości wielkości wejściowych, które maksymalizują całkowitą użyteczność odpowiedzi wielkości wyjściowych. W rezultacie wykonanych obliczeń stwierdzono, że optymalne parametry prowadzenia SSF to stężenie zacieru (X_1), dawka enzymu (X_2) oraz pH (X_3) wynoszące odpowiednio: 25%, 2,05 ml/kg s.m. mąki oraz pH równe 5,0.

5. Walidacja modeli regresji oraz wyników optymalizacji

W celu ostatecznej weryfikacji poprawności przyjętych modeli regresji oraz wyznaczonych na ich podstawie optymalnych parametrów badanego procesu wykonano cztery dodatkowe hodowle. Parametry trzech pierwszych hodowli stanowiły losowo wytypowane kombinacje wartości zmiennych niezależnych leżące w badanym przedziale, podczas gdy ostatnia z hodowli miała parametry odpowiadające optymalnym, przyjętym na podstawie wspomnianych kryteriów optymalizacji. Dla każdego z eksperymentów wyznaczono, na bazie modułu predykcji występującego w stosowanym oprogramowaniu statystycznym, przewidywane wielkości zmiennych zależnych Y_1 , Y_2 oraz 95% przedziały ufności i błędy standardowe. Następnie porównano wartości eksperymentalne z przewidywanymi (tab. 5). Stwierdzono, że uzyskane wyniki w większości przypadków mieszczą się w granicach wyznaczonych przez odpowiednie przedziały ufności, co potwierdziło poprawność przyjętych modeli regresji oraz wybór optymalnych parametrów procesu.

Tabela 5

Wyniki walidacji

Nr	X_1	X_2	X_3	Y_1 – stężenie etanolu				Y_2 – wydajność procesu			
				Obs.	Przew.	Przedział ufności		Obs.	Przew.	Przedział ufności	
						-95%	95%			-95%	95%
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	26,04	0,87	4,0	101,14	99,94	96,48	103,39	75,66	75,21	72,78	77,63
2	32,92	2,79	5,0	115,02	117,49	114,45	120,53	67,91	69,22	67,02	71,42

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
3	33,66	1,95	3,6	115,18	120,7	117,61	123,78	66,46	69,88	67,72	72,05
4	25,00	2,05	5,0	110,36	110,79	107,31	114,26	85,71	85,72	83,13	88,31

Objaśnienie: Obs. – dane eksperymentalne (obserwowane); Przew. – dane przewidywane modelami regresji.

6. Podsumowanie i wnioski

W przeprowadzonych badaniach udowodniono, że proces jednoczesnej hydrolizy i fermentacji może przebiegać wydajnie dla zacierów skrobiowych, bez stosowania wcześniejszej obróbki termicznej, która mogła zostać wyeliminowana dzięki zastosowaniu nowoczesnych preparatów enzymatycznych, scukrzających skrobię natywną. Zaobserwowano, że wzrost stężenia zacieru był dodatnio skorelowany z końcową zawartością etanolu i niestety ujemnie skorelowany z wydajnością procesu. Oznacza to, że stosując gęste zacierzy o stężeniu przekraczającym 25% otrzymywano produkt odpadowy o stosunkowo wysokiej zawartości niewykorzystanego surowca. Jednak dzięki zastosowaniu procedur optymalizacyjnych udało się otrzymać zadowalające rezultaty. W wyznaczonym, optymalnym układzie parametrów, po 72 godzinach procesu, uzyskano wydajność 85,7% (w odniesieniu do wydajności teoretycznej fermentacji) oraz stężenie etanolu wynoszące około 14% v/v (110 g/l).

Warto dodać, że zastosowanie gęstych zacierów o stężeniu przekraczającym 35% w procesie jednoczesnej hydrolizy i fermentacji prowadzonym przy użyciu preparatów enzymatycznych wykazujących aktywność w stosunku do natywnej skrobi, takich jak STARGEN 001 jest teoretycznie możliwe pod warunkiem, że proces ten będzie przebiegał w układzie bioreaktora membranowego wyposażonego w moduł do destylacji membranowej (22) lub perwaporacji (23). Powszechnie wiadomo, że etanol stanowi czynnik limitujący i jego maksymalne stężenie może wynosić 18% v/v (24). Tego rodzaju rozwiązania mogą zatem do minimum ograniczyć wpływ etanolu, dzięki czemu poszczególne przemiany będą przebiegały z prędkością oraz wydajnością zbliżoną do maksymalnej. Wymaga to jednak dalszych badań związanych przede wszystkim z zagadnieniami powiększenia skali tych procesów, bowiem w większości przypadków opisywane są instalacje pracujące w skali laboratoryjnej.

Badania zostały sfinansowane ze środków Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego (grant nr 0619/P01/2007/02).

Literatura

- Wyman C. E., (2003), *Applications of corn stover and fiber. Corn Chemistry and Technology*, 2nd ed. (Eds. White P. J., Johnson L. A.) American Association of Cereal Chemists, St. Paul MN.
- Senn T., Pieper H. J., (2001), *Classical Methods in the Biotechnology of Ethanol: Classical and Future Applications*, Ed. M. Roehr, P 1, WILEY-VCH Verlag GmbH, Weinheim.

3. Power R. F., (2003), *Enzymatic conversion of starch to fermentable sugars. The Alcohol Textbook*, 4th, Eds. Jacques K. A., Lyons T. P., Kelsall D. R., Nottingham University Press, Nottingham, U.K., 23-32.
4. Lim L. H., Macdonald D. G., Hill G. A., (2003), *Biochem. Eng. J.*, 13, 53-62.
5. Sandsted R. M., Gates R. L., (1954), *Food Res.*, 19, 190-199.
6. Ueda S., Ohba R., Kano S., (1974), *Starch/Starke*, 26, 374-378.
7. Miah M. N., Ueda N. S., (1977), *Starch/Starke* 29, 235-239.
8. Mikami S., Iwano K., Shiinoki S., Shimada T., (1987), *Agric. Biol. Chem.*, 51, 2495-2501.
9. Nichols N. N., Dien B. S., Bothast R. J., Cotta M. A., (2006), *The Corn Ethanol Industry in Alcoholic Fuels*, Ed. S. Minteer, CRC Press, Boca Raton, Fl. 2006.
10. Kobayashi F., Sawada T., Nakamura Y., Ohnaga M., Godliving M., Ushiyama T., (1998), *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 69, 177-189.
11. Öhgren K., Bura R., Lesnicki G., Saddler J., Zacchi G., (2007), *Proc. Biochemistry*, 42, 834-839.
12. Philippidis G. P., Smith T. K., (1995), *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 51/52, 117-124.
13. Ward C., Nolan A. M., O`Hanlon K., McAree T., Barron N., McHale L., McHale A. P., (1995), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 43, 408-411.
14. Verma G., Nigam P., Singh D., Chaudhary K., (2000), *Bioresource Technol.*, 72, 261-266.
15. Öhgren K., Rudolf A., Galbe M., Zacchi G., (2006), *Biomass and Bioenergy*, 30, 863-869.
16. Holm J., Björck I., Drews A., (1986), *Starch/Stärke* 38, 7, 224-226.
17. Miller G. L., (1959), *Anal. Chem.*, 31, 426-428.
18. Montgomery D. C., Runger G. C., (2003), *Applied Statistics and Probability for Engineers*, 3rd ed., John Wiley & Sons Inc., Hoboken, New Jersey.
19. Wang P., Singh V., Hue X., Johnston D. B., Rausch K. D., Tumbleson M. E., (2007), *Cereal Chem.*, 84, 1, 10-14.
20. Suresh K., Kiransree N., Venkateswar Rao L., (1999), *Bioprocess Engineering*, 21, 165-168.
21. Derringer G., Suich R., (1980), *J. Qual. Technol.*, 12, 214-219.
22. Gryta M., Morawski A. W., Tomaszewska M., (2000), *Catal. Today*, 56, 159-165.
23. Kaseno, Miyazawa I., Kokugan T., (1989), *J. Ferment. Bioeng.*, vol. 86, no 5, 488-493.
24. Lentini A., Rogers P., Higgins V., Dawes I., Chandler M., Stanley G., Chambers P., (2003), *The Impact of Ethanol Stress on Yeast Physiology in Brewing Yeast Fermentation Performance*, 2nd ed., Ed. K. Smart, Blackwell Science.