

MAGDALENA POL-SZYSZKO

PIOTR MASOJĆ

IZABELA DONIEC

AGNIESZKA WENDA

Katedra Genetyki i Hodowli Roślin

Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

## Ocena aktywności $\alpha$ -amylazy w ziarnie odmian kukurydzy zwyczajnej (*Zea mays* L.) w aspekcie ich wykorzystania do produkcji bioetanolu

### Analysis of $\alpha$ -amylase activity in grain of maize (*Zea mays* L.) cultivars in respect of their application to bioethanol production

Wzrastające zanieczyszczenie środowiska naturalnego, postępujący deficyt surowców kopalnianych oraz rosnące koszty pozyskiwania paliw konwencjonalnych spowodowały poszukiwanie alternatywnych źródeł energii. Celem pracy było wskazanie odmian kukurydzy zwyczajnej przydatnych do produkcji bioetanolu ze względu na wysoką aktywność amylolityczną ziarna. Aktywność  $\alpha$ -amylazy oceniono metodą dyfuzji w żelu agarozowym i na podstawie liczby opadania według metodyki Hagberga-Pertena. Aktywność  $\alpha$ -amylazy wahała się w granicach od 0,11 U·ml<sup>-1</sup> (Prosna) do 15,45 U·ml<sup>-1</sup> (Król) a liczba opadania od 61,0 s (Wilga) do 365,5 s (Blask). Najwyższą aktywność  $\alpha$ -amylazy i niską liczbę opadania wykazały odmiany Wigo, Wilga, Cyrkon, Kosmo 230, Boruta, Kasia, Nimba, Iman, Król i Nysa. Ze względu na dużą zawartość endogennej alfa-amylazy, odmiany te mogą okazać się przydatne do produkcji bioetanolu.

**Słowa kluczowe:** alfa-amylaza, liczba opadania, bioetanol, kukurydza zwyczajna

Rising pollution of the environment, progressive shortage of natural resources, and rising costs of getting conventional fuel caused a search for alternative energy sources. The aim of the paper was to indicate the varieties of corn useful in production of bioethanol for the sake of high amylolytic activity of the grain. The activity of alpha-amylase was estimated with the method of diffusion in agarose gel and on the basis of the falling number according to the Hagberg-Perten's methodology. The activity of alpha-amylase varied between 0,11 (Prosna) to 15,45 U·ml<sup>-1</sup> (Król), and the falling number between 61.0 s (Wilga) and 365.5 s (Blask). The highest activity of alpha-amylase and low falling number showed the varieties Wigo, Wilga, Cyrkon, Kosmo 230, Boruta, Kasia, Nimba, Iman, Król and Nysa. Because of high content of endogenous alpha-amylase these varieties can turn out to be useful in production of bioethanol.

**Key words:** *Zea mays* L., alpha-amylase, falling number, bioethanol

## WSTĘP

Wzrastające ceny ropy naftowej, jak też ograniczenie emisji gazów cieplarnianych, i uzależnienie się od zewnętrznych dostaw paliw wpłynęły na bardzo szybki wzrost produkcji biopaliw w ostatnich latach w krajach UE (Michalski, 2005). W okresie 2000–2007 światowa produkcja biopaliw uległa potrojeniu z poziomu ok. 18,2 mld litrów w 2000 roku do ok. 60,6 mld litrów w 2007 roku.

Użytkowanie kukurydzy zwyczajnej jako surowca do produkcji bioetanolu z przeznaczeniem na biopaliwo jest opłacalne ze względu na możliwość uzyskania dopłat bezpośrednich do uprawy. Przemawia za tym także wysoka wydajność produkcji bioetanolu, oszczędna gospodarka wodna, umiarkowane wymagania glebowe, wysokie plonowanie i znaczna zawartość skrobi oraz dość stosunkowo duża produkcja biomasy (Gradziuk, 2002).

Producenci alkoholu etylowego surowego poszukują na rynku ziarna tych mieszańców kukurydzy, z których mogą uzyskać najwyższą wydajność w trakcie jego przerobu w gorzelnianach. Ziarno z wysoką aktywnością  $\alpha$ -amylazy przy równoczesnej wysokiej zawartości skrobi byłoby dobrym surowcem zapewniającym wysoką wydajność produkcji bioetanolu. Endogenna  $\alpha$ -amylaza umożliwiłaby szybszy rozkład skrobi do cukrów prostych.

Celem pracy była ocena aktywności  $\alpha$ -amylazy metodą kolorymetryczną i poprzez ocenę liczby opadania jako czynnika, który ma znaczenie dla efektywności pozyskiwania bioetanolu z ziarna kukurydzy (Dreszer i in., 2003).

## MATERIAŁ I METODY

Materiał badawczy stanowiło 29 odmian kukurydzy zwyczajnej (*Zea mays*L) pochodzących z dwóch największych polskich ośrodków hodowlanych: Hodowla Roślin Rolniczych Nasiona Kobierzyc Spółka z o.o. — otrzymano 9 odmian (Limko, KB 1902, KB 1903, Iman, Cyrkon, Kosmo 230, Koka, Duet, Król) i Hodowla Roślin Smolice Spółka z o.o. Grupa IHAR — otrzymano 20 odmian (Nysa, Wilga, Wiarus, Baca, Blask, Fido, Wigo, Glejt, Prosna, Buran, Nimba, Lober, Bzura, Brda, Cedro, Reduta, Junak, Boruta, Kasia, Grom) (tab. 1).

Uprawa kukurydzy w Hodowli Roślin Smolice miała miejsce na glebach klasy IVa–IVb, na kompleksie żytnim dobrym o 2-letniej monokulturze. Stosowano nawożenie po oborniku w ilości 350–400 q/ha co 2 rok, 90 kg·ha<sup>-1</sup> P, 180 kg·ha<sup>-1</sup> K i 300 kg·ha<sup>-1</sup> N w formie mocznika. W ochronie roślin stosowano oprysk środkiem Primextra gold w ilości 3 l·ha<sup>-1</sup> w fazie do 3 liścia.

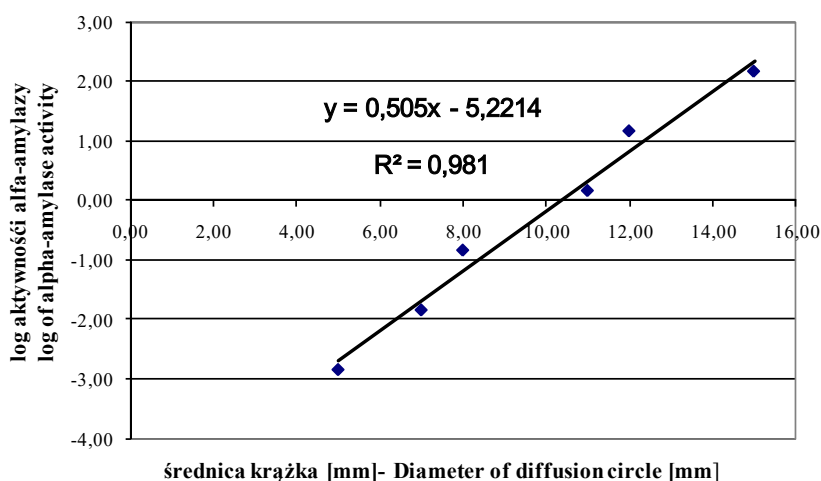
Hodowla Roślin Rolniczych Nasiona Kobierzyc do uprawy kukurydzy przeznaczyła gleby I i II klasy należące do czarnoziem wrocławskich. Stosowane nawożenie to: NPK 130–140 kg·ha<sup>-1</sup> N, 80 kg·ha<sup>-1</sup> P i 120 kg·ha<sup>-1</sup>. Do ochrony roślin wykorzystano środki Milagro, Kalisto i Dual.

Kwalifikowane nasiona mieszańcowe pierwszego pokolenia  $F_1$  pochodzą ze zbioru z 2004 roku. Wysiew odbywał się w siewie punktowym ok. 20–25.04, a zbiór kombajnem w okolicach 15.10.

Poziom aktywności  $\alpha$ -amylazy w bardzo silnym stopniu zależy od warunków pogodowych w okresie wegetacji. Okazało się, że warunki klimatyczne naszego kraju są dość zmienne i nie zawsze optymalne dla roślin ciepłolubnych, jaką jest kukurydza. Ogólnie sezon 2004 był niekorzystny dla uprawy kukurydzy i należy go uznać jako wyjątkowy. Temperatury w maju były najniższe od 40 lat.

Ocenę aktywności  $\alpha$ -amylazy w dojrzałym ziarnie kukurydzy przeprowadzono metodą dyfuzji w żelu agarozowym (Masojć i Larsson-Raźniewicz, 1991; Vu i Masojć, 1999). Wykreślono krzywą kalibracyjną obrazującą zależność między średnicą krążka dyfuzyjnego w żelu a aktywnością enzymu przy założeniu, że 1 mg oczyszczonego preparatu  $\alpha$ -amylazy (Sigma) odpowiada 1,6 jednostki aktywności [U] (rys. 1).

Dodatkowo aktywność alfa-amylazy w ziarnie oceniono metodą pośrednią przez określenie liczby opadania według Hagberga-Pertena (Jakubczyk i Haber, 1983). W tym celu wykorzystano automatyczny aparat Hagberga typu SWD produkowany przez Zakład Badawczy Przemysłu Piekarskiego sp. z o.o. z Bydgoszczy. Zastosowano naważkę mąki w ilości 7,00 g.



**Rys. 1. Krzywa kalibracyjna przedstawiająca zależność między średnicą krążka a logarytmem aktywności  $\alpha$ -amylazy**

**Fig. 1. Calibration curve showing relationship between diameter of diffusion circle and logarithm of  $\alpha$ -amylase activity**

Wyniki oceny aktywności  $\alpha$ -amylazy i liczby opadania poddano analizie statystycznej przy użyciu programu „STATISTICA”. Do oznaczenia przedziałów ufności zastosowano test D-Duncana, za pomocą którego badane odmiany kukurydzy ujęto w grupy jednorodne,

różniące się istotnie pod względem badanych cech. Obliczeń dokonano przy poziomie istotności  $\alpha = 0,05$ .

## WYNIKI I DYSKUSJA

Według Biskupskiego i wsp. (1992) aktywność  $\alpha$ -amylazy zależy przede wszystkim od warunków glebowo-klimatycznych oraz właściwości odmianowych. Aktywność amylolityczna badanych materiałów oznaczona metodą dyfuzji w żelu agarozowym wykazała znaczną zmienność.

Wyróżniono siedem grup jednorodnych dla aktywności  $\alpha$ -amylazy: niska aktywność enzymu — grupa A w zakresie od 0,11 do 0,56 U·ml<sup>-1</sup>, średnia grupa AB wartości aktywności od 0,66 do 1,33 U·ml<sup>-1</sup> i wysoka aktywność o wartościach powyżej 1,89 U·ml<sup>-1</sup> (tab. 1).

Tabela 1

**Aktywność  $\alpha$ -amylazy w ziarnie kukurydzy [U·ml<sup>-1</sup>]**  
**Alpha-amylase activity in grain of maize cultivars [U·ml<sup>-1</sup>]**

Odmiana Cultivar	Aktywność $\alpha$ -amylazy Activity of $\alpha$ -amylase [U·ml <sup>-1</sup> ]	Grupy jednorodne Homogenous groups
Prosna <sup>S</sup>	0,11	A*
Buran <sup>S</sup>	0,14	A
Fido <sup>S</sup>	0,14	A
Wiarus <sup>S</sup>	0,16	A
Reduta <sup>S</sup>	0,19	A
Glejt <sup>S</sup>	0,28	A
Koka <sup>K</sup>	0,39	A
Cedro <sup>S</sup>	0,39	A
Błask <sup>S</sup>	0,47	A
Bzura <sup>S</sup>	0,47	A
Junak <sup>S</sup>	0,47	A
Duet <sup>K</sup>	0,56	A
Cyrkon <sup>K</sup>	0,56	A
Nysa <sup>S</sup>	0,56	A
Boruta <sup>S</sup>	0,56	A
Groni <sup>S</sup>	0,66	A, B
Lober <sup>S</sup>	0,66	A, B
Brda <sup>S</sup>	0,66	A, B
KB1902 <sup>K</sup>	0,66	A, B
KB1903 <sup>K</sup>	0,79	A, B
Wilga <sup>S</sup>	0,94	A, B
Kosmo 230 <sup>K</sup>	0,94	A, B
Baca <sup>S</sup>	1,33	A, B
Wigo <sup>S</sup>	1,89	A, B, C
Limko <sup>K</sup>	2,68	B, C
Kasia <sup>S</sup>	2,68	B, C
Nimba <sup>S</sup>	3,20	C, E
Iman <sup>K</sup>	5,41	E
Król <sup>K</sup>	15,45	F

\* Grupy jednorodne, homogenous groups

<sup>S</sup>- HR Smolice, <sup>K</sup>- HRR Nasiona Kobierzyc

Aktywność  $\alpha$ -amylazy wahała się w granicach od 0,11 (Prosna) do 15,45 U·ml<sup>-1</sup> (Król). Niską aktywność  $\alpha$ -amylazy (0,11–0,56 U·ml<sup>-1</sup>) wykazało piętnaście odmian: Prosna, Buran, Fido, Wiarus, Reduta, Glejt, Koka, Cedro, Blask, Bzura, Junak, Boruta, Nysa, Duet, Cyrkon. Średnią aktywnością enzymu charakteryzowały się odmiany: Groni, Lober, Brda, KB1902, KB1903, Baca, Wilga i Kosmo230. Odmiany: Wigo, Limko, Kasia, Nimba, Iman i Król wykazały wysoką aktywność  $\alpha$ -amylazy (powyżej 1,33 U·ml<sup>-1</sup>).

Pod względem liczby opadania badane odmiany rozdzieliły się na dwie grupy: pierwsza o niskich wartościach LO zbliżonych do 60s i druga — o wysokich wartościach LO z przedziału 237–365 s (tab. 2).

Tabela 2

**Liczba opadania w ziarnie odmian kukurydzy [s]**  
**Falling number in grain of maize cultivars [s]**

	Niska Low		Wysoka High	
Wilga	61,0 ±0,0*	A**	Buran	237,5 ±6,4 B
Fido	61,5 ±0,7	A	Reduta	240,5 ±7,8 B
Cyrkon	61,5 ±0,7	A	Koka	268,0 ±5,6 C
Kosmo 230	61,5 ±0,7	A	Junak	289,0 ±5,6 D
Wigo	62,0 ±0,0	A	Brda	299,5 ±12,0 D, E
Boruta	62,0 ±0,0	A	Limko	300,5 ±13,4 D, E
Nimba	62,0 ±0,0	A	Prosna	310,0 ±5,6 E, F
Iman	62,5 ±3,5	A	Duet	310,0 ±2,8 E, F
Kasia	62,5 ±2,1	A	KB1902	311,0 ±4,2 E, F
Król	63,5 ±2,1	A	Cedro	313,5 ±7,7 E, F
Nysa	69,0 ±1,4	A	KB1903	317,0 ±11,3 F
			Groni	325,0 ±2,8 F, G
			Bzura	331,5 ±4,9 G, H
			Glejt	338,0 ±11,3 G, H
			Wiarus	340,0 ±12,7 H
			Baca	357,0 ±7,1 I
			Lober	357,5 ±10,6 I
			Blask	365,5 ±6,4 I

\* Odchylenie standardowe; Standard deviation

\*\* Grupy jednorodne; Homogenous groups

Niską liczbę opadania wykazało 11 odmian kukurydzy zwyczajnej: Król, Nimba, Kasia, Wilga, Cyrkon, Wigo, Iman, Boruta, Fido, Kosmo 230, Nysa. Pozostałe odmiany: Buran, Reduta, Junak, Koka, Brda, Bzura, Limko, Prosna, Groni, Duet, KB1902, KB1903, Baca, Lober, Blask, Cedro, Glejt i Wiarus charakteryzowały się wysoką wartością liczby opadania.

W przypadku pszenicy minimalna liczba opadania określona została na poziomie od 220 s do 250 s (Bernard, 2001; PN-ISO 3093 Zboża). Binek i wsp. (2007) podaje, że liczba opadania u pszenicy ozimej zależała od rozkładu opadów w okresie dojrzewania ziarna i od odmiany w okresie 3-lecia. Warunki pogodowe w roku 2004 spowodowały większe zróżnicowanie liczby opadania badanych odmian pszenicy.

Według Czubaszek (1995) u pszenicy zakres wahań aktywności  $\alpha$ -amylazy określonej na podstawie liczby opadania wynosił od 63 do 271 s. Przeciętna wartość tej cechy wynosiła 174 s. Wykazano także odmiany charakteryzujące się niską aktywnością

$\alpha$ -amylazy (liczba opadania 225s). Duże zróżnicowanie liczby opadania  $>200s$  i  $< 100s$  uzyskano w liniach wsobnych żyta w latach 1993 i 1994 w pracy Kolasińskiej i wsp. (1998).

Na podstawie testu D-Duncana, badane odmiany podzielono na grupy jednorodne, różniące się istotnie na poziomie istotności  $\alpha = 0,05$  pod względem badanej cechy. Utworzono 11 grup jednorodnych dla liczby opadania i 7 dla aktywności  $\alpha$ -amylazy.

O przydatności ziarna kukurydzy do produkcji bioetanolu decyduje wiele czynników genetycznych takich jak odmiana, wilgotność, zawartość skrobi i jej jakość. Aktywność endogennej alfa-amylazy jest jednym z czynników efektywności produkcji bioetanolu z ziarna. Obok czynnika genetycznego, warunkuje ją także zmienność środowiskowa. Większa część badanych odmian pochodziła z HR Smolice. Jednakże nie zauważono wpływu pochodzenia odmiany na wartość aktywności alfa-amylazy.

Ostateczna ocena odmian pod względem przydatności do produkcji bioetanolu wymagać będzie uwzględnienia takich parametrów jak wydajność produkcji etanolu z jednostki biomasy oraz zawartość skrobi. Zakłada się, że ze 100 kg ziarna kukurydzy można otrzymać 63 kg skrobi i 39 l alkoholu (Michalski, 2005). Oceniany materiał badawczy charakteryzował się dużą zawartością skrobi w przedziale od 63,3% s. m. (Fido) do 70,4% s.m. (Brda). Nie tylko zawartość skrobi może decydować o tym, że kukurydza będzie wykorzystywana w gorzelnictwie. Ważne znaczenie ma również jej wysokie plonowanie i najmniejsze koszty środowiskowe produkcji bioetanolu.

#### PODSUMOWANIE

Aktywność  $\alpha$ -amylazy w ziarnie odmian kukurydzy wahała się od 0,11 do 15,45 U·ml<sup>-1</sup>. Najwyższą aktywność amylolytyczną stwierdzono u 6 odmian: Wigo, Limko, Kasia, Nimba, Iman, Król.

Odmiany kukurydzy o najwyższych wartościach aktywności  $\alpha$ -amylazy oraz niskiej liczbie opadania (Wigo, Wilga, Kosmo 230, Kasia, Nimba, Iman, Król i Nysa) mogą być brane pod uwagę jako potencjalnie cenny materiał do efektywnej produkcji bioetanolu.

#### LITERATURA

- Bernard A. 2001. Genetic diversity of South African winter wheat cultivars in relation to preharvest sprouting and failing number. *Euphytica* 119: 107 — 110.
- Binek A., Moś M., Wójtowicz T. 2007. Zróżnicowanie liczby opadania mąki z pszenicy ozimej w zależności od odmiany i warunków pogodowych podczas dojrzewania. *Fragm. Agronom.* XXIV Nr 2 (94).
- Biskupski A., Bogdanowicz M., Subda H. 1992: Wartość technologiczna ziarna pszenżyta. Cz. I. Charakterystyka biochemiczna i technologiczna. *Hod. Rośl. Aklim.* 36, 3/ 4: 73 — 89.
- Czubaszek A. 1995. Charakterystyka technologiczna pszenżyta hodowli polskiej na podstawie metod pośrednich i wypieku laboratoryjnego. Część I. Właściwości fizyczne, przemiałowe oraz skład chemiczny ziarna i mąki pszenżyta. *Hod. Rośl. Aklim.* 39, 3:
- Dreszer K. A., Michałek R., Roszkowski A. 2003. Energia odnawialna — możliwość jej pozyskiwania i wykorzystywania w rolnictwie. *Polskie Towarzystwo Inż. Rol.* Kraków — Lublin — Warszawa. 207 — 217.
- Gradziuk P. 2002. Alternatywne wykorzystanie gruntów rolniczych — przegląd roślin energetycznych. *Czysta Energia* nr 10: 24 — 26.

- Jakubczyk T., Haber T. 1983. Analiza zbóż i przetworów zbożowych. Wyd. SGGW-AR, Warszawa: 11 — 19, 153 — 156.
- Kolasińska I., Madej L., Cygankiewicz A. 1998. Zmienność liczby opadania w liniach wsobnych i mieszańcach żyta. Biul. IHAR 205/206: 51 — 57.
- Masojć P., Larsson-Raźniewicz M. 1991. Genetic variation of alpha-amylase activity tested by gel diffusion technique. Swedish J. Agric. Res. 21: 141 — 145.
- Michalski T., 2005: Kukurydza rośliną przyszłości. Poradnik dla producentów. Agro Serwis, wydanie trzecie. Warszawa. 7 — 13.
- Vu D. T., Masojć P. 1999. Aktywność alfa-amylazy a odporność na porastanie u odmian pszenicy jarej. Biul. IHAR 211: 91 — 95.