

Особенности получения этанола из частично депротеинизированной молочной сыворотки

И. И. Вуткарева, М. К. Болога

*Институт прикладной физики АН Молдовы,
ул. Академическая, 5, г. Кишинев, MD-2028, Республика Молдова, e-mail: irinavutkareva@yahoo.com*

Обсуждаются результаты экспериментальных исследований новой технологии производства этанола из частично депротеинизированной молочной сыворотки. Описывается технологическая схема спиртовой ферментации сыворотки. Приводятся результаты экспериментальных исследований получения этанола из молочной сыворотки с помощью смеси культур дрожжей вида *Saccharomyces cerevisiae* и мезофильной культуры молочнокислых бактерий *Lactobest*. Рассматривается воздействие электрического тока малой плотности на ферментируемую сыворотку для биостимуляции дрожжей, что приводит к увеличению выхода этанола.

Ключевые слова: этанол, молочная сыворотка, дрожжи, ферментация.

УДК 637.344.8

ВВЕДЕНИЕ

В последнее время возрос интерес к промышленному производству биоэтанола, который в основном используется в качестве кислородсодержащих добавок для повышения октанового числа бензина и снижения вредных выбросов. В отличие от бензина, который производится из невозобновляемых природных ресурсов, спирт – возобновляемое топливо, производимое из крахмала, появляющегося в процессе круговорота углеводов определенных растений.

Производством биоэтанола в мире занято значительное количество заводов, основное сырье – сахарный тростник, кукуруза, сахарная свекла, пшеница, кассава (тапиока) и др. Усовершенствование технологического процесса производства кукурузного этанола ведет к образованию побочного продукта – кукурузной барды. Преобладающая часть спиртзаводов в силу их малых объемов производства, недостаточного уровня автоматизации и высоких энергозатрат на единицу продукции не в состоянии выпускать топливный этанол с приемлемой себестоимостью [1]. Биоэтанол может быть произведен также из разнообразного целлюлозосодержащего сырья – сельскохозяйственные (стебли, солома, выжимки), древесные отходы, бумажная целлюлоза и т.д. Целлюлоза является основным компонентом растительных клеток и одним из самых распространенных природных органических веществ. Себестоимость целлюлозного этанола пока примерно в полтора раза выше, чем зернового.

Предложен способ получения этанола из растительного сырья [2], в качестве которого рассматриваются древесина, торф, отходы сельскохозяйственного производства. Анаэробное спиртовое брожение проводится на гидролизатах, полученных при кислотном гидролизе. Но при этом

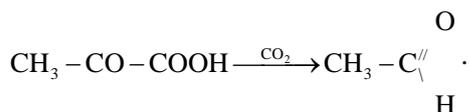
разрушается естественный растительный мир, в окружающую среду попадают токсические вещества – метиленовый спирт, фурфурол, муравьиная и уксусные кислоты, серная кислота. Патентован способ получения этанола из водорослей [3], отличие которых состоит в том, что они накапливают крахмал (криптофитовые водоросли). Но такие водоросли необходимо искусственно выращивать, и процесс дорогостоящий.

Известны способы получения спирта и из молочной сыворотки [4, 5]. Согласно первому – сыворотку сгущают на вакуум-выпарной установке до 22% массовой доли лактозы, второму – до 15% массовой доли лактозы, но с добавлением послеспиртовой барды, обогащенной низином и молочной кислотой. Все это требует дополнительных затрат.

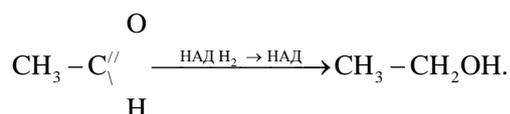
Спиртовое брожение осуществляется дрожжеподобными организмами и его суммарную реакцию можно написать уравнением Гей-Люссака: $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CO_2 + 2C_2H_5OH$. По механизму оно чрезвычайно близко к гликолизу – необратимому процессу молочнокислого брожения, для которого состояние равновесия смещено в сторону образования лактата. Расхождение начинается после этапа образования пировиноградной кислоты. При гликолизе пировиноградная кислота с участием фермента лактатдегидрогеназы и кофермента никотинамидадениндинуклеотида НАДН₂ восстанавливается в молочную кислоту. При спиртовом брожении этот конечный этап заменен двумя другими ферментативными реакциями – пируватдекарбоксилазной и алкоголь-дегидрогеназной.

В дрожжевых клетках (спиртовое брожение) пировиноградная кислота вначале подвергается расщеплению – декарбоксилации, в результате образуется уксусный альдегид. Эта

реакция катализируется ферментом пируват-декарбоксилазой, который требует наличия ионов магния и кофермента тиаминдифосфата [4]:



Затем образовавшийся уксусный альдегид присоединяет к себе водород, отщепляемый от НАДН₂, восстанавливаясь в этиловый спирт:



Реакция катализируется ферментом алкоголь-дегидрогеназой. Таким образом, конечным продуктом спиртового брожения являются этиловый спирт и СО₂, а не молочная кислота, как при гликолизе [6].

Считается, что на образование спирта расходуется 95% сахара, а остальные 5% идут на образование дрожжевых клеток и побочных продуктов спиртового брожения. Из них на синтез клеточного материала уходит около 1,61%, на образование глицерина – 2,65%, а в сумме общие потери составляют примерно 4,26% от сбраживаемого сахара.

Выход спирта, или «эффективность брожения», представляет собой отношение полученного спирта к теоретическому выходу его из сахара. В соответствии с этим из 100 кг гексоз теоретически можно получить 51,14 кг спирта и 48,86 кг диоксида углерода. Теоретический выход спирта из лактозы при ее брожении составляет 68,2 дал из 1 т [7].

Цель предпринятых исследований заключалась в повышении эффективности – в удешевлении процесса за счет использования вторичного сырья молочной промышленности без добавления дополнительных источников для ферментации. Разрабатываемая технология способствует рациональному применению вторичного сырья молочной промышленности, повышает рентабельность производства и снижает уровень загрязнения окружающей среды.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Способ производства этилового спирта из молочной сыворотки предусматривает ее очистку от белков, ферментацию лактосбраживающими культурами дрожжей и бактерий, отгонку спирта и ректификацию. Наиболее отработанный способ включает следующие операции: сыворотка подсырная и (или) творожная → депротеинизация → концентрирование депротеини-

зированной сыворотки до содержания сухих веществ 15–18% → дрожжевая масса → спиртовое брожение → сепарация (отделение дрожжей) → дистилляция → спирт-сырец.

Эффективность брожения дрожжей на сыворотке с 4,3% массовой долей лактозы составляла 86,6–94,3% от теоретического [7]. Наилучшие показатели по скорости брожения и выходу спирта получены при рН 4,0–4,5 и температуре 30–32°C.

Получение активной биомассы дрожжей. Процесс осуществляется в специальных дрожжевырастительных аппаратах (ферментерах), в них поддерживают регулируемую до определенного уровня рН, температуру и аэрацию. Питательной средой служит депротеинизированная молочная сыворотка, в которую вносят чистую культуру продуцента. В качестве продуцента обычно берут штаммы дрожжей, их вносят в субстрат в количестве 8–10% от содержания лактозы в сыворотке. Рост биомассы происходит при температуре 30°C, рН среды 4,5 и постоянном аэрировании. Полученная таким образом суспензия дрожжей используется в качестве посевного материала для инокуляции (засева) ферментера, в котором производится спиртовое брожение.

При подготовке питательной среды для спиртового брожения сыворотку депротеинизируют, пастеризуют и сгущают, по возможности вносят минеральные соли, устанавливают необходимое значение рН (4,0–4,5) и температуру (30°C). Среда инокулируется выращенными в аэробных условиях дрожжами из расчета 15%. В последнее время появились сообщения о том, что сгущение сыворотки целесообразнее осуществлять не в вакуум-выпарных установках, а методом обратного осмоса [7].

Брожение. В емкостях, обеспечивающих ведение процесса в анаэробных условиях, поддерживают рН (4,0–5) и температуру 30°C. Различают три этапа процесса брожения: взбраживание, главное брожение и дображивание. Первый начинается с момента засева дрожжей в подготовленную для брожения сыворотку. В этот период отдельные дрожжевые клетки делятся, и само брожение протекает медленно. После накопления дрожжевой массы брожение ускоряется, и наступает второй период, в котором размножение клеток замедляется, а брожение становится более интенсивным. По мере истощения питательных веществ среды и увеличения содержания в ней спирта и других продуктов метаболизма дрожжей интенсивность брожения снижается. На третьем этапе оставшаяся лактоза превращается в спирт медленно, она как бы дображивается. При введении в среду большого количества засевных дрожжей первый

этап (взбраживание) практически незаметен, клетки сразу приступают к главному брожению.

На интенсивность спиртового брожения определенное влияние оказывают различные факторы питания дрожжей, а также условия культивирования. Большое значение при этом имеет водородный показатель среды. Низкая величина рН препятствует развитию посторонней микрофлоры, может отрицательно сказаться на ходе спиртового брожения. В условиях слабощелочной среды брожение ведет к увеличению относительного содержания в общих продуктах брожения глицерина и уксусной кислоты. Снижение температуры обуславливает замедление брожения и некоторое изменение в соотношении побочных продуктов, однако выход спирта в этих условиях повышается.

Одним из ингибиторов процесса брожения является накапливающийся в среде этанол. Отделение дрожжей сепарацией или на пресс-фильтре и дальнейшая дистилляция бражки при получении спирта из сыворотки аналогичны операциям, осуществляемым при изготовлении этанола из другого сырья.

Побочными продуктами процесса получения спирта являются сывороточные белки, дрожжи, послеспиртовая бражка, а также диоксид углерода, количество которого при переработке 1 тонны концентрированной до 15% лактозы сыворотки может составлять более 60 кг [7].

Технологическая схема, разработанная авторами, предусматривает частичную депротеинизацию молочной сыворотки, пастеризацию и ферментацию ее смесью мезофильных лактобактерий и дрожжей без внесения дополнительных активаторов брожения.

Спиртовое сбраживание состоит из операций нагрева молочной сыворотки до 93°C, выдержки 15 минут с целью пастеризации, охлаждения, сепарации (отделение белковых фракций) и ферментирования лактосбраживающей закваской при температуре 32°C.

В качестве питательной среды для ферментации использовали пастеризованную молочную сыворотку (ОСТ 10-02-02-3-87). Для приготовления дрожжевого автолизата дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* смешивали с дистиллированной водой в соотношении 3:1 и полученную суспензию с содержанием 600 г дрожжевых клеток в 1 литре воды разогревали при помешивании до 45°C и выдерживали 18–24 часа. Для остановки процесса суспензию пастеризовали 5 минут при 93°C; охлаждали, затем добавляли в дрожжевой автолизат сухую закваску лактозосбраживающих бактерий *Lactobest* (DLF-N-86DI 10U) *Cadorago* (CO) Italy [8].

Совместное выращивание дрожжей и молочнокислых бактерий предпочтительно, поскольку в процессе автолиза дрожжи обогащают среду витаминами и делают ее более благоприятной для развития молочнокислых бактерий. Подкисление среды, вызываемое молочнокислыми бактериями, дает дрожжам преимущество в борьбе с конкурентными видами: некоторые бактерии характеризуются более полной, чем дрожжи, системой протеолитических ферментов, расщепляя сложные азотосодержащие соединения и благоприятствуя тем самым питанию дрожжей; многие виды дрожжей обладают способностью ассимилировать органические кислоты, образуемые в процессе брожения молочнокислыми бактериями. Внесение молочнокислых палочек в количестве 1% не угнетает рост дрожжей.

Закваска готовилась на пастеризованной осветленной сыворотке ферментированием ее суспензией в соотношении 1:5 и культивировании при 32°C в течение 1–2 суток в термостате [9]. Аэрирование среды осуществляли с помощью барботера. Далее пастеризованную, частично депротеинизированную молочную сыворотку ферментировали лактосбраживающей закваской от рН (4,6–4,7) до рН 4,3; 4,0; 3,9; 3,85; 3,8; 3,7 при том же температурном режиме. Образцы исходной и ферментированной сыворотки на различных стадиях сбраживания анализировали ядерно-магнитно-резонансной спектроскопией на содержание и количество этанола, молочной кислоты, уксусной кислоты, ацетальдегида, ацетона, глицерина, янтарной кислоты, 2,3-бутиленгликоля [9]. Определение проводили по методике, предложенной в [10]. В основе – метод, используемый для получения изображения модельного объекта, состоящего из двух наполненных водой капилляров с внутренним диаметром 1 мм и расстоянием между их центрами 2,2 мм, погруженных в сосуд с тяжелой водой. Трубки расположены параллельно оси ординат. Фрагменты CH_n-CH_m могут быть идентифицированы, поскольку в частотном пространстве появляются соответствующие сигналы.

Для увеличения продуктивности заквасок применяют различные методы стимуляции роста и ускорения метаболических процессов у микроорганизмов. Один из них предусматривает обработку сбраживаемого материала в электролизном устройстве при токах малой величины. Были обнаружены эффекты воздействия на клетки слабоинтенсивного электромагнитного излучения [11], наиболее перспективными в смысле восприимчивости к слабоинтенсивным волнам следует считать культуру дрожжей *Saccharomyces*

cerevisiae. Результаты классических экспериментов Грюндлера и Кальмана [12] неоднократно воспроизводились в различных модификациях. Подтверждены значения частот, облучение которыми способно ускорять или угнетать рост клеток [13], и возможность биостимуляции дрожжевой культуры в технологии производства биоэтанола [14].

Наша задача состояла в исследовании влияния электрообработки при малых плотностях тока на частично депротеинизированную сыворотку, ферментируемую смесью культур дрожжей *S. cerevisiae* и лактобактерий, в аппарате электролизного типа. Процесс электрообработки осуществляли в диафрагменном электролизере, разделенном ионоселективной мембраной, со стальным катодом и графитовым анодом. Электролиз проводили в диапазоне начальных рН от 3,6 до 4,3 при поддержании плотности тока на аноде в диапазоне 0,002–0,01 А/см². Величину тока контролировали в процессе эксперимента. Отбор проб осуществляли из катодной камеры электролизера в процессе электрообработки. Объем электролита – ферментированной сыворотки – составлял 250 см³.

Так как расстояние между катодом и анодом составляет около 10 см, а катодное и анодное пространства разделяются диафрагмой, перемещение электролита и отбор его из отдаленных от катода зон исключаются. Отбор объема электролита из прилегающего к катоду слоя (5 см³), исходя из толщины диффузионного слоя (около 0,1 см), проводился через равные промежутки времени после начала электролиза.

Время электрообработки варьировало от 1 часа и более. Пробы с учетом необходимого разведения высевали на питательную среду и термостатировали при температуре 30°C. Количество микроорганизмов определяли подсчетом выросших колоний лактобактерий и дрожжей на чашках Петри (среда – мясопептонный агар).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Наряду с главными продуктами брожения – спиртом и углекислым газом – образуются и вторичные продукты, к числу которых относятся молочная кислота, глицерин, янтарная и уксусная кислоты, ацетальдегид, 2,3-бутиленгликоль, ацетоин, лимонная и пировиноградная кислоты, изоамиловый спирт, изопропиловый спирт, эфиры. Образование вторичных продуктов в процессе спиртового брожения происходит неравномерно. Накопление глицерина наиболее интенсивно в начале брожения, пока в среде мало ацетальдегида, содержание которого быстро возрастает в первый период брожения, после чего устанавливается равновесие между его образова-

нием и расходом. Уксусная кислота образуется интенсивно в начале брожения, что объясняется возрастом дрожжей (молодые дрожжи образуют ее больше).

На соотношение между вторичными продуктами брожения влияют аэрация, рН среды, температура брожения, первоначальный состав суслу. Образование янтарной кислоты возрастает при аэрации суслу и уменьшается в анаэробных условиях. Образование уксусной кислоты, 2,3-бутиленгликоля и ацетоина, наоборот, возрастает в анаэробных условиях и уменьшается при аэрации суслу.

При рН > 3,0 увеличивается интенсивность глицеропировиноградного брожения, что приводит к уменьшению выхода этилового спирта. С увеличением рН образование глицерина, уксусной и янтарной кислот возрастает. При рН < 6,0 много уксусной кислоты образуется лишь в начале брожения, а при рН 7,5 (в щелочной среде) она образуется с одинаковой интенсивностью на всех стадиях брожения. Повышение рН в анаэробных условиях приводит к уменьшению содержания ацетоина и 2,3-бутиленгликоля. При высокой температуре брожения (30–35°C) преобладает глицеропировиноградное брожение с образованием глицерина.

На содержание вторичных продуктов влияет и состав суслу. Чем больше в нем сахара, тем выше содержание уксусной кислоты, ацетальдегида, глицерина, 2,3-бутиленгликоля. Выбором дрожжей и регулированием аэрации, температуры и других условий можно обеспечить оптимальное соотношение вторичных продуктов.

Жизнедеятельность микроорганизмов во многом зависит от условий среды. Установление зависимости между ними позволяет регулировать рост, развитие и обмен веществ микроорганизмов. Поддерживая необходимые условия культивирования, можно в известной степени управлять ходом ферментативных процессов. Накопление этанола и расходование сахара в ферментируемой среде отображены на рис. 1.

Перевод лактозы в молочную кислоту с помощью гомоферментативных молочнокислых бактерий позволяет культивировать на сыворотке многие виды дрожжей, которые сами не способны ассимилировать лактозу, но хорошо усваивают молочную кислоту. Это *S. cerevisiae*. Чаще всего в первые 48 часов культивирование дрожжей происходит за счет органических кислот, и лишь после этого дрожжи начинают потреблять лактозу.

Особенно большое влияние на рост, развитие и биохимическую деятельность микроорганизмов оказывают питание, температура выращивания, окислительно-восстановительные условия среды, вид и способ подготовки сыворотки.

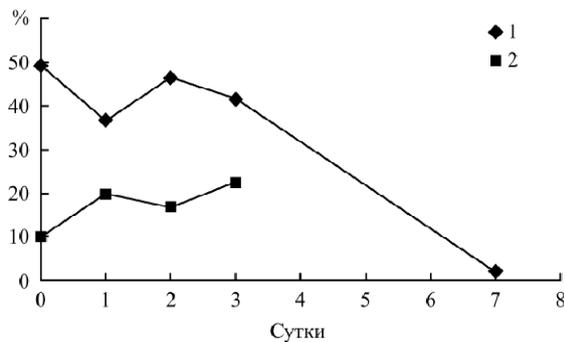


Рис. 1. Накопление этанола и расходование сахара в ферментируемой сыворотке: 1 – расход сахаров; 2 – накопление спирта в ферментируемой сыворотке. Начальное процентное соотношение в смеси компонентов: Et–этанол–10; Sug–сахара–49,3; молочной кислоты–31,6; уксусной кислоты–6,8; 2,3–бутиленгликоля–2,3.

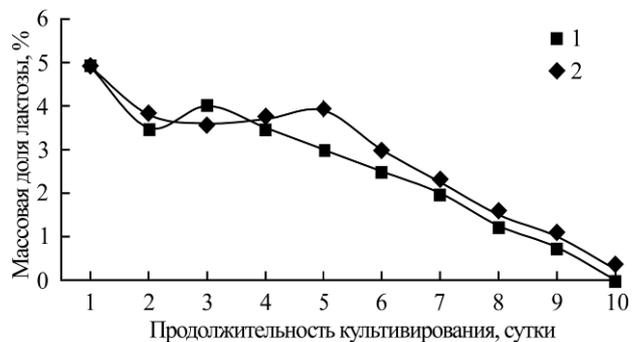


Рис. 2. Ферментирование сыворотки различным количеством культур дрожжей и молочнокислых бактерий: 1 – дрожжи (на 1 л – 100 г); 2 – Lactob. (10% + 100 г дрожжей).

Таблица 1. Результаты сбраживания стерильной и нестерильной сыворотки

Дрожжи	рН сыворотки			Массовая доля сахаров, %			Содержание молочной кислоты в смеси компонентов, %	
	При посеве	3 суток	6 суток	При посеве	3 суток	6 суток	3 суток	6 суток
Нестерильная сыворотка								
<i>S. cerevisiae</i>	4,6	3,7	3,6	4,9	–	–	62	63,2
Стерильная сыворотка								
<i>S. cerevisiae</i>	4,7	4,05	3,6	4,7	1,3	–	59	65

Таблица 2. Данные по ферментированию сыворотки дрожжами и смесью культур дрожжей и молочнокислых бактерий

Дрожжевое брожение		Процентное соотношение в смеси компонентов			
Исходная молочная сыворотка	рН сыворотки	Молочная кислота	Этанол	Уксусная кислота	Сахар
		4,75	34,9	4,5	4,7
Ферментированная сыворотка на:					
1-е сутки	4,65	32,9	3,9	5,3	56,9
2-е сутки	4,75	33,9	3,8	5,1	55,9
4-е сутки	4,75	34,9	4,5	4,7	54,8
7-е сутки	4,45	39,2	6,4	7,1	46,3
Дрожжи + молочнокислые бактерии					
1-е сутки	4	32,6	11,3	5,2	48,2
3-и сутки	4,05	–	24,5	22,2	35,9
4-е сутки	4,3	–	19,9	17,9	49,3
6-е сутки	4,6	65,1	–	20,4	–

Таблица 3. Анализ образцов ферментированной сыворотки (спиртовое брожение)

Исходная молочная сыворотка	рН	Процентное содержание в смеси компонентов				
		Этанол	Уксусная кислота	Молочная кислота	2,3 бутандиол	Сахара
	4,7	10	6,8	31,6	2,3	49,3
Ферментированная сыворотка на:						
1-е сутки	4,9	19,9	5,5	34,6	3,5	36,3
2-е сутки	4,6	16,8	5,0	28,2	3,5	46,5
3-е сутки	4,6	22,6	5,3	27,8	2,6	41,7

При осаждении сывороточных белков с помощью высоких температур повышается выход дрожжевой биомассы. Тепловая обработка молочной сыворотки меняет биологическую ценность среды, делая ее более благоприятной для роста дрожжей, так как происходит частичный гидролиз лактозы и сывороточных белков с высвобождением более легкоусвояемых продуктов полураспада.

В связи с тем, что для тепловой обработки сыворотки требуются дополнительное оборудование и связанные с его использованием затраты, представляло интерес проверить рост дрожжей на нестерильной сыворотке, полученной при производстве сыра и творога (смешанной), которая содержит значительное количество молочнокислых бактерий и «диких» дрожжей. Полученные результаты представлены в табл. 1. Наличием посторонней микрофлоры, и в частности дрожжей, сбрасывающих лактозу, можно объяснить и тот факт, что в нестерильной сыворотке быстрее использован весь молочный сахар. Большинство дрожжей–мезофильные организмы (рост при 30–32°C).

pH среды является одним из наиболее важных факторов, определяющих рост микроорганизмов, их физиологическую активность и вызывающих их гибель. В процессе роста микроорганизмы сдвигают кислотно-основное равновесие в определенную сторону, меняя тем самым величину pH (от 4,6 до 4,9). Изменение pH сыворотки в основную сторону обусловлено тем, что в процессе роста дрожжи потребляют компоненты кислого характера: молочную кислоту, цитраты, растворимые белки.

Совместное культивирование дрожжей с молочнокислыми бактериями выигрывает во многом (табл. 2). По данным таблицы, содержание этанола на 4-е сутки при чисто дрожжевом брожении – 4,5%, при дрожжевом и молочнокислом брожении – 19,9% в смеси компонентов. Это при одной и той же исходной сыворотке. На 3–4-е сутки спиртовое брожение достигает предела, и при дальнейшей ферментации происходит молочнокислое брожение. Наблюдаем процесс гликолиза: состояние равновесия смещено в сторону образования лактата. Появление молочной кислоты и увеличение количества уксусной указывают на то, что остаток сахара полностью сброжен в молочную кислоту, которая частично окислилась в уксусную.

Существует прямая зависимость скорости использования лактозы от количества засевных дрожжей – она тем ниже, чем меньше их внесено при закваске. Но увеличение количества засевных дрожжей выгодно до определенного

предела. С увеличением количества посевного материала в значительной мере сокращается лаг-фаза (или начальная фаза, в течение которой плотность популяции дрожжей не изменяется, а увеличивается размер клеток, и это подготовка к началу размножения). В промышленном производстве продуктов биосинтеза стремятся сократить лаг-фазу (как непроизводительную) до минимума (изгиб кривой на рис. 2).

В описанных выше условиях был проведен анализ образцов сыворотки, полученной на молокозаводе на 1, 2, 3-и сутки ферментации (табл. 3). Идентифицированы спектроскопические пики, соответствующие молочной, уксусной, янтарной кислотам, этанолу. Количество молочной кислоты определяет степень завершенности процесса брожения.

Большое влияние на выход оказывают способы подготовки сыворотки. Используют несколько способов осветления (депротеинизации) молочной сыворотки (термический, химический со смещением pH, комбинированный). Процесс состоит из двух стадий – выделение белков и последующее их отделение от жидкой фазы. Более высокий выход дрожжевой биомассы на подсырной сыворотке получен при осветлении ее нагреванием без смещения pH, хотя сахар среды использовался хуже.

В процессе роста и потребления различных компонентов среды микроорганизмы сдвигают кислотно-основное равновесие, меняя величину pH. Могут создаваться различные условия для роста клетки и ее физиологической активности. Буферная емкость сыворотки довольно высока, и в процессе роста дрожжей в ней без добавления минеральных источников азота и фосфора сдвиг pH в щелочную сторону происходит довольно медленно и обусловлен тем, что в процессе роста дрожжи потребляют компоненты кислого характера. Довольно высокая продуктивность дрожжей наблюдалась в пределах pH от 4,5 до 7,0 с максимумом при pH 5,0.

Интенсивность аэрации среды существенно влияет на скорость роста дрожжей. В первый период ферментации, когда в среде относительно мало дрожжевых клеток, сильная аэрация угнетает их рост. В период логарифмической фазы скорость роста дрожжей тем выше, чем выше аэрация, но до известного предела.

В табл. 4 представлены результаты влияния тока малой величины на развитие микрофлоры ферментируемой сыворотки. Более длительная электрообработка подавляет рост молочнокислых бактерий, но оказывает стимулирующее действие на развитие дрожжевой микрофлоры.

Таблица 4. Микробиологические показатели ферментированной сыворотки в процессе электрообработки

Время, ч	I, А	рН сброженной сыворотки	Количество микроорганизмов в 1 см ³ сброженной сыворотки	
			Колонии лактобактерий	Дрожжи
	0,2	4,25	6400 10 ⁸	
1,5	0,2	4,8	1100 10 ⁶	Рост
3,5	0,2	4,75	Отдельные поверхностные колонии	14400
5,5	0,2	4,75	4800	Сильный рост
7,5	0,2	4,7	7200	Сильный рост
9,5	0,2	4,7	4000	Сплошной рост

На обработку сыворотки дрожжами с целью получения пищевых продуктов, аналогичных сухому обезжиренному молоку, запатентованы различные способы, в основе которых, как правило, использование пищевых дрожжей рода *Saccharomyces* (*Kluveromyces*). В США, например, сыворотку инокулируют культурой, способной трансформировать лактозу в молочную кислоту, и смешанной культурой дрожжей, ассимилирующих лактозу и (или) молочную кислоту. Перед засевом питательную среду подвергают высокотемпературной обработке, но так, чтобы не вызвать денатурацию белков сыворотки, и после охлаждения вводят в нее необходимые минеральные соли. Культивирование ведется в условиях постоянного аэрирования среды – вначале до превращения почти всей лактозы в молочную кислоту, а затем до полного ее использования дрожжами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлена возможность получения биоэтанола из молочной сыворотки с помощью смеси дрожжей вида *Saccharomyces cerevisiae* и мезофильной культуры *Lactobest*.

Велись разработки по получению спирта после предварительного расщепления лактозы на глюкозу и галактозу. Предварительное расщепление лактозы на глюкозу и галактозу позволяет использовать в качестве продуцентов спирта микроорганизмы, которые не сбраживают лактозу. На прогидролизованной лактозе сыворотки дрожжи *S.cerevisiae* продуцировали спирт быстрее, чем другие дрожжи, однако требуется «приучение» их к росту на галактозе. Применение в качестве продуцента *S.cerevisiae* считается перспективным, они выдерживают более высокие концентрации этанола в среде, а следовательно, могут конвертировать в спирт большой процент лактозы.

Осуществлено культивирование смешанной культуры дрожжей и бактерий, возможно предварительное сбраживание молочнокислыми бактериями до получения молочной кислоты, затем ферментирование дрожжами *S. cerevisiae* без

внесения каких-либо дополнительных источников питания.

Полученные результаты позволяют оценить влияние каждого фактора на конечное содержание этанола и на сопутствующие процессы при спиртовом сбраживании молочной сыворотки.

Несмотря на некоторое угнетение роста молочнокислых бактерий при аэрировании среды, выращивать смешанную культуру дрожжей и бактерий целесообразно именно в условиях аэрации. Интенсивное перемешивание в течение первых часов создает благоприятные условия для накопления дрожжевых клеток, что позволяет интенсифицировать процесс получения спирта.

Для ферментации молочной сыворотки применяли различные закваски: *Lactobest* (смесь мезофильных лактобактерий), *Lactobest* и дрожжи и отдельно дрожжи в различных концентрациях (от 10% к объему ферментируемой среды и выше). Рекомендуемая величина – 15% культуры микроорганизмов от объема ферментируемой сыворотки.

Рациональнее вести переработку сыворотки с повышенным содержанием сухих веществ.

Электрообработка ферментируемой сыворотки током малой величины оказывает стимулирующее воздействие на развитие дрожжевой микрофлоры сыворотки. В результате повышается выход биомассы дрожжей, что в дальнейшем позволит увеличить выход спирта и уменьшить количество несброженных углеводов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Драчева Л.В. Биотопливо второго поколения – развитие в мире и в России. *Пищевая промышленность*. 2012, (7), 28–29.
2. Патент РФ № 2284355 C12P7/06. Лагутина Т.Б. *Способ получения этанола*. Опубликовано 2006.09.27. Бюл. № 27.
3. Patent WO 2007 101172A2 C12N1/12 (2006.01). Bush Ronnie A., Hall Kevin M. *Process for Production of Ethanol from Algae*. Publication Date 07.09.2007.
4. Патент РФ № 2057798 C1. Черемисина Л.В., Ахремчик Т.Д. *Способ получения спирта-сырца из молочной сыворотки*. Опубликовано 1996.04.10.

5. Патент РФ № 2036238 C12P7/06. Хрычева А.И., Устинников Б.А. и др. *Способ получения этанола из молочной сыворотки*. Опубликовано 1995.05.07.
6. Медведев С.С. *Физиология растений*. Санкт-Петербург: Издательство СПбУ, 2012. С. 111–112.
7. Залашко М.В. *Биотехнология переработки молочной сыворотки*. М.: Агропромиздат, 1990. 192 с.
8. Vutcariova I.I., Maximuk E.P. Bioethanol from Whey the Electrohydrodynamic Method. *Proceedings of the 37th Annual Congress of the American Romanian Academy of Arts and Sciences (ARA)*, June 04–09, 2013. Chisinau, Moldova, 458–459.
9. Bologa M.K., Maximuk E.P., Barba A.N., Gorincioi E.K., Vutcariova I.I. Electrohydrodynamic Technology of Obtaining Biethanol from Deproteinized Whey. *Abstracts of 6th International conference on materials science and condensed matter physics*, September 11–14, 2012. Chisinau, Moldova, p. 302.
10. William A. Bubbs NMR Spectroscopy in the Study of Carbohydrates: Characterizing the Structural Complexity. Wiley Periodicals, Inc. *Concepts in Magnetic Resonance Part A*, Vol. 19 A (1), 2003, 1–19.
11. Webb S.J. Nonlinear Phenomena in Bioenergetics and Oncology as Seen as 25 years of Research mm Microwaves and Reman Spectroscopy. *Nonlinear Electrodynamics in Biological Systems*, ed. by W.R. Adey, New York, London: Plenum Press, 1984. 603 p.
12. Grundler W., Keilmann F. Sharp Resonances Yeast Growth Prove Nonthermal Sensitivity to Microwaver. *Phys Rev Lett*. 1983, **51**(13), 2114–2116.
13. Маринченко Л.В., Нижельская А.И., Маринченко В.А. Стимуляция накопления биомассы и бродительной активности культуры дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* с помощью сверхвысокочастотного электромагнитного излучения. *Научные вестни НТУ Украины «КПИ»*. 2011, (3), 68–73.
14. Розанов А.С., Котенко А.В., Акбардин И.Р., Пельтек С.Е. Рекомбинантные штаммы *Saccharomyces cerevisiae* для получения этанола. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2014, **18**, 989–900.

Поступила 30.03.15

После доработки 27.05.15

Summary

The results of experimental investigations of a new technology for production of ethanol from partially deproteinized whey are discussed. A technological scheme of alcoholic fermentation of whey is described. The results of experimental investigations of ethanol production from whey using a mixture of cultures of the yeast species *Saccharomyces cerevisiae* and mesophilous culture of the lactic acid bacteria *Lactobest* are presented. The impact of the electric current of a low density on the whey fermented for biostimulation of yeast, which leads to an increase in the output of ethanol, is considered.

Keywords: etanol, whey, yeast, fermentation.