

# Особенности получения молочной кислоты из частично депротеинизированной 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](mailto:irinavutkareva@yahoo.com)

Обосновывается целесообразность совмещения ферментации молочной сыворотки и электролизного выделения молочной кислоты, что обеспечивает высокую степень утилизации лактозы. Разработана схема ферментирования лактозы обработанной сыворотки штаммами термоустойчивых молочнокислых бактерий *L. acidophilus* и дрожжевым экстрактом с последующим получением молочной кислоты в диафрагменном электролизере. При малых токах, позволяющих поддерживать необходимую температуру и продолжительность электролиза, создаются благоприятные условия для получения молочной кислоты. Ферментативный гидролиз и электрофизическое выделение молочной кислоты перспективны для утилизации лактозы и экологической безопасности.

Ключевые слова: молочная кислота, ферментация, электролизер.

УДК 579.663

## ВВЕДЕНИЕ

Молочная кислота используется в качестве регулятора кислотности в производстве продуктов переработки плодов и овощей, пива, безалкогольных напитков, хлебобулочных изделий, кожевенной, парфюмерной промышленности благодаря высоким диффузионным свойствам, сильному антимикробному действию. Мировой рынок молочной кислоты характеризуется ежегодными значительными объемами и неизменным увеличением спроса [1], необходимостью решения проблемы полной переработки молочной сыворотки, обусловленной также ужесточением требований к охране окружающей среды [2]. Молочная сыворотка – универсальная среда для культивирования молочнокислых микроорганизмов при получении молочной кислоты.

Молочнокислое брожение во многом сходно со спиртовым, отличие заключается в том, что при нем пировиноградная кислота не декарбонизируется, как при гликолизе в животных тканях, а восстанавливается с участием лактатдегидрогеназы за счет водорода НАДН<sub>2</sub> [3]. Таким образом, при молочнокислом брожении пировиноградная кислота (пируват) под действием фермента лактатдегидрогеназы восстанавливается в молочную кислоту (рис. 1). Оптимум pH реакции зависит от температуры, концентрации субстрата. Кроме того, для протекания реакции необходимо наличие в среде ионов магния, с которыми комплексно связывается молекула аденозинтрифосфорной кислоты в качестве кофермента.

Пировиноградная кислота образует комплекс фермент-субстрат, который в дальнейшем легко распадается с образованием уксусного альдегида, тиаминпирофосфата и углекислоты.

Скорость всей ферментативной реакции зависит непосредственно от кислотности среды и способности СС-оксигруппы отдавать свой протон. Большое значение имеет состав раствора, особенно pH и температура.

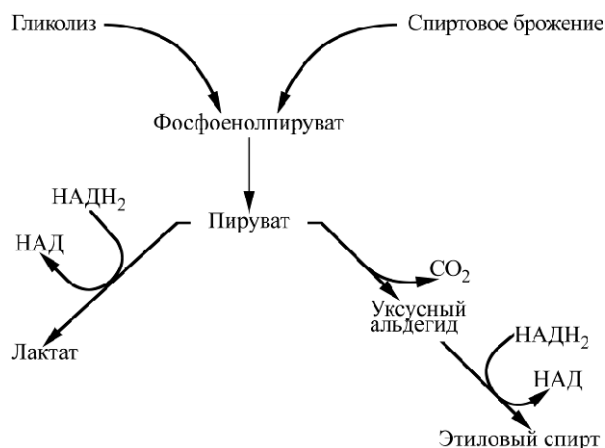


Рис. 1. Схема процесса молочнокислого (гомоферментативного) и спиртового брожения НАД, НАДН<sub>2</sub> – кофермент никотинамидадениндинуклеотид.

Важными в части оптимизации выделения молочной кислоты из сыворотки являются процесс молочнокислого брожения, применение оптимальных условий для роста культур микроорганизмов – продуцентов молочной кислоты и эффективность кислотообразования. В настоящее время применяются современные технические средства и способы разделения фаз при выделении, очистке и концентрировании растворов, что определяет получение целевого продукта более высокого качества [4].

Представляется целесообразным обоснование электрохимического способа получения молочной кислоты из вторичного сырья молочной промышленности – сыворотки, совмещающего

ее ферментацию молочнокислыми микроорганизмами и электролизное выделение образующейся кислоты, молекулы которой приобретают отрицательный заряд вследствие отщепления атома водорода.

### МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Посредством таких факторов, как источники азота и углерода, pH, температура, способом предварительной обработки сыворотки с целью частичной депротеинизации можно влиять на жизнедеятельность культуры – продуцента молочной кислоты. В работе использованы штаммы *L. acidophilus*, среда культивирования – частично депротеинизованная, пастеризованная молочная сыворотка. Источник углерода в среде – лактоза сыворотки, источник азота – дрожжевой экстракт. Для приготовления дрожжевого экстракта 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 смешивали с закваской молочнокислых бактерий *L. acidophilus*. Закваска готовилась на пастеризованной, частично депротеинизованной сыворотке ферментированием ее суспензией в соотношении 1:5 и культивированием более суток в термостате при 37°C без аэрации. Посевная доза – 5% 18–24-часовой культуры.

Тепловая обработка молочной сыворотки меняет биологическую ценность среды, делая ее более благоприятной для роста микроорганизмов, так как происходит частичный гидролиз лактозы и сывороточных белков с высвобождением более легкоусвояемых продуктов полураспада. Через 24, 48 и 72 часа измеряли количество ферментированной молочной кислоты.

Количество жизнеспособных клеток (КОЕ/мл) определяли методом 10-кратных разведений пробы и высевом на агаризованную среду MRS.

Количество кислоты (титруемую кислотность) определяли титрованием 0,1N гидроксидом натрия (количество молочной кислоты рассчитано в °Т – градусах Тернера). Идентификацию органических кислот проводили ядерно-магнитно-резонансной спектроскопией, определялось содержание молочной, уксусной, янтарной кислот, этанола [5]. Для дальнейшего получения молочной кислоты применяли обработку в электролизном устройстве. Предварительно для частичного осаждения белковых фракций сыворотки и предотвращения закупорки мембран применяли тепловую обработку: нагрев до 93°C

и выдержка 15 минут, центрифугирование.

Процесс электрообработки осуществляли в диафрагменном электролизере, разделенном ионоселективной мембраной, со стальным катодом и графитовым анодом. Электролиз проводили при начальных pH от 3,6 до 4,3. Величину тока контролировали в процессе эксперимента при постоянном напряжении 29 В. Отбор проб осуществляли из катодной камеры электролизера в процессе электрообработки. Так как расстояние между катодом и анодом составляет около 3 см, а катодное и анодное пространства разделяются диафрагмой, перемешивание и отбор электролита из отдаленных от катода зон исключаются. Отбор электролита из прилегающего к катоду слоя, исходя из толщины диффузионного слоя (около 0,1 см), проводился через равные промежутки времени после начала электролиза. Продолжительность опыта – 50 минут. Анодную камеру, камеру концентрирования заполняли слабым раствором электролита – 0,1% раствором  $\text{NaHCO}_3$ . Кроме того, проводились эксперименты по влиянию электрообработки на осветленную с добавлением гидрофосфатов кальция ферментируемую сыворотку с целью дальнейшей ферментации в катодной камере. Для этого сыворотку обрабатывали кислотой солью фосфата Ca –  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  и  $\text{CaCl}_2$ , увеличивая исходную концентрацию гидрофосфатов кальция на 10–15 ммоль/л [6].

Параллельно использовались предварительное термическое осаждение белка и ферментация сбраживаемой сыворотки в катодной камере электролизера с последующим получением молочной кислоты.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В процессе обработки сыворотки и исследования влияния pH при разных видах брожения в первые 10 минут можно отметить резкое увеличение активной кислотности, обусловленное прежде всего миграцией ионов (рис. 2, 3). Затем рост активной кислотности замедляется, что связано с высокой титруемой кислотностью среды в катодной камере.

Исходя из полученных результатов можно сделать вывод о преимуществе образцов с более ферментированной (кислой) сывороткой, при которой происходит полная диффузия молочной кислоты из катодной камеры в камеру концентрирования. Кривые кислотосодержания неферментированной и слабоферментированной сыворотки схожи и указывают на идентичность процессов кислотонакопления в сыворотке при pH 3,9–4,75.

Оптимальные результаты по концентрированию молочной кислоты получены в случае, когда

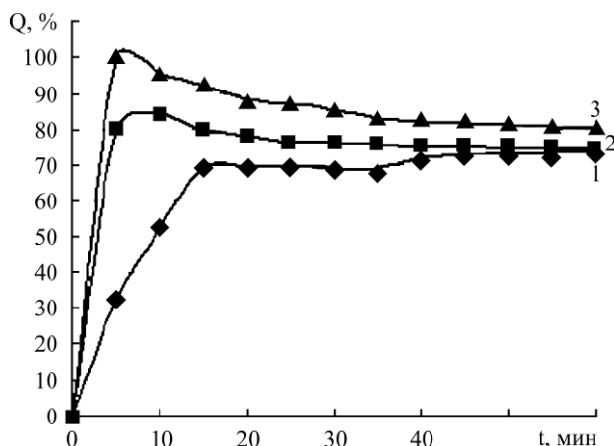


Рис. 2. Кислотонакопление в камере концентрирования электролизера: сыворотка неферментирована, pH исходной сыворотки 4,7 – 1; сыворотка ферментирована до: pH 3,6 – 2; pH 3,7 – 3.

сыворотка сброжена до pH 3,7. Основной объем молочной кислоты, имеющейся в сыворотке, мигрирует в камеру концентрирования в первые 10 минут. Но сыворотка в катодной камере остается кислой, что указывает на возможность совмещения ферментации и электролизного получения молочной кислоты в ее чистом виде, а не лактата кальция с последующей обработкой серной кислотой, как принято в современном производстве.

Следует указать на максимально допустимую температуру процесса. Сильное нагревание сыворотки в течение длительного времени может привести к термической денатурации белковых фракций, нарушению структурных свойств среды и разрушению кислот. Исключение необратимых изменений составных частей сыворотки при температурном воздействии в процессе электрообработки обеспечивается подбором температурного режима и продолжительности концентрирования. В зависимости от условий – силы тока, кислотности среды – температура при электрообработке колеблется от 20 до 45°C. Такие факторы, как вязкость продукта, структура белковых фракций, кристаллизация лактозы, определяют целесообразный предел – около 45°C. Этим обеспечивается наиболее полное сохранение исходных свойств сыворотки.

При постоянном напряжении 29 В наблюдается рост температуры до 45°C в случае сыворотки, сброженной до pH 3,7 (рис. 4).

Поскольку температура предопределяется силой тока в системе, сбраживание сыворотки в электролизере возможно при  $I$  ниже 1–1,2 А (рис. 5).

Параллельно, вместо предварительного теплового осаждения белка, для интенсификации коагуляции белковых соединений проводили опыты по выделению  $\beta$ -лактоглобулина, увеличивая исходную концентрацию гидрофосфатов кальция на 10–15 ммоль/л. Сыворотку обрабаты-

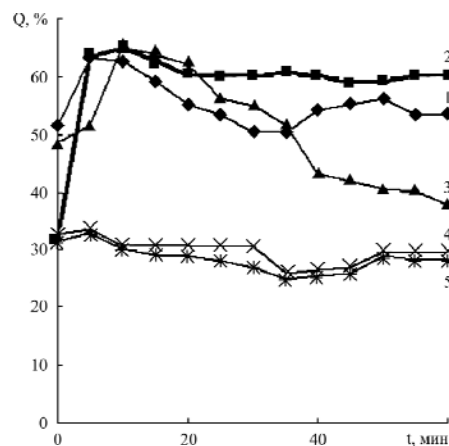
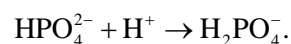


Рис. 3. Зависимость кислотосодержания от продолжительности электрообработки. Катодная камера: сыворотка ферментирована до: pH 3,9 – 1; pH 4,3 (спиртовое брожение) – 2; pH 3,7 – 3; сыворотка неферментирована, pH 4,7 и 4,75 – 4 и 5.

вали кислой солью фосфата Ca –  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  и  $\text{CaCl}_2$ . Выделение белка с использованием гидрофосфатов кальция достигает насыщения при pH 6,6–7 [6]. Далее в осветленную таким методом сыворотку вносили лактосбраживающую культуру микроорганизмов и после 16-часовой ферментации при 37°C сыворотку подвергали электрообработке при малой силе тока (1–0,2 А) в течение 7 часов. Результаты представлены в табл. 1.

Токи малой величины (табл. 1) действуют несколько угнетающе на развитие молочнокислых бактерий, но стимулируют развитие дрожжевой микрофлоры. В ходе опыта (контроля) наблюдается пониженное количество микроорганизмов по сравнению с пробой, прошедшей электрообработку. То есть микроорганизмы в камере продолжали сбраживание сыворотки (титруемая кислотность в камере довольно высока), несмотря на то, что основной объем молочной кислоты мигрировал в камеру концентрирования.

Буферные свойства фосфатов проявляются во взаимном переходе гидрофосфатов в дигидрофосфаты и обратно. При образовании кислоты часть гидрофосфатов переходит в более кислые дигидрофосфаты:



Так как анион  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  слабо диссоциирует на  $\text{H}^+$  и  $\text{HPO}_4^{2-}$ , то pH сыворотки почти не изменяется, а титруемая кислотность возрастает. Это объясняется тем, что при определении активной кислотности учитывают только ионы водорода, находящиеся в растворе. При определении титруемой кислотности в реакцию со щелочью вступают не только свободные, но и связанные H-ионы.

Несовпадение активной и титруемой кислотности объясняется буферностью сыворотки, которая обусловлена содержанием белков и смеси фосфа-

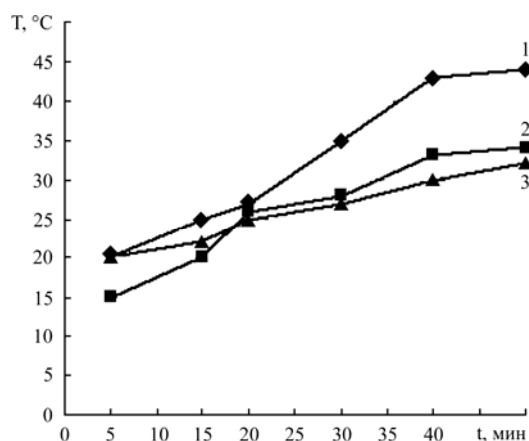


Рис. 4. Изменение температуры сыворотки при электрообработке: сыворотка ферментирована до: pH 3,7 – 1; pH 4,3 – 2; неферментированная сыворотка – 3.

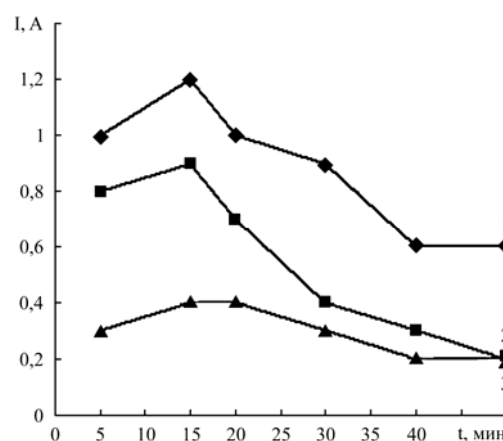


Рис. 5. Изменение силы тока при электрообработке: сыворотка сброжена до: pH 3,7 – 1; pH 4,3 – 2; сыворотка неферментирована – 3.

Таблица 1. Показатели исходной, осветленной сыворотки до и после ферментации и электрообработки. Сбраживание в катодной камере

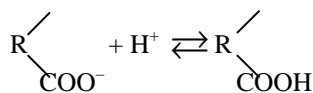
Опыт	$\tau$ , час	pH	$^{\circ}\text{T}$	КОЕ
ИМС		4,80	48	
ОС		7,05		
Культура	24	3,62	118	$10^6$
ОС+К до ферментации		5,08		
ОС+К после ферментации	40	3,60	118	5000
КК после опыта	47	4,18	84	3200
ОС+К контроль		3,60	120	320

Условные обозначения: ИМС – исходная молочная сыворотка; ОС – осветленная сыворотка; К – культура молочнокислых бактерий; КОЕ – количество колоний микроорганизмов в 1 мл раствора,  $^{\circ}\text{T}$  – градусы Тернера.

Таблица 2. Сбраживание в катодной камере при  $I = 0,2 \text{ A}$

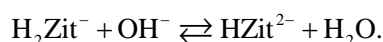
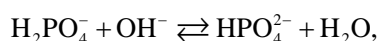
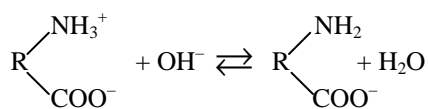
$T$ , мин	pH, катодная камера	$V_{\text{туп}}$ , катодная камера, $^{\circ}\text{T}$	pH, анодная камера	$V_{\text{туп}}$ , анодная камера, $^{\circ}\text{T}$
	3,60		7,7	
	3,62	118		
60	3,90	98	3,45	26
150	4,15	90	3,15	42
210	3,75	84	2,65	54
420	4,18	74	2,25	104

тов. Буферные свойства белков сыворотки объясняются наличием аминных и карбоксильных групп. Карбоксильные группы вступают в реакцию с образующейся молочной кислотой:



Кислотная диссоциация белков незначительна, поэтому активная кислотность остается почти прежней, а титруемая повышается.

При добавлении к сыворотке щелочи белки и соли реагируют следующим образом:



При добавлении кислоты или щелочи pH сыворотки изменится, если будет превышена бу-

ферная емкость. Следовательно, чем больше в сыворотке содержится буферных веществ, тем больше потребуется кислоты для изменения pH.

Результаты применения только термического осаждения белка представлены в табл. 2.

Буферность биологических жидкостей имеет большое значение для живого организма, это своего рода защита от возможного резкого изменения pH, влияющего неблагоприятно (или губительно). Буферные свойства составных частей молока и сыворотки играют большую роль и при изготовлении кисломолочных продуктов и сыра. Так, pH кефира при титруемой кислотности  $80^{\circ}\text{T}$  равен 4,76, что характерно для спиртового брожения. Аналогично в сыре при высокой титруемой кислотности pH составляет лишь 5,3–5,5, что объясняется буферными свойствами белков сырной массы.

При такой активной кислотности в продуктах и ферментируемых растворах возможно развитие

молочнокислых микроорганизмов, что и используется при сбраживании в катодной камере электролизера при малых токах. Лучший результат получен при предварительной ферментации сыворотки до pH 3,7 (рис. 6). Последние три пика на спектрограмме соответствуют содержанию уксусной, молочной кислот и этанола. Из данных спектроскопии видно, что культура *L. acidophilus* и дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* являются возбудителями гомоферментативного молочнокислого брожения, так как более 90% всех выделяемых органических кислот составляет молочная кислота.

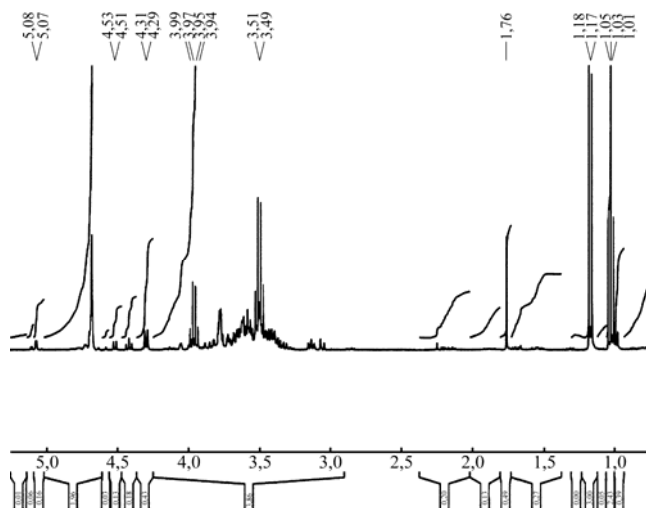


Рис. 6. Спектроскопия сыворотки из катодной камеры, сброженной до pH 3,7.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ферментация и последующая электрообработка с целью выделения молочной кислоты обусловлены высокой титруемой кислотностью раствора. Сдвиг pH среды в щелочную сторону сопровождается уменьшением биосинтеза лактатдегидрогеназы.

Применение предварительного термического осаждения белковых фракций сыворотки, без внесения дополнительных фосфатов, обеспечивает чистоту полученной молочной кислоты.

Основной объем молочной кислоты переходит в анодную камеру в первые 10–15 минут (в опытах с предварительной ферментацией), далее молочная кислота частично окисляется до уксусной, и для получения молочной кислоты в чистом виде необходим электролизер с дополнительной мембраной в прианодной зоне.

Данный способ получения молочной кислоты позволяет сократить продолжительность обработки ферментированной сыворотки без перегрева и выделить молочную кислоту в чистом виде, а не лактаты, получать L(+)-форму молочной кислоты при оптимальных режимах.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Свириденко Ю.Я., Волкова Т.А. Эффективный подход к переработке молочной сыворотки. *Молочная промышленность*. 2012, (7), 44–46.
2. Евелева В.В. Технологические инновации в производстве пищевой молочной кислоты. *Пищевая промышленность*. 2014, (4), 26–28.
3. Илушка И.В., Доценко С.П. Влияние основных факторов процесса культивирования на кислотообразующую способность продуцента молочной кислоты *Lactococcus lactis* CH5. *Научный журнал Кубанского государственного аграрного университета*. 2012, **82**(8), 1–10.
4. Патент РФ №2469548 С1 Легарт Еис Хеффнер (ДК). *Гомоферментированные продукты*. Опубликовано: 2010.08.27.
5. William A. Bubb. NMR Spectroscopy in the Study of Carbohydrates: Characterizing the Structural Complexity. *Concept Magn Reson A*. 2003, **19A**(1), 1–19.
6. Патент РФ № 2065703 С1 Болога М.К., Пыргару Ю.М., Наконечная Л.А. *Способ изоэлектрической коагуляции белков молочной сыворотки и электролизер для его осуществления*. Опубликовано: 1996.08.27.

Поступила 14.07.15

### Summary

The expediency of combining fermentation of whey and electrophoretic isolation of the formed lactic acid, which ensuring a high degree of lactose utilization, is substantiated. The scheme of the treated whey lactose fermentation by *L. acidophilus* thermo-resistant lactic acid bacteria and the yeast extract was worked out. Further production of lactic acid takes place in the diaphragm electrolyzer chamber. So, at a low current density, which allows maintaining the necessary temperature and duration of electrolysis, favorable conditions are created for the formation of lactic acid. The fermentative hydrolysis and electro-physical isolation of lactic acid are promising in solving the problems of utilization of lactose in an ecologically friendly way.

*Keywords: lactic acid, fermentation, electrolyzer.*