

ТЕХНОЛОГІЯ БРОДІННЯ, БІОТЕХНОЛОГІЯ

Л. Я. Паляниця, Н. І. Березовська

Національний університет "Львівська політехніка",
кафедра технології органічних продуктів
liubapal@ukr.netБІОКОНВЕРСІЯ МЕЛЯСИ ДО ЕТАНОЛУ
РЕАКТИВОВАНИМИ ДРІЖДЖАМИ<https://doi.org/10.23939/ctas2021.02.117>

Досліджено процес ферментації бурякової меляси до етилового спирту з використанням сухих спиртових дріжджів Deltaferm AL-18, реактивованих у суслі з різним вмістом сухих речовин. Показано, що бродильна активність цих дріжджів є вищою, ніж генеративна. Концентрація етилового спирту у бражці є максимальна за умови реактивації дріжджів у суслі (22 % СР). Густина дріжджів після бродіння пропорційно зменшується, якщо дріжджі реактивуються у суслі з вищою концентрацією.

Ключові слова: меляса, етанол, сусло, дріжджі, бродіння, реактивація, дріжджо-генерування, біомаса.

Вступ

Біоетанол отримують із відновлюваної сільськогосподарської продукції, основним компонентом якої є цукри або крохмаль [1–4]. Ця сировина має певні переваги за рахунок її постійного постачання, енергетичної та екологічної безпеки та цільового використання земельних ресурсів, що також сприяє економічному розвитку сільського господарства. Водночас важливою проблемою є раціональне використання відходів перероблення рослинної сировини.

Зусилля вчених скеровані на розроблення та удосконалення біотехнології етилового спирту через комплексне використання напівпродуктів, зокрема дифузійного соку, відтоків після кристалізації, і відходів виробництва цукру (меляси) та інших цукромісних продуктів [5–8], поєднання виробництва цукру з технологією біоетанолу [8], підбір ефективних сортів сорго для його ферментації [9–10].

До основних завдань, рішення яких впливають на собівартість біоетанолу, належать:

– ефективне використання усіх компонентів сировини як для нагромадження посівної культури, так і для біоконверсії їх до основного продукту;

– зниження енергетичних витрат за рахунок підвищення концентрації за вмістом сухих речовин зброджуваних субстратів;

– вибір відповідного до умов технології штаму дріжджів, за критеріями його толерантності до високих концентрацій сусла (осмофільності) і до етанолу, а також здатність використовувати джерела карбону, що містяться у сировині.

Неповне використання компонентів сировини може бути усунуте рециркуляцією дріжджів, що також, за результатами досліджень, може певною мірою забезпечити скорочення тривалості процесу [11–12].

Багато робіт присвячено вивченню ферментації за умов підвищеної концентрації сухих речовин у зброджуваному суслі, що потребує селекції та вибору осмотолерантних штамів дріжджів, оскільки осмотичний стрес знижує ефективність ферментації субстрату дріжджами *Saccharomyces cerevisiae* [13–15], та використання іммобілізованих дріжджових клітин на стадії бродіння [16].

Відомо, що тривалість процесу на стадії зброджування цукромісних субстратів можна скоротити, підвищуючи температуру бродіння.

Вибір активних термотолерантних дріжджів, стійких до нагромадженню етилового спирту, забезпечує, крім скорочення тривалості процесу, також й зростання виходу основного продукту [16].

Варто зазначити, що під час спиртового бродіння відбуваються два взаємопов'язані процеси: дріжджогенерування в аеробних умовах і надалі бродіння в анаеробних. Компоненти субстрату, зокрема цукри, витрачаються на ріст і розмноження дріжджів та їхній метаболізм. Це зумовлює зниження виходу етанолу, за рахунок зменшення концентрації вуглеводів на стадії бродіння. Тому важливим завданням у технології біоетанолу є забезпечення фізіологічного стану посівних дріжджів, здатних метаболізувати цукри до цільового продукту, підвищуючи його концентрацію у бражці та вихід з одиниці сировини.

У літературі є чимало інформації щодо використання сухих дріжджів у технологіях продуктів бродіння і виноробства [18–19] та умов їх реактивації [20]. Також зазначають їхні переваги: скорочення тривалості вирощування, зменшення витрат на технологічне обладнання та енергоресурси, висока осмо- і спиротолерантність за рахунок вищого вмісту ненасичених жирних кислот і трегалози, а також належна мікробіологічна чистота [19]. Позитивним у застосуванні сухих дріжджів є чітка кореляція між біомасою та кількістю клітин, внесених у сусло, що забезпечує чіткість контролю динаміки їх нагромадження.

Проте результати дослідження їх продуктивності за етанолом часто є суперечливими [21–22].

Мета роботи

Дослідження біоконверсії м'яса до етанолу за участю сухих дріжджів «Deltaferm AL-18» роду *Saccharomyces* (*S. cerevisiae*), реактивованих у суслі з різною концентрацією сухих речовин.

Матеріали та методи досліджень

У дослідженнях використовували м'ясо з такими показниками: вміст сухих речовин (СР) – 79 %, доброякісність – 60,8 %, рН 6,9–7,0. Для її підіслення до рН = 5,1 використовували сульфатну кислоту. Нітрогенвмісне ((NH₂)₂CO) та фос-

форвмісне (H₃PO₄) живлення додавали до м'яса у вигляді речовин з вмістом цих речовин 20 %.

Процеси генерування і бродіння м'ясного сусла (22–23 % СР) здійснювали з використанням дріжджів *Saccharomyces cerevisiae* (сухі препарати Deltaferm AL-18, (Німеччина)).

Фізіологічний стан спиртових дріжджів після їх регідратації визначали за вмістом клітин із бруньками (генеративна активність) та клітин, забарвлених метиленовим синім (наявність живих і мертвих клітин), що свідчило про їх життєздатність.

У м'ясному суслі та зброджених субстратах визначали активну кислотність (рН) за допомогою рН метра, видимий вміст сухих речовин – рефрактометрично, вміст етилового спирту в дистилатах – пікнометричним методом, густину дріжджової суспензії – центрифугуванням.

Результати досліджень та їх обговорення

Спочатку сухі дріжджі Deltaferm AL-18 витримували у воді (20–30 хв) для відновлення вологи (регідратація), втраченої під час сушіння, а надалі додавали м'ясу та поживні солі (карбамід та ортофосфатну кислоту), забезпечуючи різний вміст сухих речовин у суслі: 14, 18, 22 і 26 % СР. Умови та варіанти експериментів представлено у таблиці.

Умови експериментів

	Концентрація м'ясного сусла, % СР			
	14	18	22	26
Варіанти	В-1	В-2	В-3	В-4

Реактивація таким способом забезпечує рівномірне надходження води у клітину, однорідність поверхні клітинної стінки та ефективний обмін дріжджів з навколишнім середовищем.

Фізіологічний стан дріжджових клітин після реактивації у м'ясному суслі з різним вмістом сухих речовин оцінювали за кількістю клітин, що активно брунькуються (рис. 1).

Як видно на рис. 1, максимальна кількість дріжджових клітин, що брунькуються, спостерігалася на восьму годину їх культивування. Серед чотирьох варіантів найактивнішими були дріжджі, реактивовані у м'ясному суслі з

вмістом сухих речовин 22 % (В-3), а найменше у варіанті 4, де вміст сухих речовин становив 26 %.

Кількість життєздатних клітин була не меншою ніж 98 %.

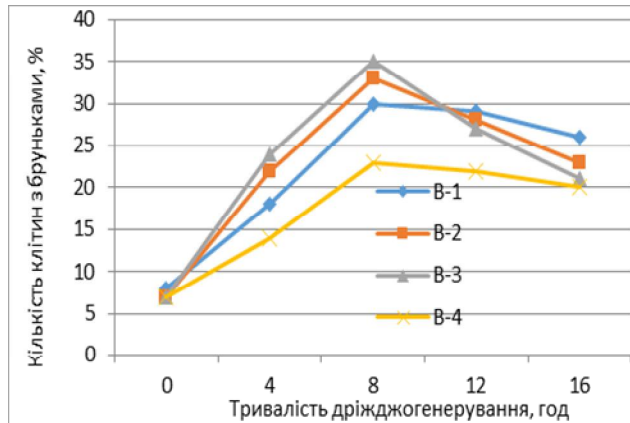


Рис. 1. Залежність кількості дріжджових клітин, що брунькуються, від концентрації м'ясного суслу, в якому реактивували сухі дріжджі

Генеративну активність реактивованих дріжджів досліджували у м'ясному суслі з вмістом сухих речовин 22 %, куди також було внесено відповідне живлення (карбамід і ортофосфатна кислота). Результати визначеної питомої швидкості росту представлено на рис. 2. Збільшення концентрації суслу до 26 % за сухими речовинами для реактивації дріжджів гальмує їх розмноження, проте після 10-ї години культивування питомі швидкості росту стають майже однаковими. Ймовірно, що для нагромадження біомаси реактивацію доцільно проводити за нижчих концентрацій суслу, або ж збільшувати тривалість цього процесу.

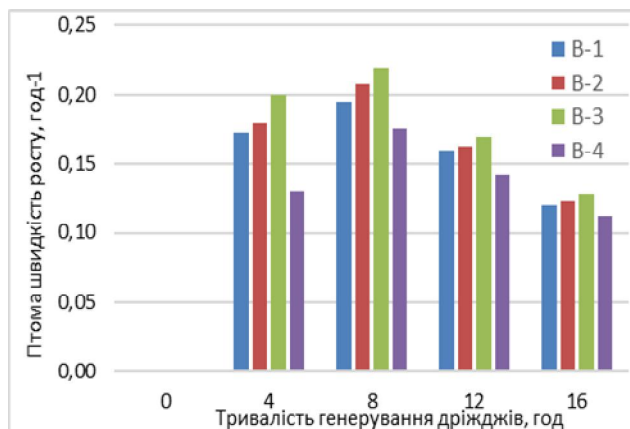


Рис. 2. Залежність питомої швидкості росту дріжджів від умов їх реактивації у м'ясному суслі

Бродильну активність реактивованих дріжджів вивчали за масою виділено CO_2 під час зброджування м'ясного суслу (23 %). Динаміка процесу показана на рис. 3. Варто зауважити, що порівняно з динамікою росту дріжджів у четвертому варіанті спостеріалася менша різниця з третім варіантом. Найменшою бродильною активністю володіли дріжджі, що були реактивовані у суслі з мінімальною концентрацією.

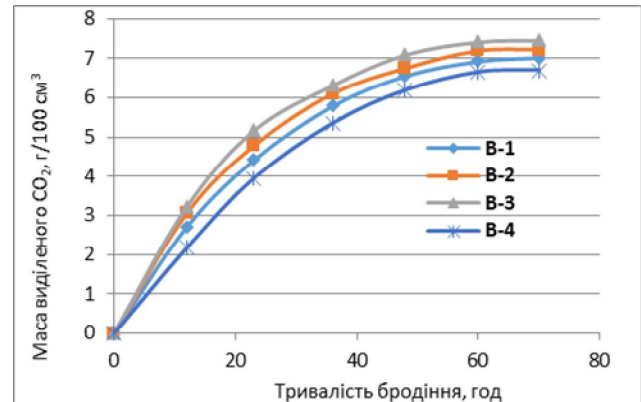


Рис. 3. Залежність динаміки накопичення CO_2 від умов реактивації дріжджів у м'ясному суслі

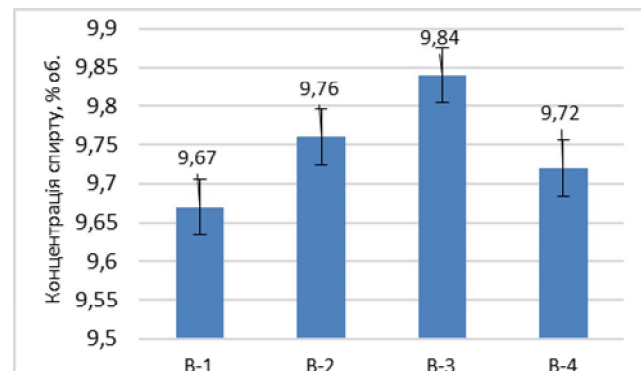


Рис. 4. Залежність концентрації етанолу від умов реактивації сухих дріжджів

Дослідження динаміки утворення етанолу під час бродіння м'ясного суслу показали, що за однакових умов (34 °С, тривалість 72 год) вміст спирту у бражному дистилаті складає у третьому варіанті 9,84 % об., в четвертому – 9,72% об., а в першому – 9,67 % об. Розрахований вміст спирту був досягнутий у трьох із чотирьох варіантів. Це свідчить про більшу активність спиртових дріжджів, реактивованих у суслі з вищими концентраціями. Проте у дослідженнях [22] зазначається про нижчу активність сухих дріжджів Deltaferm AL-18 порівняно зі штамом K-7,

оскільки вони не досягали розрахункової концентрації етанолу у бражі. Тому запропоновані у цій роботі умови реактивації сухих спиртових дріжджів дають змогу забезпечувати нормативний вихід етанолу з меляси.

Зброджування мелясного суслу дріжджами, реактивованими у субстратах з різним вмістом сухих речовин, показало істотну різницю між їх генеративною та бродильною активністю.

Виділені шляхом центрифугування дріжджі по завершенні бродіння мали різну густину (рис. 5).

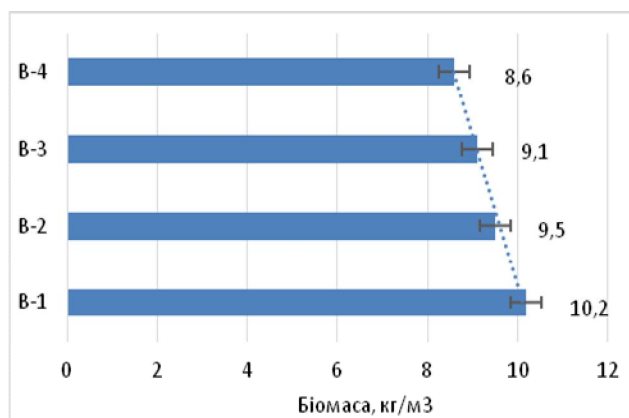


Рис. 5. Залежність густини дріжджової суспензії від умов реактивації сухих дріжджів

Максимальна величина ($10,2 \text{ кг/м}^3$) дріжджової густини була у першому варіанті і мінімальна – у четвертому ($8,6 \text{ кг/м}^3$). Варто зазначити, що спостеріали пряму залежність зменшення маси дріжджів, виділених після зброджування мелясного суслу, починаючи з першого варіанта до четвертого. Таким чином, дріжджі Deltaferm AL-18 володіють кращою бродильною активністю, якщо їх реактивувати у суслі з вмістом сухих речовин 18–22 %.

Одержані результати досліджень свідчать про перспективність використання регідратації та реактивації сухих дріжджів у процесах біоконверсії цукровмісної сировини до етанолу.

Висновки

Досліджено біоконверсію меляси до етанолу з використанням сухих спиртових дріжджів Deltaferm AL-18, реактивованих у суслі з різною концентрацією сухих речовин (14, 18, 22 і 26 % СР), що забезпечують нормативний вихід спирту.

Показано, що генеративна активність реактивованих у суслі (з вмістом сухих речовин 18–22 %) дріжджів є найвищою та меншою у суслі 14 і 26 % СР. Максимальна питома швидкість росту дріжджів досягається на 8–10 годинах культивування.

Досліджено бродильну активність дріжджів Deltaferm AL-18. Показано, що концентрація етанолу у бражі є максимальною за умови реактивації дріжджів у суслі (22 %). Густина дріжджової суспензії після бродіння зменшується на 15 %, якщо дріжджі активувати у суслі з вищою концентрацією сухих речовин.

References

1. Khareba V. V. (2012) *Naukovi aspekty vyrobnytstva bioetanolu v Ukraini. Mizhnarodna konferentsiia tsukrovkyv Ukrainy «Alternatyvni vydy palyva v tsukroburiakovomu vyrobnytstvi*. S. 179–184.
2. Dias M. O. S., Modesto M., Ensinas A. V., Nebra S. A., Filho R. M., Rossell. C. E. V. (2011) Bioethanol production from sugarcane: evaluation of distillation, thermal integration and cogeneration *Energy*. Vol. 36, issue 6. P. 3691–3703.
3. Dudka T. V. (2021) Docilnistj otrymannja bioetanolu iz zerna kukurudzy. *Sortovyvchennja ta okhorona prav na sorty roslin*. № 1. S. 44–47.
4. Kalensjka S. M., Bachynskij O. V., Kachura Ye. V., Myronecj V. M. (2009) Perspektivy jachmenju jarogho jak syrovyny dlja vyrobnytstva biopalyva. *Naukovyj visnyk Nacionalnogho universytetu bioresursiv i pryrodokorystuvannja Ukrainy*. № 141. S. 129–132.
5. Doronin A. V. (2013) Konkurentni perevaghy bioetanolu z produkciji cukroburiakovogho vyrobnytstva. *Visnyk cukrovkyv Ukrainy*. № 8 (87). S. 18–20.
6. Hossain M. Zabeed, Golam Faruq, Jaya Narayan, Sahu and all (2014) Bioethanol Production from Fermentable Sugar Juice March. *The Scientific World Journal* 2014:957102 doi: 10.1155/2014/957102.
7. Arijana Bušić, Nenad Marđetko, Semjon Kundos, Galina Morzak, Halina Belskaya, Mirela Ivančić Šantek, Draženka Komes, Srđan Novak, and Božidar Šantek Bioethanol Production from Renewable Raw Materials and Its Separation and Purification: A Review / *Food Technol Biotechnol*. 2018 Sep; 56(3): 289–311. doi: 10.17113/ftb.56.03.18.5546
8. Kovalj O. O., Olijnichuk S. T., Khomichak L. M., Batogh Yu. O., Lysak T. I. (2014) Zbrodzhuvannja cukrovmisnykh produktiv cukrovogho vyrobnytstva v bioetanol. *Cukor Ukrainy*. № 2. S. 17–20. Rezhim dostupu: http://nbuv.gov.ua/UJRN/Cu_2014_2_5.

9. Kurylo V. L., Gerasymenko L. A. (2012) Produktivnistj sorgho cukrovogho dlja vyrobnytstva biopalyva zalezno vid strokiv sivby ta ghlybyny zghortannja nasinnja. *Cukrovi burjaky*. 2012. № 1. S. 14–15.
10. Guigou M., Lareo C., Perez L. V., Luberas M. E. (2011). Bioethanol production from sweet sorghum : Evaluation of post-harvest treatments on sugar extraction and fermentation. *Biomass Bioenerg*, 35, 3058–3062. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2011.04.028>.
11. Levandovsky L. V., Tkachenko L. V., Vitryak O. P. (2015) Efficiency of recycling of yeast in alcoholic fermentation. Food chemistry and technology, *Kaunas*. T. 49. №2. P. 13–21.
12. Levandovsky L., Vitriak O., Demichkovska M. (2019) Biotechnology of alcohol fermentation with yeast recirculation. *Food science and technology*. 13(3):4-9. DOI: <http://dx.doi.org/10.15673/fst.v13i3.1450/>.
13. Djelal H., Amrane A., Larher F. Martin, G. (2005). Effect of medium osmolarity on the bioproduction of glycerol and ethanol by *Hansenula anomala* growing on glucose and ammonium. *Appl. Microbiol Biotechnol*, 69, 341–349. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-1987-1>.
14. Sofien Chniti, Monia Jemni, Imène Bentaha, Mohammad Ali Shariati, (2017) Kinetic of sugar consumption and ethanol production on very high gravity fermentation from syrup of dates by products (*Phoenix dactylifera* L.) by using *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida pelliculosa* AND *Zygosaccharomyces rouxii*. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/320161209>. doi: 10.15414/jmbfs.2017.7.2.199-203
15. Sychevskiy M. P., Oliinichuk S. T., Danilova K. O. (2016) Biosintez etylovoho spyrtu riznymy rasamy drizhdzhiv v umovakh pidvyshchenoi kontsentratsii susla / *Naukovi dopovidi Natsionalnoho universytetu bioresursiv i pryrodokorystuvannia Ukrainy*. № 5. – Rezhym dostupu: http://nbuv.gov.ua/UJRN/Nd_2016_5_10.
16. Vučurović V. M., Razmovski R. N. (2012) Ethanol fermentation of molasses by *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilized onto sugar beet pulp. *Acta Periodica Technologica*. No. 43. P. 325–333. doi: [org/10.2298/APT1243325V](https://doi.org/10.2298/APT1243325V).
17. M. Fadel, I. Abeer A. Keera, I. Foukia E. Mouafi, and Tarek Kahil High Level. (2013) Ethanol from Sugar Cane Molasses by a New Thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* Strain in Industrial Scale *Biotechnology Research International* Volume 2013, Article ID 253286, 6 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2013/253286>.
18. Martynenko N. N. (2007) Reshenie problem reaktivatsii sukhikh spirtovykh drozhzhei. *Proizvodstvo spirta i likerovodochnykh izdelii*. № 2. S. 10–19.
19. Schmidt S. A., Henschke P. A. (2015) Production, reactivation and nutrient requirements of active dried yeast in winemaking: *Theory and practice* 12 November 2015/. <https://DOI.org/10.1111/ajgw.12189/> <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1111/ajgw.12189>.
20. Paljanycja L.Ja., Berezovska N. I., Kosiv R. B., Zub N. O. (2018) Vplyv umov rehidrataciji sukhikh drizhdzhiv na jikh aktyvnistj. *Khimija, tekhnologhija rechovyn ta jikh zastosuvannja*. Vol. 1, No 1. P. 88–94. <https://DOI.org/10.23939/ctas2018.01.088>.
21. Rimareva L. V. (2003) Tekhnolohicheskie aspekty ispolzovaniia sukhikh drozhzhei v proizvodstve spirta. *Proizvodstvo spirta i likerovodochnykh izdelii*. №1. S. 15–16.
22. Koval O., Oliynichuk S., Lysak T. (2021). Porivnialne doslidzhennia dvokh komertsiiynykh shtamiv *Saccharomyces cerevisiae* dlja vyrobnytstva etanolu z vazhkozbrodzhuvanoi tsukrovymisnoi syrovyny. *Food Science and Technology*, 15(1). Retrieved iz [//journals.onaft.edu.ua/index.php/foodtech/article/view/1960](http://journals.onaft.edu.ua/index.php/foodtech/article/view/1960).

L. Ya. Palianytsia, N. I. Berezovska
Lviv Polytechnic National University,
Department of Organic Products Technology

BIOCONVERSION OF MOLESSES TO ETHANOL BY REACTIVE YEAST

The process of fermentation of beet molasses to ethanol using dry alcohol yeast Deltaferm AL-18, reactivated in wort with different dry matter content was studied. It is shown that the fermentative activity of these yeasts is higher than the generative one. The concentration of ethanol in the brew is maximum under the condition of reactivation of yeast in the wort (22 % CF). The density of yeast after fermentation decreases proportionally if the yeast is activated in the wort with a higher concentration.

Key words: molasses, ethanol, wort, yeast, fermentation, reactivation, yeast generation, biomass.