

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ РОСТА И ОБРАЗОВАНИЯ ОБЛЕПИХОВОГО ПИЩЕВОГО УКСУСА БАКТЕРИЯМИ АСЕТОВАСТЕР АСЕТИ

А.А.Ламберова, Ю.А.Кошелев, М.Э.Ламберова

В настоящее время является актуальным переход от синтетического уксуса к биохимическому, разработка новых эффективных технологий получения легко усвояемых, ароматных элитных сортов уксуса с дополнительным комплексом биологически активных веществ. Особую роль в этом играет использование плодово-ягодных соков, в том числе, уникального сока облепихи, и полуфабрикатов спиртового брожения на основе зернового сырья.

*Необходимо отработать технологические стадии и режимы получения уксуса на основе облепихи и полуфабрикатов спиртового брожения с использованием уксуснокислых бактерий *Acetobacter aceti*.*

Введение

В современной химической промышленности на основе уксусной кислоты получают важнейшие и наиболее ценные растворители, ацетатный шелк, высококачественные ацетатные лаки и пластические массы, невоспламеняющуюся фото- и киноплёнку, небьющееся стекло и многие другие продукты промышленности органического синтеза. Большие объёмы уксусной кислоты в настоящее время производят синтетическим путем из различного газового сырья: ацетилена, метана, этана, смеси окиси углерода с водородом; а также как побочный продукт в производстве жидкого топлива, жирозаменителей и др. Кроме того, ее производят лесохимическим путем.

Биохимическая уксусная кислота применяется для пищевых целей, и потребность в уксусе, полученном микробиологическим путем, растет. Биохимический уксус - продукт жизнедеятельности уксуснокислых бактерий. В зависимости от среды, на которой культивируются уксуснокислые бактерии, различают спиртовой, яблочный и винный уксусы. Добавляя к готовому уксусу настои ароматсодержащего сырья, получают ароматизированный уксус столовый, уксус для маринадов, «Пряный» и «Юбилейный». Ароматизированный уксус производят, используя в качестве ароматсодержащего сырья гвоздику, корицу, лавровый лист, перец и лимонное масло. Различное соотношение настоев этого сырья дает разные сорта уксуса [1].

Спиртовой уксус готовят на основе смеси воды и этанола с добавлением в среду солей фосфора, азота, калия и биологических стимуляторов (вытяжки солодовых ростков, дрожжевой вытяжки и т.д.); натуральный яблочный уксус — на основе сброженного

яблочного сока. Органолептические показатели и питательная ценность яблочного уксуса намного выше, чем спиртового, однако производство его требует дополнительных затрат. Самый древний вид уксуса - винный, он обладает наилучшими вкусовыми качествами. Его выпускают на основе сухих виноградных вин [2].

Среди выпускаемых видов уксуса в настоящее время нет облепихового уксуса, технологии его получения и нормативной документации.

Промышленное производство натурального спиртового уксуса осуществляется с использованием уксуснокислых бактерий рода *Acetobacter*, где сырьем для окисления служит ректификованный этиловый спирт. Бактерии закрепляются на стружках, размножаются и окисляют спирт, поступающий в аппарат в составе питательной среды (таблица 1).

Таблица 1
Состав питательной среды для культивирования *Acetobacter aceti* и образования уксусной кислоты

Компоненты	Количество
этиловый спирт, %	9,3±0,2
уксусная кислота, %	0,7±0,2
(NH ₄) ₂ HPO ₄ , г/л спирта	1,0
KH ₂ PO ₄ , г/л спирта	1,0
MgSO ₄ , г/л спирта	0,5

Кроме спирта среда содержит уксусную кислоту и минеральные соли азота, фосфора, серы, магния, калия. Другие элементы, необходимые бактериям, имеются в достаточном для них количестве в водопроводной воде. Иногда в питательную среду добавляют пивное сусло как источник витаминов. Уксусная кислота служит источником углерода и энергии для бактерий, исполь-

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ РОСТА И ОБРАЗОВАНИЯ ОБЛЕПИХОВОГО ПИЩЕВОГО УКСУСА БАКТЕРИЯМИ АСЕТОБАКТЕР АСЕТИ

зубаемых в производстве уксуса. Поэтому в процессе роста культуры происходит потребление уксусной кислоты и частичное ее окисление в цикле трикарбоновых кислот. Количество потребляемой уксусной кислоты зависит от скорости роста бактерий. В производстве уксуса окисление уксусной кислоты называют «переокислением». При высокой концентрации спирта и уксусной кислоты в питательной среде размножение бактерий ограничивается и «переокисление» имеет минимальное значение [4].

Одной из главных проблем является возрастающая стоимость этилового спирта. Чтобы выпускаемый натуральный спиртовой уксус был конкурентоспособным, необходимо снизить его себестоимость, например, за счет использования более дешевого сырья - головной фракции (ГФ) этилового спирта.

С этой целью в данной работе отрабатывались концентрации и режимы добавления облепихового сока и головной фракции вместо ректификованного этилового спирта, их соотношение с исходной уксусной кислотой в питательной среде для культивирования уксуснокислых бактерий *Acetobacter aceti* в условиях интенсивной аэрации.

Сначала осуществляли выбор оптимальных параметров процесса окисления спирто-содержащего сырья.

Синтез уксусной кислоты бактериями сопряжен с ростом биомассы. Создавая определенные режимы ведения процесса можно сдвинуть метаболизм бактерий в сторону преимущественного синтеза кислоты или наращивания биомассы.

Основным регулирующим фактором этого процесса является концентрация уксусной кислоты в культуральной жидкости, особенно в начале цикла, так называемая стартовая концентрация.

Применение режимов с неоптимальными стартовыми концентрациями кислоты, не ограничивающими размножение культуры или чрезмерно его тормозящие в начале цикла, приводит к нерациональному расходу головных фракций, снижению производительности и выхода. Следовательно, выбор оптимальной стартовой концентрации кислоты, при которой умеренно ингибируется рост бактерий и их метаболизм направляется в сторону активного синтеза продукта, является важным моментом в технологии ведения процесса.

Значение стартовой концентрации кислоты определена экспериментально. По кривой

роста культуры этой концентрации кислоты соответствует фаза замедления роста.

Для построения кривой прироста кислоты проводили измерение концентрации кислоты в культуральной жидкости в течение всего цикла окисления через каждые 4 часа. По полученным значениям строили кривую прироста уксусной кислоты (рисунок 1), находили отрезок кривой, где скорость прироста кислоты в единицу времени постоянна и имеет максимальное значение, проводили к этому отрезку касательную и отмечали точки отклонения кривой прироста от касательной.

Отрезок между этими точками соответствует фазе замедления роста с умеренной степенью ингибирования уксусной кислотой, а перегиб кривой в верхней точке - более сильному ингибированию. Из верхней точки провели перпендикуляр на ось ординат ($P\%$) и находили стартовую концентрацию кислоты для полунепрерывного способа подачи питательной среды.

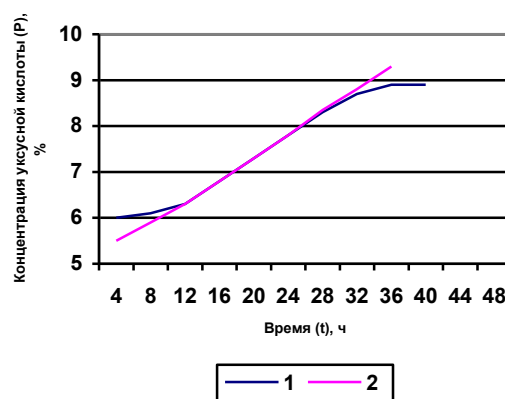


Рис. 1. Графическое определение оптимальной стартовой концентрации уксусной кислоты:

1 – график накопления уксусной кислоты, P (%);

2 – касательная, проведенная к кривой 1 на участке максимального накопления уксусной кислоты;

P_c - стартовая концентрация кислоты для единовременной подачи питательной среды, $P_c=7,0\%$;

P_c' - стартовая концентрация кислоты для полунепрерывной подачи питательной среды $P_c'=8,0\%$

Значение стартовой концентрации кислоты является величиной непостоянной. В силу адаптивных процессов и автоселекции значение стартовой концентрации кислоты с течением времени изменяется.

В производстве это проявляется в удлинении циклов, снижении производительности и выхода. В этом случае адаптация культуры к ранее установленной стартовой концентрации кислоты при неизменных других параметрах приводила к излишнему росту биомассы в начале цикла и, следовательно, повышенному расходу спирто-содержащего сырья.

Новому физиологическому состоянию культуры будет соответствовать новая стартовая концентрация кислоты, которую определяют по кривой прироста кислоты, построенной при действующих условиях культивирования.

Стартовая концентрация спирта зависит от установленной стартовой концентрации кислоты и суммарной концентрации. Она определяется по графику (рисунок 2).

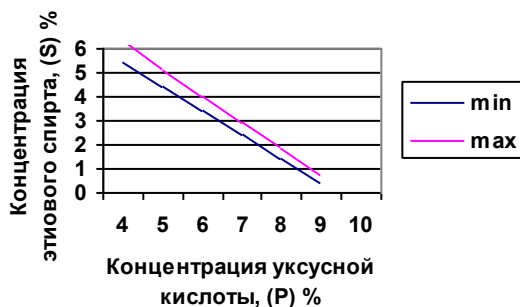


Рис. 2. Зависимость концентрации спирта в культуральной жидкости от содержания в ней уксусной кислоты

Суммарной концентрацией называется сумма концентраций кислоты и спирта в культуральной жидкости, она определяется в зависимости от желаемой концентрации кислоты в готовом уксусе с учетом потерь на остаточный спирт и размножение уксуснокислых бактерий.

Схема подготовки продуцента к работе от чистой культуры предусматривает размножение бактерий с целью накопления биомассы и постепенную адаптацию бактерий к условиям работы в производственных окислителях.

Исходную чистую культуру бактерий хранили в пробирках на агаризованной питательной среде или дистиллированной воде при температуре 5 °С по способу, разработанному ВНИИПБТ.

Подготовку продуцента к работе проводили по следующей схеме:

- 10 пробирок с культурой;

- 1-2 л среды с концентрацией кислоты 2%, ГФ 0,5 % (среда № 1) засев 10 % от объема среды после удвоения биомассы;

- 5-10 л среда с концентрацией кислоты 3%, ГФ 0,5% (среда № 2) засев 10% от объема среды после утроения биомассы;

- инокулятор чистой культуры со средой для лаг-фазы засев 10 % от объема среды;

- рабочий окислитель засев 10% от объема среды.

Минеральный состав питательной среды приведен выше (таблица 1).

Для ускорения размножения бактерий используют органические добавки, являющиеся источниками витаминов и аминокислот. В нашей работе это был пастеризованный свежий первичный облепиховый сок — 1 % к объему среды (таблица 2) [3].

Таблица 2

Показатели облепихового сока	
Показатель	Величина
Физико-химические:	
Массовая доля СВ, %, не менее	8,00÷9,00
Титруемая кислотность в пересчете на яблочную кислоту, %	1,50÷2,50
Массовая доля аскорбиновой кислоты, %, не менее	0,03
Массовая доля сорбиновой кислоты, %, не более	0,06
Активная кислотность, pH, не более	4,40
Массовая доля спирта, %, не более	0,30÷0,50
Массовая доля осадка, %, не более	
в осветлённых соках	0,10÷0,20
в неосветлённых соках	0,40÷0,90
Содержание свободных аминокислот, в мг на 100 г сока:	
Лизин	0,46÷1,46
Гистидин	1,00÷4,41
Аргинин	0,88÷2,98
Аспарагиновая кислота	9,92÷40,22
Треонин + серин + глутамин + аспарагин	42,84÷53,57
Глутаминовая кислота	3,19÷5,83
Глицин	0,84÷2,48
Аланин	7,18÷20,32
Цистеин	0,81÷2,40
Валин	2,38÷6,40
Метионин	0,39÷0,95
Изолейцин	1,30÷3,07
Лейцин	1,04÷2,19
Тирозин	1,33÷3,59
Фенилаланин	6,56÷31,88
Лизин	0,46÷1,46

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА ЭФФЕКТИВНОСТЬ РОСТА И ОБРАЗОВАНИЯ ОБЛЕПИХОВОГО ПИЩЕВОГО УКСУСА БАКТЕРИЯМИ АСЕТОВАСТЕР АСЕТИ

Питательную среду стерилизовали в течение 30 минут при 0,5 атм или пастеризовали в течение 40 минут при 80 °С. Этанол и уксусную кислоту в соответствующих количествах вносили после стерилизации в охлажденную среду.

Культуру из пробирок переносили стерильно в среду, содержащую 2 % кислоты и 1 % ГФ. Выращивание проводили при температуре (28-30) °С при интенсивной аэрации. Через 2-3 суток, после удвоения биомассы, то есть при развитии пленки на поверхности, культуральную жидкость разводили в 5 раз свежей питательной средой с 3 % кислоты и (0,5 – 1,0) % ГФ.

Выращивание посевного материала осуществляли на среде для лаг - фазы, содержащей уксусной кислоты (4,0±0,2) % и ГФ (1,0 ± 0,2) %. Минеральное и органическое питание в среду вносится средой № 1.

В конце лаг-фазы наблюдалось повышение температуры, незначительный прирост кислоты и снижение суммарной концентрации кислоты и спирта, последнее указывало на начавшееся размножение бактерий. После непродолжительной лаг-фазы культура перешла в стадию экспоненциального роста, характеризующуюся бурным размножением бактерий и одновременным интенсивным накоплением в среде уксусной кислоты.

Для сдвига процесса в сторону образования уксусной кислоты и уменьшения роста биомассы в этот период вносили в культуральную жидкость (3,0 - 3,5) % ГФ средой № 1. Затем по мере роста кислоты среда №1 подавалась со скоростью, поддерживающей концентрацию спирта в зависимости от концентрации кислоты, согласно графику (рисунок.2).

В случае, когда процесс окисления проходил с большими потерями суммарной концентрации и в конце цикла получался уксус с низкой концентрацией кислоты (7,0 - 8,0) %, что свидетельствовало о недостаточном ингибировании роста бактерий. Проводили повторный цикл при более высокой суммарной концентрации кислоты и ГФ.

Если процесс окисления проходил нормально и в конце цикла получался уксус 9 %-ной концентрации или выше, то производитель считался активным и способным вырабатывать уксус 9% - ной концентрации. Такой производитель задавали на стадию активного окисления спирта до кислоты. Для получения такого производителя проводили второй цикл следующим образом: часть полученного 9 % - ного уксуса сливали в сосуд, куда подавали среду № 2. Количество, подаваемой среды, должно быть таким, чтобы в культуральной жидкости снизить концентрацию кислоты до (6,0 ± 0,2) % и повысить концентрацию спирта до (3,0 - 3,5) %. Процесс окисления проводили до увеличения концентрации кислоты в культуральной жидкости до (7,0 - 7,5) %. Полученный активный производитель подавали на стадию окисления. Объем подаваемого туда же производителя составлял (10 - 20) % от общего объема жидкости.

Таким образом, изменяя состав питательной среды и режимы ввода этилового спирта и уксусной кислоты для уксуснокислых бактерий *Acetobacter aceti* получали либо прирост биомассы, либо образование уксусной кислоты требуемой концентрации. Ректификованный этиловый спирт удалось заменить на более дешевую головную фракцию этилового спирта из зернового сырья. Особые органолептические свойства пищевого уксуса, его биологическую активность определял добавляемый в питательную среду свежий облепиховый сок.

ЛИТЕРАТУРА

1. Фараджеева Е.Д., Федоров В.А. Общая технология бродильных производств. – М.: Колос, 2002. – 408 с.
2. Егоров Н.С. Промышленная микробиология. – М.: Высш.шк., 1989 - 688с.
3. Кошелев Ю.А., Агеева Л.Д. Облепиха: Монография.- Бийск: НИЦ БПГУ им. В.М.Шукшина, 2004. – 320 с.
4. Технологическая инструкция по производству пищевого натурального уксуса на основе использования головной фракции этилового спирта: утв. ВНИИ пищевой биотехнологии 03.92. – М., 1995. – 42 с.