

Mgr inż. Adam Świergolski  
Nauczyciel dyplomowany  
Zespół Szkół im. Ireny Kosmowskiej  
w Suszu

Referat  
z technologii fermentacji

**Fermentacja mlekowa w produkcji twarogu i jej wpływ na przebieg procesu produkcyjnego oraz parametry fizykochemiczne i organoleptyczne produktu gotowego**

- Porównanie klasyfikacji procesów fermentacyjnych wg Gadena i Deindoerfera
- Modele wzrostu mikroorganizmów
- Porównanie różnych technologii produkcji kwasu octowego
- Różnice w produkcji alkoholu etylowego i glicerolu
- Produkcja butanolu i acetonu

Twaróg jest to silnie odwodniony skrzep z mleka pełnego, z mleka częściowo odtłuszczonego lub w pełni odtłuszczonego, koagulowanego metodą kwasową bez/lub z niewielkim dodatkiem podpuszczki. Koagulacja mleka zachodzi pod wpływem bakterii mlekowych, które wytwarzając kwas mlekowy doprowadzają białka mleka, głównie kazeinę, do punktu izoelektrycznego. Bakterie mlekowe stosowane w produkcji twarogu to mezofilne, a czasem termofilne, homo- i heterofermentacyjne ziarniaki i niekiedy pałeczki. W tej grupie produktów wyróżniamy: twarogi tradycyjne i

twarożki o różnej zawartości tłuszczu, homogenizowane oraz ziarniste typu „cottage cheese”.

Twarogi i twarożki otrzymuje się wyłącznie w wyniku ukwaszania mleka, natomiast twarożki homogenizowane i ziarniste na skutek koagulacji mleka metodą kwasowo-podpuszczkową (twarożki ziarniste można również produkować metodą kwasową).

W produkcji twarogów tradycyjnych stosujemy następujące gatunki drobnoustrojów: *Lactococcus lactis subsp. lactis*, *Lactococcus lactis subsp. cremoris*, *Lactococcus lactis subsp. diacetylactis*, natomiast w produkcji twarożku ziarnistego stosujemy tylko dwa pierwsze z wymienionych gatunków. Wynika to z faktu, że *Lactococcus lactis subsp. diacetylactis* ma silne właściwości aromatyzujące i gazotwórcze, stąd skrzep uzyskany przy jego udziale zawiera dużo gazu i utrzymuje się na powierzchni. Ponieważ ten gatunek bakterii rozwija się bardzo wolno, dlatego też proces produkcji twarogu jest bardzo długi i trwa kilkanaście godzin. Stwarza to niebezpieczeństwo ataku bakteriofagów. Proces ten można skrócić podnosząc temperaturę inkubacji mleka z 25°C do 35°C, jednak mogą nastąpić trudności w obróbce skrzepu (zbyt małe nasycenie skrzepu gazem), a aromat twarogu będzie nieodpowiedni (zbyt mały udział *Lactococcus lactis subsp. diacetylactis*).

Sery twarogowe stanowią bardzo zróżnicowaną grupę produktów, przeznaczonych w zdecydowanej większości do bezpośredniego spożycia, choć niektóre poddaje się uprzedniemu dojrzewaniu lub suszeniu, przedłużającemu ich trwałość. Inne służą do celów piekarsko-cukierniczych lub po wymieszaniu z dodatkami smakowo-zapachowymi – do produkcji deserów i past kanapkowych.

Wartość odżywcza serów twarogowych jest dość wysoka, szczególnie ze względu na znaczną ilość pełnowartościowego białka, witamin (zwłaszcza B<sub>2</sub>) i wapnia.

Tabela 1

**Wartość odżywcza wybranych rodzajów serów twarogowych, w 100 g produktu  
(wg Kolanowskiego, 2000)**

Produkt	Energia (kcal)	Woda (g)	Białko (g)	Tłuszcz (g)	Wapń (mg)	Wit. A (µg*)	B-karoten (µg)	Wit. B <sub>2</sub> (mg)	Wit. B <sub>6</sub> (mg)
<b>Sery twarogowe kwasowe</b>									
Ser twarogowy chudy	100	75,3	19,8	0,5	96	5	3	0,49	0,09
Ser twarogowy półtłusty	134	72,1	18,7	4,7	94	39	29	0,45	0,09
Ser twarogowy tłusty	177	67,9	17,7	10,1	88	83	62	0,36	0,1
<b>Serki twarogowe kwasowo-podpuszczkowe</b>									
Serek homogenizowany pełnotłusty	162	72,6	12,7	11,0	98	39	30	0,25	0,03
Serek ziarnisty typu „cottage cheese”	102	79,2	12,3	4,3	80	22	14	0,25	0,06
* - ekwiwalent retinolu (retinol + β-karoten)									

W procesie produkcji serów twarogowych kwasowych wyróżnia się następujące etapy produkcji: pasteryzacja mleka, dodatek zakwasu, krojenie skrzepu, dogrzewanie, płukanie, ociekanie, prasowanie, formowanie i pakowanie. W celu uzyskania twarogu mleko pasteryzuje się (92°C, kilka sekund), schładza do temperatury 20-26°C (lub 32-34°C – metoda krótkotrwała) i miesza z zakwasem bakterii fermentacji mlekowej, zazwyczaj w ilości 0,5-2,5%, ewentualnie dodaje się określone ilości kwasu mlekowego. Koagulacja białek prowadząca do wytrącenia skrzepu kazeiny zachodzi na skutek wzrostu kwasowości mleka do punktu izoelektrycznego (pH 4,5), następuje po 12-16 godzinach (lub 6-8, zależnie od kwasowości). Kazeina tworzy w świeżym mleku koloidalny roztwór miceli hydrofilowych, które po zakwaszeniu tracą wodę z warstwy zewnętrznej i nabierają charakteru hydrofobowego (nierozpuszczalnego w wodzie). W rezultacie micelle kazeinowe łączą się w większe agregaty i wytrącają się z mleka w postaci żelu. W sieciach żelu zatrzymywane są kuleczki tłuszczu i krople serwatki. Lekko podchodzący serwatką skrzep kroi się oraz rozdrabnia na ziarna wielkości 1-5 cm i dogrzewa do temperatury ok. 30-35°C. Po oddzieleniu części serwatki gęstwą twarogową umieszcza się na stołach odciekowych w formach (o kształcie bloku, okrągłym lub klina) lub w workach z tkaniny, i poddaje prasowaniu w celu usunięcia pozostałej serwatki.

Ze 100 kg mleka odtłuszczonego otrzymuje się 8,5-10 kg twarogu kwasowego o zawartości ok. 70-75% wody. Rozróżnia się ser twarogowy prasowany – krajankę (w kształcie sześcianu), klinek (w kształcie klina) i mielony – powszechnie określane jako ser biały. Sery twarogowe kwasowe mogą być przeznaczone do bezpośredniego spożycia lub do dalszego przerobu na serki twarogowe, sery twarogowe dojrzewające lub sery twarogowe topione (sery smażone). Twarogi naturalne są produktami o krótkiej przydatności do spożycia (zazwyczaj 48-72 h).

Sery twarogowe tj. twarożki, otrzymuje się z serów twarogowych kwasowych naturalnych przez ich rozcieranie i mielenie, mieszanie z wodą, mlekiem, maślaną, śmietanką lub masłem. Tego typu twarożki doprawia się różnymi dodatkami smakowymi, takimi jak sól, zioła, warzywa, owoce itp., niekiedy stosuje się także dodatek stabilizatorów. Serki te poddaje się termizacji i pakuje w wytłoczki z tworzyw sztucznych, w warunkach aseptycznych – przez co zyskują trwałość od kilku dni do kilku tygodni. Termizacja polega na ogrzewaniu przez kilka minut masy serowej do temperatury ok. 60°C. Proces ten niszczy znaczną część mikroorganizmów obecnych w wyrobie, a tym samym przedłuża jego trwałość. Dodatek stabilizatorów pozwala na uzyskanie w czasie termizacji trwałej konsystencji wyrobu, chroniąc białka przed destrukcyjnym wpływem wysokiej temperatury i niskiego pH, ograniczając zjawisko synerozy i stabilizując emulsyjną strukturę fazy tłuszczowej.

Sery twarogowe ze wszystkich białek mleka zawierają zarówno kazeinę jak i białka serwatkowe, które w przypadku innych serów tracą wraz z serwatką. Podczas produkcji tych serków wykorzystuje się m.in. metodę serwitową. W metodzie serwitowej do surowego mleka dodaje się ok. 0,04% chlorku wapniowego i poddaje pasteryzacji (92°C, 15 sekund). Po schłodzeniu przeprowadza się koagulację kazeiny i białek serwatkowych – przez ukwaszenie dodatkiem zakwasu bakterii starterowych. Wytrącenie ok. 95% białek mleka (metodami tradycyjnymi ok. 75%) umożliwia dodatek wapnia, który w podwyższonej temperaturze wzmacnia tworzenie się kompleksów białek

serwatkowych z kazeiną. Dzięki temu wzrasta wydajność twarogu, o 10-15% oraz wartość odżywcza.

Sery twarogowe dojrzewające stanowią nieliczną grupę serów twarogowych. Sery tego typu wytwarza się na niewielką skalę i mają one znaczenie regionalne. Otrzymuje się je zazwyczaj z twarogów uzyskiwanych z mleka częściowo lub całkowicie odtłuszczonego. Twaróg miesza się z solą, często z przyprawami smakowymi (np. kminkiem, majerankiem) i formuje w serki w kształcie płaskich krążków o masie 50-200 g. Krążki obsusza się, układa w drewnianych skrzynkach i poddaje procesowi dojrzewania (tzw. gliwienia). Wyróżnia się sery twarogowe dojrzewające pleśniowe i maziowe. Do najbardziej znanych serów twarogowych dojrzewających należą serki harceńskie, kwargle i gomółki.

Dojrzewanie serów twarogowych polega na tzw. gliwieniu, czyli proteolizie kazeiny. Proces przebiega od powierzchni do wewnątrz, nadając w końcu ciemniejszy, szklisty wygląd prawie całej masie sera. Gliwienie zachodzi głównie pod wpływem pleśni *Oospora lactis*, drożdży kożuchowych i bakterii proteolitycznych, w temperaturze 15-20°C w czasie od kilku dni do kilku miesięcy, zależnie od typu sera (np. szwajcarski ser schabziger uważa się za najlepszy po roku). Pleśń *Oospora lactis* (jak i inne pleśnie) poza właściwościami silnie proteolitycznymi, posiada zdolność syntetyzowania wielu witamin z grupy B, zwiększając ich zawartość w serze. Pleśń ta dzięki białej grzybni i brakowi zarodników nie wywołuje intensywnych przebarwień, charakterystycznych dla serów z przerostem pleśniowym. Tradycyjnie w trakcie wyrobu serów tego typu nie stosuje się dodatku pleśni, wykorzystując ich naturalną obecność w powietrzu.

Serki kwasowo-podpuszczkowe otrzymuje się przez zadanie pasteryzowanego mleka wzbogaconego w chlorek wapniowy, zakwasem czystych kultur bakterii fermentacji mlekowej i niewielką ilością preparatu podpuszczki. Uzyskany po 12-14 godzinach skrzep odwapnionej kazeiny i parakazeinianu wapniowego kroi się w duże kostki, układa na specjalnych stołach lub rozpiętych chustach, do odcieknięcia serwatki. Ze 100 kg

odtłuszczonego mleka otrzymuje się 12-14,5 kg twarogu kwasowo-podpuszczkowego o zawartości wody ok. 75%. Najpopularniejsze sery kwasowo-podpuszczkowe to tzw. serki homogenizowane i serki ziarniste typu „cottage cheese” (np. serek wiejski). Otrzymywanie serków homogenizowanych polega na oddzielaniu skrzepu od serwatki metodą wirówkową. Uzyskuje się w ten sposób masę twarogową w stanie silnie rozbitym (tzw. zhomogenizowanym) o zawartości 18-24% suchej masy. Otrzymaną masę poddaje się termizacji, a po ochłodzeniu (do ok. 8°C) miesza z pasteryzowaną śmietanką i ewentualnie dodatkami smakowo-zapachowymi. Serki pakuje się w pojemniki z tworzyw sztucznych.

Serki ziarniste otrzymuje się przez rozdrobienie skrzepu mleka tak, aby ziarna serowe nie zlepiały się w masę, lecz pozostawały osobno. Rozdrabnianie polega na krojeniu gęstwy serowej na drobne ziarna, gdy skrzep osiągnie pH ok. 4,8. Stopień rozdrobnienia powinien być równomierny, a wielkość ziaren zależy od rodzaju produkowanego sera (najczęściej 1,5-2,5, 1 lub 0,6 cm). Po odczerpaniu serwatki ziarna serowe dogrzewa się w trakcie mieszania, a następnie płucze 3-krotnie wodą o coraz niższej temperaturze (odpowiednio ok. 22, 10 i 3°C). Płukanie ma na celu stopniowe i silne schłodzenie ziaren serowych, co powoduje ich stężenie i utwalenie uzyskanej tekstury. Po odcieknięciu wody ziarna serowe miesza się z soloną śmietanką i pakuje aseptycznie do termoformowanych opakowań z tworzywa sztucznego, zamykając szczelnie – przez zgrzewanie z wieczkiem z folii aluminiowej. Serek ten zawiera ok. 80% wody i minimum 20% tłuszczu w suchej masie. Dzięki termizacji i aseptycznemu pakowaniu serki zyskują większą trwałość – zwykle od 1 do 3 tygodni.

W każdym typie sera twarogowego wyróżnia się klasy jakości I i II. Sery twarogowe (z wyjątkiem serów dojrzewających) powinny charakteryzować się smakiem i zapachem czystym, łagodnym, lekko kwaśnym, a w przypadku serów z dodatkami smakowymi także wyraźnym smakiem użytych dodatków. Struktura i konsystencja powinna być jednolita, zwarta, bez grudek lub lekko ziarnista (dla twarogów chudych), z ewentualnie widocznymi cząstkami

użytych dodatków, a barwa – biała do kremowej, jednolita w całej masie lub charakterystyczna dla użytych dodatków. Kwasowość twarogów kwasowych nie powinna przekraczać  $80-110^{\circ}\text{SH}$ , a serów kwasowo-podpuszczkowych –  $70-90^{\circ}\text{SH}$ , przy czym im wyższa zawartość tłuszczu, tym dopuszczalna wartość SH jest mniejsza.

Sery twarogowe pakuje się w suchy papier pergaminowy, w kubeczki z tworzyw sztucznych, próżniowo w folię polietylenową lub w kartony laminowane. Sery twarogowe należy przechowywać w pomieszczeniach chłodnych, czystych, suchych i wolnych od obcych zapachów, w temperaturze do  $10^{\circ}\text{C}$ . Okres przydatności do spożycia serów przechowywanych w tych warunkach wynosi co najmniej 48 h, licząc od daty produkcji. W praktyce spotyka się sery twarogowe o trwałości przedłużonej przez termizację i aseptyczne pakowanie. Inne okresy przechowywania ustala producent, na podstawie badań przechowalniczych.

Najczęściej występujące wady serów twarogowych wynikają z nieodpowiedniej jakości mikrobiologicznej surowca, odstępstw technologicznych w zakresie parametrów produkcji i niewłaściwego przechowywania.

Stosowane parametry pasteryzacji mleka powinny być odpowiednie dla danego rodzaju sera. Zbyt wysoka temperatura obróbki skrzepu, oprócz poprawy czystości mikrobiologicznej i podniesienia wydajności twarogu często jest przyczyną uzyskania twarogu mazistego i trudnego do sprasowania.

Nadmierne ukwaszenie mleka (poniżej pH 4,4) powoduje rozpuszczenie części kazeiny, trudności w obróbce skrzepu i pogorszenie cech sensorycznych – twaróg mazisty i kwaśny. Zbyt wysoka temperatura ukwaszania mleka i obróbki skrzepu powoduje nadmierne odwodnienie, w wyniku czego powstaje twaróg suchy i kruchy. W niższej temperaturze – konsystencja twarogu może stawać się gumowata. Zbyt szybkie ochłodzenie twarogu przed prasowaniem spowodować może konsystencję wodnistą. Obecność wolnych przestrzeni w prasowanej gęstwie twarogowej sprzyja rozwojowi szkodliwych drobnoustrojów. Smak gorzki powstaje w wyniku

rozwoju bakterii psychrofilnych. Zakażenie drożdżami lub pleśniami jest przyczyną pojawienia się smaku nieczystego i stęchłego. Różne dodatki do masy twarogowej (np. owoce, warzywa, przyprawy) mogą podwyższać kwasowość, co sprzyja rozwojowi drobnoustrojów i śluzowaceni sera.

Porównanie klasyfikacji procesów fermentacyjnych wg Gadena i Deindoerfera  
Układ klasyfikacyjny proponowany przez Gadena opiera się na współzależności między wytwarzaniem produktu i zużyciem substratu. Inaczej klasyfikację tę można rozumieć jako próbę oceny stopnia sprzężenia reakcji wytwarzających energię z reakcjami wytwarzającymi produkty. Taki sposób interpretacji jest szczególnie dogodny w badaniach fermentacji ciągłej.

Tabela 2

**Przykłady typów procesu fermentacji wg klasyfikacji Gadena**

Typ	Charakterystyka kinetyczna	Przykład
I	Tworzenie się produktu jest związane bezpośrednio ze zużyciem węglowodanów	Etanol
II	Tworzenie się produktu jest związane pośrednio ze zużyciem węglowodanów	Kwas cytrynowy
III	Tworzenie się produktu nie jest związane ze zużyciem węglowodanów	Penicylina

Natomiast klasyfikacja proponowana przez Deindoerfera jest oparta na podziale wg sposobu przebiegu procesów fermentacyjnych, np. fermentacja prosta, równoczesna, następcza, stopniowana. Klasyfikacja ta jest bardzo użyteczna w badaniu okresowych procesów fermentacyjnych.

Tabela 3

**Klasyfikacja procesów fermentacji oparta na rodzaju zachodzących reakcji wg Deindoerfera**

Typ reakcji	Opis
Prosta	Składniki pożywki przekształcają się w produkty w określonych stosunkach stechiometrycznych, bez nagromadzenia się produktów pośrednich
Równoczesna	Składniki pożywki przekształcają się w produkty w zmiennych proporcjach stechiometrycznych, bez nagromadzenia się produktów pośrednich
Następcza	Składniki pożywki przekształcają się w produkty, przy czym występuje gromadzenie się produktów pośrednich
Stopniowana	Składniki pożywki przed przekształceniem w produkty końcowe tworzą związki pośrednie lub składniki pożywki całkowicie przekształcają się w produkty w określonej, uprzywilejowanej kolejności

Reakcje proste. Ten typ kinetyki fermentacji zawiera w sobie dwie grupy reakcji, a mianowicie reakcje związane ze wzrostem oraz reakcje bez wzrostu



kultur. Typowymi przykładami takich reakcji są odpowiednio: wzrost masy i drożdży oraz wytwarzanie kwasu glukonowego przez grzybnię.

Reakcje równoczesne. Reakcjami równoczesnymi są nazywane takie reakcje, w wyniku których powstaje więcej niż jeden produkt, a względne szybkości tworzenia produktów zmieniają się zależnie od stężenia substancji odżywczych w pożywce.

Reakcje następcze. Cechą charakterystyczną reakcji następczych jest tworzenie się produktów końcowych dopiero w wyniku wcześniejszego nagromadzenia się substancji pośrednich. Przykładem jest tu fermentacja glukozy do kwasu glukonowego, wywołwana przez organizmy nie wykazujące aktywności glukonolaktolazy. Do tej grupy reakcji można zaliczyć również szereg procesów fermentacyjnych, prowadzących do wytwarzania antybiotyków.

#### Modele wzrostu mikroorganizmów

Poznanie fizjologii drobnoustrojów, fazowości procesów mikrobiologicznych i relacji między wzrostem a tworzeniem produktu jest potrzebne do racjonalnego kierowania procesami biosyntezy i biotransformacji mikrobiologicznej. W klasycznej hodowli okresowej następujące po sobie fazy w rozwoju populacji drobnoustrojów są wyrazem zmian w ich metabolizmie oraz zmian we wzajemnym oddziaływaniu między komórkami a środowiskiem. Fazowość procesów wiąże się ściśle ze zdolnością drobnoustrojów do adaptacji do zmieniających się warunków środowiskowych, takich jak wyczerpanie składników pożywki, nagromadzenie produktów metabolizmu, zmiana pH, zmiana potencjału oksydacyjno-redukcyjnego i stężenia tlenu rozpuszczonego w podłożu.

Fazowy charakter procesów mikrobiologicznych odzwierciedlają zmiany jakościowe i ilościowe aparatu enzymatycznego komórki. W zależności od fazy hodowli mogą funkcjonować w różnym nasileniu poszczególne szlaki metaboliczne. Wynika stąd powiązanie między tworzeniem produktu a fazą wzrostu drobnoustrojów, zależnie od funkcji metabolicznej produktu lub szlaku, w którym produkt ten powstaje oraz od bieżących i wcześniejszych warunków

środowiskowych. Można wyróżnić następujące modele procesów mikrobiologicznych:

1. Namnażanie komórek jest równoznaczne z tworzeniem produktu, co oznacza, że właściwym produktem jest biomasa:

$$\frac{dP}{dt} = \frac{dX}{dt}, \quad P = X.$$

2. Tworzenie produktu związane jest bezpośrednio ze wzrostem i przebiega równoległe z namnażeniem komórek, zanikając w fazie stacjonarnej hodowli (rys. 1.A). W ten sposób przebiega synteza niektórych enzymów:

**Rys. 1. Podstawowe modele procesów biosyntezy mikrobiologicznej. Tworzenie produktu przez komórki rosnące (A), przez komórki rosnące i nie rosnące (B) oraz tylko przez komórki nie rosnące (C); X – stężenie biomasy, P – stężenie produktu**

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt},$$

gdzie:  $\alpha$  – współczynnik szybkości tworzenia produktu przez komórki rosnące.

3. Tworzenie produktu zachodzi zarówno w komórkach rosnących, jak i nie rosnących (rys. 1.B), jak to ma miejsce w przypadku wielu produktów przemian katabolicznych (kwas mlekowy, etanol) oraz niektórych produktów biosyntezy (niektóre antybiotyki, witaminy, aminokwasy). Kwas mlekowy oraz etanol wydzielane są przez żywe komórki, zarówno w czasie wzrostu, jak i w fazie stacjonarnej, gdyż są one produktami przemian katabolicznych nie zmienionych po zahamowaniu wzrostu.

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + \beta X,$$

gdzie:  $\beta$  – współczynnik szybkości tworzenia produktu przez komórki nie rosnące.

Wzajemne relacje między współczynnikami mogą być różne; zależnie od procesu dominować może jeden lub drugi.

4. Tworzenie produktu ma miejsce tylko w komórkach nie namnażających się (rys. 1.C):

$$\frac{dP}{dt} = \beta X.$$

Biosynteza wielu antybiotyków, toksyn oraz niektórych aminokwasów i witamin oraz biotransformacja steroidów i innych związków zachodzi zgodnie z tym modelem procesu, dopiero po zahamowaniu (częściowym lub całkowitym) wzrostu drobnoustrojów.

Relacje między wzrostem drobnoustrojów i tworzeniem produktu nie zawsze wynikają z funkcji metabolicznej produktów. Jeżeli dokonamy analizy fizjologii komórek, np. w procesie produkcji lizyny, okaże się, że synteza tego metabolitu w fazie wzrostu jest niewielka – określona potrzebami namnażających się komórek. Właściwa produkcja, a raczej nadprodukcja, ma miejsce dopiero po zahamowaniu wzrostu.

W klasycznym modelu biosyntezy antybiotyków w podłożu kompleksowym wyróżnia się zazwyczaj dwie fazy: (1) intensywnego wzrostu, czyli tzw. trofofazę, podczas której zachodzi zrównoważone wykorzystywanie składników podłoża oraz (2) fazę produkcji, inaczej idiofazę. Najczęściej nie obserwuje się ostrego rozgraniczenia obu faz; mogą one częściowo na siebie zachodzić.

W hodowli organizmów jednokomórkowych relacje między wzrostem populacji a tworzeniem produktu mogą być zarysowane bardziej wyraźnie aniżeli w hodowlach grzybów strzępkowych i promieniowców, stanowiących heterogeniczny zbiór komórek o zróżnicowanej fizjologii, zależnie od miejsca w rozgałęzionych wielokomórkowych strzępkach, kłaczkach lub kuleczkach grzybni. W takich hodowlach mogą występować obok siebie młode komórki

rozmnażające się, dojrzałe komórki produkujące metabolity nie związane z procesem wzrostu, a także komórki ulegające autolizie w warunkach niedotlenienia i deficytu pożywek w centrum zwartych kuleczek grzybni. Modelowanie i optymalizacja procesów mikrobiologicznych przebiegających w takich złożonych populacjach komórek przysparza wiele problemów natury biologicznej i technicznej.

#### Porównanie różnych technologii produkcji kwasu octowego

Kwas octowy o stężeniu do 10%, tzw. ocet, jest powszechnie stosowany w przemyśle spożywczym.

Fermentacja octowa tj. produkcja kwasu octowego polega na biologicznym utlenianiu etanolu przez aldehyd octowy do kwasu octowego przez bakterie z rodzaju *Acetobacter*, gatunek *Acetobacter aceti* ssp. *aceti*, *xylinum*, *orleanensis*, *liquefaciens*.

Po wyczerpaniu etanolu niektóre gatunki bakterii *Acetobacter* mogą utleniać kwas octowy do dwutlenku węgla i wody, jak również utleniać kwas octowy w obecności alkoholu.

*Acetobacter aceti* ssp. *xylinum* zdolny jest do tworzenia dużych ilości śluzu, co powoduje zlepianie się wypełnienia w ociekowych metodach produkcji octu i w konsekwencji hamuje przebieg fermentacji.

Bakterie octowe najintensywniej rozwijają się w pH 4-6,5, przy temperaturze 30°C. Wytrzymują duże, dochodzące do 15%, stężenie kwasu octowego w podłożu.

Do najstarszych metod produkcji octu należy tzw. metoda francuska lub orleańska. Fermentacja jest prowadzona w beczkach o pojemności ok. 230 dm<sup>3</sup>. Do 100 dm<sup>3</sup> dobrego jakościowo octu dodaje się 2 dm<sup>3</sup> wina, a po 8 dniach – następne 3 dm<sup>3</sup> wina. Kolejne porcje wina zwiększone o 1 dm<sup>3</sup> dolewa się co 8 dni, aż do osiągnięcia wielkości porcji wina 10 dm<sup>3</sup>.

Fermentacja octowa jako proces tlenowy przebiega bardzo wolno, gdyż bakterie octowe namnażają się jedynie na powierzchni wina, tworząc tzw. kożuszek. Po kilku tygodniach, gdy osiągnie się kwasowość podłoża odpowiadającą pH 5-6, odlewa się połowę zawartości beczki, uzyskując płyn o

zawartości 5-6% kwasu octowego i ponownie uzupełnia świeżym winem w ilości 10 dm<sup>3</sup>, nie naruszając kożuszka. Co kilka dni pobiera się po 10 dm<sup>3</sup> octu, dodając na to miejsce wina. Uzyskany ocet – vinegar – odznacza się dobrym aromatem i smakiem.

W metodzie szybkiego octowania, tzw. metodzie stojakowej, do produkcji kwasu octowego używa się drewnianych, cylindrycznych kadzi wypełnionych wiórami z drewna bukowego, na których powierzchni są namnożone bakterie octowe. Przygotowany roztwór alkoholu z kwasem octowym oraz substancjami niezbędnymi do wzrostu bakterii, zawierający 2-4% etanolu i 7-8% kwasu octowego, doprowadza się na górną powierzchnię wiórów. Podczas wolnego ściekania zacieru po wiórach, w temperaturze 28-34°C, alkohol ulega przemianie na kwas octowy. Wydajność kwasu octowego z etanolu wynosi 60-80% wydajności teoretycznej.

Natomiast produkcja octu w tzw. aparatach generatorowych ma charakter okresowy. Do zbiornika w kształcie ściętego stożka napełnionego wiórami bukowymi wprowadza się określoną ilość zacieru zawierającego ok. 10% alkoholu i 1% kwasu octowego z dodatkiem związków organicznych i mineralnych, niezbędnych do rozwoju bakterii octowych. Od dołu za pomocą specjalnych urządzeń wtłacza się do generatora powietrze. Dopływ powietrza jest ściśle kontrolowany ze względu na duże zapotrzebowanie tlenu przez bakterie octowe.

Alkohol znajdujący się w płynie po jednorazowym przejściu przez generator nie zostaje całkowicie utleniony, dlatego po ochłodzeniu jest ponownie kierowany do generatora.

Przerób etanolu na kwas octowy zachodzi z 85-90% wydajnością w stosunku do teoretycznej. Z generatora zawierającego 40 m<sup>3</sup> wiórów można otrzymać ok. 20 tysięcy litrów 10% octu na dobę.

Obecnie kwas octowy produkuje się metodą fermentacji wglębnej. Urządzenie do produkcji octu ww. metodą nazywa się acetatorem. Zapewnia ono utrzymanie jednakowych warunków temperaturowych i napowietrzania w całej masie fermentora, co pozwala na to, aby populacja bakterii octowych

była w najkorzystniejszej fazie rozwoju. Fermentację prowadzi się przy użyciu czystej kultury wyselekcjonowanego szczepu *Acetobacter*. Metoda ta pozwala na skrócenie cyklu produkcyjnego i osiągnięcie wydajności 90-95%, co znacznie obniża koszty produkcji octu.

Otrzymany ww. metodami tzw. surowy ocet spirytusowy zawiera 9-13% kwasu octowego. Po jego rozcieńczeniu do zawartości około 6-10% kwasu octowego poddaje się go filtracji i pasteryzacji (70-80°C) lub siarkowaniu dla zabicia bakterii octowych.

Różnice w produkcji alkoholu etylowego i glicerolu

Surowcami do produkcji alkoholu etylowego mogą być wszystkie produkty, które zawierają węglowodany. Najczęściej stosuje się te, które zawierają monosacharydy lub skrobię. Należą do nich surowce roślinne, takie jak: ziemniaki, zboża, buraki cukrowe, kukurydza, okopowe rośliny pastewne oraz surowce przemysłowe: melasa, odpady produkcji krochmalu, przemysłu młynarskiego, owocowo-warzywnego i celulozowego (ługi pocelulozowe).

W przemyśle spirytusowym do przygotowania surowców zawierających monosacharydy, takich jak: melasa, sok buraka cukrowego lub z trzciny cukrowej, soki owocowe itp., nie trzeba specjalnych zabiegów, natomiast do przygotowania surowców, które zawierają polisacharydy (skrobię) jest konieczna ich hydroliza do monosacharydów.

W przypadku surowców skrobiowych proces ten składa się z etapów:

- upłynnienie surowca (w parnikach lub kotłach ciśnieniowych),
- hydroliza upłynnionej skrobi, przy użyciu enzymów amylolitycznych.

Upłynnienie surowca polega niejako na rozgotowaniu surowca w wodzie, w wysokiej temperaturze. Proces prowadzi się pod ciśnieniem 0,4-0,6 MPa, w temperaturze 150-170°C. W wyniku tego dochodzi do kleikowania skrobi, która w tej formie jest podatna na działanie enzymów amylolitycznych.

Pierwszym etapem produkcji alkoholu etylowego jest zacieranie. Polega ono na takim przygotowaniu surowca, żeby był możliwy rozwój drożdży, a w rezultacie przerób węglowodanów na alkohol. W zacieraniu skrobi skleikowanej udział biorą 3 enzymy  $\alpha$ - i  $\beta$ -amylaza oraz amyloglukozydaza.

Istnieje wiele metod zacierania. Dobór metody zależy od surowca, stosowanych preparatów enzymatycznych i posiadanych urządzeń. Jednak w każdym przypadku, po skończonym procesie zacierania, zacier zawiera monosacharydy, disacharydy i dekstryny, które mogą służyć drożdżom do produkcji alkoholu.

Drożdże gorzelnicze (*Saccharomyces cerevisiae*) powinny szybko fermentować sacharydy oraz być niewrażliwe na stężenie alkoholu do 14% (V/V). Istnieją zróżnicowane wymagania co do drożdży stosowanych w gorzelniach rolniczych i przemysłowych. Rasy drożdży stosowane w

gorzelniach przemysłowych powinny być odporne na większą gęstość brzezki melasowej oraz szybciej odfermentowywać cukry. Drożdże gorzelnicze fermentują glukozę, fruktozę, maltozę, sacharozę, a niektóre rasy również częściowo mannozę, laktozę i rafinozę. Są one odporne na działanie wielu kwasów organicznych.

Obecnie do produkcji alkoholu etylowego używa się drożdży suszonych, mrożonych lub liofilizowanych. Istnieją dwie metody wprowadzenia drożdży do produkcji alkoholu. Pierwsza polega na namnożeniu biomasy drożdży mącznych w zbiornikach i dodaniu jej do zacieru, druga na dodaniu utrwalonych drożdży bezpośrednio do zacieru.

Następnym etapem produkcji alkoholu etylowego jest fermentacja, która polega na przemianie sacharydów, znajdujących się w zacierze, w alkohol etylowy, przy użyciu drożdży. Przeciętny czas fermentacji wynosi 48-72 h. W czasie fermentacji wyróżnia się 3 fazy procesu.

- 1) Zafermentowanie – jest to początkowy etap procesu (6-18 h), gdy zacier zawiera dużo powietrza oraz sacharydów. W takich warunkach drożdże zużywają sacharydy na rozmnażanie, a w mniejszym stopniu wytwarzają alkohol etylowy. Jednocześnie jest wytwarzany CO<sub>2</sub>, który najpierw nasycza lepki zacier, a następnie uwalniając się do otoczenia powoduje tworzenie piany na powierzchni. Proces jest egzotermiczny i powoduje podwyższenie temperatury zacieru. Gdy wzrost temperatury jest za duży, zacier należy schłodzić do temperatury 16-18°C. Przy końcu tego etapu proces z tlenowego stopniowo staje się beztlenowy i w coraz większym stopniu wynikiem fermentacji sacharydów jest alkohol. Powoduje to również większe wytwarzanie CO<sub>2</sub> i silniejsze „burzenie się” zacieru.
- 2) Fermentacja główna – ten etap trwa 12-18 h. Charakteryzuje się gwałtownym „burzeniem się” zacieru, na skutek silnego wydzielania CO<sub>2</sub> oraz wzrostu temperatury związanych z intensywnym tworzeniem alkoholu etylowego przez drożdże. Zwiększa się objętość zacieru. Na powierzchni gromadzi się piana, a temperatura może wzrosnąć nawet do 30°C i wyżej. Tak wysoka temperatura jest niekorzystna dla produkcji alkoholu przez



drożdże i należy dążyć do obniżenia jej do wartości optymalnych dla danej rasy drożdży. Jednocześnie zwiększenie stężenia alkoholu etylowego powyżej 5% oraz znaczne zużycie sacharydów powodują stopniowe hamowanie metabolizmu drożdży. Zakończenie tego etapu fermentacji można poznać po zmniejszeniu burzliwości procesu i zniknięciu piany na skutek zmniejszenia gęstości i lepkości zacieru.

- 3) Dofermentowanie – jest to najdłuższy etap procesu fermentacji, który trwa 20-30 h. Polega na dofermentowaniu resztek sacharydów przez drożdże. Proces przebiega powoli z powodu niewielkiego stężenia sacharydów w pożywce. W tym etapie drożdże fermentują głównie dekstryny. W rezultacie ilość wydzielanego gazu jest mała, nasycenie zacieru gazem maleje, przez co zmniejsza się jego objętość. Na skutek spowolnienia procesów metabolicznych drożdży ilość wydzielanego ciepła jest mniejsza niż ilość odprowadzana do otoczenia i temperatura zacieru obniża się. Po zakończeniu fermentacji gęstość zacieru zbożowego lub ziemniaczanego wynosi 1,0-1,5°Blg, a zawartość alkoholu etylowego (8-10% mas.) 10-12,5% (V/V).

Następnie zacier poddaje się destylacji i rektyfikacji. W wyniku destylacji i rektyfikacji, oprócz alkoholu uzyskujemy wartościowy produkt uboczny – wywar zawierający glicerynę, kwasy organiczne, wyższe alkohole (fuzle), estry i aldehydy.

Gliceryna jest jedną z najważniejszych substancji składowych win gronowych. Jako czysty związek jest ona cieczą słodką, bezbarwną i bezzapachową. Jest jednak nieodzowna przy tworzeniu aromatu i smaku win. Glicerynę otrzymuje się przez uwodornienie fosforanu dihydroksyacetonu do fosforanu  $\alpha$ -gliceryny. Fosforan  $\alpha$ -gliceryny po odłączeniu reszty kwasu fosforowego (V) tworzy glicerynę.

Gliceryna w największej ilości powstaje w początkowych etapach fermentacji alkoholowej.

Istnieje także ścisła korelacja tworzonego etanolu i gliceryny, jednak na skutek zmiennych warunków fermentacji może ona ulec zmianie, np.: w wyniku fermentacji spontanicznej, z udziałem dzikich drożdży z rodzaju: *Kloeckera*, *Candida*, *Torulasporea* i *Metschnikovia*, powstała gliceryna stanowi przeciętnie 8% powstałego etanolu. Istotny wpływ na ilość tworzonej gliceryny ma temperatura fermentacji. Przy temperaturach wyższych powstaje jej więcej.

#### Produkcja butanolu i acetonu

W środowisku kwaśnym bakterie z rodzaju *Clostridium* zamiast fermentacji masłowej wywołują fermentację aceto-butanolową, w której, obok innych produktów, powstają przede wszystkim duże ilości alkoholu butylowego i acetonu. Są też gatunki bakterii masłowych, które redukują aceton do alkoholu izopropylowego. Bakterie *Clostridium acetobutylicum* są gramdodatnimi, prostymi, ruchliwymi komórkami. Ich wygląd może być różny, zależnie od szczepu, podłoża hodowlanego i fazy hodowli. Po wykiełkowaniu przetrwalników następuje faza intensywnego namnażania komórek, początkowo występujących w postaci łańcuchów, które następnie rozpadają się na pojedyncze lub połączone parami ruchliwe komórki. W końcowej fazie hodowli obserwuje się powstawanie klostridiów, czyli komórek wrzecionowatych, zdeformowanych na skutek tworzenia się przetrwalników, które następnie są uwalniane do podłoża.

Stwierdzono istnienie współzależności między obfitym przetrwalnikowaniem i dużą ruchliwością a efektywnością produkcji acetonu i butanolu w hodowli *C. acetobutylicum*. W klasycznym procesie fermentacji acetonowo-butanolowej, w fazie intensywnego namnażania komórek zachodzi szybkie zużywanie węglowodanów i wydzielanie małocząsteczkowych kwasów organicznych – masłowego i octowego w stężeniu kilku g/l. Zakwaszenie środowiska poniżej pH 5,5 i wcześniejsze wykorzystanie dużej części węglowodanów sprzyjają przestawieniu metabolizmu na produkcję butanolu i

acetonu, która zachodzi intensywnie przy ograniczonej szybkości przyswajania zasadniczego źródła węgla i energii. W tych warunkach zachodzi efektywna redukcja wytworzonych uprzednio kwasów organicznych. Końcowe stężenie rozpuszczalników nie przekracza zazwyczaj 20 g/l. Trwają poszukiwania szczepów bardziej wydajnych, o podwyższonej odporności na butanol i aceton. Wydajność rozpuszczalników w przeliczeniu na zużyte węglowodany kształtuje się w granicach 30-35%, zaś produktywność w procesie okresowym wynosi 0,2-0,6 g/l·h. Opracowywane są obecnie procesy z kontrolowanym uzupełnianiem węglowodanów oraz fermentacje ciągłe, a także z użyciem komórek unieruchomionych w (lub na) nierozpuszczalnych nośnikach. Syntezie butanolu i acetonu w tych warunkach sprzyja utrzymywanie odczynu podłoża w granicach pH 4,3-5,5.

Beztlenowa przemiana cukrów u *C. acetobutylicum* (rys. 3) w pierwszym etapie przebiega zgodnie z glikolityczną drogą EMP. Zredukowana ferredoksyna powstająca w procesie oksydacyjnej dekarboksylacji pirogronianu do acetylo-CoA, może być dawcą protonów do tworzenia NADPH lub jest utleniana przy udziale hydrogenazy. W wyniku tej drugiej reakcji powstaje H<sub>2</sub> jako jeden z końcowych produktów fermentacji. Centralny metabolit pośredni – acetylo-CoA, ulega przemianie w trzech kierunkach z wytworzeniem etanolu, octanu, (który w późniejszej fazie fermentacji jest przekształcany z powrotem do acetylo-CoA) i acetoacetylo-CoA. Ten ostatni jest drugim punktem rozgałęziania się szlaku fermentacyjnego, w którego odgałęzieniach powstają: aceton, maślan (produkt przejściowy) i butanol (produkt końcowy). Produkcja kwasu masłowego i octowego przypada na fazę intensywnego wzrostu wegetatywnego *C. acetobutylicum*, podczas gdy produkcja acetonu i butanolu ma miejsce w fazie stacjonarnej i przebiega przy udziale klostridialnych form komórek.

**Rys. 3. Zarys metabolizmu cukrów u bakterii z rodzaju *Clostridium*; w ramkach ciągłych zaznaczono możliwe produkty końcowe fermentacji, w ramkach przerywanych – produkty przejściowe, powstające w początkowym etapie fermentacji**

## Literatura

1. Babuchowski A.: Technologie fermentacyjne. W: Biotechnologia żywności. Pod redakcją W. Bednarskiego i A. Repsa. WNT, Warszawa, 2001.
2. Chmiel A.: Biotechnologia, podstawy mikrobiologiczne i biochemiczne. Wyd. Nauk. PWN, Warszawa, 1994.
3. Drewniak E., T.: Mikrobiologia żywności. WSiP, Warszawa, 1997.
4. Kolanowski W.: Sery twarogowe śmietankowe, tłuste i chude. Przegląd Gastronomiczny, 2000, nr 5, str. 10-11.
5. Molska I.: Zarys mikrobiologii mleczarskiej. PWRiL, Warszawa, 1988.
6. Pijanowski E., Gaweł J.: Zarys chemii i technologii mleczarstwa – tom III. PWRiL, Warszawa, 1986.