

## Proizvodnja alkohola i vina iz sirutke\* (Production of Ethanol and Wine From Whey)

Prof. dr. Slobodan GRBA, mr. Vesna STEHLIK-TOMAS i Karmenka MAJDAK,  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb

Izvorni znanstveni rad — Original Scientific Paper  
Prispjelo: 26. 2. 1988.

UDK: 637.344.8

### Sažetak

Studirala se mogućnost proizvodnje alkohola i vina iz djelomično deproteinizirane sirutke dodatkom saharoze, te vina uz dodatak saharoze. Fermentacija je provedena u anaerobnim uvjetima uz pomoć kvasca *Kluyveromyces fragilis* pri pH 4,5—5,5 i 32 °C.

Kvasac *K. fragilis* uspješno fermentira laktozu iz sirutke i saharozu dodanu u koncentracijama od 5, 10 i 15%. S povećanjem koncentracije šećera u podlozi smanjuje se specifična brzina fermentacije i stupanj konverzije supstrata. Optimalnom količinom inokuluma od 2 g s.tv. L<sup>-1</sup> postignut je stupanj konverzije ukupnih šećera od 0,52 ml · g<sup>-1</sup> i specifičnu brzinu fermentacije od 0,35 ml · g<sup>-1</sup> · h<sup>-1</sup>. Dodatkom diamonijevog hidrogenfosfata i diamonijevog sulfata u podlogu pospješuje se kinetika procesa i stupanj konverzije supstrata od 10 do 20%.

Fermentacijom sirutke s dodatkom 15% saharoze može se proizvesti vino sirutke s oko 10% etanola. Fermentacija je nešto dužu (7 dana) zbog manje početne količine inokuluma u podlozi (1 g s. tv. · L<sup>-1</sup>).

### Summary

Production of ethanol and wine from whey with the addition of sucrose was studied. Fermentations were performed by yeast *Kluyveromyces fragilis* at 32 °C and pH 4,5—5,5.

The yeast *K. fragilis* successfully ferments lactose from whey and supplemented sucrose in the concentrations of 5, 10 and 15% as well. With the increase of sugar concentration in the substrate specific fermentation rate and the substrate yield coefficient decreased.

At optimal inoculum concentration of 2 g D.M. × L<sup>-1</sup> the yield of 0,52 ml · g<sup>-1</sup> and the specific fermentation rate of 0,35 ml · g<sup>-1</sup> · h<sup>-1</sup> were achieved. If diamonium hydrogen phosphate and diamonium sulphate were added to the medium kinetic of fermentative process and substrate yield coefficient increased up to 20%.

Wine from whey can be produced in the similar process by addition of 15% sucrose. At the end of fermentation which lasted 7 days, ethanol concentration was about 10% (vol/vol). Process was carried out at lower amount of inoculum (1 g · h<sup>-1</sup>) and at lower temperature (28 °C).

\* Referat održan na XXVI Simpoziju za mljekarsku industriju, Lovran, 1988.

### Uvod

U današnje vrijeme energetske krize i porasta cijene nafte potaknut je razvoj alternativnih tehnologija proizvodnje tekućeg goriva.

Etanol je prihvatljiva alternativa za poboljšanje snabdijevanja tekućim gorivom. Danas u svijetu komercijala postrojenja za fermentaciju etanola još uvijek kao glavne sirovine upotrebljavaju kukuruz i melasu. Međutim, istraživači nastoje razviti i druge tehnologije za proizvodnju alkohola iz ekonomski opravdanih sirovina (sirak, topinambur, sirutka) te poljoprivrednih i industrijskih otpadaka koji sadrže visok postotak šećera i škroba (K r e t s c h m a n, 1955). Kao supstrat za proizvodnju etanola i alkoholnih napitaka sve je zanimljivija sirovina sirutka koja sadrži oko 6% suhe tvari, od čega je tri četvrtine laktoza koju kvasci mogu fermentirati u alkohol (O'Leary et al. 1977).

Svrha ovog rada bila je da se uz odabrani mikroorganizam za proizvodnju alkohola iz sirutke odrede optimalni parametri fermentacije, prati kinetika fermentacije uz povećanu koncentraciju šećera u podlozi te razmotri mogućnost proizvodnje vina iz sirutke uz dodatak saharoze.

### Materijali i metode

Za pokuse je odabran kvasac *Kluyveromyces fragilis* iz mikrobiološke zbirke Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Zagreb. Kultura kvasca čuvana je na kosom agaru u hladnjaku pri 2–4 °C.

#### Priprema inokuluma

S kosog agara kvasac je precijepljen u epruvete koje su sadržavale po 10 ml tekuće sterilne podloge sastava ( $g \cdot L^{-1}$ ): glukoza — 20, Bacto pepton — 10, kvašćev ekstrakt — 5, destilirana voda. Nakon inkubacije u termostatu pri 28 °C u toku 24 sata cjepivo je prebačeno u Erlenmeyerove tikvice od 500 ml koje su sadržavale po 100 ml podloge ovog sastava ( $g \cdot L^{-1}$ ): laktoza — 20, Bacto pepton — 10, Kvašćev ekstrakt — 5 destilirana voda. Uzgoj je proveden na rotacionoj tresilici (150 %/min) kroz 24 sata pri 30 °C. Tako pripremljena kultura kvasca poslužila je kao inokulum za pokuse anaerobne fermentacije.

#### Priprema osnovnog supstrata

Za pokuse je uzeta deproteinizirana sirutka čiji je sadržaj laktoze varirao od 2,5 do 5% (tablica 1), uz dodatak različitih koncentracija saharoze (5, 10 i 15%), te soli diamonijev sulfat ( $1 g \cdot L^{-1}$ ) i diamonijev hidrogen fosfat ( $0,5 g \cdot L^{-1}$ ).

#### Analitičke metode

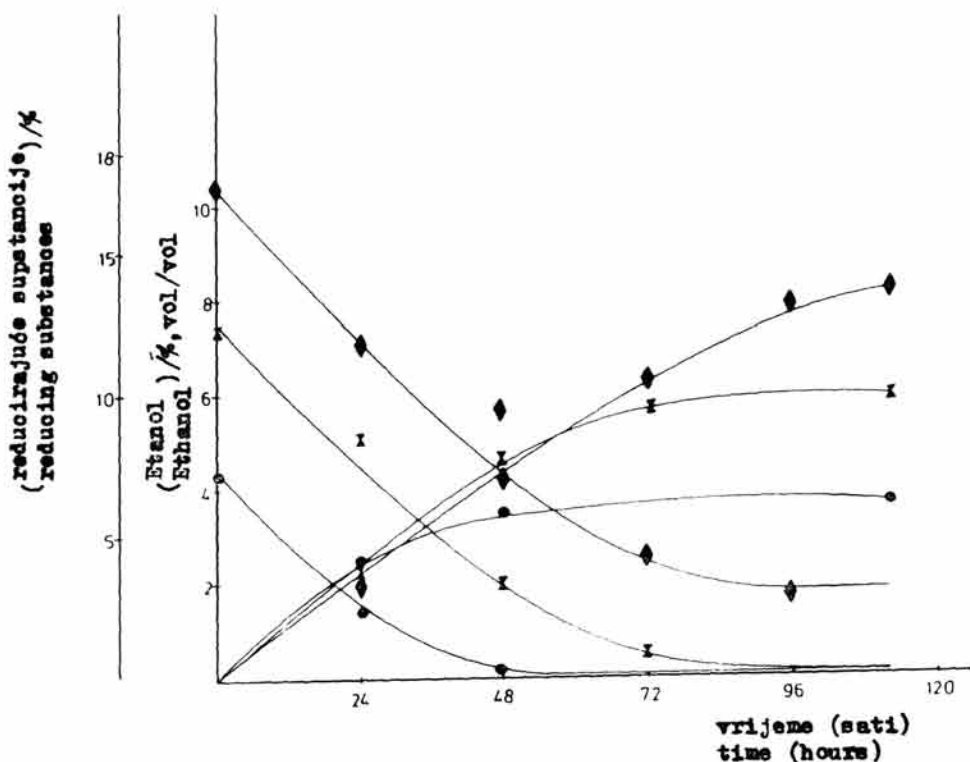
Sastav deproteinizirane sirutke određen je analitičkim metodama prilagođenim sirutki (V a j i ć, 1964). Laktoza se određivala metodom po Luff-Schurlu, dok se saharoza prethodno hidrolizirala kuhanjem (uz dodatak 8 ml

15% HCl i 37 ml H<sub>2</sub>O) u toku 2 sata uz povratno hladilo. Količina proteina računala se iz sadržaja ukupnih dušičnih tvari određenih digestijom po Kjeldalu (Vajić, 1964). Količina alkohola u fermentiranoj komini određivala se metodom po Martinu i Dietrichu (Kosarić et al., 1983).

### Rezultati i rasprava

Sastav sirutke uzete kao sirovina za fermentaciju prikazan je u tablici 1.

Utjecaj količine šećera u podlozi na iskorištenje supstrata i produktivnost procesa prikazan je na slici 1. U sirutku s 2,5% laktoze dodane su koncentracije saharoze od 5, 10 i 15%, te soli diamonijev sulfat i diamonijev hidrogen fosfat uz početnu količinu inokuluma od  $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ .



Slika 1. Fermentacija sirutke uz dodatak različitih količina saharoze i početnu količinu inokuluma ( $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ )

Figure 1. Fermentation of Whey With Addition of Different Amounts of Sucrose and an Initial Inoculum Content ( $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ )

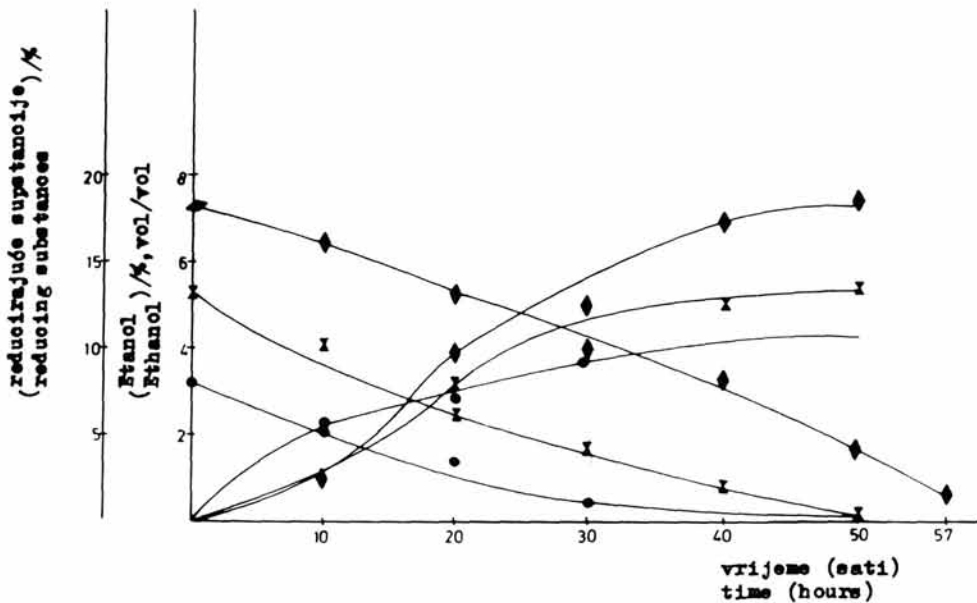
—◆—◆—	15% saharoze	—◆—◆—	15% sucrose
—X—X—	10% saharoze	—X—X—	10% sucrose
—O—O—	5% saharoze	—O—O—	5% sucrose

**Tablica 1. Sastav deproteinizirane sirutke**  
**Table 1. Composition of Deproteinized Whey**

Komponente	$g \cdot L^{-1}$
Suha tvar	
Dry matter	50,9—63,0
Organska tvar	
Organic matter	44,6—51,2
Anorganska tvar	
Anorganic matter	5,2— 5,31
Laktoza	
Lactose	25,0—50,4
Ukupni proteini	
Total proteins	1,5— 5,9
Ukupni fosfati	
Total phosphate	0,13— 0,19

Rezultati prikazuju da je najbolji stupanj konverzije supstrata u etanol i specifična brzina fermentacije ( $0,3 \text{ ml} \cdot \text{g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) postignuta ukoliko je u podlogu dodano 5% saharoze (slike 1 i 4).

Slika 2 prikazuje utjecaj povećane količine inokuluma ( $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) na kinetiku fermentacije.

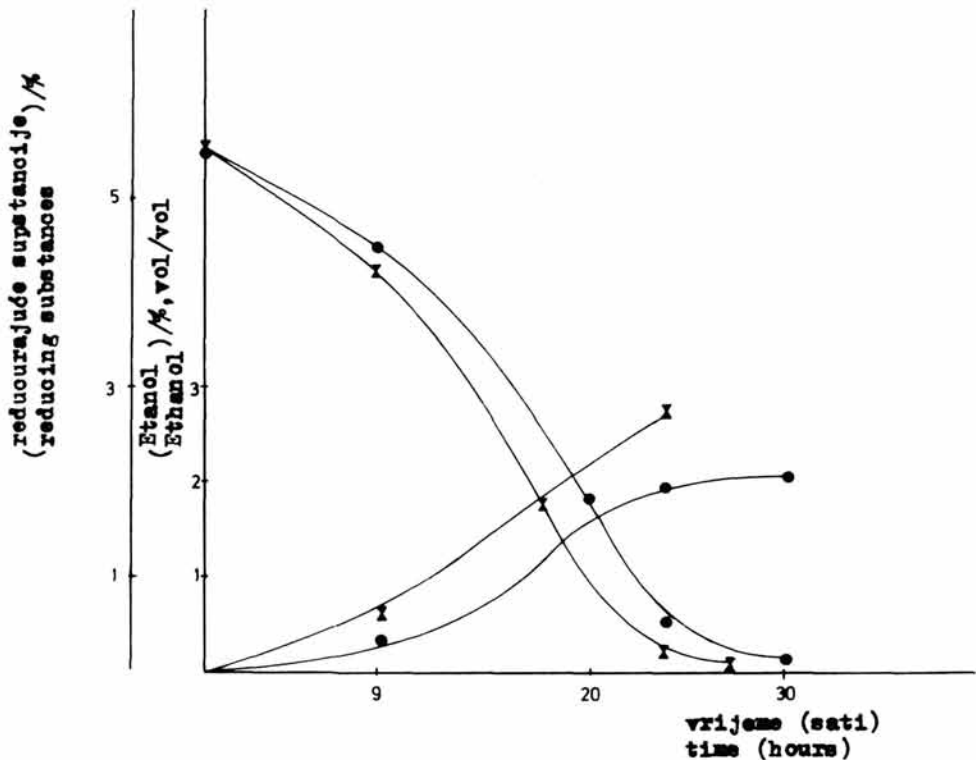


**Slika 2. Fermentacija sirutke uz dodatak različiti količina saharoze i početnu količinu inokuluma ( $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ )**  
**Figure 2. Fermentation of Whey With Addition of Different Amounts of Sucrose and an Initial Inoculum Content of ( $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ )**

—◆—◆—	15% saharoze	—◆—◆—	15% sucrose
—X—X—	10% saharoze	—X—X—	10% sucrose
—O—O—	5% saharoze	—O—O—	5% sucrose

S povećanjem količine inokuluma znatno se skraćuje vrijeme fermentacije, ali se specifična brzina fermentacije ne povećava nego je čak nešto niža ( $0,23 \text{ ml} \cdot \text{g} \cdot \text{h}^{-1}$ ). Fermentacijom u podlozi uz dodatak 5% saharoze postignut je najbolji stupanj konverzije supstrata u etanol ( $0,45 \text{ ml} \cdot \text{g}^{-1}$ ). Ukoliko se fermentacija provodi u podlozi s povećanom količinom šećera, veća količina inokuluma može znatno skratiti vrijeme procesa (Maiorella et al., 1984).

Utjecaj dodatka soli diamonijevog sulfata i diamonijevog hidrogen fosfata u podlogu koja sadrži 5% laktoze prikazuje slika 3.



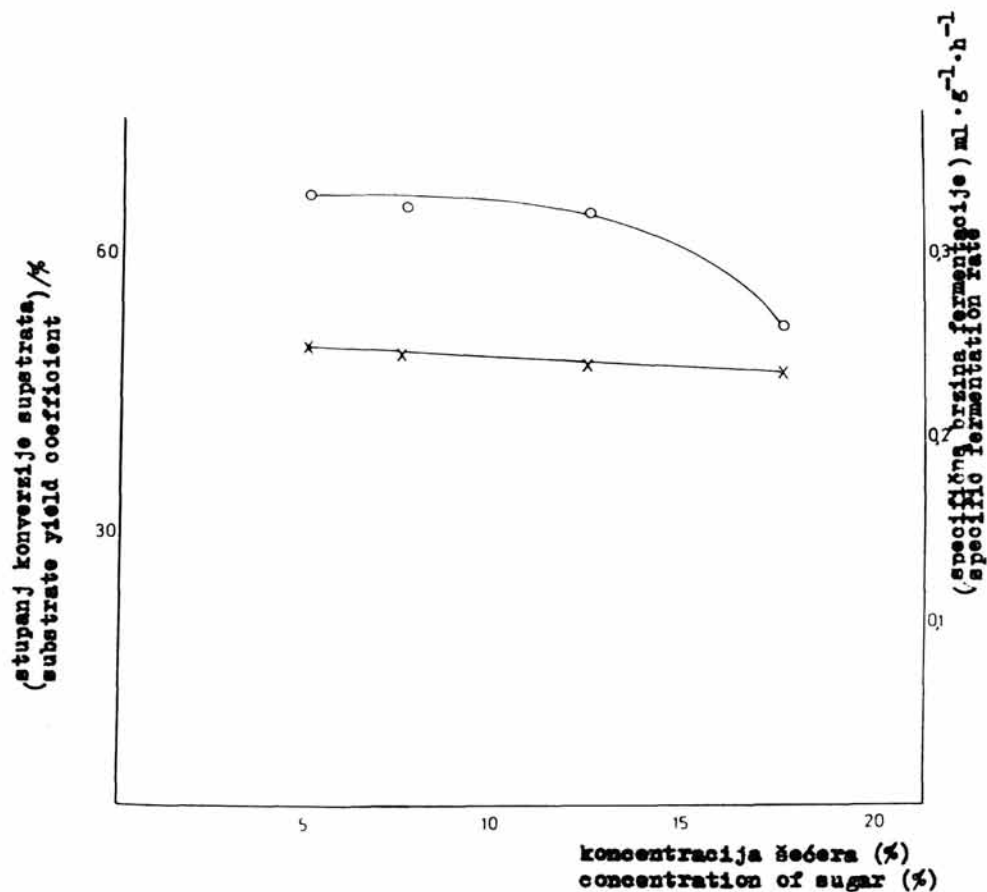
Slika 3. Kinetika sirutke s dodatkom amonijevih soli

Figure 3. Whey Fermentation With or Without Addition of Ammonium Salt

—X—X—	Dodatak soli	—X—X—	Addition of salt
—O—O—	Bez dodatka soli (kontrola)	—O—O—	Without addition of salt (control)

Iz slike se vidi da je specifična brzina fermentacije veća u podlozi koja sadrži soli, a i količina alkohola na kraju procesa je veća. Ako se fermentacija želi ubrzati, potrebno je dodati određenu količinu  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$  i  $(\text{NH}_4)_2 \text{HPO}_4$ . U tom se slučaju kvasac razmnožava brže, povećava se prosječna koncentracija kvasca u komini i aktivnost kvašćevih stanica.

Ovisnost stupnja konverzije šećera u alkohol i specifične brzine fermentacije o koncentraciji šećera u podlozi pri optimalnim uvjetima (pH i temp.) i početnoj količini inokuluma od 2 g s. tv. · L<sup>-1</sup> prikazuje slika 4.



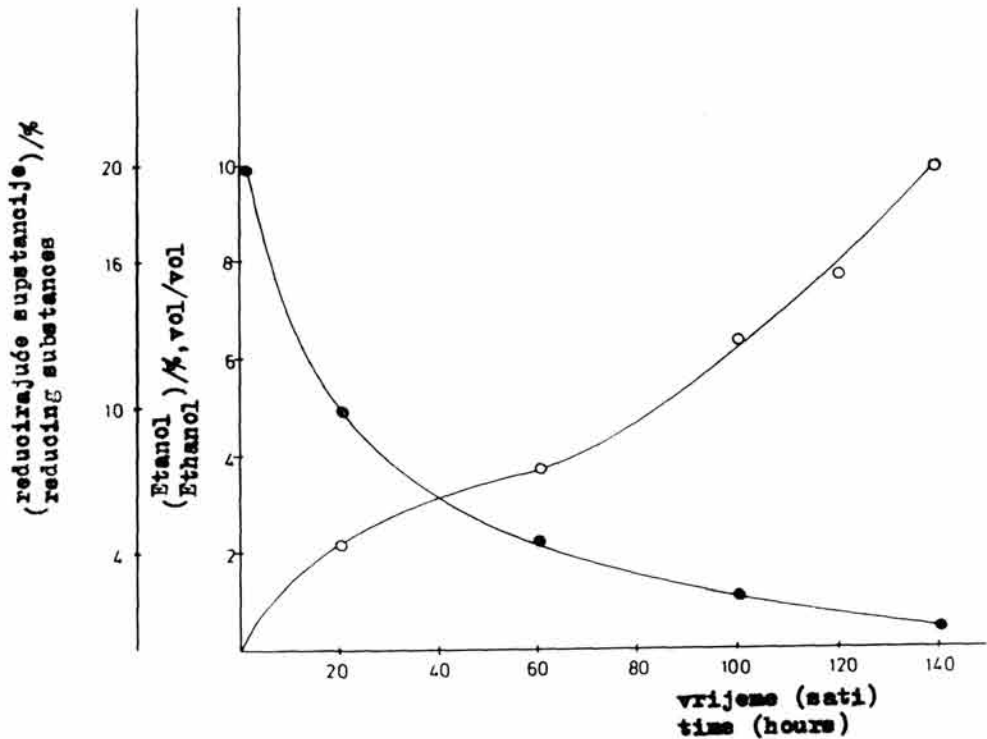
Slika 4. Utjecaj koncentracije šećera u podlozi na stupanj konverzije i specifičnu brzinu fermentacije

Figure 4. Influence of Sugar Concentration in the Medium on Substrate Yield Coefficient and Specific Fermentation Rate

—O—O— Specifična brzina fermentacije —O—O— Specific fermentation rate  
 —X—X— Iskorištenje supstrata —X—X— Substrate yield coefficient

Iz slike se vidi da su stupanj konverzije supstrata i specifična brzina fermentacije najbolji u podlozi s nižom koncentracijom šećera. Zato bi se procesi, u kojima se upotrebljava veća koncentracija šećera u podlozi, morali voditi s pritokom supstrata, da se izbjegne inhibitorni učinak visoke koncentracije

šećera. Provedena je i fermentacija sirutke obogaćene solima i dodatkom 15% saharoze s 1 g s. tv. · L<sup>-1</sup> kvašćevih stanica, u svrhu dobivanja vina iz sirutke.



Slika 5. Proizvodnja vina iz sirutke uz dodatak 15% saharoze

Figure 5. Production of Wine From Whey With Addition of 15% Sucrose

- |       |                                 |       |                                 |
|-------|---------------------------------|-------|---------------------------------|
| —○—○— | Koncentracija alkohola u komini | —○—○— | Ethanol concentration in medium |
| —●—●— | Koncentracija šećera u komini   | —●—●— | Sugar concentration in medium   |

Iz slike je vidljivo da je na kraju fermentacije količina alkohola bila zadovoljavajuća (cca 10%). Međutim, vrijeme fermentacije bilo je dugo (140 sati). Stupanj konverzije šećera u etanol bio je 0,5 ml · g<sup>-1</sup>, a specifična brzina fermentacije 0,397 ml g<sup>-1</sup> · h<sup>-1</sup>. Vrijeme fermentacije bi se smanjilo ukoliko bi se povećala količina inokuluma u podlozi, što dokazuje dijagram 2. Tako proizvedeno vino iz sirutke ne zadovoljava u potpunosti organoleptička svojstva (okus i miris). Poboljšanje arome dodatkom voćnih sokova opisali su Jang i sur. (1977). Naši rezultati proizvodnje vina iz sirutke uz dodatak saharoze u skladu su s rezultatima drugih autora (Kosikowski, 1981; Yoo, et. al., 1969).

### Zaključak

Na temelju prikazanih rezultata zaključuje se da kvasac *Kluyveromyces fragilis* uspješno fermentira laktozu iz sirutke, te saharozu dodanu u koncentracijama 5, 10 i 15%. Fermentacijom sirutke uz dodatak 5% saharoze i početnom količinom inokuluma od 2 g s. tv. · L<sup>-1</sup> postignut je najviši stupanj konverzije supstrata i specifična brzina fermentacije. Povećanjem količine početnog inokuluma na 5 g s. tv. · L<sup>-1</sup> skraćuje se vrijeme fermentacije, ali se ne povećava specifična brzina fermentacije i prinos alkohola.

Dodatkom soli diamonijev hidrogen fosfat i diamonijev sulfat u podlogu pospješuje se kinetika fermentacije.

Dodatkom 15% saharoze u sirutku može se dobiti vino sirutke s oko 10% etanola. Tako proizvedenom vinu sirutke potrebno je poboljšati organoleptička svojstva (okus, miris) dodacima kao što su voćni sokovi, voće, umjetne arome.

### Literatura

- KOSIKOWSKI F. V. (1981): Potential Value of Whey Drinks, **Technique Laitiere**, N° 925, 93, 95, 97.
- KRETSCHMAN H.: Hefe und Alkohol Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, 597—600, 1955.
- KOSARIĆ N; WIEIZORELE A; CASENITINO G; MAGGEL J. and PUNASIE E. (1983): **Ethanol Fermentation in Biotechnology** (ured. Rehm, Reed i J. Prenosil) 3 (257—385).
- MAIORELLA B. L. and CASTILLO F. J.: Ethanol, Biomass and Enzyme Production for Waste Abatement, *Process Biochem.* 157—161, 1984.
- O'LEARY V. S.; GREEN R.; SULLIVAN B. C. and HOLSINGER V. H. (1977): Alcohol Production by Selected Yeast Strains in Lactase-Hydrolyzed Acid Whey, **Biotechnol. Bioeng.** 19 1019—1035.
- VAJIĆ B.: Živežne namirnice — određivanje osnovnih sastojaka, (Skripta) Sveučilište u Zagrebu, 1964.
- YANG H. Y.; BODYFELT F. W.; BERGGREN K. E. and LARSON P. K.: Utilization of Cheese Whey for Wine Production EPA-600/2-77-106, Environmental Protection Technology Series, National Technical Information Service, Springfield, Virginia 22161, 1977.
- YOO B. W. and MOTLICH J. F. (1969): Utilization of Acid and Sweet Cheese Whey in Wine Production, **J. Dairy Sci.** 52, 900.