

Производство этанола в Бразилии: промышленный процесс и его влияние на брожение дрожжей

Луис Карлос Бассо, Тьяго Олитта Бассо, Саул Нитче Роча

Университет Сан-Паулу, Бразилия

1. Введение

Этанол является наиболее потребляемым биотопливом в мире. Бразилия - страна, которая впервые представила это возобновляемое топливо в своей энергетической матрице. В результате этой новаторской инициативы возникла крупная индустрия, и в настоящее время существует наиболее экономически целесообразный процесс производства биоэтанола. В течение десятилетий Бразилия была основным производителем, но недавно была превзойдена Соединенными Штатами. Тем не менее, Бразилия в настоящее время является крупнейшим экспортером этанола. Многие факторы повлияли на эффективность этой отрасли, такие как: сырье, ферментация и усовершенствования процессов. В этой статье будут представлены общие аспекты процесса ферментации бразильского этанола, будут отмечены многие улучшения и будет обсуждаться влияние особенностей этого процесса на дрожжевую ферментацию.

2. Краткая история производства этанола в Бразилии

Этанол является основным биотопливом, используемым для транспорта, а Бразилия является вторым по величине производителем биоэтанола и крупнейшим экспортером. На США (крупнейший производитель) и Бразилию приходится 70% мирового производства этанола (RFA, 2011). Производство сахара и этанола в Бразилии составляет 2,3% от валового внутреннего продукта, создавая 4,5 млн. рабочих мест. Кроме того, топливный этанол составляет почти 50% от общего объема топлива, потребляемого автомобилями (и легкими транспортными средствами). Сахарный тростник начал использоваться в Бразилии португальскими колонизаторами в начале 16-го века. Первые заводы по производству тростникового сахара (потребляемого в Европе) были созданы примерно в 1530 году (Amorim and Leão, 2005). Сегодня сахарный тростник является важной культурой в Бразилии, занимающей около 8 миллионов гектаров с производительностью более 600 миллионов тонн в год, что делает страну крупнейшим производителем сахарного тростника в мире. Бразильские знания в области производства этанола из сахарного тростника начали развиваться в колониальный период, когда фермеры производили бразильский дистиллированный спирт из сахарного тростника, «кашасу» (Basso and Rosa, 2010). Затем, с начала 20-го века, Бразилия использовала этанол в энергетических целях. В 1905 году были проведены первые испытания использования этанола в качестве топлива для двигателей транспортных средств. Эти испытания привлекли официальное внимание и привели к принятию закона, опубликованного в 1931 году, который определил, что этанол следует смешивать с бензином из расчета 5% (об./об.). Как и любая новая технология, этанол нуждался в экономических и политических инвестициях, чтобы сохранить свою жизнеспособность на национальном рынке, а также для борьбы с основным конкурентом - бензином. Тенденции изменились в начале 1970-х годов, когда нефтяной кризис утроил затраты на импорт нефти в Бразилию в 1973 году из-за арабского нефтяного эмбарго. Кроме того, мировые цены на сахар, которые росли с середины 60-х годов, резко снизились в 1974 году (Sandalow, 2006). Во время этих кардинальных изменений на мировом топливном рынке в 1975 году страна запустила Бразильскую национальную алкогольную программу (PROALCOOL), направленную на крупномасштабное производство этанола местными винокурнями и адаптацию двигателей к потреблению смеси E20 (20% и 80% этанола, бензина, соответственно) или даже чистый безводный этанол (Amorim и Leão, 2005). Для повышения конкурентоспособности этанола правительство предложило ссуды под низкие проценты для

строительства новых нефтеперерабатывающих заводов, и цены на бензин были установлены, чтобы дать этанолу конкурентное преимущество. Бразильская государственная нефтяная компания (Petrobras) начала инвестировать в распространение этанола по всей стране. После этого вмешательства производство этанола увеличилось более чем на 500% (Sandalow, 2006). В 1980-х годах основные автомобильные компании договорились об установке сборочных линий для автомобилей со 100%-ным этанолом. Это привело к высокому спросу, который достиг пика в половине десятилетия, когда поставки этанола в качестве топлива для транспортных средств составляли половину общего потребления топлива в Бразилии. Цены на нефть резко упали в 1985-86 гг. Параллельно плохой экономический период (о чем свидетельствует высокая инфляция) привел к тому, что правительство сократило субсидии промышленности по производству этанола, что привело к нехватке топлива на рынке. Тем не менее, в 1990-х годах бразильская экономика поднялась. Кроме того, мировой энергетический рынок, особенно цены на нефть и кризис в Азии, были благоприятными для производства этанола (Moreira, 2000). В первом десятилетии 2000 года гибкие топливные двигатели были специально разработаны для местного рынка Бразилии. Эти двигатели позволяют потребителям выбирать между этанолом и бензином, в зависимости от его цены на рынке. Косвенно это также способствовало регулированию рынка этанола. В настоящее время большая часть производимого этанола потребляется внутри страны. Из всех автомобилей, используемых в Бразилии, восемь из десяти являются автомобилями на гибком топливе - больше, чем в любой другой стране мира (Pilgrim, 2009).

3. Промышленный процесс

3.1 Исходное сырье

Технически этанол может быть получен из широкого спектра возобновляемого сырья, которое можно условно разделить на три основные группы: (1) те, которые содержат значительные количества легко сбраживаемых сахаров (сахарный тростник, сахарная свекла, сладкое сорго), (2) крахмалы и фруктозаны (кукуруза, картофель, рис, пшеница, агава) и (3) целлюлозная масса (солома, травы, початки кукурузы, древесина, жом сахарного тростника). Сахарный тростник, свекла и сладкий сорго обеспечивают простые сахара, такие как сахароза, глюкоза и фруктоза, которые могут легко сбраживаться дрожжами (Amoim и др. 2009). Это отличается от процессов производства этанола на основе крахмалистого или лигноцеллюлозного сырья, где необходим предварительный гидролиз полисахаридов с повышенными затратами на производство этанола (Dien и Bothast, 2009). Сырье оказывает большое влияние на себестоимость производства этанола, что также зависит от региона и его переработки. Производственные затраты зависят от совершенствования технологий и время от времени меняются, что делает реалистичное сравнение сложной задачей (Рис. 1).

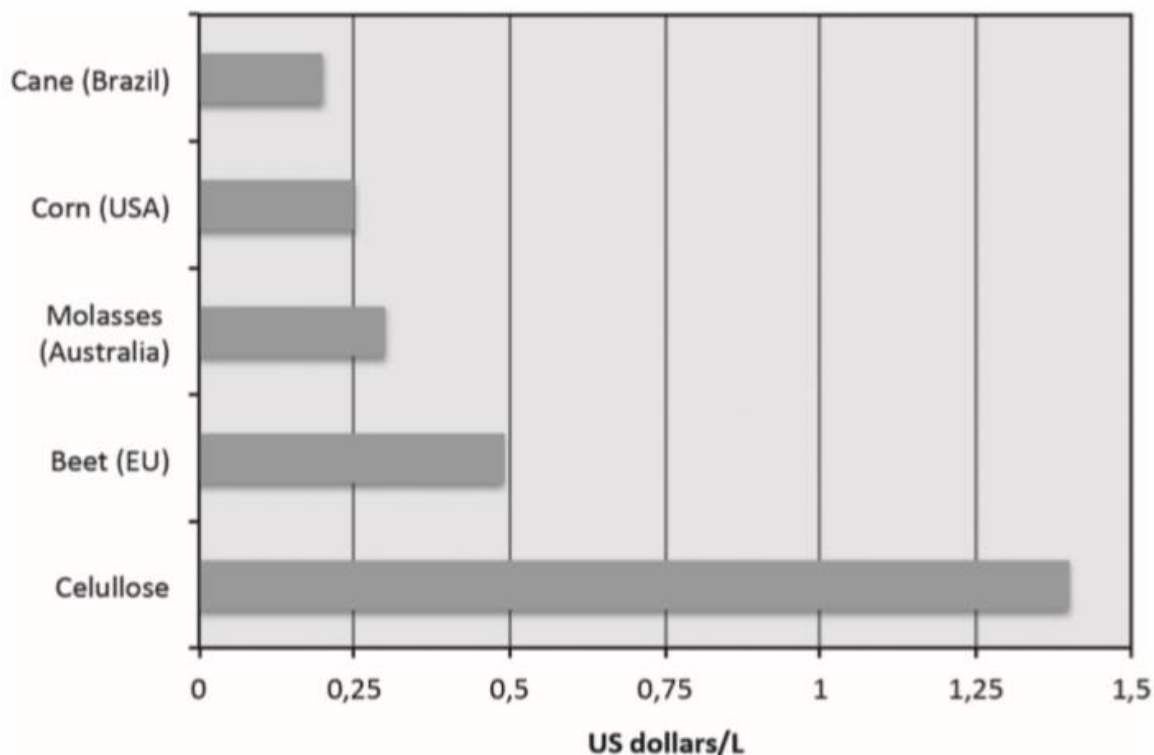


Рис. 1. Общая оценка затрат на производство этанола в долларах США / л из разных видов сырья и регионов из нескольких источников, доступных в 2007 году (Burnquist, 2007).

В качестве фотосинтетического вида С-4 сахарный тростник обладает очень высокой продуктивностью биомассы, составляющей 80-120 т / га в год при промышленном производстве этанола 8000 л / га, что выше по сравнению с 3000 л / га кукурузы. Азотфиксирующие эндофитные бактерии (в основном *Acetobacter diazotrophicus*, *Azospirillum* spp. и *Herbaspirillum* spp., *Gluconacetobacter diazotrophicus*) были обнаружены как в сахарном тростнике, так и в кукурузе. Было высказано предположение, что, по крайней мере, 60% потребности растений в азоте обеспечивается эндогенно, когда сахарный тростник выращивается в почве с низкой плодородностью (James и Olivares, 1997; Boddley, 1995; Wheals и др., 1999; Bertalan и др., 2009). Поскольку азотные удобрения довольно дороги и требуют огромного количества ископаемой энергии для их производства, сахарный тростник имеет экономические и экологические преимущества по сравнению с другими культурами. Устойчивость к засухе также способствует некоторым сельскохозяйственным преимуществам.

Сахарный тростник содержит в общем 12-17% сахаров (90% сахарозы и 10% глюкозы плюс фруктоза) в расчете на влажную массу с влажностью 68-72%. Средняя эффективность извлечения сахара путем дробления (или диффузии) составляет приблизительно 95-97% (Wheals и др., 1999). Багасса играет важную роль в энергетическом балансе этанола из сахарного тростника. Она составляет от 20 до 30% (с влажностью 50%) сахарного тростника на влажной основе и используется для выработки пара для измельчения, нагрева, дистилляции и, в последнее время, для выработки электроэнергии (ко-генерация), что делает завод по производству этанола не только самодостаточным, но также и экспортером энергии.

После начала нового тысячелетия несколько бразильских спиртовых заводов начали вкладывать средства в приобретение более эффективных котлов высокого давления (рабочее давление пара до 80 бар), производящих 120 кВт-ч/на тонну багассы. Совместное производство электроэнергии подняло уже до того положительный энергетический баланс. По словам Коэльо и соавт. (2006), энергетический баланс в промышленности этанола может быть выше, чем 10: 1 (выход: вход). Лайт

и соавт. (2005) оценивают его как 8:1. Основная энергия, затрачиваемая при производстве этанола из сахарного тростника, связана с сельскохозяйственными характеристиками, главным образом с использованием удобрений и транспорта. Что касается кукурузы, Sharourі и соавт. (2008) пришли к выводу, что энергетический баланс для этаноловых спиртовых заводов на основе кукурузы составлял 2,3: 1 или даже 2,8: 1. Эти значения намного выше, чем баланс, показанный Пиментелем (2003), который предполагал, что не происходит никакого прироста энергии при производстве этанола из кукурузы, так как энергетический баланс составляет 1:1. Кроме того, энергетические балансы для этанола, полученного из лигноцеллюлозы и сахарной свеклы, составили 5,6: 1 и 2: 1 соответственно (Elsayed и соавт., 2003).

Кроме того, поскольку перевозка грузов в Бразилии осуществляется главным образом автомобильным транспортом с использованием малотоннажных грузовых автомобилей, этот факт приводит к увеличению расхода энергии. Улучшения в этой области могли бы сделать этанол из сахарного тростника еще более выгодным. Ожидается также, что ферментация с очень высокой концентрацией (VHG) сделает такие показатели еще лучше, благодаря экономии энергии при перегонке и, в основном, при транспортировке барды в поле, поскольку этот побочный продукт будет генерироваться в более концентрированной форме и, следовательно, в меньшем объеме. Следовательно, энергетический баланс при производстве этанола из сахарного тростника является весьма положительным и намного выше, чем этанол, полученный из других источников.

3.2 Субстрат для ферментации

Традиционно производство этанола в Бразилии сочеталось с сахарной промышленностью (Basso and Rosa, 2010). Тростниковый сахар прессуется (некоторые заводы используют диффузию), в результате получается сок сахарного тростника и твердый волокнистый остаток, тростниковый жом. После осветления сок концентрируют выпариванием до кристаллизации сахарозы. Кристаллы сахарозы собирают центрифугированием, образуя вязкую фазу, насыщенную сахарозой, называемую тростниковой патокой с 45-60% сахарозы и 5-20% глюкозы плюс фруктоза. Первоначально производство этанола было налажено как способ переработки полученной мелассы в сахарной промышленности, но из-за возрастающей важности этанола в 80-х годах многие заводы стали автономными заводами по производству этанола. Со временем дополнительные инвестиции позволили мельницам направлять тростниковый сахар либо на рядный сахар, либо на этанол, и сегодня только несколько предприятий ориентированы на производство исключительно этанола без производства сахара. После этого в бразильском промышленном процессе по производству топливного этанола начали использовать сок сахарного тростника и патоку в качестве субстратов, смешанных в разных пропорциях. Действительно, некоторые заводы используют только сок, в то время как другие только мелассу, но смесь считается лучшим субстратом, поскольку в соке недостаточно питательных веществ, в то время как меласса имеет ингибирующие соединения для дрожжевого брожения. Минеральный состав субстратов сахарного тростника широко варьируется в зависимости от пропорции мелассы, используемой для составления среды, сорта и зрелости сахарного тростника, почвы, климата и переработки тростникового сока (Таблица 1).

Питательное вещество	Диапазон концентрации* (мг / л)	Оптимальный уровень * (мг / л)
Азот (NH ₄ + и R-NH ₂)	70-350	100-300
Фосфор	20-200	50-250
Калий	300-12,000	700-1,300
Магний	80-3,900	100-200
Сера	80-3,900	как можно ниже
Кальций	150-2000	как можно ниже

Цинк	0,45-9	1-5
Медь	0,20-8	1-5
Марганец	2-8	1-5
Алюминий **	2-500	<10 (в субстрате сока)

Таблица 1. Минеральный состав субстратов на основе сахарного тростника и рекомендуемые уровни для дрожжевого брожения (Amorim and Leão, 2005). * Концентрация элемента; ** Непитательное вещество, а токсическое вещество.

3.3. Ферментация (брожение).

Процесс осуществляется в периодической загрузке (75% заводов), также упоминаемой как процесс Мелле-Буно, или в непрерывном режиме, в обоих используется рециркуляция дрожжевых клеток. В обоих процессах после окончания ферментации дрожжевые клетки собирают центрифугированием и повторно используют в следующем цикле ферментации. До 90-95% дрожжевых клеток рециркулируется, что приводит к высокой плотности клеток внутри ферментера [от 10 до 14% (в пересчете на влажную массу / объем)]. Повторное использование клеток снижает потребность в интенсивном размножении дрожжей, и для образования биомассы расходуется меньше сахара. Подсчитано, что дрожжевая биомасса увеличивается на 5-10% (по отношению к исходной биомассе) в течение цикла ферментации, что достаточно для замены дрожжевых клеток, потерянных на стадии центрифугирования. Эта высокая дрожжевая биомасса внутри ферментера ответственна за очень короткое время ферментации, от 6 до 10 часов, по сравнению с 40-50 часами в процессе ферментации кукурузы. Обычно температура поддерживается на уровне от 32 до 35 °С, но из-за короткого времени ферментации охлаждение не всегда достаточно эффективно для отвода тепла, и температура может достигать 40 °С, особенно в летний сезон (Lima и др., 2001; Lalice, 1991; Wheals и др., 1999; Lima и др., 2001; Amorim и др., 2004; Andrietta и др., 2002).

Как правило, ферментация начинается с добавления тростникового сусла (приготовленного путем смешивания тростникового сока и патоки в любой пропорции), который содержит от 18 до 22% (мас. / мас.) общих редуцирующих сахаров (TRS), к суспензии дрожжевых клеток. Эта дрожжевая суспензия (приблизительно с 30% дрожжевых клеток на влажной основе) составляет от 25 до 30% от общего объема ферментации и проводится в резервуарах объемом от 300 до 3000 м³. Этот большой инокулят обычно готовят путем смешивания от 2 до 12 тонн пекарских дрожжей с 10 до 300 кг выбранных штаммов в форме активных сухих дрожжей. Время кормления обычно длится от 4 до 6 часов, а ферментация заканчивается в течение 6-10 часов, что приводит к титрам этанола от 8 до 12% (об. / об.). Когда ферментация прекращается, дрожжевые клетки отделяются центрифугированием, что приводит к концентрированной суспензии дрожжевых клеток (дрожжевой «крем») с 60-70% (в пересчете на влажную массу / об) клеток. Дрожжевой крем разводят водой (1: 1) и обрабатывают серной кислотой (рН 1,8 - 2,5) в течение 2 часов, чтобы уменьшить бактериальное загрязнение и повторно использовать в качестве стартера для следующего цикла ферментации. Эта особенность переработки делает бразильский процесс весьма своеобразным, так как дрожжевые клетки используются не реже двух раз в день в течение сезона производства 200-250 дней. Перемешивание в резервуаре также желательно при низкой мощности только для того, чтобы избежать уплотнения ячеек на дне резервуара и сохранить более высокую поверхность контакта с подложкой.

После центрифугирования бражку направляют на дистилляцию для извлечения этанола, обычно с использованием технологии тарелок для дистилляции. После перегонки получается жидкий поток, называемый барда или «виньяс», в соотношении 10-15 литров на литр произведенного этанола, и доставляется на поля тростника для использования в качестве поливной воды и удобрения

(добавление в почву калия, кальция, магния, другие микроэлементы и некоторые органические вещества).

По сравнению с непрерывным режимом процесс Мелле-Буно (Рис. 2) показал более высокие доходность и производительность, более низкие уровни загрязнения, и его было легче чистить (Zhang, 2009). Но согласно Andrietta и др. (2007) полезные черты непрерывной версии маскируются неправильной инженерной концепцией недорогой адаптации периодического процесса к непрерывным установкам.

4. Влияние производственных условий на физиологию дрожжей и динамику популяций.

4.1 Промышленные стрессы.

Как уже отмечалось ранее, промышленные штаммы дрожжей сталкиваются с несколькими одновременными или последовательными стрессовыми условиями, вызванными самим процессом, такими как: высокие титры этанола, высокое осмотическое давление, низкий pH, высокая температура и многие другие, все они усиливаются из-за практики утилизации (рециклинга) клеток.

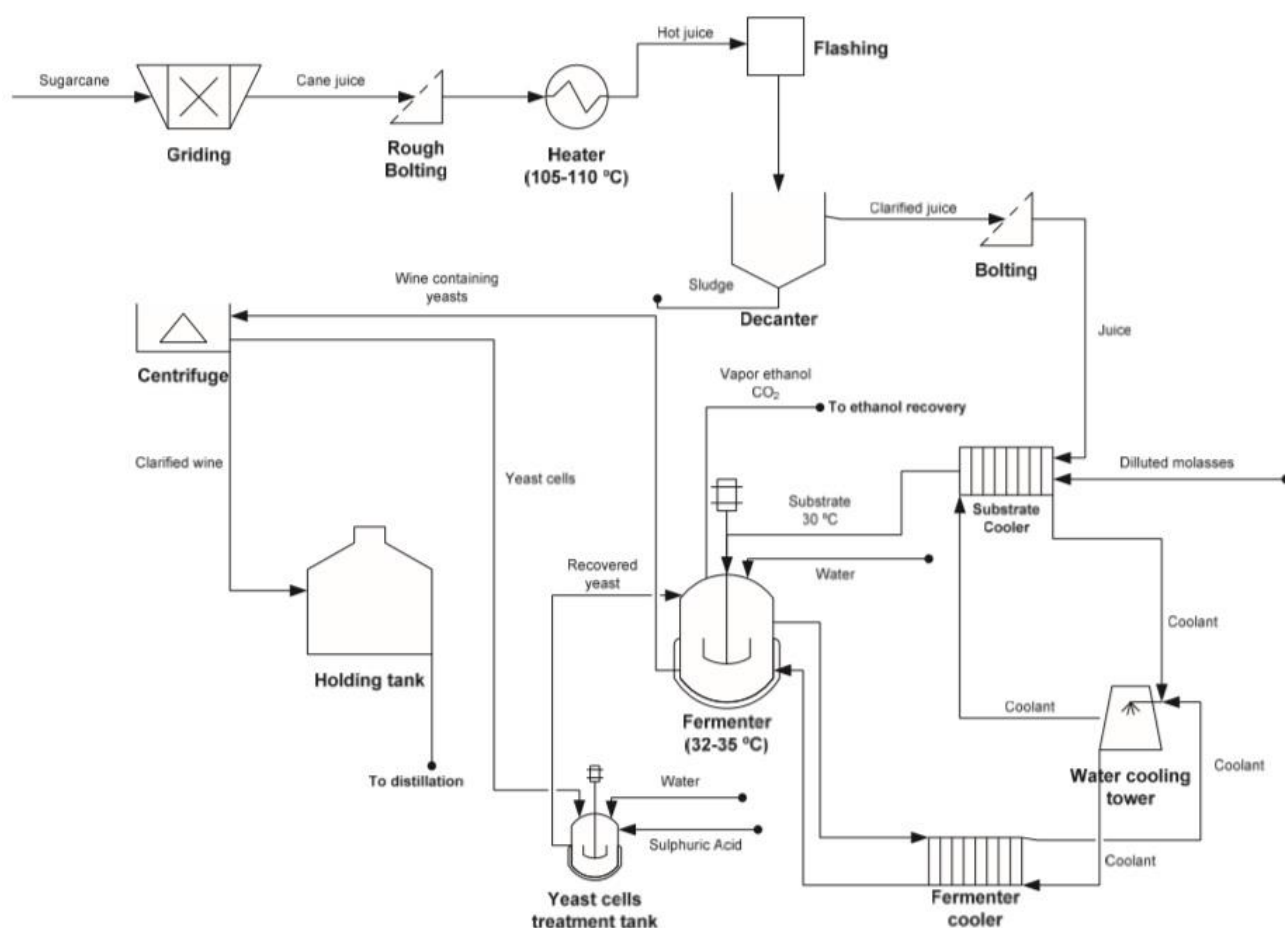


Рис. 2. Схема периодического процесса с подпиткой с переработкой клеток (Melle-Boinot).

4.1.1 Осмотический стресс

Осмотический стресс часто упоминается в различных производственных процессах. При ферментации топливного этанола на основе сахарного тростника дрожжи часто подвергаются воздействию высоких концентраций сахара, так как конечное содержание этанола в 8-12% (об. / Об.) Очень часто достигается. Теоретически, концентрация сахара, необходимая для получения

концентраций этанола 12%, будет составлять около 20% (вес / объем) от TRS, учитывая выход этанола 90%. Однако дрожжи никогда не сталкиваются с такими концентрациями сахара во время промышленной ферментации. Это связано с тем, что во время периодического процесса с подпиткой, с 4-6 ч времени дрожжегенерации, общая концентрация сахара едва превышает 5-7% (вес / вес). Действительно, в некоторых случаях уровень потребления сахара дрожжевыми клетками равен скорости утилизации сахара, и очень низкие уровни сахара [$<2\%$ (вес / объем)] достигаются во время ферментации. Следовательно, можно сделать вывод, что осмотическим напряжением, создаваемым сахарами, можно практически пренебречь, особенно в случае производства топливного этанола, осуществляемого в режиме с подпиткой. С другой стороны, вызывает беспокойство осмотический стресс, вызванный солями, которые присутствуют в больших количествах в патоке сахарного тростника. Высокие уровни калия, кальция и магния, содержащиеся в этом субстрате, намного превосходят требования к дрожжевому питанию. Средние уровни калия (4000 мг / л) достаточно высоки, чтобы вызвать стрессовые реакции у ферментирующих (бродящих) дрожжей, увеличивая образование глицерина, уменьшая запасы углеводов в дрожжах и снижая выход этанола (Alves, 2000).

Часто наблюдается повышенное образование глицерина в условиях осмотического стресса (Brumm & Hebeda, 1988; Myers et al, 1997), а также во время других стрессовых ситуаций, таких как бактериальное загрязнение (Alves, 1994; Gomes, 2009). Это говорит о том, что увеличенное образование этого метаболита может быть показателем общих стрессовых состояний во время промышленных брожений. Глицерин является основным побочным продуктом в процессе ферментации, в основном образующимся в результате реакций повторного окисления с целью потребления избыточного NADH, образующегося во время биосинтеза в анаэробных условиях (van Dijken e Scheffers, 1986). В результате во время промышленной ферментации от 5 до 8% сахара, потребляемого дрожжевыми клетками, направляется в глицерин (Oura, 1977). Снижение количества этого полиола считается перспективным путем для увеличения выхода этанола. Это может быть достигнуто путем регулирования скорости подачи во время периодического процесса с подпиткой или путем выбора штаммов, которые производят меньше глицерина. Оба подхода считаются перспективными путями для увеличения выхода этанола, и они наблюдаются как в лабораторных условиях, так и в промышленной практике.

4.1.2 Этанольный стресс

Ввиду высоких концентраций этанола в конце каждого цикла ферментации [8-12% (об. / об.)] Этот спирт является одним из основных стрессовых факторов, действующих на дрожжи. Ингибирующая (замедляющая) роль этанола в отношении *S. cerevisiae* до конца не изучена. Тем не менее, основной мишенью этанола считается цитоплазматическая мембрана дрожжевых клеток (Thomas и др., 1978; Alexandre и др., 2001). Текучесть мембраны, которая связана с ее липидным составом, глубоко изменяется в присутствии этанола, и, как следствие, значительно ухудшается проницаемость мембраны для некоторых ионов (особенно ионов H⁺). Когда ионы попадают в клетку, на мембране происходит рассеяние электрохимического градиента, что, в свою очередь, влияет на формирование и поддержание движущей силы протона с последующим снижением внутриклеточного pH. Помимо влияния на состав мембран дрожжей, существует несколько других воздействий этанола на физиологию дрожжей во время ферментации, включая ингибирование роста и ферментативную инактивацию (снижение бродильной активности), что приводит к снижению жизнеспособности клеток.

Повторное использование клеток (рецикл дрожжей) создает жесткие условия для промышленных штаммов. Клетки дрожжей должны сохранять высокую жизнеспособность в конце каждого цикла ферментации, чтобы справиться со следующим. Вот почему данный штамм может хорошо работать в одном цикле ферментации с конечным содержанием этанола 18% (об. / об.), но не может быть

переработан для последующих циклов ферментации. Действительно, если физиологическое состояние дрожжей, а именно жизнеспособность клеток в конце ферментации, не вызывает беспокойства, можно легко достичь более высокого содержания этанола. Это наблюдается в некоторых процессах ферментации на основе кукурузы и злаков, когда при использовании пшеницы и приготовленных пюре получают от 17 до 23% (об. / об.) концентраций этанола (Jones и др., 1994; Bayrock и Ingledew, 2001).

Несмотря на эти проблемы, желательны ферментации с высоким содержанием этанола, чтобы снизить потребление воды и затраты энергии на стадии перегонки. Также ожидается, что это условие ферментации будет способствовать энергетическому балансу производимого этанола и улучшит устойчивость промышленного процесса. Однако в большинстве спиртовых заводов конечное содержание этанола ограничено толерантностью к ферментации в отношении этанола. Кроме того, стресс от этанола может усиливаться при высокой температуре и кислотности, и все эти стрессовые факторы воздействуют одновременно или последовательно на дрожжи при промышленной ферментации (Dorta и др., 2006). В настоящее время ведется большая исследовательская работа по поиску штаммов дрожжей, устойчивых к этанолу, для использования в ферментациях с высоким содержанием этанола, особенно в случае рецикла клеток.

Генетическая основа толерантности к этанолу является полигенной и сложной. Более 250 генов, по-видимому, связаны с этим признаком (Alexandre и др., 2001; Ну и др., 2007). Большинство из этих генов связаны с энергетическим обменом, синтезом липидов, ионным гомеостазом, синтезом трегалозы и т. д. Это означает, что повышение толерантности дрожжей к этанолу с помощью рационального подхода является сложной задачей, а более «слепой» подход (такой как перестановка генома, мутагенез, направленная эволюция) может быть полезен при поиске таких штаммов (Stephanopoulos, 2002; Sakar и др., 2005; Giudici и др., 2005).

4.1.3 Кислотный стресс

Хотя хорошо известно, что дрожжи, как правило, могут переносить низкий уровень pH, обработка культуры дрожжей серной кислотой (pH от 1,8 до 2,5 в течение нескольких часов) с целью уменьшения бактериального загрязнения вызывает физиологические нарушения в организме дрожжевых клеток. Это наблюдается по утечке минералов (N, P, K, Mg) и снижению уровня дрожжевой клеточной трегалозы параллельно с падением жизнеспособности клеток (Ferreira и др. 1999). Штаммы дрожжей, которые переносят стрессовые условия промышленной ферментации, обычно имеют более высокий уровень трегалозы (Basso и др., 2008). Несомненно, недиссоциированные органические слабые кислоты, присутствующие в субстрате или продуцируемые загрязняющими бактериями, могут снижать внутриклеточный pH с последующей транслокацией ионов через плазматическую мембрану дрожжей. Эти события усиливаются низким pH ферментационной среды (бражки). Остаточные уровни сульфита (SO₂), используемого для осветления тростникового сока, можно обнаружить, в частности, в субстратах мелассы. Хотя сульфит считается токсичным веществом для дрожжей на уровне 200 мг / л, он может считаться полезным для ферментации, если он способен снизить бактериальное загрязнение (Alves, 1994).

4.1.4 Другие стрессы

Наличие токсичных уровней алюминия в промышленных субстратах на основе тростника также является причиной снижения эффективности ферментации (брожения). Из-за кислых условий брожения алюминий (поглощенный сахарным тростником в кислых почвах) в основном присутствует в виде токсичной формы (Al³⁺), что приводит к серьезным проблемам во время брожения. Это отрицательно влияет на жизнеспособность дрожжей, уровень клеточной трегалозы, скорость ферментации и выход этанола. Токсическое воздействие алюминия может быть частично смягчено ионами магния и полностью устранено в богатой мелассой среде, что указывает на

присутствие хелатообразующих соединений в этом субстрате (Basso и др., 2004). Промышленные штаммы дрожжей сильно различаются по толерантности к алюминию с точки зрения жизнеспособности клеток, выхода этанола и накопления алюминия в клетках. *S. cerevisiae* CAT-1 менее чувствителен по сравнению с PE-2 и коммерческими пекарскими дрожжами. В промышленной практике высокие уровни алюминия связаны с низкой жизнеспособностью клеток и сниженным выходом этанола. Очень низкие уровни кадмия были обнаружены в сахарном тростнике из района, удобренного обработанным осадком городских сточных вод (Silva и др. 2010). Тем не менее, рецикл (повторное использование) клеток и способность накопления кадмия в дрожжах привели к токсичному уровню этого металла для дрожжевого брожения. Клетки дрожжей имели низкую жизнеспособность, пониженное поглощение сахара, пониженные уровни трегалозы и низкий выход этанола. Винасса (стоки, образующиеся после дистилляции этанола), когда она используется в качестве субстратной добавки, показал свою эффективность в снижении токсического действия алюминия и кадмия на дрожжи (Oliveira и др., 2009; Mariano-da-Silva, 2001; Mariano-da-Silva и Basso, 2004). Считается, что хелатинообразующие соединения, присутствующие в винассе, были ответственны за смягчение токсического воздействия тяжелых металлов.

Было предпринято несколько попыток выбрать термоустойчивые штаммы для промышленной ферментации (Laluce, 1991). С другой стороны, известно, что высокая температура усиливает стрессовое воздействие этанола и кислот на дрожжи. Поскольку бактериальное загрязнение сильно стимулируется температурой выше 32 ° C, возможность более высоких температур спорна. В настоящее время из-за преимуществ использования ферментации с очень высокой плотностью (VHG) более низкая температура (27 ° C) назначается в качестве способа снижения токсичности алкоголя. Все эти предложения еще предстоит оценить в промышленном масштабе.

Другие факторы стресса, такие как гербициды, используемые на полях сахарного тростника, фенолы, обнаруженные в соке сахарного тростника, избыточное количество железа в патоке и другие, вероятно, влияют на дрожжи во время промышленной ферментации, но их влияние еще предстоит продемонстрировать. Кроме того, резкие изменения в физиологических условиях во время ферментации, поскольку скорость кормления, кислотная обработка и частая остановка, все это серьезно влияет на ферментативную активность дрожжей.

4.1.5 Бактериальное загрязнение

Ввиду характера промышленного процесса и больших объемов обрабатываемых субстратов очень трудно достичь асептических условий, и ферментация обычно происходит с бактериальным загрязнением. Это часто рассматривается как главный недостаток при промышленной ферментации этанола. Помимо отклонения сахара в сырье при образовании этанола, существует также вредное влияние бактериальных метаболитов (таких как молочная и уксусная кислоты) на ферментативную активность дрожжей, что приводит к снижению выхода этанола, флокуляции дрожжевых клеток, образованию пены и низкой жизнеспособности дрожжей (Yokoуа и др. , 1997; Narendranath и др., 1997; Bayrock & Ingledew, 2004; Eggleston и др. 2007). Индуцированная дрожжевая флокуляция ухудшает эффективность центрифуги и уменьшает поверхность контакта между дрожжами и средой. Чрезмерное пенообразование увеличивает затраты из-за использования большего количества пеногасителей, чтобы уменьшить свободное пространство., Использование антибиотиков для уменьшения загрязнения увеличивает затраты, а также их остаточные уровни, делают сухие дрожжи (побочный продукт производства этанола) неподходящими для коммерциализации (для потребления человеком или кормом для животных). Большинство бактериальных загрязняющих веществ во время ферментативной стадии производства этанола представляют собой молочнокислые бактерии (LAB), вероятно, из-за их более высокой способности справляться с низкими значениями pH и высокими концентрациями этанола по сравнению с другими микроорганизмами (Kandler, 1983; Skinner and Leathers, 2004).

В опросе, в котором исследовали идентичность этих загрязнителей во время промышленной ферментации на заводах по производству этанола (спиртзаводах), расположенных в Бразилии, Gallo et al. (1990) обнаружили, что *Lactobacillus* был наиболее распространенным изолированным родом. Недавно Lucena et al. (2010) показали, что LAB являются наиболее распространенными загрязнителями на спиртзаводах, расположенных в северо-восточном регионе Бразилии. LAB традиционно классифицируют в две метаболические подгруппы в соответствии с путем, используемым для метаболизма гексозных сахаров: гомо- и гетероферментативные (Kandler, 1983), и бактериальные изоляты из промышленных ферментированных субстратов сахарного тростника, охватывают как гомо-, так и гетероферментирующие лактобациллы. (Costa et al., 2008). Также было обнаружено, что такие загрязняющие бактерии продуцируют оптические изомеры молочной кислоты L (+) - и D (-). Некоторые штаммы продуцируют только форму L (+), другие - только форму D (-), но большинство штаммов продуцируют разные пропорции обоих изомеров. Поскольку титр молочной кислоты является индикатором уровня бактериального загрязнения, а ферментативный набор, используемый для этой цели, обнаруживает только изомер L (+), можно ожидать, что отрицательное влияние загрязнения недооценивается, поскольку изомер D (-) не вычислен (Costa и др., 2008).

4.2 Важность дрожжевого гликогена и трегалозы в условиях стресса

Как было сказано ранее, жизнеспособность дрожжей имеет большое значение в процессе на основе Мелле-Буно, поскольку клетки будут повторно использоваться в последующих циклах ферментации. У дрожжевых клеток при ферментации в стрессовых условиях обычно наблюдается снижение жизнеспособности клеток, увеличение образования глицерина, снижение выхода биомассы, а также снижение уровня углеводов хранения, таких как гликоген и трегалоза. Все эти параметры являются чрезвычайно полезными показателями, которые можно использовать для выбора новых толерантных штаммов. Следовательно, гликоген и трегалоза [два основных запасных углевода в *S. cerevisiae*, на которые приходится до 25% биомассы дрожжей (вес / вес в сухом состоянии)], были вовлечены с толерантностью к нескольким стрессам (Attfield, 1997; D'Amore и др. 1991; Parrou и др., 1997; Singer & Lindquist, 1998).

Во время периодической ферментации с подпиткой трегалоза и гликоген демонстрируют большие различия. Эти два соединения первоначально разлагаются в ответ на повышение уровня сахара в среде и восстанавливаются, когда уровни сахара снижаются к концу ферментации (Alves, 2000). Уровни этих запасов выше в конце по сравнению с началом ферментации. Следовательно, значительное количество сахаров хранится в виде гликогена и трегалосеата за счет производства этанола. К счастью, высокий уровень запасов углеводов имеет первостепенное значение для дрожжей, чтобы противостоять стрессовой кислотной промывке, навязанной производственным процессом. Во время обработки часть гликогена и трегалозы диссимилируется посредством гликолиза, а этанол образуется во время кислотной обработки без наличия сахара в среде (Ferreira и др., 1999). В конце кислотной обработки уровни этих резервов достаточны, чтобы гарантировать высокую жизнеспособность. Считается, что высокая толерантность промышленных штаммов частично объясняется их более высоким уровнем гликогена и трегалозы по сравнению с менее стойкими штаммами.

4.3 Стартовый штамм и конкуренция с местными *Saccharomyces* во время ферментации

Молекулярные методы, такие как кариотипирование и ПЦР-фингерпринтинг, использовались для мониторинга динамики популяции дрожжей во время промышленной ферментации. В начале 1990-х годов Basso и др. (1993) впервые подтвердили, что некоторые традиционные заквасочные штаммы (пекарские дрожжи и два других штамма *S. cerevisiae* TA и NF) были заменены местными (загрязняющими) дрожжами в период до 40 дней переработки. Это исследование было выполнено на 5 заводах в штате Сан-Паулу (юго-восточный регион Бразилии) в течение двух сезонов урожая

(1991-1993). Фактически, последовательность различных местных штаммов *S. cerevisiae* была обнаружена в течение всех сезонов брожения в большинстве спиртовых заводов. Хотя стартовые штаммы не могли сохраняться во время рециркуляции клеток, было показано, что дикий штамм (JA-1), ранее выделенный из одного из спиртовых заводов, был способен доминировать при повторном введении в процесс. Это было важным показателем для отбора штаммов из огромного биоразнообразия, обнаруженного на спиртзаводах. В последнее время в выборке, насчитывающей до 70 спиртзаводов, было подтверждено, что пекарские дрожжи были быстро заменены дикими штаммами за очень короткий период (от 20 до 60 дней) рециркуляции клеток (Basso и др., 2008). В ходе этого исследования было также продемонстрировано, что никакие штаммы (от пивоварения, виноделия, перегонки), кроме тех, которые были выделены из промышленного процесса, не могли быть имплантированы в исследуемые винокурни. Да Силва и соавт. (2005) использовали метод ПЦР-фингерпринтинга в качестве метода иллюстрации динамики популяции дрожжей во время промышленной ферментации. Было вновь показано, что местные штаммы заменили коммерческие стартовые штаммы в процессе переработки. Используя эту методику в сочетании с физиологическими анализами, можно было выделить местный штамм (JP1), который будет использоваться в качестве стартовой культуры для северо-восточных спиртовых заводов (Da Silva и др., 2005).

Различная пропорция не-*Saccharomyces* штаммов загрязняет стадию ферментации. Было обнаружено, что *Dekkera bruxellensis*, *Candida tropicalis*, *Pichia galeiformis*, *Schizosaccharomyces pombe* и *C. krusei* являются основными загрязнителями в эпизодах острого загрязнения, отвечающими за снижение выхода этанола. Лишь немногие спиртовые заводы (<5%), расположенные в центральных и юго-восточных регионах Бразилии (ответственных за большую часть производства этанола), обнаруживают загрязнение не-*Saccharomyces* дрожжами (Basso и др., 2008). С другой стороны, около 30% заводов, расположенных в северо-восточном регионе страны, страдают от этого особого загрязнения (Basillo и др., 2008).

4.4 Отбор подходящих штаммов из биоразнообразия, обнаруженного на заводах

Путем мониторинга динамики популяции дрожжей во время промышленной ферментации были отобраны доминантные и устойчивые местные штаммы, которые использовались в качестве стартовых штаммов. Одним примером (упомянутым выше) является случай штамма JP1. Это высоко доминирующий штамм, который проявляет стрессоустойчивость к кислотному pH, высокому уровню этанола и высокой температуре. Кроме того, он обладает ферментативными свойствами, аналогичными другим коммерческим промышленным штаммам. Этот штамм был повторно введен в качестве стартового в один из выделенных заводов, и динамика населения этого завода ежемесячно отслеживалась в течение двух последовательных производственных сезонов. Было обнаружено, что штамм способен доминировать в популяции дрожжей, обеспечивая высокий выход этанола (> 90%) в течение этого периода (Da Silva и др., 2005). Наиболее обширное исследование динамики популяции дрожжей было выполнено Basso и др. (2008), с ежемесячной схемой отбора проб дрожжей из множества 70 заводов, ответственных за большую часть произведенного бразильского этанола и охватывающих период 12 лет. В течение этого периода штаммы с преобладанием (которое доминирует в популяции дрожжей в процессе брожения) и устойчивостью (присутствующим в течение 200-дневного сезона) были идентифицированы путем кариотипирования, выделены и проверены в лабораторных исследованиях на наличие желательных признаков брожения (отсутствие флокуляции, низкое образование пены, высокий выход этанола, низкое образование глицерина, высокая жизнеспособность при утилизации и высокое содержание клеточного гликогена и трегалозы). Как только многообещающий штамм был идентифицирован, он был размножен в лаборатории и повторно введен во многие спиртовые заводы (до 54, в зависимости от сезона) с последующим кариотипированием. В ходе исследования до 14 отобранных штаммов были повторно введены в промышленные процессы. Некоторые из них

(например, PE-2) отслеживались в течение 10 лет на разных винокурнях, включая разные регионы, разные процессы (с подпиткой или непрерывно), разные субстраты (меласса / сок) и, таким образом, охватывали большие различия.

Большинство оцениваемых штаммов не были способны постоянно сохраняться среди дрожжевой популяции. С другой стороны, некоторые штаммы могли доминировать в ферментативной популяции в течение нескольких сезонов. Вероятно, изменения условий процесса, климата, субстрата и т. д. ответственны за сниженные способности имплантации этих штаммов. Немногие штаммы могли сохраняться во многих винокурнях в течение многих сезонов. Штаммы PE-2 и CAT-1 показали самые высокие возможности имплантации. Эти штаммы могут быть имплантированы в 51-58% заводов, где они были введены. Они также продемонстрировали более высокую конкурентоспособность в отношении загрязняющих штаммов, что составляет в среднем от 45 до 54% биомассы дрожжей в течение периода ферментации. В некоторых винокурнях эти штаммы представляли общую биомассу реактора в течение всего сезона (более 200 дней переработки). Из-за этих замечательных особенностей промышленной ферментации CAT-1 и PE-2 являются наиболее часто используемыми стартовыми штаммами, представляя сегодня 80% коммерчески активных сухих дрожжей для топливного этанола в Бразилии. Они ежегодно используются в более чем 200 заводах, на которые приходится 60% общего производства этанола в стране.

Несмотря на то, что отбор местных штаммов считается привлекательной стратегией, гарантирующей высокую урожайность и однородность популяции во время промышленной ферментации, этот подход является трудоемким и не всегда успешным. Как назначено Бассо и соавт. (2008), после 12-летней программы селекции дрожжей, среди 14 отобранных штаммов, демонстрирующих высокую эффективность в лабораторных исследованиях, лишь немногие продемонстрировали высокую способность к имплантации при повторном введении в производственный процесс.

Вероятно, процедуры лабораторного скрининга не моделируют все стрессовые агенты, с которыми сталкиваются дрожжи в промышленном процессе. Другим важным фактором могут быть различия, которые происходят в промышленных ферментациях от одного сезона к другому. Стоит отметить, что каждая винокурня имеет специфические особенности процесса, придающие дрожжам разные напряжения с разными величинами. Это может объяснить, что данный штамм хорошо работает только в нескольких винокурнях (иногда только в одном) и только в течение одного или нескольких сезонов. В заключение можно сказать, что любой выбранный штамм должен оцениваться в промышленных условиях на как можно большем количестве заводов в течение многих сезонов. Наиболее важным и редким признаком превосходных заквасок для дрожжей является способность к имплантации, поскольку хороший профиль ферментации (в лабораторных скрининговых экспериментах) легче обнаружить среди местных и даже лабораторных штаммов.

5. Будущие тенденции и заключительные замечания

Можно предвидеть, что производство биоэтанола в Бразилии, как ожидается, будет непрерывно расти из-за растущих инвестиций в эту область. Строятся новые заводы, в результате чего по всей стране работает почти 400 заводов (МАРА, 2011). В следующем сезоне они будут производить около 30 миллиардов литров этанола. Хотя производство биоэтанола в Бразилии считается зрелым процессом, есть много возможностей для улучшения. В настоящее время широкий интерес к использованию ферментации с очень высокой плотностью (VHG) в промышленном сценарии в основном сосредоточен на снижении производственных затрат. Также ожидается, что эта технология принесет пользу общей экологической устойчивости процесса за счет снижения потребления воды и энергии. Таким образом, по-прежнему возможно повысить эффективность процесса получения топливного этанола первого поколения, применяя эту технологию. Ферментации, приводящие к высоким титрам этанола, не только улучшат энергетический баланс,

но также приведут к значительному уменьшению объема виннасы. Это приведет к значительному экономическому и экологическому воздействию из-за снижения затрат на транспортировку и сбор винасы в качестве удобрения на плантациях сахарного тростника. Кроме того, более высокие концентрации этанола будут подавлять рост бактерий во время ферментации и по этой причине уменьшать использование антибиотиков для контроля таких загрязнений.

Несмотря на все эти преимущества, внедрение технологии VHG в бразильском промышленном сценарии ограничено наличием штаммов с очень высокой устойчивостью к этанолу. Ожидается, что для ферментации VHG субстраты будут составлены с большим количеством патоки, где сахара находятся в концентрированной форме. В результате, помимо продолжительного стресса от этанола, дрожжи будут подвергаться другим стрессам от патоки.

Высокая международная цена на сахар побуждает сахарную промышленность уделять приоритетное внимание производству сахарозы, и будет производиться больше патоки (мелассы). Меласса также будет более истощенной (то есть имеющей более низкую концентрацию сахара по отношению к общему количеству твердых веществ) и, несомненно, будет оказывать более выраженное токсическое действие на ферментацию дрожжей. Новые штаммы дрожжей также должны справляться с субстратами с высоким содержанием мелассы, даже работая с обычными титрами этанола.

Багасса (жмых) сахарного тростника считается перспективным сырьем для этанола второго поколения. Тем не менее, полученный этанол из этого лигноцеллюлозного побочного продукта должен оказаться более выгодным, чем использование багассы в качестве топлива для производства пара, используемого для измельчения, нагрева, дистилляции и выработки электроэнергии.

Перевод выполнен:

ООО «НПО ВЫСОКИЕ ТЕХНОЛОГИИ», 420080, РОССИЯ, RU, г. Казань, пр-т Ямашева, 10

Проектирование и модернизация спиртовых заводов, автоматизация технологических процессов, производство научно-технической продукции.

+7-927-0445779, +7-995-0079609, npo-vt@mail.ru, www.superspirit.ru