

ВЕТЕРИНАРИЯ, ЗООТЕХНИЯ И БИОТЕХНОЛОГИЯ

DOI: 10.31677/2072-6724-2025-75-2-106-115

УДК 579.66:663.54

БИОКОНВЕРСИЯ ЛАКТОЗЫ В ЭТАНОЛ ДРОЖЖАМИ *KLUYVEROMYCES LACTIS* КАК ЭТАП УТИЛИЗАЦИИ ПОДСЫРНОЙ СЫВОРОТКИ

К.С. Аббас, В.В. Новочадов

Волгоградский государственный университет, Волгоград, Россия

E-mail: novochadov.valeriy@volsu.ru

Для цитирования: Аббас К.С., Новочадов В.В. Биоконверсия лактозы в этанол дрожжами *Kluyveromyces lactis* как этап утилизации подсырной сыворотки // Вестник НГАУ (Новосибирский государственный аграрный университет). – 2025. – № 2(75). – С. 106–115. – DOI 10.31677/2072-6724-2025-75-2-106-115.

Ключевые слова: сыроварение, отходы, молочная сыворотка, лактоза, ферментация, биоэтанол, *Kluyveromyces lactis*.

Реферат. Увеличение количества лактозосодержащих отходов на фоне роста производства сыров в России и повсеместно в мире повысили интерес к поиску новых эффективных биотехнологий их переработки, в том числе путем биоконверсии лактозы в этанол. В работе использована подсырная сыворотка с исходным содержанием лактозы 40 г/л и pH 4,84, три промышленных штамма *Kluyveromyces lactis* – Y-2035, Y-2037, Y-2040 и штамм сравнения *Saccharomyces cerevisiae* Y-187. Культивирование дрожжей проводили в ферментере ФА-2 (Проинтех, Россия) в течение 48 ч в сыворотке с добавлением подпитывающих растворов и ионов цинка, при температуре 34 °C, перемешивании и аэрации. В качестве показателей динамики и эффективности биотехнологического процесса периодически определяли pH, число дрожжевых клеток, концентрацию белка, лактозы и этанола в культуральной среде, используя для этого коммерческие наборы для определения этих веществ, рассчитывали скорость роста, процент и среднюю скорость утилизации лактозы, среднюю скорость образования этанола, а также эффективность ферментации. В результате показано, что штаммы *K. lactis* Y-2035, *K. lactis* Y-2037 и *K. lactis* Y-2040 способны утилизировать от 76,3 до 86,0 % лактозы, при этом в среде образуется от 17,7 до 21,0 г/л этанола. Эффективность ферментации варьирует у штаммов *K. lactis* от 75,6 до 89,7 % против 5,6 % у штамма сравнения *S. Cerevisiae* Y-187. Штамм *K. lactis* Y-2037 среди изученных обладает максимальной способностью к утилизации лактозы и образованию этанола. Технологию переработки лактозосодержащих отходов молочной промышленности путем конверсии лактозы в этанол дрожжевыми культурами *K. lactis* предложено использовать для получения перспективного сырья, уменьшения объемов загрязнений, а также для внутреннего производства биоэтанола, рекомендовать использовать для этого штамм *K. lactis* Y-2037.

BIO-CONVERSION OF LACTOSE TO ETHANOL BY *KLUYVEROMYCES LACTIS* YEAST AS A STAGE OF CHEESE WHEY UTILIZATION

K. S. Abbas, V.V. Novochadov

Volgograd State University, Volgograd, Russia

E-mail: novochadov.valeriy@volsu.ru

Keywords: cheese production, waste, whey, lactose, fermentation, bioethanol, *Kluyveromyces lactis*.

Abstract. Growing accumulation of lactose-containing waste resulting from the growth of cheese production in Russia and throughout the world has increased interest in the search for new effective biotechnologies for their processing, including through the bioconversion of lactose into ethanol. The work used cheese whey with an initial lactose content of 40 g/L and a pH of 4.84, three industrial strains of *Kluyveromyces lactis* Y-2035, Y-2037, Y-2040, and the reference strain *Saccharomyces cerevisiae* Y-187. We carried out yeast cultivation in a FA-2 fermenter (Prointech, Russia) for 48 hours in cheese whey with the addition of nutrient solutions and zinc ions, at a temperature of 34 °C, stirring, and aeration. As indicators of the dynamics and efficiency of the biotechnological

process we choose pH, the number of yeast cells, the concentration of protein, lactose and ethanol in the culture medium for periodical control using commercial kits. After that, we calculated the growth rate, percentage and average rate of lactose utilization, average rate of ethanol formation, and fermentation efficiency. As a result, it was shown that the *K. lactis* Y-2035, *K. lactis* Y-2037 and *K. lactis* Y-2040 can utilize from 76.3 to 86.0 % lactose, while from 17.7 to 21.0 g/l of ethanol is formed in the medium. The fermentation efficiency varies in *K. lactis* strains from 75.6 to 89.7 % versus 5.6 % in the reference strain *S. Cerevisiae* Y-187. Among those studied the *K. lactis* Y-2037 strain has the maximum capacity for lactose utilization and ethanol formation. It is proposed to use technology for processing lactose-containing dairy industry waste by converting lactose into ethanol with yeast cultures *K. lactis* for obtaining promising raw materials, reducing pollution, as well as for the internal production of bioethanol, and to recommend the *K. lactis* Y-2037 strain for this purpose.

В последнее десятилетие производство сыра в России увеличилось более чем на 50 %, что эксперты связывают как с очевидным прогрессом в импортозамещении, так и со смещением пищевых потребностей населения [1]. Процесс сыроварения относится к высокоотходным производствам: до 90 % молочного сырья в итоге превращается в побочный продукт, подсырную молочную сыворотку (далее – сыворотку). Объем ее мирового производства оценивается в 200 млн т в год и ежегодно увеличивается на 1–2 %, в то время как перерабатывается в другие пищевые продукты не более 25 % от этого количества, а остальное требует утилизации, и это ложится бременем на производителей [2]. Кроме того, представители малого бизнеса и кустарных производств не в состоянии обеспечить полноценную очистку и/или переработку лактозосодержащей сыворотки. В результате этого, до половины отходов сыроварения оказывается в поверхностных водоемах [3, 4].

Сыворотка имеет кислую реакцию (pH 4,3–5,6), содержит лактозу (до 50 г/л), растворимые белки (до 8 г/л), липиды и минералы, которые, с одной стороны, делают ее питательной средой при биотехнологической утилизации или переработке, а с другой – делают этот продукт опасным загрязнителем, вызывающим чрезмерное потребление кислорода и нарушение экосистем при попадании в водоемы [2, 5].

Совершенно понятно, что для решения проблемы утилизации лактозосодержащих отходов необходимы современные биотехнологические подходы, сочетающие в себе как их возможности, так и технологии переработки в полезные для человека продукты [6, 7]. Для молочной сыворотки одним из таких продуктов может быть биоэтанол [8–10].

Дрожжи *Kluyveromyces* spp. имеют уникальную способность к расщеплению лактозы, что делает их особенно ценными в производстве молочных продуктов и переработке лактозосодержащих отходов молочной промышленности. Данное

свойство *Kluyveromyces* spp. обеспечивается наличием двух генов: *LAC12*, кодирующего фермент лактозопермеазу с функцией активного транспорта лактозы в клетку, и *LAC4*, ответственного за синтез β -галактозидазы, которая катализирует гидролиз лактозы до глюкозы и галактозы [11]. Среди представителей данного рода дрожжи *Kluyveromyces lactis* наиболее активно используются в молочной промышленности для расщепления лактозы, а также как высокоэффективная микробная система для промышленного биосинтеза и экологических биотехнологий [12, 13].

Все вышеперечисленное диктует необходимость разработки и внедрения новых эффективных биотехнологий переработки отходов сыроваренного производства путем конверсии лактозы в этанол, в том числе за счет использования современных высокопродуктивных штаммов. Для отработки технологии ферментации лактозы мы выбрали три штамма *K. lactis*, предполагая, что интенсивность ферментации будет различаться в зависимости от конкретного продуцента.

Цель исследования – сравнение возможности трех штаммов дрожжей *Kluyveromyces lactis* к удалению лактозы из отходов сыроварения (подсырной сыворотки) путем конверсии ее в этанол и характеристика этого биотехнологического процесса в лабораторной модели.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для ферментации лактозы сыворотки использовали три штамма дрожжей *K. lactis*, маркированных в соответствии с каталогом ВКПМ Национального биоресурсного центра России как Y-2035, Y-2037, Y-2040. В качестве отрицательного контроля был взят штамм *Saccharomyces cerevisiae* Y-187 с заведомо минимальной способностью к ферментации лактозы.

Сыворотка была получена из ООО «Еланский сыродельный комбинат». В процессе производства при нагревании в нормализованную

молочную смесь была добавлена молочная кислота для снижения pH. После створаживания к смеси прибавляли хлорид кальция и нагревали до 48–50 °C в течение 1,5 ч для образования сыра. После удаления сырной массы оставшаяся жидкость и представляла собой сыворотку. Ее пропускали через фильтр с диаметром пор 0,2 мкм для удаления микроорганизмов и хранили до использования в работе при температуре 4 °C. В такой сыворотке концентрация лактозы составила 43,5 г/л, белка – 6,4 г/л, этанола – менее 1 г/л.

Для выращивания инокулята в целях обеспечения максимально быстрого роста культуры использовали специально приготовленную питательную среду, которая включала (по объему) 75 % сыворотки, 10 % сахарозы (60 г/л), 10 % взвеси соевой муки (1 %) и 5 % гидролизата дрожжей *S. cerevisiae*. pH среды до стерилизации составил 4,84.

Инокуляцию проводили в стеклянных сосудах емкостью 200 мл, в которые вначале помещали по 150 мл описанной выше питательной среды, закрывали ватно-марлевыми пробками и стерилизовали в автоклаве. После остывания до температуры 30 °C в каждый сосуд с соблюдением условий стерильности прибавляли по 10 мл активированной культуры соответствующего штамма дрожжей, после перемешивания отбирали 10 мл для измерения исходных показателей перед культивированием и помещали в орбитальный шейкер-термостат ES-20 (BioSan, Латвия) на 36 ч при контролируемой температуре 34 °C и скорости движения столика 100 об/мин. Использовали по три повтора на каждый штамм дрожжей. Финальный материал в каждом сосуде был нормализован по оптической плотности с использованием заранее построенной калибровочной кривой до содержания дрожжей 10^8 клеток/мл, pH среды составил 4,35.

Основной биотехнологический процесс осуществляли в лабораторном ферментере ФА-02 (Проинтех, Россия) с рабочей камерой объемом 2,0 л. Аппарат снабжен системой регулируемого термостатирования, перемешивания, аэрации (барботирования), конденсатором испарений, датчиками pH, температуры, а также дозаторами для подачи дополнительных жидкостей из стерильных емкостей с помощью перистальтических насосов. Перед началом работы все съемные узлы ферментера стерилизовали автоклавированием согласно инструкции производителя, сосуд для культивирования стерилизовали вместе с 1,5 л питательной среды (сыворотки), несъемные части аппарата, не подвергающиеся автоклавированию,

и металлическую поверхность корпуса дополнительно обрабатывали 70%-м этанолом.

Загрузку посевного материала в ферментер проводили через канал дозатора непосредственно из инокуляционного сосуда через стерилизуемый разъем на крышке рабочей камеры. В каждой серии экспериментов в питательную среду добавляли 50 мл инокулята. Дополнительно для ускорения роста дрожжей прибавляли раствор сульфата цинка из расчета его конечной концентрации 10 мг/л [14]. Режим культивирования поддерживался в течение 48 ч и предусматривал поддержание следующих условий: атмосферное давление, влажность воздуха не менее 80 %, свободная аэрация и газоотведение, скорость вращения мешалки 100 об/мин, температура 34,0 °C. Дополнительная подкормка и введение сыворотки в процессе культивации не проводились. Фиксацию показаний встроенного датчика pH и отбор проб для лабораторного анализа осуществляли непосредственно перед началом инкубации и спустя 6, 12, 24 и 48 ч. Перед исследованием пробы очищали от микроорганизмов и дисперсных компонентов среды с использованием фильтра с диаметром пор 0,2 мкм.

Параллельно с проведением биоконверсии лактозы различными штаммами дрожжей в ферментере аналогичные серии были заложены в 96-луночные планшеты по 6 повторов в каждой и культивированы в тех же условиях на орбитальном шейкере-термостате для построения кривых роста, значения для которых получали каждые 3 ч, после 12 ч ферментации – каждые 6 ч. Исследование проводили на анализаторе микропланшетов iMARK (Bio-Rad Laboratories Inc., США), исходное значение оптической плотности при длине волны 600 нм (OD_{600}) было стандартизировано до 0,1. Максимальную скорость роста R_{Gmax} (ч⁻¹) определяли по формуле [15]:

$$R_{Gmax} = \log \Delta OD_{600} / t, \quad (1)$$

где ΔOD_{600} – максимальная разница оптической плотности среды при 600 нм в фазу экспоненциального роста; t – время между измерениями, ч.

Анализ белка проводили в культуральной среде до начала и в течение 48 ч ферментации с различными штаммами дрожжей, используя микрометод на 96-луночных планшетах. Для определения был взят набор для анализа белка ООО «Эйлитон» (Россия), его адаптировали по объему используемых проб и реагентов, фотометрию проводили на анализаторе микропланшетов. Итоговую концентрацию в г/л рассчитывали,

исходя из калибровочной кривой, построенной при использовании растворов сывороточного альбумина с концентрациями от 0,5 г/л до 10 г/л.

В динамике ферментации в культуральной среде определяли концентрацию лактозы энзиматическим методом на спектрофотометре SmartSpectPlus (Bio-Rad Laboratories Inc., США) с помощью готовых наборов производства R-Biopharm AG (Германия), результат выражали в г/л.

Этанол измеряли во всех необходимых случаях также спектрофотометрическим методом с помощью готовых наборов Steroglass S.r.l. (Италия) в соответствии с инструкциями производителя. Концентрацию этанола представляли в г/л.

Итоговые показатели ферментации рассчитывали, исходя из полученных количественных данных для каждого штамма. К ним относили:

- долю утилизированной лактозы L_R , %;
- среднюю скорость утилизации лактозы за 48 ч R_{L48} , г / (л × ч);
- среднюю скорость образования этанола за 48 ч R_{E48} , г / (л × ч);
- эффективность ферментации $\mathcal{E}_\phi$, %.

Последний интегральный показатель рассчитывали по формуле [16]:

$$\mathcal{E}_\phi = 185,9 \times E_{48} / L_0, \quad (2)$$

где 185,9 – коэффициент, учитывающий теоретический максимальный выход при образовании этанола из лактозы (0,538); E_{48} – концентрация

этанола через 48 ч ферментации; L_0 концентрация лактозы в стартовой среде.

Обработку количественных результатов и их графическую визуализацию проводили с использованием программного пакета Statistica 12.0 (StatSoft Inc., США). После исключения по критерию Колмогорова нормального характера распределения в выборках ($n = 6$) их статистическое описание представляли в формате медианы и межквартильного интервала – $Me (Q1 \div Q3)$. Внутригрупповые сравнения проводили по критерию Краскела–Уоллиса, сравнение между группами – по критерию Манна–Уитни. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Показатель pH в сыворотке при культивировании различных штаммов дрожжей изменялся неодинаково, общая динамика заключалась в постепенном снижении pH в процессе ферментации. Максимальное снижение pH отмечено для *K. lactis* Y-2037, несколько меньшее снижение – для штаммов Y-2035 и Y-2040. При культивировании *S. cerevisiae* pH практически не изменялся, принимая минимальные значения к 12 ч опыта и вновь возвращаясь к исходным величинам к 48 ч ферментации (табл. 1).

Таблица 1

Изменение pH при культивировании трех штаммов *Kluyveromyces lactis* в сравнении со штаммом *Saccharomyces cerevisiae* Y-187 в среде на основе подсырной сыворотки
pH changes during cultivation of three strains of *Kluyveromyces lactis* in comparison with strain *Saccharomyces cerevisiae* Y-187 in a whey-based medium

Время ферментации, ч	Штамм			
	<i>K. lactis</i> Y-2035	<i>K. lactis</i> Y-2037	<i>K. lactis</i> Y-2040	<i>S. cerevisiae</i> Y-187
0	4,33	4,33	4,35	4,37
6	4,36	4,25	4,30	4,29
12	4,30	4,27	4,26	4,24
24	4,15	4,05	4,28	4,20
48	4,00	3,86	4,10	4,41
ΔpH_{max}	–0,33*	–0,47*	–0,25	–0,17

Примечание. * статистически значимые различия со значениями при культивировании *S. cerevisiae*.

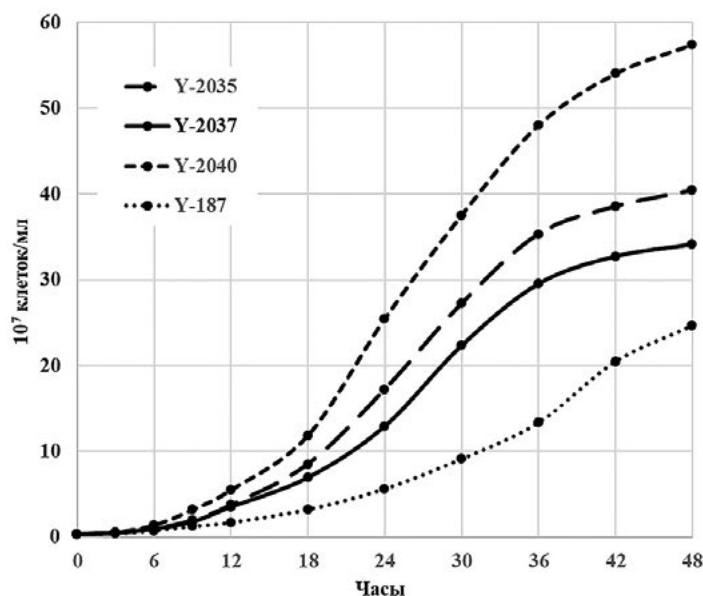
Достаточно умеренные изменения pH в сторону закисления вполне объяснимы высокой буферной емкостью сыворотки, которая определяется не только ее электролитным составом, но наличием

белка и активными биохимическими процессами, протекающими в дрожжевых клетках.

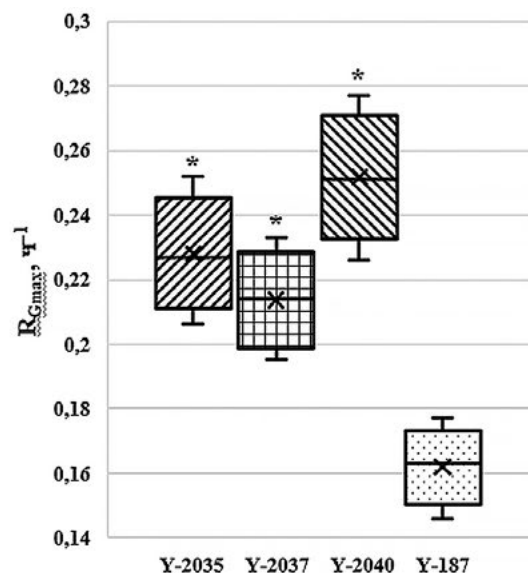
Динамика количества клеток при культивировании отражала фазовый характер их роста: лаг

фаза продолжалась от 6–9 ч у представителей рода *Kluyveromyces* и до 12 ч у *S. cerevisiae* Y-187; фаза экспоненциального роста – до 24-го и 30-го часов ферментации соответственно. Общий прирост клеточной массы за 48 ч ферментации составил от $2,5 \times 10^8$ клеток/л у *S. cerevisiae* Y-187 до $5,7 \times 10^8$ клеток/л *K. lactis* Y-2040. Наименьшая

скорость роста зафиксирована у *S. cerevisiae* Y187, скорость роста штаммов *K. lactis* Y-2035 и *K. lactis* Y-2037 была в 1,31 и 1,39 раза больше этой величины, а *K. lactis* Y-2040 продемонстрировал наибольшую скорость роста – в 1,54 раза больше, чем *S. cerevisiae* Y-187 (рис. 1).



а



б

Рис. 1. Рост дрожжей на 96-луночных микропланшетах трех штаммов *Kluyveromyces lactis* в сравнении со штаммом *Saccharomyces cerevisiae* Y-187 в среде на основе подсырной сыворотки:

а – кривые роста штаммов дрожжей; б – максимальная скорость роста штаммов

Yeast growth on 96-well microplates of three strains of *Kluyveromyces lactis* compared with the strain *Saccharomyces cerevisiae* Y-187 in a whey-based medium: а – growth curves of yeast strains; б – maximum growth rate of the strains

В процессе ферментации концентрация белка в сыворотке снижалась при использовании всех четырех штаммов дрожжей, величина снижения зависела от используемого штамма. При культивировании *S. cerevisiae* Y-187 концентрация белка за 48 ч уменьшалась в 1,71 раза ($p < 0,05$). Среди *K. lactis* наибольшей активностью обладал штамм Y-2037 (уменьшение концентрации в 2,28 раза), несколько меньше – штаммы Y-2035 (снижение в 2,17 раза) и Y-2040 (в 1,89 раза).

Эксперименты показали, что все использованные штаммы дрожжей были в состоянии в той или иной мере конвертировать лактозу в этанол, ее концентрация заметно уменьшалась начиная с 12-го часа ферментации. За 48 ч работы фер-

ментера *S. cerevisiae* Y-187 утилизировал 8,9 % лактозы сыворотки, в то время как для исследуемых штаммов *K. lactis* в подобранных условиях культивирования эта величина составила 76,3 % для Y-240, 78,6 % – для Y-235 и 86,0 % – для наиболее активного штамма Y-237 (табл. 2).

Ферментативная утилизация лактозы молочной сыворотки сопровождалась образованием этанола. Штамм сравнения, *S. cerevisiae* Y-187 обладал минимальной способностью к конверсии: к 48 ч концентрация этанола в среде составила менее 2 г/л. Содержание этанола в сыворотке при культивировании штаммов *K. lactis* было значительно выше и для штамма Y-2037 эта величина превышала 20 г/л.

Таблица 2

Изменение белка, лактозы и этанола при культивировании трех штаммов *Kluyveromyces lactis* в сравнении со штаммом *Saccharomyces cerevisiae* Y-187 на среде на основе подсырной сыворотки
Changes in protein, lactose, and ethanol content during cultivation of three *Kluyveromyces lactis* strains compared with strain *Saccharomyces cerevisiae* Y-187 in a whey-based medium

Время ферментации, ч	Штамм			
	<i>K. lactis</i> Y-2035	<i>K. lactis</i> Y-2037	<i>K. lactis</i> Y-2040	<i>S. cerevisiae</i> Y-187
Белок, г/л				
0	6,41 [6,15÷6,70]			
6	5,58 [5,27÷5,87]*	5,24 [4,99÷5,52]*	5,61 [5,37÷5,91]*	5,95 [5,64÷6,20]
12	4,48 [4,25÷4,71]*#	4,22 [3,99÷4,45]*#	4,63 [4,40÷4,88]*#	5,61 [5,36÷5,85]*
24	3,75 [3,56÷3,95]*#	3,57 [3,40÷3,76]*#	3,89 [3,71÷4,08]*#	4,66 [4,43÷4,87]*
48	2,96 [2,81÷3,12]*#	2,81 [2,65÷2,96]*#	3,12 [2,95÷3,27]*#	3,76 [3,60÷3,91]*
Лактоза, г/л				
0	43,5 [41,7÷45,3]			
6	40,1 [37,9÷42,4]	39,1 [37,0÷41,2]*	40,8 [38,3÷42,9]	43,1 [40,8÷45,3]
12	29,4 [27,7÷30,8]*#	25,5 [24,2÷26,3]*#	29,6 [28,2÷31,0]*#	42,7 [40,8÷44,6]
24	13,0 [11,7÷14,4]*#	11,2 [10,0÷12,5]*#	16,1 [14,4÷17,8]*#	40,8 [38,9÷42,7]
48	9,3 [8,4÷10,4]*#	6,1 [5,7÷6,9]*#	10,3 [9,2÷11,3]*#	39,6 [37,7÷41,8]
Этанол, г/л				
0	0,6 [0,4÷0,8]			
6	1,9 [1,7÷2,2]*	2,5 [2,3÷2,8]*	1,8 [1,6÷2,2]*	0,8 [0,6÷1,1]
12	4,7 [4,3÷5,2]*#	6,5 [6,0÷7,2]*#	5,0 [4,5÷6,1]*#	1,1 [0,9÷1,3]
24	14,3 [12,9÷15,8]*#	15,7 [14,1÷17,4]*#	12,9 [11,6÷14,4]*#	1,4 [1,2÷1,7]
48	19,6 [17,6÷21,8]*#	21,0 [18,8÷23,3]*#	17,7 [15,8÷19,5]*#	1,9 [1,7÷2,2]

Примечание. Здесь и в последующих таблицах знаком * отмечены – статистически значимые различия со стартовыми значениями до ферментации; знаком # – со значениями при культивировании *S. cerevisiae*.

Чтобы оценить эффективность ферментации, рассчитали скорости утилизации основного субстрата и образования конечного продукта (рис. 2).

Расчет скоростей утилизации лактозы и образования этанола показал, что они были минимальными для *S. cerevisiae* Y-187, а для штаммов *K. lactis* определялись возле 0,7 и 0,4 г/(л×ч) соответственно. Эффективность ферментации этими штаммами в десять с лишним раз превышала эффективность дрожжей *S. cerevisiae* (5,6 %), составляя для штамма *K. lactis* Y-2040 75,6 %, для *K. lactis* Y-2040 83,8 %, а для наиболее активного штамма *K. lactis* Y-2037 – 89,7 %.

В настоящем исследовании для проверки эффективности в отношении биоконверсии лактозы и подбора условий для осуществления этого биотехнологического процесса были использованы штаммы дрожжей из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов. В биотехнологии среди дрожжей лидерами, безусловно, являются различные, в том числе и рекомбинантные штаммы *Saccharomyces* spp. [8, 17], но в молочной промышленности с недавнего времени им практически не уступают представители рода *Kluyveromyces* [18, 19].

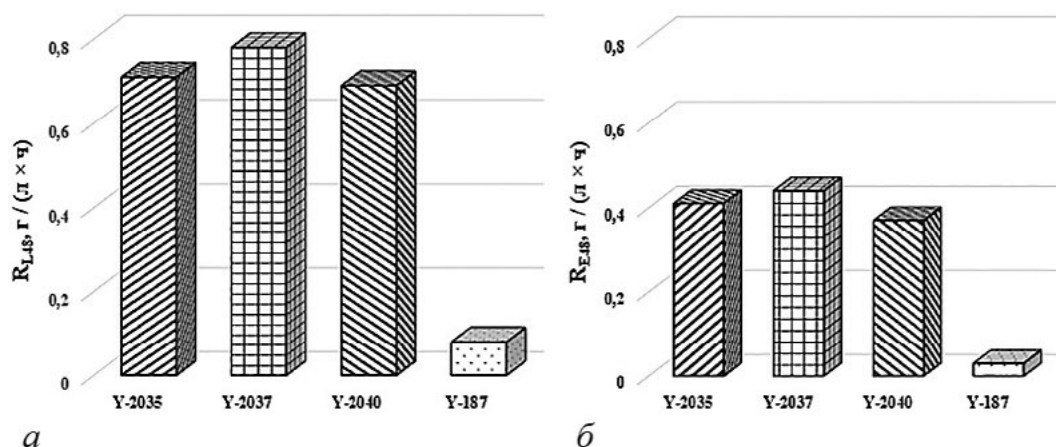


Рис. 2. Скорость утилизации лактозы (R_{L48}) – а и образования этанола (R_{E48}) – б в подсырной сыворотке при ферментации в течение 48 ч тремя штаммами *Kluyveromyces lactis* в сравнении со штаммом *Saccharomyces cerevisiae* Y187

The rate of lactose utilization (A, R_{L48}) and ethanol synthesis (B, R_{E48}) in subsurface whey during fermentation for 48 hours with three of *Kluyveromyces lactis* compared with strain *Saccharomyces cerevisiae* Y187

В целом результаты, полученные при тестировании выбранных штаммов *K. lactis*, показали их высокую способность к утилизации лактозы и конверсии части этого продукта в этанол. По значениям ключевых показателей биотехнологического процесса эти данные оказались сходными с результатами ранее проведенных исследований с другими штаммами дрожжей [20, 21].

Процесс ферментации подвержен воздействию множества факторов, которые могут существенно влиять на конверсию углеводов в биоэтанол конкретным штаммом дрожжей. Важнейшими из этих факторов являются условия культивирования, прежде всего состав молочной сыворотки, присутствие в ней экотоксикантов, стимуляторов роста, температура, pH и аэрация. Оптимизация этих параметров может значительно повысить выход этанола [3, 19, 22, 23].

Для *Kluyveromyces* температура оптимальна в пределах 32–35 °C, что несколько выше температурного оптимума для *Saccharomyces* – 25–30 °C. Последнее могло стать одним из факторов, замедливших рост этой дрожжевой культуры, поскольку мы выбрали для культивирования температуру 34 °C.

Все штаммы дрожжей, использованных в исследовании, незначительно снижали pH сыворотки в течение 48 ч ферментации в пределах от 0,17 (*S. cerevisiae* Y-187) до 0,47 (*K. lactis* Y-2037), и это снижение было тем больше, чем выше ферментирующая способность штамма в отношении лактозы. Даже такие небольшие снижения pH могли подавлять рост дрожжей

и негативно отразиться на скорости конверсии лактозы на поздних сроках ферментации.

Сам факт присутствия белков в сыворотке важен для жизнедеятельности и ферментативной активности дрожжей. Выбранные штаммы за время культивирования в течение 48 ч потребляли от 41,3 % белка (*S. cerevisiae* Y-187) до 56,1 % (*K. lactis* Y-2037) также в прямой зависимости от количества утилизированной лактозы. Этот процесс может приобретать особое значение, если задачей переработки сыворотки является не только удаление лактозы, но и придание сыворотке свойств потенциального сырья для изготовления функциональных напитков с высоким содержанием аминокислот и биоактивных пептидов [24].

Концентрация лактозы в среде также является важным фактором для ее конверсии. Используемая концентрация чуть более 40 г/л оказалась вполне достаточной для утилизации от 76,3 % лактозы (*K. lactis* Y-2037) до 86,0 % (*K. lactis* Y-2040), хотя для повышения эффективности биоконверсии и выхода этанола в настоящее время используются концентрации до 100 г/л [8, 21]. Поскольку настоящее исследование было предпринято в рамках экологической биотехнологии очистки сыворотки от лактозы, из экономических соображений было решено попробовать отказаться от затратных процедур выделения белка и концентрации сыворотки, оставив нативное содержание в ней лактозы.

Оценка эффективности ферментации, как и следовало ожидать, показала, что не вся лактоза в процессе переработки превращается в этанол. Как известно, почти половина лактозы окисляется

в энергетических целях, максимальный теоретический выход этанола по массе в этом процессе составляет 0,538 [16]. Поскольку задачей технологии в исследованных условиях являлось именно окисление лактозы, вопрос о количестве образующегося в этом случае этанола являлся в определенной мере второстепенным.

В перспективе для улучшения конвертирующей способности штаммов дрожжей по отношению к лактозе могут использоваться методы классической и молекулярной селекции, геномной инженерии в виде трансгенеза или геномного редактирования. Основные задачи, которые при этом придется решать, состоят в повышении защиты от контаминации, повышении активности ключевых ферментов доставки лактозы в клетки и биоконверсии, повышении устойчивости к ингибирующим веществам, в том числе к основному конечному продукту – этанолу.

В целом данное исследование подчеркивает важность изучения дрожжей *Kluyveromyces* в контексте их применения для утилизации лактозосодержащих отходов молочной промышленности и в определенной мере производства биоэтанола. Экологичность, энергетическая безопасность и экономические факторы в перспективе будут поддерживать заинтересованность производителей молочных продуктов в данной биотехнологии.

ВЫВОДЫ

1. В эксперименте с использованием лабораторного ферментера и лактозосодержащей подсырной сыворотки с добавлением подпитывающих растворов и ионов цинка показано, что штаммы дрожжей *K. lactis* ВКПМ Y-2035, *K. lactis* ВКПМ Y-2037 и *K. lactis* ВКПМ Y-2040 способны в течение 48 ч при контролируемой температуре 34 °С, перемешивании и аэрации утилизировать от 76,3 до 86,0 % лактозы, значительно превосходя по активности штамм сравнения *S. cerevisiae* Y-187.

2. При ферментации до половины лактозы сыворотки конвертируется в этанол. В среде в течение 48 ч ферментации дрожжами *Kluyveromyces* образуется от 17,7 до 21,0 г/л этанола. Эффективность ферментации варьирует у штаммов *K. lactis* от 75,6 до 89,7 % против 5,6 % у штамма сравнения *S. Cerevisiae* Y-187. Штамм *K. lactis* Y-2037 среди изученных обладает максимальной способностью к утилизации лактозы и образованию этанола.

3. Переработка лактозосодержащих отходов молочной промышленности на основе биоконверсии лактозы в этанол дрожжевыми культурами *Kluyveromyces lactis* является для производителей малого и среднего бизнеса эффективной, простой и дешевой стратегией для получения ценного сырья и/или уменьшения объемов загрязнений, а также для внутреннего производства биоэтанола. В качестве наиболее перспективного среди изученных для этих целей рекомендуется штамм *K. lactis* Y-2037.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Просяков А.Ю. Тенденции развития сыродельной отрасли в России // Сыроделие и маслоделие. – 2024. – № 4. – С. 3–6.
2. Recent advances in whey processing and valorisation: technological and environmental perspectives / D. Buchanan, W. Martindale, E. Romeih, E. Hebishy // International Journal of Dairy Technology. – 2023. – Vol. 76. – P. 291–312. – DOI: 10.1111/1471-0307.12935.
3. Bioethanol production from renewable raw materials and its separation and purification: a review / A. Bušić, N. Mardetko, S. Kundas [et al.] // Food Technology and Biotechnology. – 2018. – Vol. 56, № 10. – P. 289–311. – DOI: 10.17113/ftb.56.03.18.5546.
4. Ethanol production from cheese whey and expired milk by the brown rot fungus *Neolentinus lepideus* / K. Okamoto, S. Nakagawa, R. Kanawaku, S. Kawamura // Fermentation. – 2019. – Vol. 5, № 49. – P. e290. – DOI: 10.3390/fermentation5020049.
5. Bioprospecting of microbial strains for biofuel production: metabolic engineering, applications, and challenges / M.F. Adegbeye, O.B. Ojuederie, P.M. Talia, O.O. Babalola // Biotechnology for Biofuels. – 2021. – Vol. 14, № 1. – P. e5. – DOI: 10.1186/s13068-020-01853-2.
6. Papademas P., Kotsaki P. Technological utilization of whey towards sustainable exploitation // Advances in Dairy Research. – 2019. – Vol. 7, Iss. 4. – P. e231. – DOI: 10.35248/2329-888X.19.7.231.
7. Promising renewable raw for ethanol biosynthesis / Y.A. Zimina, M.V. Postnova, K.S. Abbas [et al.] // European Journal of Molecular Biotechnology. – 2020. – Vol. 8, № 1. – P. 42–51. – DOI: 10.13187/ejmb.2020.1.42.
8. Bioethanol production from renewable sources: Current perspectives and technological progress / H. Zayed, J. Sahu, S. Akter [et al.] // Renewable and Sustainable Energy Reviews. – 2017. – Vol. 71. – P. e76. – DOI: 10.1016/j.rser.2016.12.076.

9. *Selection and subsequent physiological characterization of industrial Saccharomyces cerevisiae strains during continuous growth at sub- and supra optimal temperatures* / K.Y.F. Lip, E. García-Ríos, C.E. Costa [et al.] // *Biotechnology Reports*. – 2020. – Vol. 26. – P. e00462. – DOI: 10.1016/j.btre.2020.e00462.
10. *Zandona E., Blažič M., Režek Jambrak A. Whey utilization: sustainable uses and environmental approach* // *Food Technology and Biotechnology*. – 2021. – Vol. 59, № 2. – P. 147–161. – DOI: 10.17113/ftb.59.02.21.6968.
11. *Origin of lactose fermentation in Kluyveromyces lactis by interspecies transfer of a neo-functionalized gene cluster during domestication* / J.A. Varela, M. Puricelli, R.A. Ortiz-Merino [et al.] // *Current Biology*. – 2019. – Vol. 29. – P. 4284–4290. – DOI: 10.1016/j.cub.2019.10.044.
12. *Молекулярный полиморфизм генов β-галактозидазы LAC4 у молочных и природных штаммов дрожжей Kluyveromyces* / Л.В. Лютова, Г.И. Наумов, А.В. Шнырева, Е.С. Наумова // *Молекулярная биология*. – 2021. – Т. 55, № 1. – С. 75–85. – DOI: 10.31857/S0026898421010109.
13. *Vu H.H., Jin C., Chang J.H. Structural basis for substrate recognition of glucose-6-phosphate dehydrogenase from Kluyveromyces lactis* // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2021. – Iss. 553. – P. 85–91. – DOI: 10.1016/j.bbrc.2021.02.088.
14. *Аббас К.С., Лушикова Е.С., Новочадов В.В. Оценка лактозоконвертирующей способности дрожжей Kluyveromyces lactis в зависимости от концентрации цинка в среде культивирования* // *Природные системы и ресурсы*. – 2024. – №1. – С. 18–25. – DOI: 10.15688/nsr.jvolsu.2024.1.2.
15. *Feng C.T., Du X., Wee J. Microbial and chemical analysis of non-Saccharomyces yeasts from Chambourcin hybrid grapes for potential use in winemaking* // *Fermentation*. – 2021. – Vol. 7. – P. 1–22. – DOI: 10.3390/fermentation7010015.
16. *Koushki M., Jafari M., Azizi M. Comparison of ethanol production from cheese whey permeate by two yeast strains* // *Journal of Food Science and Technology*. – 2012. – Vol. 49. – P. 614–619. – DOI: 10.1007/s13197-011-0309-0.
17. *Оценка эффективности процесса биосинтеза этанола дрожжами рода Saccharomyces* / И.В. Калинина, Р.И. Фаткулина, Н.В. Попова, А.Р. Шарипова // *Вестник Южно-Уральского государственного университета. Сер. Пищевые и биотехнологии*. – 2018. – Т. 6, № 4. – С. 74–82. – DOI: 10.14529/food180410.
18. *Bioprospecting Kluyveromyces marxianus as a robust host for industrial biotechnology* / M. Bilal, L. Ji, Y. Xu [et al.] // *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. – 2022. – Vol. 10. – P. e851768. – DOI: 10.3389/fbioe.2022.851768.
19. *Evaluation of Kluyveromyces spp. for conversion of lactose in different types of whey from dairy processing waste into ethanol* / A.M. Ohstrom, A.E. Buck, X. Du, J. Wee // *Frontiers in Microbiology*. – 2023. – Vol. 14. – P. e1208284. – DOI: 10.3389/fmicb.2023.1208284.
20. *Bio-utilization of cheese manufacturing wastes (cheese whey powder) for bioethanol and specific product (galactonic acid) production via a two-step bioprocess* / X. Zhou, X. Hua, L. Huang, Y. Xu // *Bioresource Technology*. – 2019. – Vol. 272. – P. 70–76. – DOI: 10.1016/j.biortech.2018.10.001.
21. *Marcus J.F., DeMarsh T.A., Alcaine S.D. Upcycling of whey permeate through yeast-and Mold-driven fermentations under anoxic and oxic conditions*. *Fermentation*. – 2021. – Vol. 7. – P. 1–16. – DOI: 10.3390/fermentation7010016.
22. *Жарыкбасова К.С. Фазовое распределение экотоксикантов в молочном сырье* // *Вестник НГАУ (Новосибирский государственный аграрный университет)*. – 2009. – № 3(11). – С. 24–26.
23. *Tesfaw A. The current trends of bioethanol production from cheese whey using yeasts: biological and economical perspectives* // *Frontiers in Energy Research*. – 2023. – Vol. 11. – P. e11. – DOI: 10.3389/fenrg.2023.1183035/full.
24. *Invited review: acid whey trends and health benefits* / D. Rocha-Mendoza, E. Kosmerl, A. Krentz [et al.] // *Journal of Dairy Science*. – 2021. – Vol. 104. – P. 1262–1275. – DOI: 10.3168/jds.2020-19038.

REFERENCES

1. Prosekov A.Yu., *Syrodelle i maslodelie*, 2024, No. 4, pp. 3–6. (In Russ.)
2. Buchanan D., Martindale W., Romeih E., Hebishy E., Recent advances in whey processing and valorisation: technological and environmental perspectives, *International Journal of Dairy Technology*, 2023, Vol. 76, pp. 291–312, DOI: 10.1111/1471-0307.12935.
3. Bušić A., Mardetko N., Kundas S., Morzak G., Belskaya H., Ivancic S., Mirela K.D., Novak S., Šantek B., Bioethanol production from renewable raw materials and its separation and purification: a review, *Food Technology and Biotechnology*, 2018, Vol. 56, No. 3, pp. 289–311, DOI: 10.17113/ftb.56.03.18.5546.
4. Okamoto K., Nakagawa S., Kanawaku R., Kawamura S., Ethanol production from cheese whey and expired milk by the brown rot fungus Neolentinus lepideus, *Fermentation*, 2019, Vol. 5, No. 2, pp. e49, DOI: 10.3390/fermentation5020049.
5. Adegboye M.F., Ojuederie O.B., Talia P.M., Babalola O.O., Bioprospecting of microbial strains for biofuel production: metabolic engineering, applications, and challenges, *Biotechnology for Biofuels*, 2021, Vol. 14, No. 1, pp. e5, DOI: 10.1186/s13068-020-01853-2.
6. Papademas P., Kotsaki P., Technological utilization of whey towards sustainable exploitation, *Advances in Dairy Research*, 2019, Vol. 7, Iss. 4, pp. 1–10. DOI: 10.35248/2329-888X.19.7.231.

7. Zimina Y.A., Postnova M.V., Abbas K.S., Ivanova G.S., Novochadov V.V., Promising renewable raw for ethanol biosynthesis, *European Journal of Molecular Biotechnology*, 2020, Vol. 8, No. 1, pp. 42–51, DOI: 10.13187/ejmb.2020.1.42.
8. Zabeed H., Sahu J., Akter S., Nasrulhaq Amru B., Faruq G., Bioethanol production from renewable sources: Current perspectives and technological progress, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2017, Vol. 71, pp. 475–501, DOI: 10.1016/j.rser.2016.12.076.
9. Lip K.Y.F., García-Ríos E., Costa C.E., Guillamón J.M., Domingues L., Teixeira J., van Gulik W.M., Selection and subsequent physiological characterization of industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains during continuous growth at sub- and supra optimal temperatures, *Biotechnology Reports*, 2020, Vol. 26, pp. e00462, DOI: 10.1016/j.btre.2020.e00462.
10. Zandona E., Blažić M., Režek Jambrak A., Whey utilization: sustainable uses and environmental approach, *Food Technology and Biotechnology*, 2021, Vol. 59, No. 2, pp. 147–161, DOI: 10.17113/ftb.59.02.21.6968.
11. Varela J.A., Puricelli M., Ortiz-Merino R.A., Giacomobono R., Braun-Galleani S., Wolfe K.H., Morrissey J.P., Origin of lactose fermentation in *Kluyveromyces lactis* by interspecies transfer of a neo-functionalized gene cluster during domestication, *Current Biology*, 2019, Vol. 29, pp. 4284–4290, DOI: 10.1016/j.cub.2019.10.044.
12. Lyutova L.V., Naumov G.I., Shnyreva A.V., Naumova E.S., *Molekularnaya Biologiya*, 2021, Vol. 55, No. 1, pp. 75–85, DOI: 10.31857/S0026898421010109. (In Russ.)
13. Vu H.H., Jin C., Chang J.H., Structural basis for substrate recognition of glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Kluyveromyces lactis*, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2021, Iss. 553, pp. 85–91, DOI: 10.1016/j.bbrc.2021.02.088.
14. Abbas K.S., Lushnikova E.S., Novochadov V.V., *Prirodnye sistemy i resursy*, 2024, No. 1, pp. 18–25, DOI: 10.15688/nsr.jvolsu.2024.1.2. (In Russ.)
15. Feng C.T., Du X., Wee J., Microbial and chemical analysis of non-*Saccharomyces* yeasts from Chambourcin hybrid grapes for potential use in winemaking, *Fermentation*, 2021, Vol. 7, No. 1, pp. e15, DOI: 10.3390/fermentation7010015.
16. Koushki M., Jafari M., Azizi M., Comparison of ethanol production from cheese whey permeate by two yeast strains, *Journal of Food Science and Technology*, 2012, Vol. 49, pp. 614–619, DOI: 10.1007/s13197-011-0309-0.
17. Kalinina I.V., Fatkullin R.I., Popova N.V., Sharipova A.R., *Vestnik Yuzhno-Ural'skogo Gosudarstvennogo Universiteta, Seriya 'Pishchevye i Biotekhnologii'*, 2018, Vol. 6, No. 4, pp. 74–82, DOI: 10.14529/food180410. (In Russ.)
18. Bilal M., Ji L., Xu Y., Xu S., Lin Y., Iqbal H.M.N., Cheng H., Bioprospecting *Kluyveromyces marxianus* as a robust host for industrial biotechnology, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2022, Vol. 10, pp. e851768, DOI: 10.3389/fbioe.2022.851768.
19. Ohstrom A.M., Buck A.E., Du X., Wee J., Evaluation of *Kluyveromyces* spp. for conversion of lactose in different types of whey from dairy processing waste into ethanol, *Frontiers in Microbiology*, 2023, Vol. 14, pp. e1208284, DOI: 10.3389/fmicb.2023.1208284.
20. Zhou X., Hua X., Huang L., Xu Y., Bio-utilization of cheese manufacturing wastes (cheese whey powder) for bio-ethanol and specific product (galactonic acid) production via a two-step bioprocess, *Bioresource Technology*, 2019, Vol. 272, pp. 70–76, DOI: 10.1016/j.biortech.2018.10.001.
21. Marcus J.F., DeMarsh T.A., Alcaine S.D., Upcycling of whey permeate through yeast-and Mold-driven fermentations under anoxic and Oxic conditions, *Fermentation*, 2021, Vol. 7, No. 1, pp. e16, DOI: 10.3390/fermentation7010016.
22. Zharybasova K.S., *Vestnik NGAU (Novosibirskij gosudarstvennyj agrarnyj universitet)*, 2009, No. 3(11), pp. 24–26. (In Russ.)
23. Tesfaw A., The current trends of bioethanol production from cheese whey using yeasts: biological and economical perspectives, *Frontiers in Energy Research*, 2023, Vol. 11, pp. e11, DOI: 10.3389/fenrg.2023.1183035/full.
24. Rocha-Mendoza D., Kosmerl E., Krentz A., Zhang L., Badiger S., Miyagusuku-Cruzado G., Mayta-Apaza A., Giusti M., Jiménez-Flores R., García-Cano I., Invited review: acid whey trends and health benefits. *Journal of Dairy Science*, 2021, Vol. 104, pp. 1262–1275, DOI: 10.3168/jds.2020-19038.

Информация об авторах:

К.С. Аббас, аспирант ФГАОУ ВО «Волгоградский государственный университет», кафедра биологии и биоинженерии

В.В. Новочадов, доктор медицинских наук, профессор ФГАОУ ВО «Волгоградский государственный университет», кафедра биологии и биоинженерии

Contribution of the authors:

K.S. Abbas, postgraduate student (Volgograd State University)

V.V. Novochadov, Doctor of Medical Sciences, Professor (Volgograd State University)

Вклад авторов:

Все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.