

На правах рукописи

ГЕРМАН ЛЮДМИЛА СЕРГЕЕВНА

**КОМПЛЕКСНАЯ ТЕХНОЛОГИЯ ПЕРЕРАБОТКИ
НЕКОНДИЦИОННОГО ЗЕРНА КАК ИСХОДНАЯ СТАДИЯ
БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПРОИЗВОДСТВ**

Специальность 03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

диссертации на соискание учёной степени

кандидата технических наук

Москва – 2012

Работа выполнена в ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет инженерной экологии» (МГУИЭ) на кафедре «Экологическая и промышленная биотехнология»

Научный руководитель: доктор технических наук, профессор
Бирюков Валентин Васильевич

Официальные оппоненты: Авчиева Пенкер Бабаевна
доктор технических наук, профессор
Генеральный директор
ООО «Здоровье и красота»

Воробьева Галина Ивановна
доктор биологических наук, профессор
заведующая лабораторией
сельскохозяйственной биотехнологии
ОАО ГосНИИсинтезбелок

Ведущая организация: ФГБОУ ВПО Московский государственный университет
пищевых производств (МГУПП)

Защита диссертации состоится «22» мая 2012г. в _____ на заседании
объединенного диссертационного совета ДМ 212.204.13 в Российском химико-
технологическом университете имени Д.И. Менделеева по адресу: 125047, г. Москва,
Миусская пл., 9, конференц-зал (к.443).

С диссертацией можно ознакомиться в Информационно-библиотечном центре
РХТУ имени Д.И. Менделеева.

Автореферат диссертации разослан «__» апреля 2012г.

Учёный секретарь
диссертационного совета
ДМ 212.204.13

Шакир И.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы

85% территории РФ находится в зоне рискованного земледелия. Ежегодно в связи с погодными условиями в разных регионах нашей страны образуется от 8 до 15млн тонн некондиционного зерна с содержанием белка менее 10%. Часто это зерно не вывозят с полей и оно гниет, нарушая экологию, ухудшая и без того катастрофичную картину по увеличению парникового эффекта. Некондиционное зерно не используется в пищевой промышленности из-за низкого содержания белка, не обладает необходимыми хлебопекарскими свойствами, поэтому не подходит для производства муки. Как основа корма для сельскохозяйственных животных - не может быть использовано без внесения добавок, компенсирующих недостаток белка.

Некондиционное зерно используется при производстве спирта. Однако, в настоящее время большая часть спиртовых заводов закрыта, т.к. в технологическом цикле не предусмотрена переработка послеспиртовой барды.

Некондиционное зерно может быть использовано для получения крахмала и различных патонок. На территории РФ развито производство крахмала из картофеля, есть предприятия, перерабатывающие кукурузу. Отрасль переработки некондиционного зерна в крахмал и патоки в настоящее время в РФ только начинает развиваться.

Комплексная технология переработки некондиционного зерна в стандартизованное сырье для культивирования различных микроорганизмов - продуцентов биологически активных веществ, разрешила бы многие проблемы дальнейшего развития биотехнологии в нашей стране, попутно решая экологические проблемы, связанные с некондиционным зерном.

Цель и задачи исследования

Целью настоящей работы является разработка технологии переработки крахмалсодержащего зернового сырья в компоненты питательной среды для культивирования различных микроорганизмов и биосинтеза биологически активных веществ.

Для достижения этой цели необходимо решить следующие задачи:

1. Разработать технологию переработки крахмалсодержащего растительного сырья в компоненты питательной среды для культивирования микроорганизмов.
2. Изучить основные зависимости, влияющие на выход крахмала и белка по предлагаемой схеме переработки зерновых культур.
3. Исследовать процесс ферментативного гидролиза крахмала и белка для получения компонентов питательной среды в качестве источника углерода и органического азота.

4. Разработать технологию переработки супернатанта зерновой суспензии после дробления зерна и фракционирования зерновой пульпы с последующим его применением для культивирования микроорганизмов.
5. Разработать способ получения пищевых волокон и сырья для модификации целлюлозы из зерновых оболочек (шелухи).
6. Разработать технологии процессов ферментации биологически активных веществ на питательных средах, полученных в процессе переработки некондиционного зерна и провести их апробацию.

Научная новизна работы

- Определены основные закономерности процесса влажного дробления крахмалсодержащего растительного сырья – некондиционной пшеницы и тритикале (зависимости процессов разделения суспензии зерновых на фракции от вида зерновой культуры, рН суспензии, типа роторно-пульсационного аппарата и фактора разделения).
- Предложено использовать в качестве углеводной части ферментационных сред ферментолитат крахмала и определены значения технологических параметров, обеспечивающих оптимизацию процессов ферментолита для крахмала пшеницы и тритикале.
- Разработана технология получения зернового супернатанта и показано, что этот продукт может быть использован в качестве эффективного ростового фактора в процессах культивирования микроорганизмов.
- Предложено использовать также в качестве ростового фактора ферментолитат зернового белка и изучено влияние технологических параметров на процесс ферментолита белка.
- Разработана технология переработки зерновых оболочек с получением пищевых волокон и сырья для модификации целлюлозы.
- Разработаны и испытаны альтернативные технологии биосинтеза астаксантина и L-лизина, использующие в качестве углеводной и азотистой части ферментационных сред продукты переработки зерна.

Практическая ценность работы

На основании проведенных исследований разработан опытно-промышленный регламент переработки крахмалсодержащего растительного сырья, опытно-промышленный регламент получения кристаллического L-лизина монохлоргидрата, лабораторный регламент получения белково-витаминной добавки, содержащей астаксантин.

Разработанная технология использована в Чувашии (г.Шумерля) на опытно-промышленной установке по переработке зерна и производству L-лизина.

Апробация работы

Основные положения диссертационной работы были доложены и обсуждены на VII и VIII Всероссийских выставках научно-технического творчества молодежи НТТМ 2007 и 2008 (работа отмечена золотой медалью); XI Международной конференции «Математические методы в технике и технологиях ММТТ-21»; Международной химической ассамблее «ICA-2008», 2-й Биотехнологической выставке-ярмарке «РосБиоТех-2008» (работа удостоена медали); V Московском Международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» Москва, 2009, (работа удостоена медали Конгресса).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 7 печатных работ, в том числе 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК, а также получен 1 патент РФ.

Структура и объем работы

Диссертационная работа включает: введение, обзор литературы, описание объектов, материалов и методов исследования, 7 глав, в которых изложены результаты экспериментов и их обсуждение, выводы, список цитируемой литературы, содержащий 132 наименования.

Материал изложен на 236 страницах, содержит 85 рисунков, 53 таблиц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Введение

Обоснована актуальность темы, сформулированы положения, выносимые на защиту, научная новизна, практическая ценность, приведены сведения о личном вкладе соискателя.

Глава 1. Состояние сырьевой базы микробиологических производств

Рассмотрены традиционные источники углеводов и органического азота, используемые в ферментационных средах, существующие аспекты применения и способы переработки некондиционного крахмалсодержащего зернового сырья. Рассмотрено применение продуктов переработки зернового сырья для биосинтеза биологически активных веществ. Сформулированы основные направления исследований настоящей работы.

Глава 2. Объекты и методы исследования

Объекты исследования: партии некондиционной пшеницы из Чувашии, партии пшеницы 5-го класса из Мордовии, партии тритикале из Воронежской области.

Штаммы-продуценты: штамм *Phaffia rhodozyma* ВКПМ Y-2228 – продуцент атаксантина, штамм-продуцент L-лизина *Corynebacterium glutamicum* «BIGOR-55».

Дробление зерна проводили на роторно-пульсационных аппаратах РПА с разной величиной зазора между режущими частями производства «ЭНА» (Россия), S-эмульгатор (РПА с ультразвуковой системой, Казань).

Разделение зерновой суспензии на фракции осуществляли на центрифуге «Thermo Jouan C4i» (Франция). Отделение зерновых оболочек проводили на соковыжималке «Vork» (Германия) и ситах с размером ячеек от 5мм до 0,05мм производства «Евролаб» (Санкт-Петербург). Механическое воздействие на крахмально-белковую суспензию производили верхнеприводной мешалкой «Kika-Werke RW16 basic».

Ферментативный гидролиз крахмала и белка проводили в колбах на качалке «New Brunswick Scientific» (США), в стеклянных стаканах объемом 400мл на магнитной мешалке с регулируемым подогревом «VELP scientific VTF» (Германия), в лабораторном биореакторе «АКА» (Пушино) объемом 3л, в аппарате вместимостью 30л «Сарториус» (Латвия).

Переработку зерновых оболочек проводили в стеклянных стаканах объемом 400мл на магнитной мешалке с регулируемым подогревом «VELP scientific VTF» (Германия), в лабораторном биореакторе «АКА» (Пушино), в аппарате вместимостью 30л «Сарториус» (филиал фирмы «Сарториус», Латвия).

Сушку пищевых волокон проводили на лабораторной распылительной сушильной установке РС-20, (РФ), сушилке в фонтанирующем слое СФС-10 (РФ), вакуум-сушилке (Биохиммашпроект, РФ).

Исследование процесса культивирования продуцента L-лизина на питательных средах, полученных при переработке крахмалсодержащего зернового сырья, осуществляли в колбах объемом 250мл на качалке «New Brunswick Scientific» (США), в аппаратах «Bioflo» 110, вместимостью 1л «New Brunswick Scientific» (США), в аппарате вместимостью 10л «Toioden» (Япония).

Исследование процесса культивирования продуцента астаксантина на питательных средах, полученных при переработке крахмалсодержащего зернового сырья проводили в колбах объемом 250мл на качалке «New Brunswick Scientific» (США), в лабораторном фотобиореакторе вместимостью 3л с внутренним осветительным устройством и гибким перемешивающим устройством типа «беличье колесо».

Контрольно-аналитические методы.

Анализ размера частиц в суспензии и скорость их оседания проводили при соответствующем разведении проб на оптическом седиментаторе «Horiga» (Япония).

Гранулометрический состав зерновых оболочек определяли ситами с размером ячеек от 5мм до 0,05мм производства «Евролаб» (Санкт-Петербург).

Вязкость неньютоновских жидкостей – крахмально-белковой суспензии и клейстеризованного крахмала в процессе ферментативного гидролиза определяли на вискозиметре Реотест-2 (РФ).

Величину рН определяли с помощью рН-метра Эксперт 001 «Биос» (РФ). Концентрацию белка в крахмально-белковой суспензии и при ферментализации белка определяли пересчетом величины общего азота, определенного по методу Къельдаля, общее количество свободных аминокислот определяли по методу Лоури.

Концентрацию аминокислот в ферментализате белка и в культуральной жидкости в процессе биосинтеза L-лизина определяли методом тонкослойной хроматографии в системе изопропанол / аммиак / вода с последующим проявлением 0,5% раствором нингидрина в ацетоне и компьютерным количественным определением после сканирования хроматограммы.

Оптическую плотность культуральной жидкости определяли на фотоэлектроколориметре КФК-2.

Для определения количества биомассы продуцентов использовали метод построения калибровочной кривой, полученной измерением оптической плотности при последовательном разведении отделенной центрифугированием и промытой водой биомассы продуцентов.

Концентрацию крахмала определяли после полного гидролиза крахмала 20%-ной серной кислотой по модифицированному методу Бертрана-Шоорля. Концентрацию глюкозы в ферментализатах крахмала определяли по модифицированному методу Бертрана-Шоорля без предварительного гидролиза.

Спектр и количественный состав ферментализатов крахмала определяли тонкослойной хроматографией в системе этил-ацетат / изопропанол / вода с последующим проявлением 0,5% раствором нингидрина в ацетоне и компьютерным количественным определением после сканирования хроматограммы.

Концентрацию пятиатомных сахаров и пентозанов (после гидролиза 20% серной кислотой) определяли методом тонкослойной хроматографии в системе этил-ацетат / изопропанол / вода с последующим проявлением орциновым проявителем.

Планирование экспериментов и статистическая обработка данных.

При определении оптимального состава питательных сред, оптимальных условий окисления зерновых оболочек использовали ортогонально-решетчатые планы (латинских прямоугольников) проведения экспериментов, планы Бокса-Вилсона и крутого восхождения.

Дисперсию воспроизводимости по выходному показателю (концентрации продукта, влагоудерживающей способности, выходу глюкозы и мальтозы) определяли усредненно для всех опытов по схеме планирования экспериментов.

Глава 3. Разработка базовой схемы технологии переработки некондиционного зерна в компоненты питательных сред для культивирования микроорганизмов.

Стадии фракционирования компонентов

В работе предложена модифицированная технология переработки некондиционного зерна. Технология включает следующие стадии:

- предобработка зерна - мойка и увлажнение зерна;
- влажный размол зерна - гидро-механо-акустическим способом на роторно-пульсационном аппарате;
- фракционирование зерновой пульпы - первичное отделение зерновых оболочек, промывка зерновых оболочек водой, вторичное отделение зерновых оболочек, первичное центрифугирование объединенной крахмально-белковой суспензии (объединяется крахмально-белковая суспензия после первого отделения зерновых оболочек и промывка зерновых оболочек), корректировка рН оставшейся крахмально-белковой суспензии и механическое воздействие на нее, вторичное центрифугирование крахмально-белковой суспензии;
- получение углеводной части питательных сред - ферментативный гидролиз крахмала, выделенного на двух стадиях центрифугирования;
- получение зернового белка и его гидролизата – разбавление белковой фракции водой, центрифугирование полученной суспензии, ферментативный гидролиз белка, сушка белка, ферментализата белка;
- получение зернового супернатанта - фракционирование зерновой пульпы, упаривание жидкой фракции, оставшейся после всех операций..

3.1. Гидро-механо-акустический способ измельчения зерна

В спиртовой промышленности при применении гидро-механо-акустического способа дробления зерна используется принцип максимального измельчения зерна.

Этот способ неприемлем для фракционирования зерновой пульпы. Для переработки зерна, включающей дальнейшее фракционирование зерновой пульпы на крахмал, белок и супернатант, необходимо найти оптимальный размер частиц зерна после дробления, обеспечивающий отделение зерновых оболочек с минимальным количеством остаточного крахмала и белка.

При размере частиц после размола (влажных зерновых оболочек) 5мм и более в них остается до 15% крахмала от общего количества в зерне и доизвлечение крахмала

затруднено, т.к. полностью влажные зерновые оболочки обладают пластичностью и гибкостью и не изменяют свой размер при дополнительной гидро-механо-акустической обработке.

При размере частиц зерновых оболочек после размола менее 0,2мм (что обеспечивается использованием РПА, снабженной ультразвуковой системой, S-эмульгатора) разделение суспензии после дробления на фракции в центробежном поле невозможно из-за близкого по весу размера частиц суспензии. Другие типы разделения (фильтрация, осаждение и т.д.) не применимы из-за вязкости зерновой пульпы. В работе изучено влияние размера зазора между режущими частями роторно-пульсационных аппаратов и количества циклов циркуляции измельчаемой суспензии на гранулометрический состав зерновых оболочек (рис.1, 2).

Показано, что для получения суспензии зерна с преобладающим размером частиц зерновых оболочек 1мм величина зазора между режущими частями РПА должна быть 1,0-0,5мм. Трех циклов циркуляции измельчаемой суспензии достаточно для получения 80-85% зерновых оболочек размером 1мм. Увеличение кратности циркуляции на РПА с определенной величиной зазора не приводит к существенному изменению гранулометрического состава частиц зерновых оболочек.

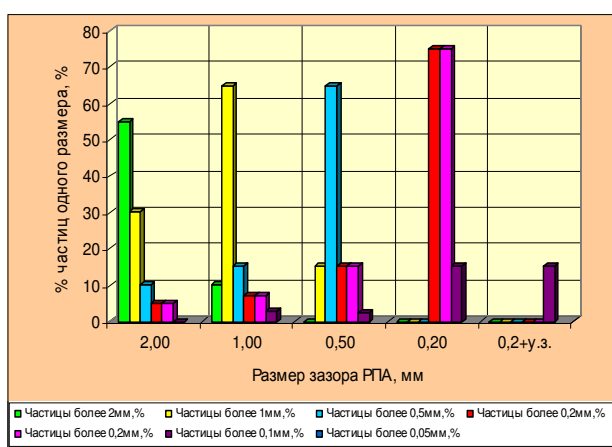


Рис.1. Изменение гранулометрического состава частиц зерновых оболочек при дроблении на РПА с различной величиной зазора за три цикла дробления при температуре водно-зерновой смеси 50⁰С

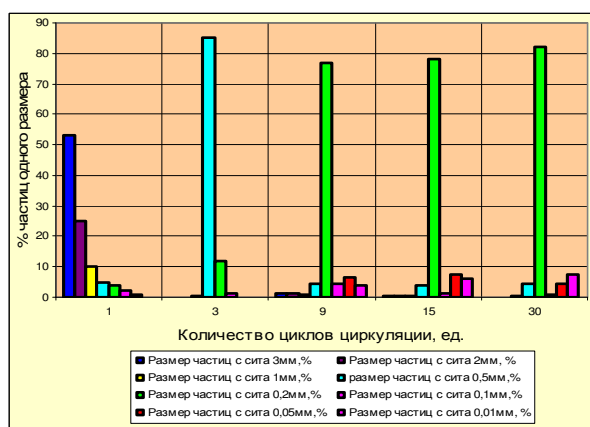


Рис.2 Гранулометрический состав частиц зерновых оболочек после обработки водно-зерновой смеси на РПА с зазором 0,5мм при 50⁰С и различной кратности циркуляции

На общий выход крахмала и белка влияет температура водно-зерновой смеси и суспензии (пульпы) после дробления. Проведены эксперименты при различной температуре воды, смешиваемой с зерном перед дроблением (табл. 1). Показано, что при температуре воды 5⁰С и 50⁰С накопление в супернатанте глюкозы меньше, чем при комнатной температуре воды, смешиваемой с зерном, за счет снижения активности амилолитических и протеолитических ферментов зерна. Осуществлять нагрев легче, чем

охлаждать до температуры 5⁰С, поэтому для снижения активности ферментов зерна выбран способ внесения в зерно перед размолотом воды, нагретой до 50⁰С.

Таблица 1

Влияние температуры воды на концентрацию в супернатанте глюкозы и аминокислот.

| № | Температура воды, смешиваемой с зерном, °С | Концентрация глюкозы в супернатанте, % | Концентрация Аминокислот в супернатанте, г/л | Вид зерна |
|---|--|--|--|-----------|
| | 5,0 | 0,35 | 2,7 | пшеница |
| | 20, | 0,64 | 6,5 | пшеница |
| | 50,0 | 0,26 | 3,6 | пшеница |
| | 5,0 | 0,45 | 3,7 | тритикале |
| | 20,0 | 0,86 | 7,6 | тритикале |
| | 50,0 | 0,32 | 4,3 | тритикале |

Время обработки пульпы зерна до получения супернатанта – 2 часа.

Показано, что на размер частиц зерновых оболочек после дробления влияет тип использованного роторно-пульсационного оборудования (размер зазора и наличие ультразвука), кратность циркуляции, но практически не влияет тип зернового сырья.

3.2. Отделение зерновых оболочек от пульпы размолотого зерна и промывка зерновых оболочек

На отделение зерновых оболочек от пульпы после дробления влияет размер частиц зерновых оболочек (табл. 2).

Таблица 2

Влияние размера зерновых оболочек на степень отделения и на потери крахмала и белка

| № | Тип зерна | Размер частиц, мм | Процент отделенных частиц, % | % потерь крахмала от общего количества крахмала в зерне, % | % потерь белка общего количества белка в зерне, % |
|---|-----------|-------------------|------------------------------|--|---|
| 1 | пшеница | 5,0 | 99,6 | 15,2 | 7,8 |
| 2 | пшеница | 1,0 | 98,8 | 3,0 | 1,12 |
| 3 | пшеница | 0,02 | 0 | Нет разделения | Нет разделения |
| 4 | тритикале | 5,0 | 99,5 | 14,5 | 7,2 |
| 5 | тритикале | 1,0 | 98,6 | 2,9 | 1,04 |
| 6 | тритикале | 0,02 | 0 | Нет разделения | Нет разделения |

Показано, что при влажном размолотом зерна до размера 1мм основной массы (80-85%) частиц зерновых оболочек осуществляется разделение суспензии на фракции, а потери крахмала с зерновыми оболочками не превышают 3% от общего количества крахмала в зерне. Определено влияние скорости подачи суспензии на разделение и

скорости вращения сит на показатели отделения: % остаточных частиц и количество сухих веществ в зерновых оболочках (табл. 3).

Таблица 3.

Влияние скорости подачи зерновой суспензии и скорости вращения сит на показатели отделения зерновых оболочек

| № опыта | Скорость вращения сит, тыс. об/мин | Проток через сита, л/час | % остаточных частиц на сите 0,5мм | % остаточных частиц на сите 1мм | % сухих веществ в зерн. оболочках, % |
|---------|------------------------------------|--------------------------|-----------------------------------|---------------------------------|--------------------------------------|
| 1 | 5,0 | 4,0 | 0,01 | 4,5 | 25,0 |
| 2 | 5,0 | 6,0 | 0,05 | 6,2 | 31,2 |
| 3 | 5,0 | 8,0 | 0,10 | 8,5 | 35,0 |
| 4 | 10,0 | 4,0 | 0,80 | 1,2 | 28,0 |
| 5 | 10,0 | 6,0 | 1,50 | 2,4 | 26,0 |
| 6 | 10,0 | 8,0 | 2,45 | 3,5 | 25,0 |
| 7 | 5,0 | 4,0 | 0,005 | 2,5 | 23,0 |
| 8 | 5,0 | 6,0 | 0,01 | 4,2 | 28,5 |
| 9 | 5,0 | 8,0 | 0,05 | 5,4 | 32,0 |
| 10 | 10,0 | 4,0 | 0,1 | 0,2 | 28,3 |
| 11 | 10,0 | 6,0 | 0,3 | 0,6 | 25,0 |
| 12 | 10,0 | 8,0 | 0,5 | 0,8 | 21,5 |

Подобран оптимальный режим отделения зерновых оболочек от пульпы зерна после дробления (вариант №3 в табл. 3), промывки зерновых оболочек после первичного отделения: при температуре 15⁰С с гидромодулем 2:1.

3.3. Разделение крахмально-белковой суспензии

После удаления амилопектина при переработке пшеницы и после первого центрифугирования суспензии крахмала тритикале остается фугат, содержащий 40-52% крахмала и основное количество белка и пентозанов. Отделение от фугата оставшегося крахмала (амилозы) затруднено из-за образования ячеистой структуры, обладающей свойством удерживать частицы крахмала. Без дополнительной обработки фугат пшеницы и тритикале на фракции не разделяется.

От скорости оседания частиц крахмала из суспензии зависит величина фактора разделения, при котором крахмал осаждается в нижнюю фракцию, а остальные компоненты суспензии остаются в фугате. Проведены эксперименты по определению предельного фактора разделения G при центрифугировании суспензий крахмала пшеницы и тритикале. Результаты экспериментов для суспензий с различной скоростью оседания крахмальных частиц представлены на рис.3.

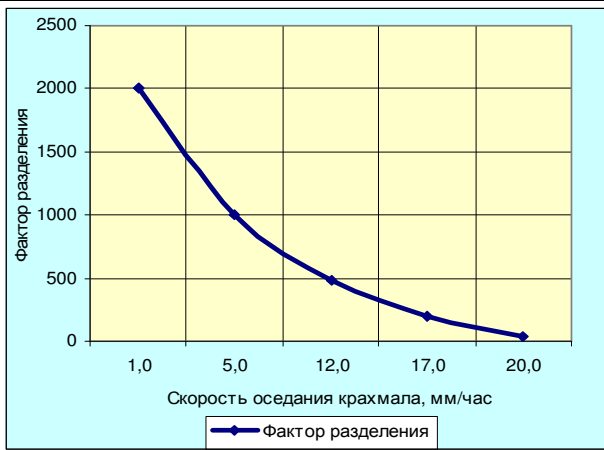


Рис.3 Связь предельного фактора разделения G и скорости оседания крахмала из крахмально-белковой суспензии.

Проведены эксперименты по изучению влияния pH на скорость оседания крахмала из крахмально-белковой суспензии (рис.4). При кислом и нейтральном pH суспензии крахмал оседает при комнатной температуре крайне медленно, в щелочной области pH отделение крахмала от суспензии происходит с большей скоростью, т.к. частицы белка частично коагулируют и приобретают больший размер, что приводит к разрушению ячеистой структуры, удерживающей крахмал.

Изучено влияние скорости перемешивания крахмально-белковой суспензии (центробежного критерия Рейнольдса) на скорость оседания крахмала (рис.5). Показано, что механическое воздействие на крахмально-белковую суспензию с pH 4,5, при котором без обработки скорость оседания минимальна, увеличивает скорость оседания крахмала более чем в два раза. Механическое воздействие также приводит к разрушению ячеистой структуры, удерживающей крахмал, но оно происходит за счет уменьшения размера частиц белка.

При изменении pH в щелочную сторону и увеличении размера частиц белка в процессе разделения в центробежном поле белок может отделяться вместе с крахмалом.

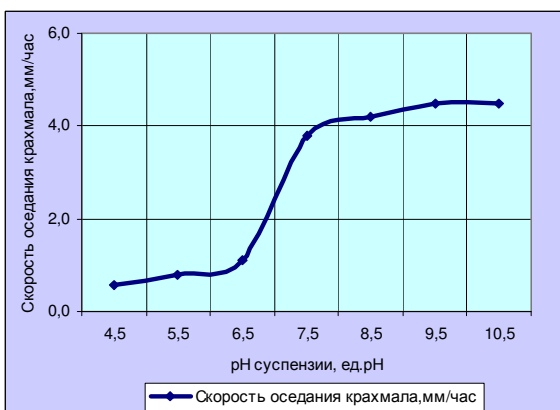


Рис.4 Влияние величины pH суспензии на скорость оседания крахмала при комнатной температуре (для пшеницы и тритикале).

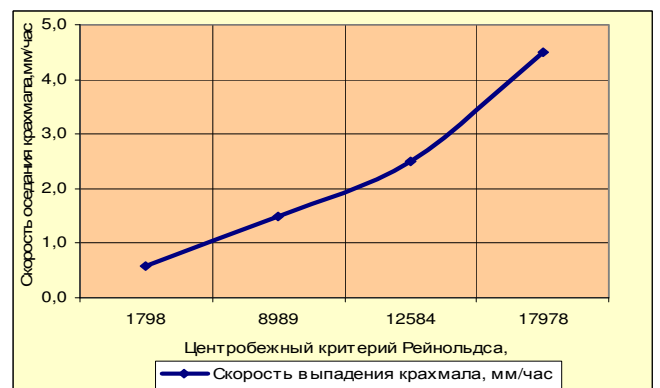


Рис.5 Влияние скорости перемешивания суспензии (центробежного критерия Рейнольдса) на скорость оседания крахмала при температуре 20° С и pH 4,5 в течение 10мин перемешивания (для пшеницы и тритикале).

Предложено совмещение двух способов: изменения значения pH суспензии до оптимального и добавление механического воздействия, приводящее к разрушению

структур, мешающих отделению амилозы. Показано при анализе суспензии на седиментаторе, что одновременное изменение рН суспензии в щелочную сторону и механическое воздействие на суспензию с щелочным рН приводит к уменьшению размера белковых частиц суспензии с 20мкм до 5-7мкм. Именно уменьшение размера белковых частиц приводит к полному разрушению структур, удерживающих амилозу, после чего амилоза легко отделяется от крахмально-белковой суспензии. Снижение оптимального значения рН суспензии с 8,5-9,5 до 7,5 при дополнительной механической обработке приводит к снижению в концентрате крахмала количества балластных солей.

Глава 4. Ферментативный гидролиз крахмала пшеницы и тритикале

Ферментативный гидролиз крахмала пшеницы и тритикале, предлагаемый в работе, рассчитан на использование в питательной среде для культивирования микроорганизмов, утилизирующих моно- и ди- сахара и не обладающих собственными амилолитическими ферментами.

Показано, что после первой стадии ферментативного гидролиза крахмала пшеницы и тритикале при начальной концентрации крахмала в суспензии 20% и 40% качественный состав ферментолитатов отличается тем, что гидролизат крахмала пшеницы по сравнению с гидролизатом крахмала тритикале содержит, кроме мальтозы, большое количество декстринов (табл. 4).

Таблица 4

Сравнительная характеристика первой стадии ферментативного гидролиза крахмала пшеницы и тритикале при концентрации крахмала в суспензии 20 и 40%.

| Вид крахмала | Содержание крахмала в суспензии, % | Концентрация фермента, МЕ/г крахмала | Время экспозиции с ферментом, мин | Кол-во глюкозы, % | Кол-во мальтозы, % | Кол-во декстринов, % |
|--------------|------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------|-------------------|--------------------|----------------------|
| пшеница | 20,0 | 0,8 | 60,0 | 15,0 | 45,0 | 40,0 |
| | 40,0 | 2,0 | 120,0 | 15,0 | 35,0 | 50, |
| тритикале | 20,0 | 0,2 | 15,0 | 5,0 | 85,0 | 10,0 |
| | 40,0 | 0,8 | 30,0 | 5,0 | 75,0 | 20,0 |

В работе показано, что количество амилолитических ферментных препаратов, необходимых для полного гидролиза крахмала, зависит от источника крахмала (пшеница, тритикале) и начальной концентрации крахмала в суспензии. В отличие от способов ферментализации, применяемых в спиртовой промышленности, при ферментализации крахмала до глюкозы или мальтозы с начальной концентрацией крахмала в суспензии 38-40%, концентрация фермента в суспензии должна быть выше, чем применяемая при

производстве спирта концентрация α -амилазы 0,1-0,2МЕ/г крахмала. При начальной концентрации крахмала 18-20%, удается снизить необходимую концентрацию фермента почти до той же величины (табл. 4), что и используется при получении спирта.

Подобраны оптимальные условия для получения ферментолизата крахмала пшеницы, содержащего глюкозу, а также ферментолизата крахмала тритикале, содержащего мальтозу. Процессы ферментативного гидролиза проводили при начальной концентрации крахмала 20 и 40%. При начальной концентрации крахмала 20% после дополнительной очистки ферментолизата проводится дополнительное концентрирование, а при начальной концентрации крахмала 40% ферментолизат используют без упаривания.

Преимущество использования крахмала зерна тритикале для получения углеводной части питательной среды состоит в том, что для получения мальтозного сиропа достаточно одной стадии ферментолиза и снижения необходимого количества фермента с 2МЕ/г крахмала до 0,2МЕ/г крахмала.

Глава 5. Получение компонентов азотистого питания

5.1 Получение зернового супернатанта

Разработана технология получения зернового супернатанта, включающая отделение в центробежном поле от зерновой пульпы после влажного дробления крахмала, белка и вакуумное упаривание жидкой фракции до концентрации сухих веществ 48-52%.

Исследован состав полученного после упаривания супернатанта. Показано, что по составу аминокислот, содержанию аминного и общего азота зерновой супернатант не уступает лучшим образцам кукурузного экстракта (Ефремовский крахмало-паточный комбинат) (табл. 5).

Таблица 5

Процентное содержание аминокислот в кукурузном экстракте, зерновом супернатанте и ферментолизате глютена.

| № | Наименование аминокислоты | % от общего содержания аминокислот | | |
|---|---------------------------|------------------------------------|---|--|
| | | Кукурузный экстракт | Упаренный супернатант пшеницы и тритикале | Ферментолизат пшеничного белка (глютена) |
| 1 | Глицин | 5,4 | 5,6 | 4,13 |
| 2 | Аланин | 7,3 | 7,1 | 13,37 |
| 3 | Валин | 5,8 | 5,6 | 8,04 |
| 4 | Лейцин | 10,5 | 16,8 | 10,9 |
| 5 | Изолейцин | 2,0 | 2,2 | 3,5 |
| 6 | Серин | 5,3 | 5,1 | 5,9 |
| 7 | Треонин | 4,2 | 6,8 | 1,79 |
| 8 | Аспарагиновая кислота | 8,0 | 8,0 | 2,02 |
| 9 | Глутаминовая кислота | 19,3 | 18,8 | 12,09 |

| | | | | |
|----|-------------|-----|-----|------|
| 10 | Лизин | 5,0 | 4,5 | 1,3 |
| 11 | Аргинин | 4,4 | 4,6 | 9,0 |
| 12 | Цистин | 0,1 | 0,1 | 1,5 |
| 13 | Метионин | 2,0 | 5,4 | 5,6 |
| 14 | Фенилаланин | 3,8 | 3,6 | 4,0 |
| 15 | Пролин | 9,8 | 9,6 | 9,23 |
| 16 | Тирозин | 2,5 | 2,5 | 2,7 |
| 17 | Гистидин | 4,2 | 4,1 | 4,1 |
| 18 | Триптофан | 0,4 | 0,5 | 0,8 |
| 19 | Сумма | 100 | 100 | 100 |

5.2 Ферментативный гидролиз зернового белка

Проведены кинетические эксперименты по изучению влияния режимных параметров (начальной концентрации субстрата, концентрации фермента, времени экспозиции, типа фермента) на скорость ферментативного гидролиза зернового белка. Показано существенное ингибирование процесса продуктом реакции гидролиза белка (рис.8). Показано, что удаление продукта гидролиза – свободных аминокислот - из зоны реакции центрифугированием, а затем внесение такого же как удаленное, количество водопроводной воды или дополнительного раствора фермента восстанавливает скорость гидролиза белка. Показано, что при низких концентрациях белка 30-45г/л в суспензии, подвергаемой ферментативному гидролизу, влияние ингибирования конечным продуктом незначительно. Показано, что для получения компонента питательной среды, содержащего азотистое питание, по параметрам близкого к кукурузному экстракту,

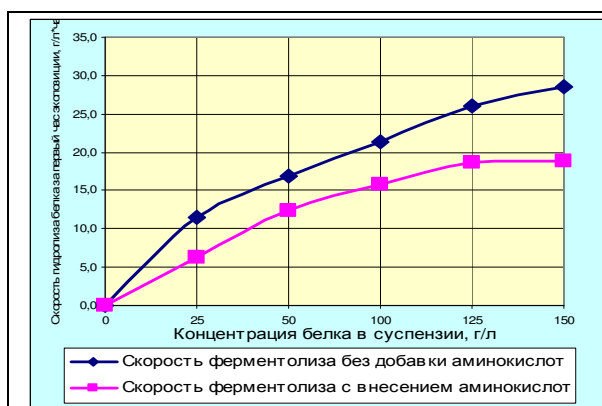


Рис.8 Зависимость скорости ферментации белка за первый час экспозиции от начальной концентрации белка в суспензии с внесением дополнительного количества свободных аминокислот и без него

следует проводить ферментацию зернового белка при начальной концентрации белка 30-45г/л, а затем упаривать полученный ферментолит до содержания СВ 45-50%. Состав ферментолита пшеничного белка приведен в табл. 5. Разработана технология ферментативного гидролиза зернового белка, учитывающая ингибирование процесса ферментации конечным продуктом, что позволяет повысить степень гидролиза белка с 53% (при одностадийном гидролизе) до 95% от начального содержания белка.

В процессе переработки 1кг зерна получается 0,10-0,12кг зернового супернатанта. Такое количество азотистого компонента не может удовлетворить потребности некоторых

культур микроорганизмов в ростовых факторах (например: продуцента лизина). Сухой пшеничный белок (клейковина) имеет высокую товарную стоимость, однако, при переработке некондиционного зерна с низким общим содержанием белка, содержание глютелинов незначительно (менее 18% от общего количества белка в зерне). В таком случае, а также при переработке тритикале, возможно проведение ферментативного гидролиза белка сразу после отделения крахмала, а затем упаривание полученной азотистой части до содержания СВ 50%.

Глава 6. Переработка зерновых оболочек в пищевые волокна и сырье для модификации целлюлозы.

Зерновые оболочки, полученные по экспериментальной технологии, отличаются от отрубей, полученных при традиционной переработке зерна, значительно более низким содержанием крахмала (3-5% от общих СВ) и белка (2-3% от общих СВ), т.е. состоят практически из клетчатки.

В работе предложена технология обработки зерновых оболочек перекисью водорода. Это приводит к окислению остатков крахмала и белка до диоксида углерода. Кроме того, после первоначального отщепления ацетильных групп от лигнина образуется уксусная кислота. Совместное действие уксусной кислоты, активного кислорода приводит к разложению и окислению до диоксида углерода лигнина, входящего в состав клетчатки. Аналогично разрушается гемицеллюлоза. Таким образом, после обработки зерновых оболочек перекисью водорода остается только целлюлоза.

Результаты экспериментов в колбах по изучению влияния концентрации перекиси водорода, начальной концентрации сухих веществ зерновых оболочек, температуры процесса, времени экспозиции с реагентом на ВУС и конечную массу волокон показали, что при начальной концентрации СВ зерновых оболочек 20%, температуре 112-121⁰С, концентрации H₂O₂ 6% происходит частичное окисление лигнина до низкомолекулярного лигнина, ВУС- 5мл/гСВ (низкая), конечная масса темная; при СВ зерновых оболочек 5%, температуре 121⁰С концентрации H₂O₂ 12% большая часть (90%) массы зерновых оболочек окисляется до диоксида углерода; при начальной концентрации СВ 5%, температуре 80⁰С, концентрации H₂O₂ 9% - ВУС -7мл/гСВ (соответствует ТУ), конечная масса (35% от начальной) волокон светлая.

Показано, что гидродинамические характеристики процесса (в колбах, стеклянном стакане с магнитным перемешиванием, в аппарате 3л, в ферментере 30л), оцениваемые по сульфитному числу, влияют на величину предельной концентрации перекиси водорода, при которой происходит окисление лигнина и гемицеллюлоз с максимальным выходом целлюлозы, и время экспозиции с реагентом (рис.12,13).

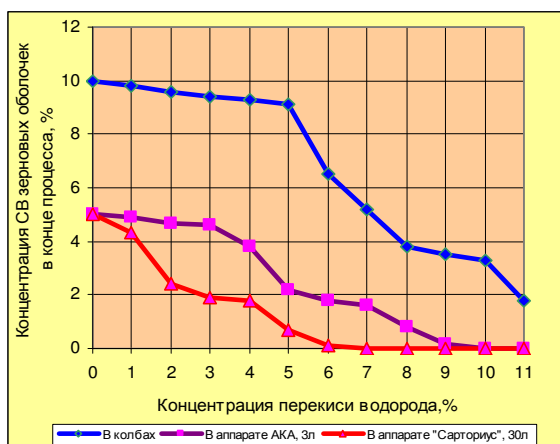


Рис.12 Изменение количества волокон после окончания обработки в колбах и ферментерах АКА 3л и Сарториус 30л при различных концентрациях перекиси водорода

Осуществлена сушка пищевых волокон

Представлен материальный баланс процесса получения пищевых волокон из зерновых оболочек, полученных после влажного дробления зерна пшеницы и тритикале.

Полученная из зерновых оболочек целлюлоза может быть использована не только в качестве пищевых волокон, но и как сырье для модификации целлюлозы (для синтеза КМЦ, НЦ и т.д).

Глава 7. Разработка и апробация технологии биосинтеза биологически активных веществ на питательных средах, компоненты которых получены переработкой зернового сырья

Астаксантин

В главе рассмотрено культивирование продуцента астаксантина дрожжей *Phaffia rhodozyma* на питательной среде, содержащей в качестве источника углеводов ферментолитат крахмала пшеницы, гидролизованный до глюкозы, а в качестве источника органического азота зерновой супернатант. Проведены эксперименты по оптимизации концентрации ферментолитата крахмала и зернового супернатанта в питательной среде по схеме ортогональных латинских прямоугольников. Исследовано влияние освещения на биосинтез астаксантина. Культивирование продуцента астаксантина осуществляли в колбах на качалке при постоянном наружном освещении и в фотобиореакторе вместимостью 3л, снабженном внутренним источником освещения при постоянном и периодическом режиме освещения. Определены оптимальные режимы освещения.

Показано, что при культивировании продуцента астаксантина на питательных средах, полученных переработкой крахмалосодержащего зернового сырья, синтез астаксантина на экспериментальной питательной среде начинается на 12-14 час культивирования, т.е. на 20-24 часа раньше, чем на стандартной питательной среде.

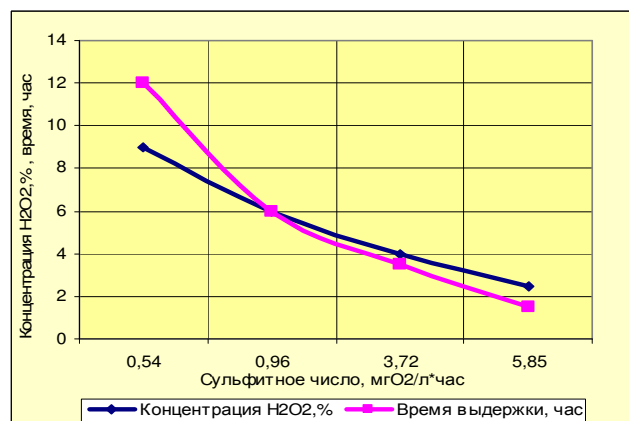


Рис.13 Изменение предельной концентрации перекиси водорода и времени экспозиции с реагентом в зависимости от сульфитного числа в колбах, ферментере от скорости 3л и ферментере 30л.

Сокращается до 3 суток общее время культивирования в колбах и ферментере при периодическом способе культивирования, т.е. продуктивность процесса на экспериментальной среде выше, чем на стандартной питательной среде, включающей кристаллическую глюкозу и пептон.

L-лизин

Культивирование штамма-продуцента L-лизина *Corynebacterium glutamicum* «BIGOR-55», на питательных средах, содержащих в качестве источника углеводов ферментолитат крахмала пшеницы, гидролизованный до глюкозы, ферментолитат крахмала тритикале, гидролизованный до мальтозы, а в качестве источника органического азота - зерновой супернатант, показало, что для каждого источника углеводов существует оптимальная начальная концентрация РВ.

Предпочтительным по достигнутой в культуральной жидкости концентрации продукта и величине коэффициента конверсии РВ в продукт является использование ферментолитата крахмала тритикале до мальтозы.

В работе показано, что при использовании в качестве источника углерода ферментолитата крахмала, для уменьшения лаг-фазы необходимо использовать две стадии выращивания посевного материала: в колбах на среде, содержащей 1,5% РВ, 3% зернового супернатанта, 1% NaCl в течение 18-20 часов, в ферментере на среде, занимающей промежуточное положение между посевной и ферментационной средой и имеющей следующий состав: 4,0% РВ, 4,0% зернового супернатанта, 1% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,15% K_2HPO_4 , 0,07% MgSO_4 . Время культивирования второго пассажа посевного материала, при котором достигается максимальная активность продуцента в основной ферментации, определяется временем изменения рН культуральной жидкости до 6,8 и выходом показателя концентрации растворенного кислорода из минимума.

Показано, что культивирование штамма-продуцента L-лизина на экспериментальной питательной среде имеет ряд преимуществ, по сравнению со стандартной средой. Концентрация РВ, при которой происходит ингибирование роста микроорганизмов, возрастает, что позволяет начинать процесс культивирования с более высоких начальных концентраций РВ

Показано, что экспериментальная среда, содержащая в качестве источника углеводов ферментолитат крахмала, а в качестве источника органического азота содержащей зерновой супернатант и ферментолитат зернового белка, продуцентов лейцина, валина, пробиотика, гликопептидного антибиотика, пищевого белка и фермента лакказы, удовлетворяет потребности микроорганизмов в углеводном и азотистом питании.

Использование в качестве ростового фактора зернового супернатанта и ферментализата зернового белка делает процесс получения биологически активных веществ независимым от других источников органического азота.

Перспективные направления развития технологий переработки зерна для получения ферментационных сред.

Предложенная технология переработки некондиционного зерна должна найти широкое применение в биотехнологии. На питательных средах, содержащих углеводы, культивируют продуценты органических кислот, таких как молочная, лимонная, яблочная и др. Углеводы являются основой для культивирования пробиотиков, пребиотиков, многих видов дрожжей, продуцентов витаминов и ферментов, минорных полисахаридов, лекарственных препаратов. Данную технологию можно использовать для получения крахмала и различных видов патоки. Особенно перспективным в этом случае является переработка зерна тритикале. Используя способ переработки зерновых оболочек можно получать низкомолекулярный лигнин, пульпу для производства некоторых сортов бумажного производства, ценное сырье для органического синтеза.

Основные результаты и выводы

- 1) Исследован процесс переработки крахмалсодержащего сырья для определения основных закономерностей, влияющих на выход крахмала и белка по предложенной схеме переработки зерновых культур.
- 2) Изучен процесс ферментативного гидролиза крахмала и белка для получения компонентов питательной среды, удовлетворяющих широкий круг микроорганизмов в качестве источника углерода и органического азота.
- 3) Показана возможность использования зернового супернатанта после дополнительной переработки для культивирования микроорганизмов в качестве заменителя кукурузного экстракта.
- 4) Разработан способ переработки зерновых оболочек (шелухи) в пищевые волокна и в сырье для модификации целлюлозы.
- 5) На основании полученных результатов разработана технология переработки крахмалсодержащего растительного сырья в компоненты питательной среды для культивирования микроорганизмов. Изучено культивирование на питательных средах из зернового сырья, полученных по предлагаемой технологии, продуцентов биологически активных веществ – L-лизина, астаксантина, L-лейцина, L-валина, пробиотика (*Bacillus subtilis* 2266), продуцента гликопептидного антибиотика (*Streptomyces sp.* 205), базидиальных грибов – продуцентов пищевого белка и фермента лакказы.

Показано, что использование ферментоллизатов крахмала некондиционной пшеницы и тритикале в качестве источника углеводов, а зернового супернатанта и ферментоллизата зернового белка как источника органического азота полностью удовлетворяет потребности продуцентов, обеспечивая высокий выход целевых продуктов.

Основные результаты диссертации изложены в следующих работах:

1. Герман Л.С. Ферментоллизат глютена как ростовой фактор процесса ферментации. /Федотова Н.В., Бирюков В.В., Герман Л.С., Поляков А.Н.// Биотехнология, 2009, №4. С. 64-68.
2. Герман Л.С. Кинетика ферментоллиза глютенной фракции пшеницы /Федотова Н.В., Герман Л.С., Бирюков В.В.// Биотехнология, 2009, №6. С 62-67.
3. Герман Л.С. Математическое моделирование процессов ферментативного гидролиза глютена с применением методов математического планирования экспериментов. /Федотова Н.В., Бирюков В.В., Герман Л.С.// Сельскохозяйственная биотехнология, 2009, №12. С 61-65.
4. Герман Л.С. Оптимизация процесса ферментоллиза зернового белка для культивирования микроорганизмов. / Федотова Н.В., Бирюков В.В., Герман Л.С., Поляков А.Н.// Химрегаты, 2008, №1 (5). С 33-34.
5. Патент РФ на полезную модель № 71118 «Универсальная автоматизированная установка для культивирования фотозависимых микроорганизмов»// Жаворонков В.А., Шкарин Н.Ю., Герман Л.С., бюл.№6, 27.02.2008г.
6. Патент РФ № 2410419 «Способ переработки крахмалсодержащего растительного сырья для приготовления компонентов ферментационных сред, используемых в микробиологической промышленности при культивировании микроорганизмов»// Герман Л.С., Метальникова Н.В., Сенаторова В.Н., Бирюков В.В., Щерблякин И.Н., Федотова Н.В., Пасхин А.В.,//Заявка №2009124609, приоритет с 29.06.2009, Бюл.№3, регистрация 27.01.2011г.
7. Герман Л.С. Влияние характеристик работы роторно-пульсационного аппарата на качество компонентов питательной среды из зерна для экологически чистой технологии биосинтеза./ Шадрин С.Б., Герман Л.С., Поляков А.Н., Сенаторова В.Н., Ковалева Е.В.// Сборник научных трудов МГУИЭ, 2006, выпуск 3. С 275-280.
8. Герман Л.С. Технология и опытная установка для ферментативного гидролиза целлюлозосодержащих зерновых отходов/ Федотова Н.В., Бирюков В.В., Герман Л.С., Поляков А.Н., Корпуснова С.Н.// Материалы Научно-практической конференции НТТМ «Научно-техническое творчество молодежи - путь к обществу, основанному на знаниях», 2007. С 257-259.
9. Герман Л.С. Культивирование дрожжей *Phaffia rhodozyma* в качестве продуцента астаксантина на среде, полученной из отходов пищевого производства или зерна. /Жаворонков В.А., Герман Л.С., Захаров З.В.//Материалы Международной конференции «New Information Technology in Medicine, Pharmacology, Biology and Ecology», Гурзуф, 2010. С 257-259.