

На правах рукописи

Смирнова Вероника Дмитриевна

**Отходы производства концентрированных
белковых продуктов из сои как сырьё для
получения кормовых добавок**

Специальность: 03.01.06 – Биотехнология
(в том числе бионанотехнологии)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата технических наук

Москва – 2012

Работа выполнена на кафедре биотехнологии Российского химико-технологического университета имени Д.И.Менделеева.

Научный руководитель: кандидат технических наук, доцент
Шакир Ирина Васильевна

Официальные оппоненты: доктор технических наук, профессор
Бирюков Валентин Васильевич
Московский государственный
университет инженерной экологии

доктор технических наук, профессор
Правдин Валерий Геннадьевич
Научно технический центр
биологических технологий в сельском
хозяйстве

Ведущая организация: Тверской государственный
технический университет

Защита состоится «14» февраля 2012 г. в 10^{30} часов 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., д.9, в аудитории 443 (конференц зал)

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

Автореферат диссертации разослан «12» января 2012 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
ДМ 212.204.13

Шакир И.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Одной из мировых проблем при постоянно увеличивающемся населении Земли была и остается нехватка продуктов питания, в особенности белковой составляющей рациона человека. По данным ВНИИ питания РАМН за последние 20 лет дефицит пищевого белка в России превысил 1 млн. т. в год. Современные подходы для решения данной проблемы направлены на использование в пищевых целях растительного соевого белка, служащего признанной альтернативой животному белку.

В связи с этим в 2003 году Министерством сельского хозяйства России была принята целевая программа «Развитие производства и глубокой переработки сои в Российской Федерации на 2003–2011 гг.», реализация которой привела к увеличению производства данной культуры в нашей стране до 740 тыс. тонн/год. К 2020 году планируется довести производство сои в России до 12 млн. тонн [Устюжанин, 2011]. Однако, в рамках этой программы на сегодняшний день 95 % сои отечественного производства перерабатывается на кормовые цели, что является нерациональным, поскольку потенциал переработки данного сырья гораздо выше. За рубежом активно развиваются технологии глубокой переработки сои с получением белковых продуктов: концентратов и изолятов, которые находят широкое применение в пищевой промышленности [Alibhai, 2006, Wang, 2004 и др.].

Для развития технологий глубокой переработки сои в России необходим комплексный подход, учитывающий как недостатки уже известных технологий, так и потребности страны в продуктах вторичной переработки сырья.

Анализ литературы показал, что основным недостатком технологий производства концентрированных белковых продуктов из сои является значительное количество отходов, требующих дальнейшей переработки [Paula, 2008, Rodrigues, 2006]. Так, при получении концентрата белка сои выделением безазотистых экстрактивных веществ из 1 тонны обезжиренных соевых бобов образуется в среднем 260 кг соевой мелассы. Получение изолятов экстракцией белка из 1 тонны соевого шрота сопровождается образованием около 6 тонн соевой сыворотки и 300 кг депротеинизированного соевого шрота.

Указанная проблема может быть решена традиционными приемами переработки вторичного сырья микробной биоконверсией в продукты кормового назначения, что также является актуальным, поскольку в настоящее время российское животноводство испытывает недостаток полноценных кормов. Стоит проблема низкого качества кормов - несбалансированность состава и недостаток белка, что ведет к снижению генетического потенциала продуктивности животных.

Таким образом, использование отходов с целью обогащения их микробным белком позволит решить экологические проблемы, возникающие при реализации технологий переработки сои, а также расширит сырьевую базу для получения кормовых продуктов.

В связи с этим **целью** настоящей работы явилась оценка качества образующихся отходов в технологиях получения концентрированных белковых продуктов, а также экспериментальное обоснование возможности использования отходов производства соевых белковых продуктов для получения на их основе кормовых добавок. Для достижения цели поставлены следующие **задачи**:

- Провести оценку влияния технологических параметров получения концентрированных продуктов из сои на состав образующихся отходов;
- Разработать технологию переработки соевой мелассы с получением высокобелковой кормовой добавки, для чего:
 - провести скрининг микробных культур и выбрать микроорганизм, способный наиболее полно ассимилировать компоненты соевого углеводного экстракта;
 - интенсифицировать процесс биоконверсии соевой мелассы путем воздействия агентом окислительного стресса на микроорганизм;
 - исследовать влияние режимов культивирования выбранного продуцента на параметры технологического процесса и качество микробной биомассы;
- Разработать технологию переработки твердого остатка депротеинизированного соевого шрота, образующегося при получении изолята белка сои, в белково-углеводную кормовую добавку, для чего:
 - провести скрининг грибных культур по степени потребления субстрата и накоплению белка в биомассе при твердофазном культивировании на твердом остатке отхода производства изолята белка сои;
 - исследовать способы повышения биодоступности компонентов отхода для культивирования дрожжей при использовании кислотного и ферментативного гидролиза, определить оптимальные параметры обработки твердого отхода;
- Определить возможность использования соевой сыворотки в качестве питательной среды для культивирования дрожжей.

Научная новизна результатов исследований. Среди набора дрожжевых и грибных культур, способных развиваться на питательных средах, содержащих нативные отходы переработки сои, выявлены штаммы, обладающие наибольшей физиологической активностью (удельная скорость роста, максимальное накопление биомассы, содержание белка в биомассе). При культивировании на питательной среде, содержащей соевую мелассу, штамм *Endomycopsis fibuligera*, способен ассимилировать до 87,5 % углеводов мелассы, биомасса при этом содержит не менее 35,7 % истинного белка. На питательной среде с соевой сывороткой штамм *Rhodotorua rubra* способен ассимилировать до 76,8 % углеводов, образующаяся биомасса содержит 48,0 % истинного белка. При твердофазном культивировании грибов на твердом отходе изолята белка сои оптимальными характеристиками обладает штамм *Aspergillus niger* - образующийся продукт содержит до 36,4 % истинного белка. Подтверждены ранее выявленные закономерности повышения ростовых характеристик микроорганизмов при использовании инокулята, активированного под действием пероксида

водорода (для культуры *Endomycopsis fibuligera*). Показано, что фильтрат культуральной жидкости *Endomycopsis fibuligera* при культивировании на питательной среде на основе соевой мелассы, может использоваться в качестве питательной среды для культивирования молочнокислых бактерий *Lactobacillus plantarum*.

Практическая значимость.

Проведена оценка влияния параметров получения концентрированных белковых продуктов из сои на состав отходов, что позволило выявить потенциальную ценность данного сырья для получения микробных белковых продуктов. Разработана технология переработки соевой мелассы с получением биомассы *Endomycopsis fibuligera* и жидкой пробиотической добавки на основе молочнокислых бактерий. Проведена технико-экономическая оценка эффективности реализации предложенной технологии при расчетной мощности производства 5000 т в год по перерабатываемому сырью. Предложены варианты биоконверсии депротеинизированного соевого шрота в белково-углеводные кормовые добавки на основе дрожжей с содержанием сырого протеина не менее 39,0 %, на основе грибной культуры *Aspergillus niger* с содержанием сырого протеина не менее 52,0 %.

Разработаны лабораторные регламенты на получение кормовых добавок на основе соевой мелассы и депротеинизированного соевого шрота.

Апробация работы. Результаты диссертационной работы были представлены в материалах IV и V Московских международных конгрессов «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2006 г.; Москва, 2007 г.); X и XII международных конференций «Окружающая среда для нас и будущих поколений»; Всероссийской научно-технической конференции «Наука – производство – технологии – экология» (Киров, 2008 г.); Киров, 2009 г., Киров, 2010 г.), студенческом конкурсе инновационных проектов (Москва 2008 г), Международной химической ассамблее ISA-2008 (Москва 2008), 8-й Международной конференции «Сотрудничество для решения проблемы отходов» (Харьков 2011 г.). Результаты исследования использованы в учебном процессе при подготовке студентов-биотехнологов.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 10 печатных работ, в том числе 2 статьи в рецензируемых журналах.

Объем и структура работы. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, выводов, списка литературы, приложений. Работа изложена на 203 страницах текста. Работа содержит 36 рисунков, 42 таблицы и 5 приложений. Библиография включает 210 наименований, из них иностранных источников – 92.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

В обзоре литературы представлен состав сои, проведен сравнительный анализ основных технологий получения концентрированных белковых продуктов из сои. Приведены данные об образующихся отходах и способах их переработки при использовании физико-химических и биотехнологических методов. Описаны существующие способы интенсификации процессов микробной биоконверсии с использованием предварительной обработки субстрата, а также при воздействии окислительного стресса на микроорганизмы. Показана перспективность использования отходов сельского хозяйства и пищевой промышленности при получении кормовых добавок. На основании анализа литературного обзора обоснована необходимость разработки технологических решений по получению кормовых добавок на основе отходов глубокой переработки сои.

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Основным объектом исследования являлся соевый шрот с содержанием белка 50,0 %, индекс растворимости белка (NSI) 83,2 %, содержание общих углеводов 29,7 %.

В качестве микробных объектов были использованы культуры грибов, относящиеся к родам *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Phanerochaete*, дрожжей – *Saccharomyces cerevisiae* штамм *SL-100*, а также промышленные расы “Я”, II, XII, *S. carlsbergensis*, *Candida tropicalis*, *C. utilis* и *C. maltosa*, *Rhodotorula rubra*, *Torulopsis fumata* и *T. utilis*, *Yarrowia lipolytica*, *Endomycopsis fibuligera* и бактерий *Lactobacillus plantarum* и *Lactobacillus acidophilus*, полученные из коллекции кафедры биотехнологии РХТУ им. Д.И. Менделеева.

Глубинное культивирование дрожжей и грибов проводили в колбах Эрленмейера объемом 250 мл (100 мл среды) при инкубировании на качалках New Brunswick Scientific G10 (150 об/мин) при температуре 30-32°C и 28-30°C, соответственно, а также в лабораторном ферментере Фермус-3 НПО «Биоавтоматика» (коэффициент массопередачи по кислороду – 800-850 ч⁻¹) объемом 5 л с заполнением питательной средой на 70 % и постоянном перемешивании 250 об/мин.

Накопление микробной биомассы определяли прямым подсчетом клеток в камере Горяева, гравиметрическим методом и косвенно по содержанию белка. Рост молочнокислых культур и активность молочнокислого брожения оценивали по изменению рН среды при использовании рН-метра, а также при определении общей титруемой кислотности [Горбатова, 1997].

Пробиотическую активность молочнокислых бактерий, полученных при культивировании на соевой мелассе, устанавливали путем определения устойчивости культур к высокотемпературному воздействию (60-65⁰С), к желчи, ферментам пищеварительного тракта - трипсину и пепсину, поваренной соли (NaCl), фенолу, к щелочной реакции среды [Банникова, 1975].

Содержание сырого протеина, истинного белка, общих углеводов и общих жиров в исследуемом субстрате и продукте определяли в соответствии с

ГОСТ 28178-89. Острую токсичность микробной биомассы – с помощью тест-культуры инфузорий *Tetrachymena pyriformis* [ГОСТ 28178-89].

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакетов программ «Excel» и «Statistica 6.0».

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка влияния технологических параметров получения концентрированных продуктов из сои на состав образующихся отходов

Анализ опубликованных в литературе данных, касающихся способов получения концентрированных белковых продуктов из сои, показал, что наиболее перспективной является технология, включающая предварительное обезжиривание соевых бобов с получением масла. В зависимости от целевого продукта дальнейшая переработка развивается в двух направлениях: в случае получения концентратов белка сои наиболее распространенной и полно отвечающей требованиям качества конечного продукта является спиртовая экстракция безазотистых соединений из соевого шрота. Отход – соевая меласса образуется на стадии регенерации экстрагента из полученного углеводного экстракта. В случае получения изолятов белка сои, наилучшими характеристиками обладает продукт, образующийся в условиях щелочной экстракции белка из соевого шрота. При реализации этой технологии образуется два отхода: на стадии фильтрации суспензии соевого шрота образуется депротенинизированный твердый остаток, на стадии выделения белка из экстракта образуется соевая сыворотка (схема 1).



Схема. 1. Схема переработки соевых бобов с получением концентрированных белковых продуктов

Основные параметры ключевого этапа – экстракции компонентов из соевого шрота – варьируются для различных предприятий в некотором диапазоне, не оказывающем выраженного влияния на характеристики основных продуктов. Однако, изменение условий экстракции в определенной степени может оказывать влияние на состав отходов, что является немаловажным при исследовании дальнейших способов переработки вторичного сырья в кормовые добавки. Поэтому первым этапом нашего исследования стала оценка влияния параметров экстракции (температуры, продолжительности, концентрации экстрагента, содержания сухого вещества в суспензии) на состав образующихся отхо-

дов. При этом оценивали и качество целевого продукта – концентрата и изолята белка сои.

Извлечение безазотистых экстрактивных веществ из соевого шрота. В результате исследования установлено, что оптимальными условиями получения соевого углеводного экстракта без потери качества целевого продукта - концентрата белка сои, являются: продолжительность 60 мин., концентрация этанола - 70 % об., температура 60⁰С, содержание сухого вещества в суспензии 14,5% (табл.1). Образующийся экстракт содержит 89,2 % углеводов в расчете на сухое

Таблица 1

Влияние параметров процесса экстракции углеводов из соевого шрота на состав образующегося отхода и концентрата белка сои

| Время экстракции, мин | Температура экстракции, °С | Конц. экстрагента, % об. | Содержание сухого вещества в суспензии, % | Соевый углеводный экстракт | | Концентрат белка сои | |
|-----------------------|----------------------------|--------------------------|---|---------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|-------------------------|
| | | | | Степень экстракции углеводов, % | Содержание белка в экстракте, г/л | Содержание сырого протеина, % | Содержание углеводов, % |
| 90 | | | 14,5 | 69,0 | - | - | - |
| 120 | 20 | 70 | | 70,1 | 2,32±0,05 | 68,5±0,24 | 6,5±0,10 |
| 60 | 40 | | | 75,3 | - | - | - |
| 90 | | | | 87,4 | 2,31±0,03 | 69,4±0,20 | 5,6±0,12 |
| 60 | 60 | | | 99,0 | 2,22±0,04 | 69,4±0,22 | 5,0±0,14 |
| 90 | | 99,0 | | 2,22±0,04 | 69,4±0,22 | 5,0±0,14 | |
| 20 | | 96 | | 17,0 | - | - | - |
| 60 | | | | 17,0 | 2,30±0,05 | 57,5±0,25 | 17,0±0,10 |
| 60 | | 50 | | 74,5 | - | - | - |
| 90 | | | | 85,0 | 3,4±0,07 | 63,2±0,23 | 9,5±0,13 |
| 60 | 70 | 10 | | 99,0 | - | - | - |
| 90 | | | | 99,2 | 1,5±0,06 | 68,8±0,25 | 3,6±0,12 |
| 60 | | 20 | | 98,6 | - | - | - |
| 90 | | | | 98,6 | 1,65±0,04 | 69,0±0,26 | 6,6±0,14 |

вещество. При анализе состава основного продукта исследуемой технологии - концентрата белка сои показано, что он содержит около 70 % белка и не более 5 % углеводов.

Необходимой технологической стадией процесса является регенерация экстрагента, сопровождающаяся изменением химического состава упариваемого экстракта. Варьирование кислотности экстракта позволило установить оптимальное значение рН - 5,5, что приводит не только к снижению пенообразования в процессе упаривания, но и к частичному гидролизу углеводов и повышению содержания редуцирующих веществ в составе экстракта.

Анализ состава экстракта различной степени концентрирования показал, что при достижении содержания 70% мас. СВ в готовой мелассе доли редуцирующих веществ и общих углеводов снижаются на 3,6 и 4,3 % соответственно, содержание белковых веществ (по сумме аминокислот) снижается на 30%, что свидетельствует о побочных реакциях при получении данного отхода (табл. 2.). Кроме того, в ходе вакуум выпаривания подкисленного до рН 5,5 экстракта наблюдается инверсия около 40%-ов сахарозы в глюкозу и фруктозу.

Таблица 2

Химический состав водно-спиртового экстракта и соевой мелассы

| Наименование отдельных показателей | Спиртовой экстракт | Водный раствор экстрагента после удаления спирта | Соевая меласса | Соевая меласса |
|--|--------------------|--|----------------|----------------|
| Содержание СВ, % масс. | 3,6 | 13,6 | 45,2 | 69,6 |
| Общие сахара, % от СВ | 89,2 | 89,0 | 88,0 | 84,9 |
| РВ (по методу Бертрана-Шорля), % от СВ | 70,4 | 70,4 | 70,0 | 66,8 |
| Сырой протеин (Nx6,25) | 3,1 | 3,1 | 3,1 | 3,1 |
| Аминокислоты, % от СВ: | 9,4 | - | - | 6,6 |
| Сроки хранения | - | менее суток | 2 месяца | 6 месяцев |

Следовательно, наименьшие потери углеводов, ценных с точки зрения компонентов субстрата для микроорганизмов, наблюдаются при минимальной степени концентрирования экстракта, однако при установлении максимальных сроков хранения данных субстратов выявлена ограниченность их использования в концентрациях менее 70 %.

Таким образом, образующаяся соевая меласса представляет собой довольно сложную смесь водорастворимых сахаров на фоне азотистых соединений. Наличие в ее составе значительного количества нередуцирующих веществ 18,1 % мас. может ограничить ее использование в качестве источника углерода в традиционных микробиологических производствах.

Извлечение белковых веществ из соевого шрота при производстве изолята. При исследовании влияния параметров щелочной экстракции белка из соевого шрота на состав образующихся отходов установлено, что высокое содержание углеводов в депротеинизированном твердом остатке согласуется с максимальной степенью экстракции белковых веществ в раствор. Оптимальными условиями получения данного отхода являются продолжительность экстракции 90 мин, рН экстракции 10, температура экстракции 25⁰С, гидромодуль 1:10. Депротеинизированный остаток содержит 65,7 % углеводов. Вторым отходом данной технологии является соевая сыворотка, образующаяся при концентрировании и осаждении белка из раствора при использовании стандартных методов выделения (табл. 3).

Состав отходов, образующихся при выделении белка из соевого шрота

| Твердый остаток | Соевая сыворотка |
|--|---|
| Общие углеводы - $65,7 \pm 1,0$ % | Содержание сухих веществ – 4,6 % |
| - «Сырая клетчатка» - $16,4 \pm 1,0$ % от СВ | Общие углеводы - 51,0, % от СВ |
| - Экстрагируемые спиртом сахара - $13,9 \pm 0,2$ % от СВ | Редуцирующие вещества – 29,0, % от СВ |
| - полисахариды - $35,4 \pm 1,0$ % от СВ | Олигосахара – 22,0 % от СВ |
| Сырой протеин - $22,5 \pm 0,5$ % от СВ | Концентрация белковых веществ, 37,2 % от СВ |
| Общий жир - $1,78 \pm 0,5$ % от СВ | ХПК – 100000 мгО ₂ /л |
| Зола - $10,0 \pm 0,5$ % от СВ | |

Биоконверсия соевой мелассы в дрожжевую биомассу кормового назначения.

Как указывалось ранее, одним из отходов, образующихся при реализации технологии получения концентрата белка сои, является соевая меласса. Предварительные эксперименты по использованию ее в качестве источника углерода в процессах микробного синтеза показали, что наиболее целесообразной является аэробная биоконверсия данного отхода в белковую биомассу кормового назначения.

Отбор продуцентов белка проводили среди имеющихся в коллекции кафедры культур, используемых для получения белковых кормовых добавок. Критериями выбора были максимальное накопление биомассы, содержание белковых веществ в биомассе и степень потребления общих углеводов соевой мелассы (табл. 4). В результате исследования установлено, что наиболее перспективным штаммом, удовлетворяющим этим критериям, является *Endomycopsis fibuligera*. При культивировании на питательной среде, содержащей соевую мелассу в количестве 20 г/л по общим сахарам, выход биомассы достигает 0,41 г/г, содержание сырого протеина в биомассе составляет 51,0 %.

Таблица 4

Скрининг дрожжевых культур при культивировании на питательной среде, содержащей соевую мелассу (20,0 г/л по общим сахарам)

| Микроорганизм | Максимальное накопление биомассы, г/л | Степень потребления углеводов, % | Экономический коэффициент, г/г | Удельная скорость роста, ч ⁻¹ | Содержание сырого протеина в биомассе, % |
|--------------------------------|---------------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|--|--|
| <i>S. cerevisiae II</i> | $4,5 \pm 0,48$ | $82,4 \pm 0,55$ | 0,27 | 0,20 | $51,3 \pm 0,20$ |
| <i>S. cerevisiae XII</i> | $4,3 \pm 0,40$ | $78,9 \pm 0,68$ | 0,27 | 0,19 | $50,6 \pm 0,18$ |
| <i>S. cerevisiae SL100</i> | $4,1 \pm 0,33$ | $78,1 \pm 0,70$ | 0,27 | 0,25 | $49,0 \pm 0,16$ |
| <i>S. cerevisiae "Я"</i> | $4,5 \pm 0,48$ | $74,6 \pm 0,73$ | 0,30 | 0,17 | $48,9 \pm 0,15$ |
| <i>S. carlsbergensis</i> | $3,9 \pm 0,20$ | $72,2 \pm 0,75$ | 0,27 | 0,18 | $47,2 \pm 0,13$ |
| <i>Candida maltosa</i> | $3,8 \pm 0,18$ | $74,9 \pm 0,72$ | 0,26 | 0,18 | $49,8 \pm 0,17$ |
| <i>Candida tropicalis</i> | $4,4 \pm 0,45$ | $82,4 \pm 0,52$ | 0,27 | 0,18 | $54,2 \pm 0,25$ |
| <i>Candida utilis</i> | $4,5 \pm 0,50$ | $81,1 \pm 0,57$ | 0,28 | 0,20 | $50,6 \pm 0,18$ |
| <i>Yarrowia lipolytica</i> | $2,6 \pm 0,11$ | $49,4 \pm 0,90$ | 0,26 | 0,10 | $43,5 \pm 0,10$ |
| <i>Rhodotorula rubra</i> | $4,2 \pm 0,36$ | $79,0 \pm 0,65$ | 0,27 | 0,20 | $48,9 \pm 0,15$ |
| <i>Torulopsis utilis</i> | $4,0 \pm 0,22$ | $74,6 \pm 0,72$ | 0,27 | 0,16 | $45,7 \pm 0,21$ |
| <i>Endomycopsis fibuligera</i> | $7,4 \pm 0,75$ | $87,5 \pm 0,50$ | 0,41 | 0,14 | $51,0 \pm 0,20$ |

Влияние агентов окислительного стресса на эффективность биоконверсии соевой мелассы

Проведенные исследования позволили установить, что степень потребления углеводов при культивировании *Endomycopsis fibuligera* на питательной среде, содержащей соевую мелассу, не превышает 88 %, что при повышенных начальных концентрациях субстрата может существенно затруднить очистку образующихся сточных вод в случае применения данного углеводного экстракта в промышленности. Ранее, на других биологических объектах [Davies et al., 1995, Сорокодумов, 2005, Суясов, 2007] было показано, что пероксид водорода, как агент окислительного стресса, способен оказывать стимулирующее действие на ростовые характеристики микроорганизмов, повышая степень потребления компонентов субстрата. В связи с этим нами была исследована возможность повышения достигнутых ранее показателей при использовании пероксида водорода в качестве окислительного агента на стадии подготовки посевного материала *Endomycopsis fibuligera*.

Результаты по установлению оптимальной концентрации пероксида водорода, а также фазы роста культуры для внесения стрессового агента показали,

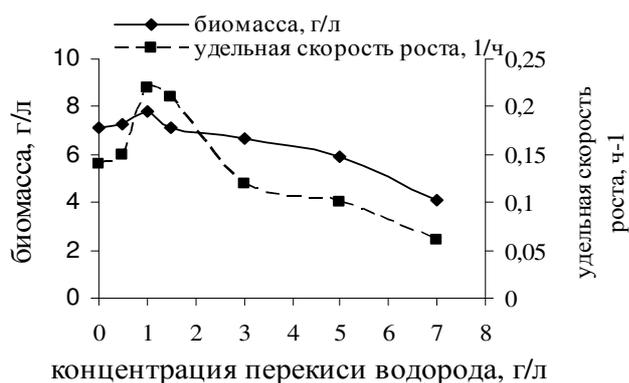


Рис. 1. Влияние концентрации пероксида водорода на ростовые характеристики *Endomycopsis fibuligera*

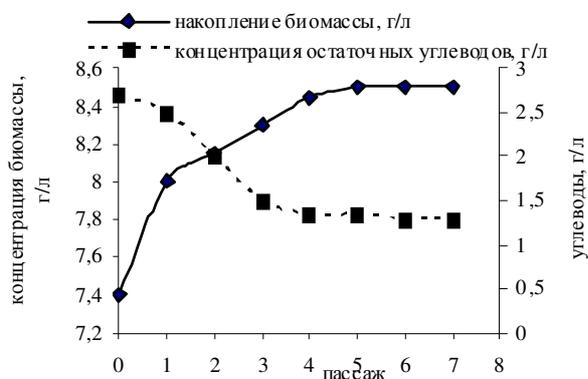


Рис. 2. Адаптация *Endomycopsis fibuligera* к пероксиду водорода при более раннем внесении окислительного агента в каждом последующем пассаже

что положительный эффект наблюдается при внесении стрессорного агента в концентрации 1 г/л на 22 час культивирования, что соответствует экспоненциальной фазе роста культуры и согласуется с литературными данными. В этом случае максимальная скорость роста возрастает до 0,20 ч⁻¹ а максимальное накопление биомассы увеличивается на 9,5 % (рис.1.)

Для увеличения положительного влияния, наблюдаемого при однократном внесении пероксида водорода в культуральную жидкость, исследовали варианты многократного воздействия агентом окислительного стресса на *Endomycopsis fibuligera* в процессе пересевов как в оптимальных подобранных условиях, так и в условиях увеличивающейся концентрации пероксида водорода, а также в варианте снижения возраста культуры. При этом установлено, что наибольший эффект наблюдается в случае многократ-

ных пересевов (5 пассажей) с последующим более ранним внесением окислительного агента в количестве 1 г/л в каждом следующем пассаже. Максимальное накопление биомассы в этом случае составляет 8,5 г/л, степень потребления углеводов повышается с 87,5 до 93,5 %.

Проведение комплекса мер при осуществлении аэробной биоконверсии углеводного экстракта сои с использованием инокулята *Endomycopsis fibuligera*, подверженного многократному воздействию пероксидом водорода, на стадии подготовки посевного материала, позволило сократить продолжительность основного процесса ферментации (на 6-8 часов), повысить выход биомассы на 24 % и получить целевой продукт – дрожжевую биомассу, содержащую 48,6 % истинного белка.

Исследование режимов культивирования *Endomycopsis fibuligera*

Ключевой стадией биотехнологического производства является стадия ферментации. Поэтому на следующем этапе работы исследовали влияние режимов культивирования на эффективность биоконверсии соевой мелассы и качество продукта.

Предварительные исследования по подбору оптимальной концентрации соевой мелассы в среде при культивировании *Endomycopsis fibuligera* показали, что основные параметры процесса – максимальная удельная скорость роста, а также экономический коэффициент, остаются на высоком уровне при концентрации мелассы в среде не более 50 г/л по общим сахарам.

Отработку режимов культивирования осуществляли в лабораторном ферментере (объем 5 литров, заполнение 70 %). Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что при использовании штамма *Endomycopsis fibuligera* для биоконверсии соевой мелассы оптимальным режимом культивирования является непрерывный. Вымывания не наблюдается при скорости протока 0,22 ч⁻¹, при этом содержание сырого протеина и истинного белка в биомассе составляет не менее 58,0 и 45,0 % соответственно.

Таблица 5

Характеристики процессов биоконверсии соевой мелассы культурой *Endomycopsis fibuligera* селективного к пероксиду водорода при различных режимах глубинного культивирования (А – периодическое; Б – отъемно-доливное; В – непрерывное, Г – периодическое с подпиткой)

| Характеристики | А | Б | В | Г |
|--|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Удельная скорость роста, ч ⁻¹ | 0,22 | 0,15* | 0,22** | 0,20 |
| Накопление биомассы, г/л | 21,0±0,25 | 17,4±0,22 | 24,5±0,20 | 45,0±0,50 |
| Состав биомассы, % | | | | |
| • сырой протеин | 61,5±0,95 | 60,4±0,75 | 58,7±0,80 | 50,5±0,85 |
| • истинный белок | 48,6±0,50 | 47,2±0,43 | 48,3±0,15 | 36,2±0,20 |

* - доля отъема культуральной жидкости каждый час

** - скорость протока культуральной жидкости

Повышение экономической эффективности процессов ферментации возможно при использовании замкнутого цикла водопользования. Кроме того, использование рециркуляции позволяет сократить объемы образующихся сточных вод. В связи с этим исследовали процесс культивирования дрожжей на пи-

тательной среде с содержанием соевой мелассы 50 г/л по общим углеводам с рециркуляцией фильтрата культуральной жидкости. Установлено, что при полном возврате фильтрата на стадию культивирования с учетом потерь при фильтрации, уже после 1 цикла степень потребления углеводов снижается до 55 %. Оптимальным является возврат 60 % получаемого на стадии выделения биомассы фильтрата. В этом случае выраженного угнетения ростовых характеристик не наблюдается, а концентрация остаточных углеводов с 5 цикла стабилизируется на уровне 14,5 г/л.

Образующийся фильтрат отличается значительным содержанием остаточных углеводов. Одним из возможных способов повышения степени утилизации углеводных компонентов соевой мелассы, может являться последовательное культивирование нескольких видов микроорганизмов. При культивировании микроорганизмов *L. plantarum* и *L. acidophilus* на культуральной жидкости, образующейся в ходе рецикла (60 %) при культивировании *Endomycopsis fibuligera* установлено, что максимальное накопление биомассы составляет 1,3 г/л для *L. plantarum*. Содержание остаточных углеводов при этом снижается в 1,8 раза. Кроме того, дополнительное введение в состав питательной среды азотсодержащих веществ приводит к повышению накопления биомассы в среднем в 2,3 раза (табл.6).

Таблица 6

Влияние дополнительного внесения источников азота в состав питательной среды на основе фильтрата культуральной жидкости *Endomycopsis fibuligera* на ростовые характеристики *L. plantarum* (начальное содержание общих сахаров – 14,5 г/л)

| Источник азота | Концентрация биомассы, г/л | Остаточные углеводы, г/л | Степень потребления углеводов, % |
|--|----------------------------|--------------------------|----------------------------------|
| Дрожжевой экстракт – 0,5% | 3,0 | 6,3 | 56,5 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ – 4 г/л | 2,7 | 7,7 | 46,8 |
| Пептон – 0,2 % | 3,3 | 6,7 | 53,7 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ – 4 г/л + Пептон – 0,2 % | 2,9 | 7,2 | 50,3 |
| Без дополнительного источника азота | 1,3 | 8,0 | 45,5 |

Таким образом, последовательное культивирование *Endomycopsis fibuligera* и *Lactobacillus plantarum* при биоконверсии соевой мелассы позволяет не только повысить степень использования субстрата, но и получить дополнительный продукт - биомассу молочнокислых микроорганизмов, которая может быть использована в качестве пробиотической добавки для животных. Проведенный анализ пробиотических свойств у исследуемой культуры при развитии на молоке и на питательной среде, содержащей соевую мелассу, показал, что культура устойчива к воздействию температуры в диапазоне 60-65⁰С, желчи и пищеварительным ферментам.

На основе проведенных исследований разработана принципиальная блок-схема переработки соевой мелассы в грибную биомассу и пробиотическую добавку кормового назначения (схема 2, табл. 7).

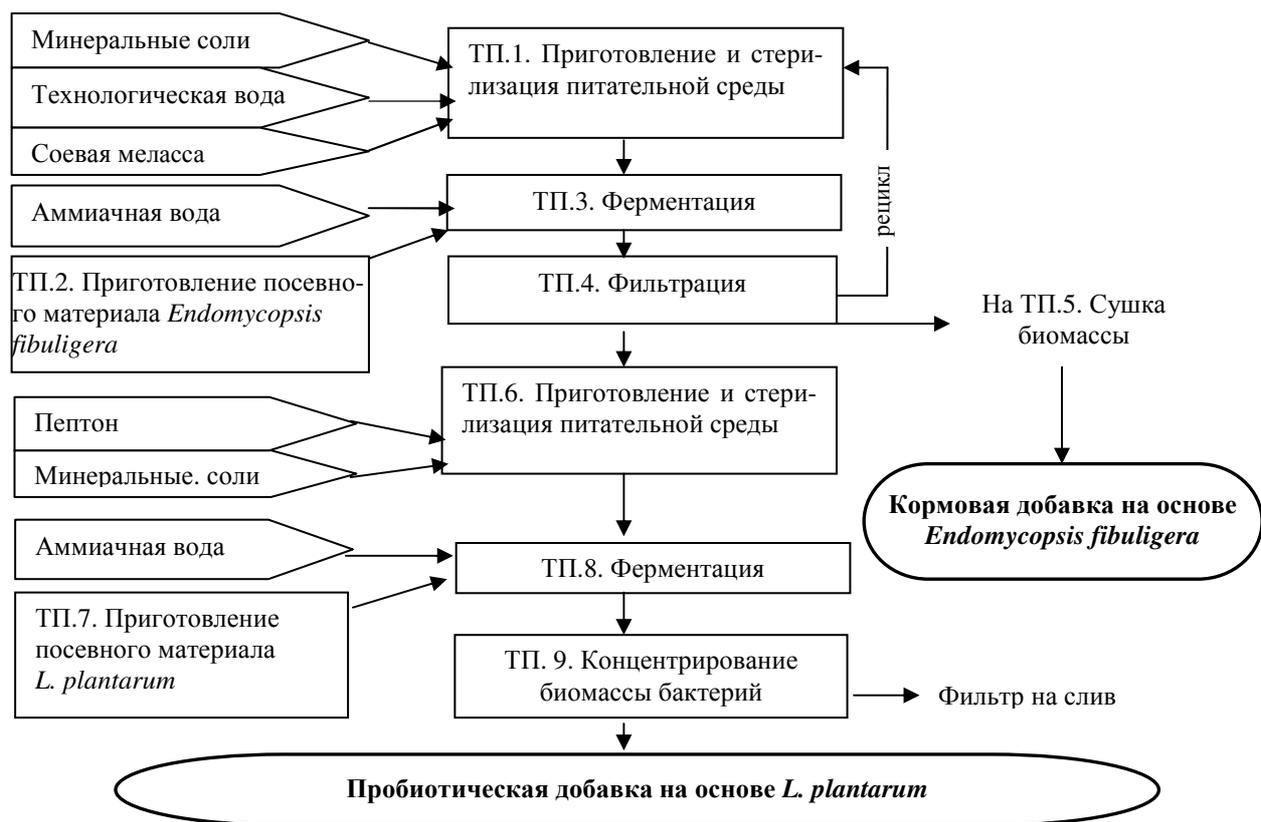


Схема.2. Принципиальная блок схема, включающая основные стадии технологического процесса (ТП) переработки соевой мелассы

Таблица 7

Технико-экономические параметры биоконверсии соевой мелассы мощностью 5000 т/год по объему перерабатываемого сырья в белковую биомассу и пробиотическую кормовую добавку

| Наименование показателя | Единица измерения | Значение показателей |
|--|-----------------------------|----------------------|
| 1. Годовой выпуск продукции | | |
| а) в натуральном выражении | | |
| • белково-углеводная кормовая добавка | т | 1443,3 |
| • жидкая пробиотическая добавка | м ³ | 3237,0 |
| б) в оптовых ценах | | |
| • белковая кормовая добавка | тыс. руб. за т | 13,0 |
| • жидкая пробиотическая добавка | тыс. руб. за м ³ | 80,0 |
| 2. Капитальные затраты | тыс. руб. | 42858,4 |
| 3. Полная себестоимость годового выпуска | тыс. руб. | 126580,5 |
| 4. Себестоимость единицы продукции | | |
| • белково-углеводная кормовая добавка | тыс. руб. за т | 6,0 |
| • жидкая пробиотическая добавка | тыс. руб. за м ³ | 37,0 |
| 5. Стоимость годового выпуска продукции | тыс. руб. | 277722,9 |
| 6. Прибыль годовая | тыс. руб. | 151142,9 |
| 7. Рентабельность: | | |
| а) производственных фондов | % | 80,5 |
| б) продукции | % | 51,1 |
| 8. Срок окупаемости капитальных вложений | год | 1,13 |

Использование депротеинизированного соевого шрота для получения микробных кормовых добавок

Одним из отходов производства изолята белка сои является депротеинизированный соевый шрот, в составе которого содержится, как было показано ранее, до 67,5 % углеводов. Существует два принципиальных подхода к биоконверсии такого рода субстратов – либо использование грибных культур при твердофазном способе культивирования, либо использование дрожжевых культур при предварительной обработке сырья с целью повышения биодоступности субстрата.

Биоконверсия депротеинизированного соевого шрота в дрожжевую биомассу кормового назначения

В настоящей работе были исследованы два вида предобработки субстрата – кислотный и ферментативный гидролиз. Определение параметров кислотного гидролиза позволило установить оптимальные условия его проведения – pH 1,5, концентрация субстрата 30 г/л, температура 128°C, длительность 90 мин. Полученный гидролизат содержал - 506,7 г/кг общих сахаров.

Таблица 8
Содержание сахаров в гидролизате, предобработанном ферментативным гидролизом

| № | Расход фермента, % | Т, °С | Время гидролиза, мин | Концентрация углеводов в гидролизате | |
|----|--------------------|-------|----------------------|--------------------------------------|-----------|
| | | | | г/л | к/кг |
| 1 | 1,0 | 40 | 90 | 1,0±0,05 | 33,3±1,7 |
| 2 | 1,0 | 50 | 90 | 1,3±0,07 | 42,4±2,4 |
| 3 | 1,0 | 55 | 90 | 1,3±0,04 | 43,3±1,4 |
| 4 | 1,0 | 60 | 90 | 1,18±0,06 | 39,6±1,7 |
| 5 | 1,0 | 55 | 20 | 0,45±0,05 | 15,0±1,0 |
| 6 | 1,0 | 55 | 40 | 0,75±0,09 | 25,0±2,8 |
| 7 | 1,0 | 55 | 60 | 1,2±0,03 | 40,2±0,8 |
| 8 | 0,5 | 55 | 90 | 0,75±0,07 | 25,0±2,3 |
| 9 | 2,0 | 55 | 90 | 2,2±0,04 | 73,3±1,4 |
| 10 | 3,0 | 55 | 90 | 2,9±0,09 | 96,7±2,9 |
| 11 | 4,0 | 55 | 90 | 3,5±0,10 | 116,7±3,3 |
| 12 | 5,0 | 55 | 90 | 3,5±0,06 | 116,7±1,9 |
| 13 | 4,0 | 55 | 90 | 8,1±0,10 | 200,0±3,3 |
| 14 | 4,0 | 55 | 90 | 9,1±0,15 | 303,3±5,0 |
| 15 | 4,0 | 55 | 90 | 4,4±0,11 | 147,7±2,6 |
| 16 | 4,0 | 55 | 90 | 10,5±0,20 | 350,0±6,7 |
| 17 | 4,0 | 55 | 90 | 9,8±0,15 | 326,7±5,0 |

1-12 без дополнительной обработки

13 – измельчение субстрата до размера частиц 1,0 мм

14 – термообработка субстрата в течение 30 мин при T=121°C

15 – ультразвуковая обработка субстрата в течение 15 мин при T=60°C

16 – совместная температурная обработка и измельчение

17 – совместная температурная и ультразвуковая обработка

нению с наиболее интенсивным способом обработки – термообработкой, и с эко-

При ферментативном способе предобработки депротеинизированного соевого шрота показано, что наибольший эффект наблюдается при воздействии ферментным препаратом Целловиридин ГЗХ в течение 1,5 часа при температуре 55 °С на твердый отход, предварительно подвергшийся температурной обработке при повышенном давлении в автоклаве в течение 30 мин (табл. 8). Оптимальная концентрация препарата фермента Целловиридин ГЗХ при ферментативном гидролизе составила 4 % от массы загруженного субстрата. При изучении ферментативных гидролизатов, полученных при комбинировании способов предобработки установлено, что выход редуцирующих веществ увеличивается незначительно по сравнению с наиболее интенсивным способом обработки – термообработкой, и с эко-

номической точки зрения использование нескольких методов предобработки нецелесообразно.

Конечным этапом оценки полученных гидролизатов явилось исследование их доброкачественности при культивировании дрожжей. Наилучшие результаты при культивировании на кислотном гидролизате получены для дрожжей *Candida tropicalis* - накопление биомассы составляет 293,0 г биомассы/ кг отхода, содержание сырого протеина в образующемся белково-углеводном продукте составляет 42,4 % . Лучшими ростовыми характеристиками при культивировании на ферментативных гидролизатах обладает штамм *Saccharomyces cerevisiae II* – накопление биомассы составляет 226,7 г/ кг отхода, содержание сырого протеина в продукте – 39,3 % (табл. 9).

Таблица 9

Ростовые характеристики дрожжей при их глубинном культивировании на предобработанных питательных средах, содержащих 30 г/л субстрата (в числителе – характеристики для гидролизата, предобработанного ферментативным гидролизом (4 % ферментного препарата, T – 55⁰C, в знаменателе для субстрата, полученного в условиях кислотного гидролиза (pH 1,5, T – 121 °C)

| Микроорганизм | Степень потребления углеводов, % | Максимальное накопление биомассы, г/л | Удельная скорость роста, ч ⁻¹ | Сырой протеин в продукте, % |
|-------------------------------------|----------------------------------|---------------------------------------|--|-----------------------------|
| <i>Saccharomyces cerevisiae II</i> | 95,0/55,5 | 6,8/5,1 | 0,10/0,18 | 39,3/34,7 |
| <i>Saccharomyces cerevisiae "Я"</i> | 88,2/37,1 | 1,5/1,0 | 0,06/0,17 | 23,8/27,3 |
| <i>Candida maltosa</i> | 83,3/48,0 | 4,5/4,5 | 0,08/0,19 | 28,6/34,1 |
| <i>Candida tropicalis</i> | 80,3/90,5 | 5,2/8,8 | 0,07/0,19 | 29,7/42,4 |
| <i>Candida utilis</i> | 87,2/39,4 | 3,0/2,0 | 0,11/0,10 | 26,2/30,2 |
| <i>Yarrowia lipolytica</i> | 83,3/46,2 | 4,7/5,8 | 0,08/0,11 | 28,9/31,3 |
| <i>Rhodotorula rubra</i> | 79,4/34,5 | 4,5/5,6 | 0,07/0,17 | 28,6/35,1 |
| <i>Torulopsis utilis</i> | 86,2/86,3 | 5,5/3,7 | 0,05/0,15 | 30,2/33,2 |
| <i>Endomycoopsis fibuligera</i> | 85,2/54,3 | 3,0/2,0 | 0,06/0,18 | 26,2/30,2 |

Следует отметить, однако, что наиболее перспективной с точки зрения промышленной реализации является термическая обработка депротеинизированного шрота, ферментативный гидролиз и последующее культивирование на ферментализате дрожжевой культуры *Saccharomyces cerevisiae II*.

Биоконверсия депротеинизированного соевого шрота в биомассу кормового назначения при твердофазном культивировании грибных культур

Альтернативным способом использования целлюлозсодержащего сырья является прямая биоконверсия в микробный продукт с использованием грибных культур. Скрининг 12 грибных культур по показателям степени использования субстрата, а также содержанию белка в биомассе, позволил выделить шесть штаммов степень использования субстрата для которых превысила 55 %. При этом наиболее перспективным штаммом является *Aspergillus niger*, содержание сырого протеина в продукте превысило 50 % (табл. 10).

Таблица 10

Ростовые характеристики некоторых грибных культур при их твердофазном культивировании (субстрат - твердый отход изолята белка сои)

| Микроорганизм | Сырой протеин, % | Накопление биомассы г/кг | Общие углеводы, % | Степень использования субстрата, % |
|--------------------------------|------------------|--------------------------|-------------------|------------------------------------|
| <i>Aspergillus niger</i> | 52,6±0,35 | 510,3 | 25,2±0,38 | 67,6±0,64 |
| <i>Penicillium chrysogenum</i> | 50,2±0,29 | 502,5 | 35,7±0,14 | 54,1±0,50 |
| <i>Penicillium funiculosum</i> | 47,8±0,52 | 415,0 | 33,5±0,17 | 57,0±0,52 |
| <i>Trichoderma harsianum</i> | 38,1±0,40 | 162,1 | 34,8±0,12 | 55,3±0,51 |
| <i>Trichoderma viride</i> | 28,1±0,18 | 316,8 | 30,1±0,15 | 61,4±0,60 |
| <i>Aspergillus flavus</i> | 49,4±0,40 | 407,6 | 26,8±0,30 | 65,6±0,55 |

Таким образом, данные свидетельствуют о том, что для получения белково-углеводной кормовой добавки в случае твердофазного способа биоконверсии исследуемых отходов наиболее целесообразно использовать *Aspergillus niger*.

Разработка способов биологической конверсии соевой сыворотки, образующей при получении изолята белка сои

Соевая сыворотка – отход производства изолята белка сои, который содержит большое количество белковых веществ и сахаров в соотношении 1:1,4 (г/л). При использовании соевой сыворотки в качестве питательной среды для глубинного культивирования дрожжей установлено, что максимальное накопление биомассы – 12,3 г/л составляет для *Rhodotorula rubra*. При анализе состава дрожжевой биомассы максимальное содержание истинного белка также наблюдается для данной культуры и составляет 48,0 % (табл. 11).

Таблица 11

Ростовые характеристики некоторых видов дрожжей при их глубинном культивировании на соевой сыворотке

| Микроорганизм | Накопление биомассы, г/л | Остаточное содержание углеводов, г/л | Степень потребления углеводов, % | Истинный белок в биомассе, % |
|--|--------------------------|--------------------------------------|----------------------------------|------------------------------|
| <i>Rhodotorula rubra</i> | 12,3±0,50 | 4,9±0,22 | 76,8±0,25 | 48,0±0,24 |
| <i>Saccharomyces cerevisiae SL-100</i> | 6,5±0,22 | 4,2±0,18 | 80,1±0,52 | 47,9±0,22 |
| <i>Candida scotii</i> | 3,4±0,12 | 7,3±0,31 | 65,4±0,25 | 46,0±0,16 |
| <i>Torulopsis utilis</i> | 3,8±0,15 | 5,4±0,27 | 74,4±0,35 | 42,2±0,12 |
| <i>Endomycopsis fibuligera</i> | 2,5±0,05 | 10,1±0,50 | 52,1±0,20 | 42,0±0,19 |

Поскольку соевая сыворотка содержит до 17 г/л белковых веществ, то считали целесообразным исследовать варианты обогащения ее углеводными компонентами. При определении ростовых характеристик микроорганизмов при культивировании на питательных средах, содержащих соевую сыворотку с дополнительным введением углеводов в количестве 5 г/л при использовании сахарозы и соевой мелассы, показано, что данные манипуляции приводят к повышению скорости роста и экономического коэффициента.

Кроме того, использование дрожжевого экстракта и минеральных компонентов для приготовления такой питательной среды является необязательным условием, поскольку все необходимые компоненты имеются в составе соевой сыворотки.

Таким образом, полученные результаты позволяют сделать вывод, что соевая сыворотка может быть использована для получения высокобелковой биомассы дрожжей *Rhodotorula rubra*, а также в качестве ингредиента комплексных сред как источник белковых и ростстимулирующих компонентов.

ВЫВОДЫ

1. Разработана технология переработки отхода производства концентрата белка сои (соевой мелассы) глубинным культивированием *Endomycopsis fibuligera* с получением продукта кормового назначения (содержание истинного белка не менее 45 %) и пробиотической добавки на основе молочнокислых бактерий *Lactobacillus plantarum* с содержанием КОЕ не менее 10^{10} ед/мл.

2. Установлено, что предварительная обработка агентом окислительного стресса (пероксидом водорода) культуры *Endomycopsis fibuligera* на стадии приготовления посевного материала позволяет повысить степень утилизации углеводных компонентов соевой мелассы до 93,5% на стадии ферментации.

3. Предложены три способа переработки отхода производства изолята белка сои (депротеинизированного соевого шрота - содержание белка 22,5 %) с получением кормовой белково-углеводной добавки:

- ферментативным гидролизом препаратом Целловиридин ГЗХ термически обработанного депротеинизированного соевого шрота и последующим глубинным гетерофазным культивированием на полученном ферментолизате дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* II. Содержание белка увеличивается до 39,3 %;

- кислотным гидролизом депротеинизированного соевого шрота с последующим глубинным гетерофазным культивированием на полученном гидролизате дрожжей *Candida tropicalis*, обеспечивающим повышение содержания белка в продукте до 42,4 %;

- твердофазным культивированием *Aspergillus niger* на нативном твердом остатке, обеспечивающим повышение содержания белка в продукте до 52,6 %.

4. Предложена технология переработки соевой сыворотки микробной биоконверсией в кормовую добавку на основе биомассы дрожжей *Rhodotorula rubra*, реализация которой позволит снизить эколого-экономический ущерб от загрязнений водных объектов на 62,2 %.

Основные результаты диссертации изложены в следующих работах:

1. Смирнова, В. Д. Биотехнологический путь переработки отходов производства соевого белка / В.Д. Смирнова, Р.Ю. Киселева, И. В. Шакир, В. И. Панфилов // Экология и промышленность в России. 2010. № 5. С. 14-16.
2. Смирнова, В. Д. Интенсификация процесса биоконверсии отходов пищевой промышленности в дрожжевую биомассу кормового назначения / В.Д. Смирнова, И.В. Балакирев, Е.В. Башашкина, Н.А. Суясов, И.В. Шакир // Химическая промышленность сегодня. 2010. № 8. С.10-15.
3. Смирнова, В.Д. Биоконверсия углеводного экстракта сои в кормовой продукт белковой природы / В.Д. Смирнова, И.В. Шакир // Материалы Международной научно-практической конференции «Биотехнология: вода и пищевые продукты». 2007. Москва, 11-13 марта .ч.2 С.98.
4. Смирнова, В.Д. Исследование ферментативного гидролиза для интенсификации процесса биоконверсии отходов, образующихся при получении изолята белка сои / В.Д. Смирнова, Р.Ю. Учурова, В.И. Панфилов, И. В. Шакир // Материалы Международной научно-практической конференции «Биотехнология: вода и пищевые продукты». 2008. Москва, 11-13 марта .ч.1 С. 251.
5. Смирнова, В.Д. Получение белковой кормовой добавки на основе отходов производства изолята белка сои / В.Д. Смирнова, И.В. Шакир, Р.Ю. Киселева // Материалы Всероссийской научно-технической конференции «Наука-Производство-Технологии-Экология». Киров. 2008. С. 237-239.
6. Смирнова, В.Д. Использование соевой мелассы в качестве субстрата для культивирования молочнокислых бактерий / В.Д. Смирнова, И.В. Шакир, Т.В. Кузницова, В. И. Панфилов // Материалы Всероссийской научно-технической конференции «Наука-производство-Экология». Киров. 2010. С.106-108.
7. Смирнова, В. Д. Использование сухого остатка, образующегося после извлечения белка из соевого шрота, в качестве субстрата для глубинного гетерофазного культивирования дрожжей / В.Д. Смирнова, Р.Ю. Учурова, И.В. Шакир // Труды XII международной конференции «Окружающая среда для нас и будущих поколений» Самара, 4-10 сентября 2007 г. С. 58.
8. Смирнова, В.Д. Использование отходов производства изолятов белка сои для культивирования дрожжей / В.Д. Смирнова, Р.Ю. Учурова, В.И. Панфилов // Материалы XIII международной конференции «Окружающая среда для нас и будущих поколений», Самара-Астрахань-Самара, сентябрь 2008 г. С.124.
9. Смирнова, В.Д. Биоконверсия отходов предприятий, перерабатывающих сою / В.Д. Смирнова, Т.В. Кузницова, П.А. Карпов // Тезисы V Международного конгресса молодых ученых по химии и химической технологии «МКХТ-2009». С. 99-103.
10. Смирнова, В.Д. Влияние условий получения белковых продуктов из сои на состав и биологическую ценность образующихся отходов / В.Д. Смирнова, И.В. Шакир, В. И. Панфилов // Материалы 8-й Международной конференции «Сотрудничество для решения проблемы отходов». – Харьков, Украина. 2011. С.46.