

Хромова Наталья Юрьевна

**БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ КОНВЕРСИЯ
ЗЕРНОВОГО СЫРЬЯ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ
ПРОБИОТИЧЕСКИХ ПРОДУКТОВ И
КОРМОВЫХ БЕЛКОВЫХ ДОБАВОК**

03.01.06 – Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата технических наук

Научный руководитель:

доктор технических наук,
профессор
В. И. Панфилов

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
1.1. Состояние и перспективы развития зернового производства в Российской Федерации	11
1.2. Химический состав и биологическая ценность крахмалосодержащего зернового сырья.....	13
1.3. Концепция функционального питания.....	17
1.4. Концепция пробиотиков и их роль в оздоровлении человека	23
1.5. Микроорганизмы р. <i>Lactobacillus</i> и <i>Bifidobacterium</i> как пробиотические культуры и их характеристика	26
1.6. Использование зернового сырья для производства пробиотических функциональных продуктов питания.....	30
1.7. Технология глубокой переработки зерна.....	39
1.8. Использование побочных продуктов глубокой переработки зерна в биотехнологии	42
1.8.1. Использование отрубей.....	43
1.8.2. Использование пентозановой фракции	46
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	53
Глава 2. Материалы и методы исследования.....	53
2.1. Объекты исследования.....	53
2.1.1. Крахмалосодержащее зерновое сырье и побочный продукт его переработки	53
2.1.2. Микробные объекты исследования	53
2.1.3. Ферментные препараты	53
2.2. Биохимические и физико-химические методы анализа.....	56
2.2.1. Определение сухих веществ	56
2.2.2. Определение сырого протеина методом Кьельдаля	57
2.2.3. Определение массовой доли белка по Барнштейну	58
2.2.4. Определение содержания общего жира	59

2.2.5. Определение массовой доли нуклеиновых кислот.....	59
2.2.6. Определение содержания углеводов модифицированным методом Бертрана.....	60
2.2.7. Определение содержания олиго- и полисахаридов методом Бертрана-Шорля.....	61
2.2.8. Определение общего содержания углеводов методом Дюбуа	61
2.2.9. Колориметрический метод определения белка по Лоури.....	62
2.2.10. Определение концентрации водорастворимых пентозанов.....	63
2.2.11. Определение аминного азота формальным титрованием	63
2.2.12. Определение концентрации молочной кислоты потенциометрическим титрованием	65
2.2.13. Определение протеолитической активности	66
2.3. Микробиологические методы.....	67
2.3.1. Питательные среды	67
2.3.2. Культивирование микроорганизмов	69
2.3.3. Определение количества жизнеспособных клеток лактобактерий методом Коха.....	70
2.3.4. Определение количества жизнеспособных клеток бифидобактерий	71
2.3.5. Определение выживаемости штаммов молочнокислых бактерий в условиях воздействия желчи	72
2.3.6. Определение выживаемости штаммов молочнокислых бактерий в условиях имитации кислотности желудка.....	73
2.3.7. Определение выживаемости штаммов лакто- и бифидобактерий в условиях длительного хранения при 4 °С.....	73
2.3.8. Определение количества клеток дрожжей путем прямого подсчета в счетных камерах	73
2.3.9. Определение наличия живых клеток продуцента	74
2.3.10. Определение острой токсичности БКД с применением тест-культуры инфузорий <i>Tetrachylena pyriformis</i>	74

2.3.11. Определение острой и субхронической токсичности, кожно-резорбтивного и аллергенного действия белковой кормовой добавки	75
2.4. Методы исследования	76
2.4.1. Методика проведения ферментативного гидролиза.....	76
2.4.2. Методика определения концентрации молочной, уксусной и пропионовой кислоты методом ВЭЖХ.....	76
2.4.3. Методика проведения лиофильного высушивания	77
2.4.4. Методика проведения органолептического анализа	77
2.5. Методы математической обработки результатов.....	78
2.5.1. Полный факторный эксперимент и его обработка	78
2.5.2. Ротатабельный центральный композиционный план и его обработка	79
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	81
3.1 Выбор типа зернового сырья, ферментных препаратов для его гидролиза и исследование роста лактобактерий	81
3.1.1. Выбор типа зернового сырья для ферментации лактобактерий	81
3.1.2. Выбор протеолитического ферментного препарата и его дозировки	84
3.1.3. Исследование роста лактобактерий на гидролизатах пшеничной муки в биореакторе	89
3.1.4. Оптимизация условий предварительной обработки суспензий пшеничной муки протеазами для культивирования лактобактерий	91
3.1.5. Сравнение роста <i>L. rhamnosus</i> на гидролизатах обойной пшеничной муки, полученных в оптимальных условиях, и на среде MRS	95
3.1.6. Получение пробиотических функциональных напитков из гидролизатов пшеничной муки	96
3.1.7. Исследование стабильности лактобацилл в функциональном напитке при хранении и в условиях, моделирующих прохождение через желудочно-кишечный тракт	98
3.2. Выбор ферментных препаратов для гидролиза пшеничной муки, состава питательных сред и исследование роста бифидобактерий.....	103
3.2.1. Выбор состава питательных сред для ферментации бифидобактерий....	103

3.2.2. Оптимизация условий гидролиза суспензии пшеничной муки для культивирования бифидобактерий методом факторного эксперимента	104
3.2.3. Исследование роста бифидобактерий на питательных средах на основе гидролизата пшеничной муки для получения пробиотического ингредиента	111
3.2.4. Лиофильное высушивание <i>B. adolescentis</i>	115
3.2.5. Оценка пригодности питательной среды на основе гидролизата пшеничной муки для роста различных видов бифидобактерий	118
3.2.6. Технологическая схема переработки зерна пшеницы с получением пробиотических функциональных продуктов/добавок питания	120
3.3. Разработка технологии получения БКД путем микробиологической конверсии пентозановой фракции – побочного продукта переработки пшеницы	122
3.3.1. Исследование химического состава пентозановой фракции	122
3.3.2. Скрининг штаммов дрожжей для биоконверсии пентозановой фракции	124
3.3.3. Исследование способов предварительной обработки пентозановой фракции для повышения эффективности ее биоконверсии дрожжами ..	128
3.3.4. Подбор минерального состава питательной среды с пентозановой фракцией	134
3.3.5. Изучение и подбор режима культивирования смешанной культуры дрожжей на питательной среде с пентозановой фракцией	136
3.3.6. Исследование основных показателей качества и безопасности белковой кормовой добавки.....	140
3.3.7. Технологическая схема переработки пентозановой фракции пшеницы с получением белковой кормовой добавки для животных.....	142
ВЫВОДЫ	145
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	147
ПРИЛОЖЕНИЯ	164

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Согласно данным Федеральной государственной службы статистики России, а также Продовольственной и сельскохозяйственной организации ООН (ФАО ООН), ежегодно в зерновом хозяйстве, как в Российской Федерации, так и в мире, наблюдается рост производства зерновых культур с увеличением объема с 1050 млн. т. в 1966–1970 гг. до 2400–2600 млн. т. в 2014–2018 гг [1]. Основная доля в структуре мирового производства зерна, а именно 93%, отводится таким культурам, как кукуруза, рис, ячмень и пшеница, из которых 27% составляет последняя [2,3].

Традиционно значительная часть зерна используется в продовольственных целях, либо идет на экспорт. В силу современного развития мирового промышленного биотехнологического и химического производства, направленного на создание инновационных продуктов, особо значимы малоотходные или безотходные технологии, в которых в качестве сырьевой базы используются возобновляемые растительные ресурсы.

В последние годы наблюдается повышение спроса на пробиотические продукты, для производства которых используется не молоко, а растительное сырье, что особенно важно для потребителей, страдающих непереносимостью лактозы или аллергией на молочный белок. В качестве потенциального сырья для роста лакто- и бифидобактерий могут быть использованы зерновые культуры, характеризующиеся богатым химическим составом, способным удовлетворить их питательные потребности. Кроме того, в состав зерновых входят неперевариваемые углеводы, оказывающие положительные эффекты, как на организм человека, так и на рост микроорганизмов. Продуктивность ферментации при этом зависит от обработки сырья, а качество получаемых на его основе продуктов от органолептических показателей, стабильности культуры при хранении и пищевой ценности.

В число приоритетных проектов текущего развития биотехнологического кластера России, согласно Программе БИО – 2020,

входит не только создание качественных и безопасных продуктов питания, но и технология глубокой переработки зерна с получением различных продуктов с высокой добавочной стоимостью, в том числе крахмала и глютена, при реализации технологии которых образуется ряд побочных продуктов, в частности, на стадии сепарации и отмывки – жидкая фракция, т. н. пентозаны. После концентрирования и упаривания их применяют для получения этанола или малоценных кормов, содержащих около 60 % углеводов и не более 10 % протеина. В условиях дефицита пищевого и кормового белка интерес представляет поиск альтернативных решений для биотехнологической конверсии углеводной фракции побочного продукта пшеницы в микробный протеин.

Целью работы является разработка основ гибкой технологии получения функциональных продуктов питания и ингредиентов, содержащих бифидо- и лактобактерии, а также белковых кормовых добавок путем биоконверсии зернового возобновляемого крахмалосодержащего растительного сырья.

Для достижения цели были сформулированы следующие **задачи**:

- обосновать выбор типа зернового сырья, ферментных препаратов для гидролиза крахмалистых и белковых веществ, а также исследовать рост бифидо- и лактобактерий в питательных средах на основе получаемых гидролизатов;
- с применением методологии активного эксперимента определить оптимальные условия гидролиза для достижения максимальной продуктивности ферментации по содержанию бифидо- и лактобактерий, а также исследовать особенности их роста при различных условиях культивирования;
- разработать технологические основы получения функциональных продуктов из гидролизатов зернового сырья, ферментированных бифидо- или лактобактериями, и проанализировать их основные характеристики;

– изучить химический состав побочного продукта глубокой переработки пшеницы – пентозановой фракции, оценить ее биологический потенциал для культивирования дрожжей и обосновать способы предварительной обработки для последующей биоконверсии;

– подобрать минеральный состав питательной среды и обосновать режим культивирования с учетом максимальной продуктивности и качества микробной биомассы;

– разработать практические рекомендации и провести технико-экономическую оценку предлагаемых технологий.

В диссертации защищаются следующие положения.

Научная новизна. Показана значимость предварительной обработки зернового сырья для получения на его основе функциональных продуктов и ингредиентов, содержащих бифидо- или лактобактерии, не только амилолитическими, но и протеолитическими ферментными препаратами. Условия гидролиза суспензий пшеничной муки оптимизированы таким образом, что дополнительное внесение в среды компонентов животного происхождения для ферментации лактобацилл не требуется, а в случае бифидобактерий гидролизат может выступать в качестве основного источника азота. Ростовые свойства полученных питательных сред на основе гидролизатов по конечному содержанию бифидо- или лактобактерий (до 10^8 - 10^9 КОЕ/мл), соответствуют ростовым свойствам стандартной среды MRS. Исследованы закономерности роста *L. rhamnosus* и *B. adolescentis*.

Впервые изучена лиофильная сушка бифидобактерий с гидролизатом пшеничной муки в качестве единственного протектора и определены показатели выживаемости бифидобактерий в полученном продукте после сушки и при длительном хранении.

Исследован потенциал пентозанового побочного продукта переработки зерна пшеницы для биоконверсии и показано, что наилучшие показатели ферментации достигаются при использовании смешанной культуры дрожжей *C. utilis* и *L. scotti*.

Практическая значимость. Разработаны основы гибкой технологии переработки зерна пшеницы в пробиотические функциональные напитки и ингредиенты, а также белковые кормовые добавки.

Установлено, что обработка суспензий пшеничной муки амилолитическими и протеолитическими ферментными препаратами позволяет получить питательную среду для культивирования лактобактерий без внесения дополнительных компонентов с ростовыми свойствами, идентичными стандартной среде MRS.

Определены оптимальные условия предварительной обработки пшеничной муки для получения биосуспензий лактобацилл и бифидобактерий с максимальным содержанием живых пробиотических микроорганизмов не менее 10^8 КОЕ/мл.

Установлено, что использование гидролизата пшеничной муки в качестве защитной среды при лиофильном высушивании *B. adolescentis* позволяет получить продукт с содержанием бифидобактерий не менее 10^{10} КОЕ/г при показателе выживаемости 90%.

Разработана технология биоконверсии побочного продукта глубокой переработки зерна пшеницы – пентозан-содержащей фракции, смешанной культурой дрожжей *S. utilis* и *L. scottii* в белковую кормовую добавку (БКД), содержащую не менее 54 % сырого протеина.

Проведена технико-экономическая оценка предлагаемых технологий исходя из расчетной мощности производства пробиотического напитка 600 тонн/год, ингредиента 8,5 тонн/год, а также 20 000 тонн/год по перерабатываемому сырью для производства БКД.

Внедрение в практику. Апробация получения белковой кормовой добавки проведена на предприятии ЗАО «Завод Премиксов №1».

На защиту выносятся:

– результаты исследования влияния ферментативной обработки суспензий зернового сырья протеазами на рост бифидо- и лактобактерий;

– результаты оптимизации ферментативного гидролиза протеазами суспензий пшеничной муки для получения максимального количества КОЕ бифидо- и лактобактерий;

– результаты лиофильного высушивания бифидобактерий с гидролизатом пшеничной муки в качестве протектора и основные характеристики получаемых продуктов;

– технология получения БКД путем биоконверсии побочного продукта переработки пшеницы – пентозановой фракции, дрожжами.

Соответствие паспорту научной специальности. Диссертация соответствует паспорту специальности 03.01.06 «Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)» по пунктам 2-3.

Апробация работы. Основные результаты работы представлены на международных и всероссийских конференциях: на XI и XIV Международном конгрессе молодых ученых по химии и химической технологии (Москва, «МКХТ – 2015, 2018»); на VIII Московском международном конгрессе «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2015), на XI Конкурсе проектов молодых ученых в рамках выставки Химия-2017 (Москва, 2017), на Конкурсе молодых ученых в рамках международного форума «Биотехнология: состояние и перспективы развития. Науки о жизни» (Москва, 2018), на V и VI международной научно-практической конференции «Биотехнология: наука и практика» (Ялта, 2017, 2018).

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 16-19-10469) и финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (уникальный идентификатор проекта RFMEFI62614X0003; соглашение о предоставлении субсидии № 14.626.21.0003 от 17.11.2014).

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Состояние и перспективы развития зернового производства в Российской Федерации

Определяющей отраслью сельского хозяйства России и в немалой степени экономики является растениеводство. Ведущее место среди возделываемых полевых сельскохозяйственных культур занимают зерновые культуры. К ним относятся пшеница, рожь, ячмень, овес, кукуруза, просо, гречиха, рис, тритикале, сорго и зернобобовые культуры. Именно уровень производства зерна обеспечивает продовольственную безопасность государства и формирует значительную сырьевую базу, необходимую для нормального развития перерабатывающей и пищевой промышленности. Из зерна и продуктов его переработки человечество получает до 50% белка, 70% углеводов и 15% жиров [4]. Оно является незаменимым кормовым продуктом для сельскохозяйственных животных и птицы, служит источником сырья для крахмалопаточной, спиртовой, декстриновой, пивоваренной и комбикормовой промышленности. К тому же зерно важный стратегический ресурс для экспорта. Значимость зерна, как национального достояния Российской Федерации и одного из факторов устойчивости ее экономики, рассмотрена на уровне Федерального закона «О зерне» [5].

По данным Росстата на 2017 год из 80,6 млн. га всех посевных площадей сельскохозяйственных культур Российской Федерации зерновые и зернобобовые культуры занимали 47,7 млн. га, из которых существенная доля принадлежала озимой и яровой пшенице (14, 9 и 12,9 млн. га, соответственно). При этом наблюдается явная тенденция не только устойчивого роста посевных площадей, но и урожайности зерновых и зернобобовых культур, а также валового сбора зерна (рисунок 1). По сравнению с 2000 годом валовой сбор зерна увеличился в два раза и составил 135,4 млн. т. [6].

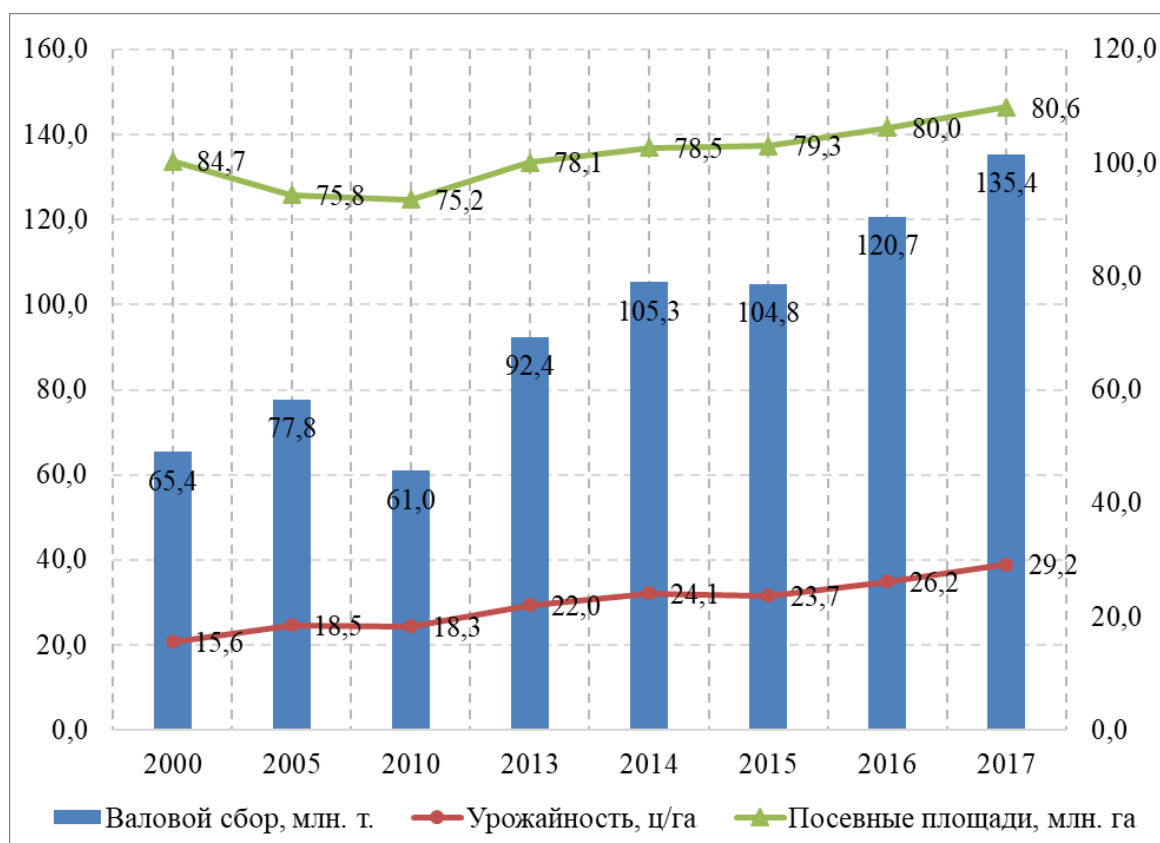


Рисунок 1. Динамика основных факторов зернового производства Российской Федерации в 2000 - 2017 гг.

На сегодняшний день по производству зерна Россия занимает 4 место в мире после США, Китая и Индии и входит в семерку стран-лидеров по его экспорту [7].

Согласно совместному прогнозу Продовольственной и сельскохозяйственной организации ООН (ФАО ООН) и Организации экономического сотрудничества и развития (ОЭСР) к 2023 г. Российская Федерация по объему экспорта зерна может занять 3-е место в мире после США и Канады, оставив позади Австралию и страны ЕС [8].

Такая положительная динамика в зерновом хозяйстве России связана с глубокими процессами перехода на новые эффективные технологии производства, благодаря которым снижается зависимость от природно-климатических условий, а также совершенствованием технологий управления в сельском хозяйстве [9]. В то же время объемы производства зерна становятся намного выше его потребления, что стимулирует развитие

других направлений производства, таких как животноводство, глубокая переработка зерна, а также перспективных направлений с использованием биотехнологий для получения продуктов с высокой добавленной стоимостью [10].

1.2. Химический состав и биологическая ценность крахмалосодержащего зернового сырья

Основными веществами, которые определяют питательную ценность зерна и имеют наибольшее значение в питании большинства людей и кормлении сельскохозяйственных животных, являются крахмал и белковые вещества. Причем содержание белка и его состав определяют качество зерна и продуктов его переработки. Помимо крахмала и белка в состав зерна также входят нуклеиновые кислоты, жиры и жироподобные вещества, витамины, красящие вещества (пигменты), ферменты и минеральные соединения.

По химическому составу семян все зерновые культуры разделяются на три группы: богатые крахмалом, богатые белковыми веществами и богатые жирами [11]. К первой группе относятся злаковые культуры, среди которых по сравнению с рожью, овсом, просом и ячменем больше всего протеинов обычно в зерне пшеницы. Наиболее низкое содержание белков в семенах кукурузы и риса. Зерновые бобовые – соя, горох, фасоль, вика, чечевица, люпины – относятся ко второй группе и характеризуются наибольшим количеством белковых (в среднем около 22% и выше) и азотистых веществ, благодаря их способности фиксировать молекулярный азот из воздуха при помощи азотфиксирующих клубеньковых бактерий. Типичным представителем третьей группы зерновых культур (масличных) является подсолнечник, в котором до 45% жира. Однако большей частью химический состав семян зерновых культур и его изменчивость обусловлены сортом растений и его особенностями, почвенно-климатическими факторами и условиями культивирования, а также видом применяемых для роста

удобрений. Средний химический состав зерна злаковых и бобовых сельскохозяйственных культур представлен в таблице 1.2.1.

Таблица 1.2.1.

Средний химический состав целого зерна злаковых и бобовых культур
(в % веса сухой массы) [12]

Культура	Белки	Крахмал	Жир	Клетчатка	Сахар	Пентозаны и другие углеводы	Зола
Пшеница	15	60	2,0	2,8	4,3	8,0	2,2
Кукуруза	10	70	4,6	2,1	3,0	7,0	1,3
Рожь	13	65	2,0	2,2	5,0	10,0	2,0
Овес	12	45	5,5	14,0	2,0	13,0	3,8
Ячмень	12	55	2,0	6,0	4,0	11,0	3,5
Рис	7	63	2,3	12,0	3,6	1,5	6,0
Просо	12	58	4,6	11,0	3,8	2,0	4,0
Горох	28	43	1,2	6,0	8,0	-	3,3
Соя	39	3	20,0	5,0	10,0	-	5,8
Фасоль	23	55	1,8	3,8	5,2	-	4,0
Вика	29	43	2,3	6,0	4,8	-	3,2
Чечевица	30	47	1,0	3,6	3,5	-	3,3
Люпин	32	3	5,0	16,0	2,0	-	3,8

Основная масса всех белковых веществ семян злаковых и бобовых – это запасные белки. Протеин злаковых и бобовых культур в основном представлен альбуминами, глобулинами, проламинами и глютелинами. Растворимые в воде альбумины у большинства культур составляют небольшую концентрацию от общего количества протеина: в пшенице – 5 – 7 %, овсе – 15 %, кукурузе – 6 – 14 %, в зерне ржи – 20 %, ячмене – 8 – 12 %. Альбуминовая фракция представлена как высокомолекулярными, так и низкомолекулярными белками, также она содержит много гидролитических ферментов, амилаз и т. д. Значительная часть белковых веществ зерновых

культур представлена глобулинами – белками, извлекаемыми легкими щелочными растворами и растворами нейтральных солей. В бобовых культурах на долю глобулинов приходится свыше 60 %, которые представлены в семенах гороха легумином, вицилином и легумелином, в сое – глицинином, в люпине – α -, β - и γ - конглотинами, в фасоле - фазеолином. Специфическими белками, которые синтезируются в семенах злаковых культур, являются проламины, растворимые в 70 %-ом этиловом спирте. В зерне ржи и пшеницы эта группа белков называется глиадинами, овса – авенином, ячменя – гордеинами, кукурузы – зеином и т. д. Содержание глютелинов – белков, нерастворимых в воде, но растворимых в слабых щелочах, например в зерне овса и пшеницы составляет 25-40%. Зерна пшеницы, ячменя, ржи и некоторых луговых трав в отличие от других растений характеризуются наличием в них клейковины [11-13].

Аминокислотный состав белков разных культур злаков и бобовых отличается друг от друга, как и аминокислотный состав различных частей зерна. Более сбалансированным составом характеризуется белок зародыша. В таблице 1.2.2. представлены данные по содержанию незаменимых аминокислот в зерне.

Таблица 1.2.2.

Содержание незаменимых аминокислот в зерне некоторых сельскохозяйственных культур (г на 100 г белка) [11]

Аминокислота	Пшеница	Рожь	Кукуруза	Рис	Горох	Соя
Лизин	2,6	3,8	2,5	3,5	6,5	6,6
Метионин	1,7	1,7	2,1	2,9	1,4	1,4
Триптофан	1,3	1,6	0,6	1,3	1,3	1,3
Валин	4,6	5,3	4,4	6,5	5,4	5,4
Лейцин	6,9	7,5	11,2	8,0	7,9	7,9
Изолейцин	3,4	3,5	2,7	4,6	5,3	5,3
Треонин	2,6	3,2	3,2	3,5	3,8	3,8
Фенилаланин	4,3	3,2	4,1	5,2	5,1	5,1

Кроме белков в семенах бобовых и злаковых содержится много других азотистых соединений. В зерне бобовых концентрация свободных аминокислот достигает 5 % массы зерна, а их амидов 2 % массы зерна. Также содержатся пептиды, нуклеиновые кислоты и минеральный азот.

Общее содержание углеводов в зерне злаковых и бобовых культур может достигать 80 %. В него входят крахмал, сахариды, гемицеллюлоза, клетчатка и пентозаны. Основным запасным углеводом у зерновых является крахмал и только у семян сои – жиры. Состав крахмала может значительно изменяться. Например, чем выше содержание амилозы у разных сортов гороха, тем меньше содержание крахмала и наоборот.

Биологическая ценность зерновых злаков также определяется наличием в них витаминов, среди которых в составе особенно много витаминов группы В. Так витамин В₁ (тиамин) содержится в злаках в количестве около 0,5 мг, витамин В₂ – около 0,2 мг, витамин В₆ (пиридоксин) – тоже около 0,5 мг на 100 г. Содержание витамина РР (никотиновой кислоты) в пшенице составляет – 6,0 мг, ячмене – 7,0 мг, овсе – 9,4 мг, кукурузе – 6,4 мг, рисе – 5,7 мг и ржи – 1,3 мг на 100 г сухого веса. Значительно больше никотиновой кислоты в отрубях, например в пшеничных ее содержание достигает 25-30 мг. Содержание витамина Е (токоферола) в зерне злаков составляет около 1 мг на 100 г. В зерне бобовых культур также много различных витаминов, особенно много витаминов В₁ и В₂, а также найдены витамины РР, А, Е, К, D и С. При этом общее содержание витамина В₁ в семенах бобовых в 3-4 раза больше, чем в сухом коровьем молоке. Наряду с полезными веществами, бобовые содержат алкалоиды и гликозиды, которые токсичны для человека, что ограничивает применение в пищу некоторых культур, таких как люпин, фасоль и вика [11-13].

Таким образом, зерно злаковых и бобовых культур обладает высоким биологическим потенциалом для применения не только в качестве пищи в

чистом виде, а также в качестве составляющих в продуктах питания, например ферментированных пробиотическими бактериями.

1.3. Концепция функционального питания

Серьезные исследования, направленные на выявление возможной связи между питанием и дегенеративными заболеваниями, например между сердечно-сосудистыми заболеваниями и потреблением жиров, начались примерно в 1950-х годах [14]. Однако история функциональных продуктов питания (ФПП) начинается задолго до этого. Еще в древности в Китае, Японии и других азиатских странах, многие виды пищевых продуктов традиционно были связаны с конкретными и специфическими преимуществами для здоровья. Тем не менее научное обоснование разрабатываемые продукты питания и напитки с определенными заявленными свойствами полезными для здоровья получили лишь во второй половине двадцатого века.

Впервые концепция «функционального питания» и соответствующий термин были предложены в 1984 году в Японии в результате проводимого исследования взаимосвязи между здоровьем человека и питанием, которое было направлено на определение тех пищевых продуктов, обогащенных специальными ингредиентами, которые обладают полезными физиологическими свойствами. Самым первым функциональным продуктом считается японский продукт Fibe Mini, выпущенный компанией Otsuka Pharmaceutical в 1988 году, – безалкогольный напиток, содержащий в своем составе в качестве функционального ингредиента для регулирования кишечника – диетические волокна, а именно полидекстрозу [15].

В Европе и США широкое распространение концепция функционального питания в пищевой промышленности получила в 1990-х годах и активно развивается по настоящее время. Научные исследования о функциональном питании направлены на поддержание здоровья, улучшение благосостояния и создание условий для снижения риска заболеваний,

особенно сердечно-сосудистых, некоторых видов рака, аллергий, а также проблем с кишечником [14].

В настоящее время термин «функциональные продукты» в основном считается маркетинговым термином и точного определения, которое бы признавалось регулирующими органами в мире, не существует, так как считается, что все пищевые продукты, по существу, функциональны, так как обеспечивают организм энергией и питательными веществами, необходимыми для поддержания жизни [16]. Однако появление все больших доказательств того, что некоторые пищевые компоненты, не считающиеся питательными веществами в традиционном смысле, могут обеспечить положительное влияние на здоровье, и могут быть введены в состав пищевых продуктов, приводит к тому, что существует ряд рабочих определений, уточняющих, какие продукты могут быть названы функциональными. В таблице 1.3.1. представлены определения функциональных продуктов питания в соответствии с различными мировыми организациями.

Таблица 1.3.1.

Рабочие определения термина «функциональные продукты питания» [16]

Организация	Определение
Американская академия питания и диетологии	«ФПП определяются как цельные продукты вместе с обогащенными или улучшенными продуктами питания, которые оказывают благоприятное воздействие на здоровье человека, при потреблении в рамках разнообразного рациона на регулярной основе на эффективном уровне»
Международный совет по продовольственной информации	«Продукты питания или диетические компоненты, которые могут обеспечить здоровую пищу помимо основного рациона питания и могут играть определенную роль в уменьшении или минимизации риска определенных заболеваний и других состояний здоровья»
Европейская комиссия	«Пища, которая благотворно влияет на одну или несколько целевых функций в организме, помимо адекватных питательных эффектов, таким образом, что имеет отношение либо к улучшению состояния здоровья и благополучия и / или снижению риска заболевания. Это часть нормальной пищевой картины. Это не таблетки, капсулы или любые формы диетических добавок»
Институт пищевых технологий	«Продукты питания и пищевые компоненты, которые обеспечивают здоровье, помимо основного питания (для предполагаемого населения)»
Международный институт наук о жизни	«Продукты, которые благодаря наличию физиологически активных компонентов, обеспечивают преимущества для здоровья помимо основного питания»

Продолжение таблицы 1.3.2.

<p>Министерство здравоохранения Канады</p>	<p>«ФПП по внешнему виду представляют собой обычные продукты или могут быть обычной пищей, потребляются как часть обычного рациона, и, как показано, имеют физиологические преимущества и / или снижают риск хронического заболевания помимо основных питательных функций»</p>
<p>Японское министерство здравоохранения, труда и социального обеспечения</p>	<p>ФПП относятся к пищевым продуктам, содержащим ингредиент с функциями для здоровья и официально утвержденным для утверждения его физиологического воздействия на организм человека. ФПП предназначаются для потребления/поддержания здоровья или специального использования для здоровья людьми, которые хотят контролировать состояние здоровья, включая артериальное давление или холестерин в крови»</p>
<p>Продовольственная и сельскохозяйственная организация ООН</p>	<p>«ФПП – это пищевой продукт, который не только полезен для здоровья, но и дает особые выгоды, включая профилактику и лечение болезней».</p>

Все функциональные пищевые продукты в соответствии с Американской академией питания и диетологии можно разделить на три основные категории [16, 17]:

1. Традиционные продукты питания, содержащие натуральные биоактивные пищевые соединения. Большинство овощей, фруктов, злаков, молочных продуктов, рыбы и мяса содержат биоактивные пищевые соединения, которые обеспечивают их преимущественное использование в рационе питания человека.

2. Модифицированные пищевые продукты, которые были улучшены в результате их обогащения биоактивными пищевыми соединениями.

3. Синтезируемые пищевые ингредиенты, такие как не усваиваемые углеводы, которые обеспечивают продукту пребиотические свойства, например олигосахариды или неперевариваемый крахмал.

В Японии в отношении «функциональных продуктов питания» создана специальная система регулирования, которая направлена на информирование общественности о медицинских исследованиях о конкретных продуктах питания. ФПП получили официальную законодательную категорию продуктов, называемую FOSHU. ФПП в Японии должны удовлетворять трем требованиям: (1) доказанная эффективность в клинических испытаниях, (2) безопасность в клинических и неклинических исследованиях, (3) должны быть представлены результаты определения активных компонентов [18, 19].

В российской науке впервые понятие функциональных продуктов питания появилось в 1991 году, сформулированное академиком РАСХН И. А. Роговым. В 2005 году был введен государственный стандарт «Продукты пищевые. Продукты пищевые функциональные. Термины и определения. ГОСТ Р 52349-2005», согласно которому под термином «функциональный пищевой продукт» (functional food), понимают продукт, предназначенный для систематического употребления в составе пищевых рационов всеми возрастными группами здорового населения, снижающий риск развития

заболеваний, связанных с питанием, сохраняющий и улучшающий здоровье за счет наличия в его составе физиологически функциональных пищевых ингредиентов [20]. Согласно тому же ГОСТ Р 52349-2005 к функциональным пищевым ингредиентам относятся физиологически активные, ценные и безопасные для здоровья ингредиенты с известными физико-химическими характеристиками, для которых выявлены и научно обоснованы полезные для сохранения и улучшения здоровья свойства, установлена суточная физиологическая потребность: растворимые и нерастворимые пищевые волокна (пектины и др.), витамины, минеральные вещества, жиры, полисахариды, вторичные растительные соединения, пробиотики, пребиотики и синбиотики [20].

Спектр задач, для решения которых предназначены функциональные пищевые ингредиенты в рационах питания, достаточно широк. К наиболее важным можно отнести [21]:

- 1) восполнение дефицита белка в рационах питания и отдельных незаменимых аминокислот, липидов, жирных кислот, углеводов и витаминов, макро- и микроэлементов и др. биоактивных соединений;
- 2) регулирование калорийности рациона, которая влияет на аппетит и массу тела;
- 3) повышение иммунитета организма к различным инфекциям, снижение риска развития заболеваний и нарушения обмена веществ;
- 4) поддержание физиологического гомеостаза и нормальных функций организма;
- 5) связывание и выведение чужеродных веществ, токсинов и аллергенов;
- 6) поддержание естественного состава и функциональной активности микрофлоры кишечника.

Отдельное место среди функциональных продуктов питания занимают пробиотические пищевые продукты, которые в качестве физиологически

функционального пищевого ингредиента содержат специально выделенные штаммы полезных для человека (непатогенных и нетоксикогенных) живых микроорганизмов, благоприятно воздействующие на организм человека [20]. Пробиотическая концепция на сегодняшний день является ведущей при назначении бактериальных препаратов для профилактики, диагностики и лечения инфекционных болезней и нарушений естественной экологии организма.

1.4. Концепция пробиотиков и их роль в оздоровлении человека

Функциональные продукты питания, содержащие пробиотики, занимают особое положение между обычными пищевыми продуктами и лекарственными средствами.

Понятие пробиотиков, произошедшее от греческих слов «pro» и «bios» и означающее «для жизни», возникло в начале 20 века благодаря наблюдениям Ильи Мечникова, Нобелевского лауреата 1908 года, установившего, что некоторые обнаруженные им бактерии играют положительную роль в продолжительности и благополучии жизни болгарских крестьян, которые употребляли ферментированное молоко, содержащее микроорганизмы родов *Lactobacillus* и *Streptococcus*. По его предположению они подавляли брожение кишечной флоры гнилостного типа и помогали организму человека усваивать необычные компоненты по аналогии с жвачными животными [22].

Впервые термин «пробиотик» был употреблен в 1954 г F. Vergio в монографии «Anti- und Probiotika», в которой приводилось сравнение различных веществ, обладающих либо стимулирующими рост, либо антимикробными эффектами [23]. В 1965 году в научных исследованиях авторов Lilly и Stillwell термин был использован для описания вещества, выделяемого одним видом микроорганизмов, который стимулировал рост других, в противоположность известному термину «антибиотик» – веществу, ингибирующему рост некоторых организмов [24]. В общепринятом понимании термин «пробиотик» впервые был использован Паркером в 1974 году и

подразумевал под собой «организмы, которые вносят определенный вклад в микробный баланс кишечника», а в 1989 году Фуллер в своей работе про кормовые добавки подчеркнул обязательное наличие жизнеспособности у пробиотиков [25, 26]. В 2001 году в ходе проведенной конференции ФАО/ВОЗ созванной рабочей группой экспертов было дано определение актуальное и на сегодняшний день: «Пробиотики – это живые микроорганизмы, которые при введении в адекватных количествах приносят пользу здоровью организма-хозяина» [27]. По мнению Блинова и др. при введении в организм пробиотиков происходит изменение эндогенной микрофлоры, которое приводит к ее развитию в естественном направлении и тем самым оказываются благоприятные эффекты на физиологические функции и биохимические реакции организма-хозяина [28].

В качестве пробиотиков применяются штаммы микроорганизмов различных типов, таких как бактерии, дрожжи и грибы, которые различаются по многим физиологическим, морфологическим и другим признакам. Наиболее широко распространены следующие виды: 1) бактерии р. *Lactobacillus*: *acidophilus*, *sporogenes*, *plantarum*, *rhamnosus*, *delbruecki*, *reuteri*, *fermentum*, *lactus*, *cellobiosus*, *brevis*, *casei*, *farciminis*, *paracasei*, *gasseri*, *crispatus*; р. *Bifidobacterium*: *bifidum*, *infantis*, *adolescentis*, *longum*, *thermophilum*, *breve*, *lactis*, *animalis*; р. *Streptococcus*: *lactis*, *cremoris*, *alivarius*, *intermedius*, *thermophilis*, *diacetylactis*; *Leuconostoc mesenteroides*; р. *Pediococcus*; р. *Propionibacterium*; р. *Bacillus*; р. *Enterococcus*; *Enterococcus faecium*; 2) дрожжи и грибы: *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Candida pintolopesii* [22].

Для того чтобы микроорганизмы, которые входят в состав пробиотиков, предназначенных для введения человеку, оказывали максимальный терапевтический эффект, к ним предъявляются следующие требования [29, 30]:

1) штаммы бактерий, используемые в качестве пробиотических, должны быть выделены от человека, что основано на экологических причинах,

учитывающих исходную среду обитания. Считается, что у таких бактерий выше шанс конкурировать с резидентными бактериями с установлением постоянной численности в организме-хозяина;

2) биологическая выживаемость при прохождении через пищеварительный тракт с сохранением способности приносить определенный эффект организму человека посредством роста и/или активности в кишечнике, т. е. микроорганизмы должны быть устойчивы к воздействию желудочного сока и желчи;

3) пробиотические штаммы бактерий должны обладать высокой способностью к адгезии к эпителию кишечного тракта.

Механизмы действия пробиотиков на организм-хозяина можно классифицировать по трем основным способам [31, 32]:

1) модулирование врожденной и приобретенной иммунной системы, что важно для профилактики и лечения инфекционных заболеваний, а также лечения хронического воспаления пищеварительного тракта и его отдельных частей; доказано, что пробиотики играют роль в пролиферации и дифференцировке эпителиальных клеток, а также в развитии и гомеостазе иммунной системы;

2) влияние пробиотических микроорганизмов на другие микроорганизмы – комменсальные и/или патогенные, что важно для профилактики и лечения инфекций, а также восстановления микробного равновесия в кишечнике;

3) воздействие на другие микробные продукты, в том числе токсины, и на метаболиты человека, например соли желчных кислот, что приводит к инаktivации токсинов и детоксикации компонентов организма и пищи в кишечнике.

Роль пробиотиков в оздоровлении человека, как и их эффективность, была показана во многих исследованиях, например при лечении кишечных расстройств [33-35]. В некоторых работах была показана их способность ингибировать колонизацию желудка и активность бактерий *Helicobacter pylori*,

которые вызывают гастрит, язвенную болезнь желудка и рак [36-38]. Доказано, что пробиотики снижают риск развития некоторых видов рака и гипертонии [39-41], регулируют состояние мочеполового тракта [42]. Иногда пробиотики участвуют в тех процессах, которые организм человека не может регулировать. Например, восполнение дефицита лактазы в пищеварении [43].

В большинстве случаев наиболее четкие доказательства положительного воздействия на организм человека пробиотических микроорганизмов были получены в отношении бифидо- и лактобактерий.

1.5. Микроорганизмы р. *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* как пробиотические культуры и их характеристика

Основными группами микроорганизмов, которые наиболее часто используются в составе пробиотических продуктов и лекарственных препаратов, являются молочнокислые бактерии р. *Lactobacillus* и бактерии группы актиномицетов р. *Bifidobacterium*. Именно представители этих родов в нормальных условиях составляют основную часть постоянной микрофлоры человека и играют ключевую физиологическую роль в ее функционировании.

Таксономический род *Lactobacillus* принадлежит к типу *Firmicutes*, класса *Bacilli*, отряда *Lactobacillales*, семейства *Lactobacillaceae* [44]. Представители рода *Lactobacillus* – это не спорообразующие грамположительные неподвижные микроорганизмы, которые по отношению к молекулярному кислороду могут относиться как к факультативным, так и строгим анаэробам. Имеют вид коротких или длинных тонких палочек, иногда слегка извитых, расположенных парами или цепочками, причем длина отдельных клеток и цепочек зависит от среды культивирования. По характеру продуктов сбраживания гексоз (глюкоза, фруктоза, манноза, галактоза), дисахаридов (лактоза, мальтоза, сахароза) и полисахаридов (декстрин, крахмал) относятся к гомоферментативным микроорганизмам, у которых основным конечным продуктом углеводного обмена является молочная кислота, но при росте на

рибозе и последующей инкубации на глюкозе могут вести себя как гетероферментативные с образованием также уксусной кислоты [45, 46]. Они отрицательны по каталазе, но у некоторых штаммов иногда может присутствовать псевдокаталазная активность [47]. Лактобациллы достаточно требовательны к составу питательных сред и нуждаются в углеводах, аминокислотах, пептидах, сложных эфирах жирных кислот, минеральных солях, производных нуклеиновых кислот и витаминах [44].

На долю лактобацилл фекальной микробиоты взрослого человека приходится около 0,01% - 0,6% от общего количества бактерий, при этом к автохтонным видам относятся *L. gasseri*, *L. reuteri*, *L. crispatus*, *L. salivarius* и *L. ruminis* [48]. Виды *L. fermentum*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. johnsonii*, *L. rhamnosus*, *L. plantarum*, *L. delbrueckii*, *L. brevis*, *L. sakei* и *L. curvatus* также встречаются в ЖКТ человека, но на неустойчивом уровне [48, 49]. У новорожденных детей количество лактобактерий находится около 10^5 КОЕ/г фекалий с преобладающими видами лактобацилл *L. salivarius*, *L. rhamnosus* и *L. paracasei* [49, 50].

Ключевым противомикробным соединением, продуцируемым лактобактериями, является молочная кислота. Например, было показано, что сильная противомикробная активность *L. rhamnosus* GG против *S. typhimurium* обусловлена именно накоплением молочной кислоты [51]. Также известно, что многие лактобактерии секретируют антимикробные пептиды, называемые бактериоцинами. Обычно бактериоцины активны в отношении близкородственных бактерий, которые могут находиться в одной и той же экологической нише. Большинство бактериоцинов *Lactobacillus* представляют собой небольшие термостабильные белки с изоэлектрической точкой в щелочных областях рН, действие которых заключается в увеличении проницаемости мембран вследствие чего происходит утечка молекул из бактерий-мишеней. Предполагается, что выработка бактериоцинов происходит в те периоды, когда увеличивается конкуренция за питательные вещества [52].

Также важным антимикробным механизмом лактобактерий является выработка H_2O_2 .

Существуют некоторые доказательства того, что пробиотики могут использовать один и тот же сайт прикрепления к эпителиальным клеткам слизистой оболочки кишечника с патогенами, тем самым обеспечивая им конкуренцию. В исследованиях Velraedes et al. было экспериментально продемонстрировано, что штаммы рода *Lactobacillus* проявляют адгезионные свойства, которые позволяют им ингибировать адгезию бактериальных патогенов к клеткам-хозяевам [53]. В исследовании Johnson-Henry et al. было показано, что *L. helveticus* R0052 ингибируют адгезию *E. coli* O157: H7 [54].

Также пробиотические лактобактерии усиливают эпителиальный барьер с помощью различных механизмов таких как индукция секреции муцина [55], активация цитопротективных белков теплового шока [56,57] и профилактика апоптоза эпителиальных клеток [58].

Использование бифидобактерий в качестве пробиотиков началось с работы Н. Tissier 1905 года, которая показала, что эти организмы являются доминирующими бактериями в кишечнике здоровых детей грудного возраста, находящихся на естественном вскармливании [59]. Именно он предложил перорально применять бифидобактерии пациентам с диареей для восстановления здоровой кишечной микрофлоры, четко сформировав представления, что устойчивость грудных детей к болезням как раз связана с бифидобактериями.

Представители р. *Bifidobacterium* – это грамположительные, неподвижные бактерии, не обладающие способностью к образованию спор и относящиеся по отношению к кислороду к строгим анаэробам, типа *Acinetobacteria* [60]. Представляют собой палочки несколько изогнутые по форме, могут иметь разветвления в виде Y- или V-формы с булабовидными вздутиями на концах, но в основном их морфология зависит от условий выращивания [61].

В настоящее время всего известно 48 видов бифидобактерий, у которых расщепление сахаров происходит по одному общему ферментативному метаболическому пути, специфичному для р. *Bifidobacterium*, названному бифидо-шунт [60]. Общим антигеном в пределах р. *Bifidobacterium* является наличие в их клеточной стенке помимо полисахаридов липотейхоевых кислот, которые не разрушаются под действием лизоцима. Вместе с белками они обуславливают гидрофобный характер поверхности бифидобактерий и участвуют в адгезии. Помимо этого, у некоторых штаммов бифидобактерий обнаружены дополнительные факторы адгезии: пилеподобные структуры и афимбриальные факторы. Именно наличие большого числа адгезивных факторов позволяет бифидобактериям доминировать и конкурировать с патогенными микроорганизмами в кишечном микробиоценозе [61]. В настоящее время в качестве пробиотиков широко используются виды бифидобактерий *Bifidobacterium adolescentis*, *B. animalis*, *B. bifidum*, *B. infantis*, *B. longum*, *B. breve* и *B. thermophilum* [60].

Исследования питательных потребностей бифидобактерий показали, что для нормального роста и питания бифидобактерий необходимо наличие в питательной среде не только источников углеводов и азота, но также многих ростовых факторов. К таким стимулирующим рост веществам относятся кальций пантотенат, биотин, рибофлавин, пиридоксин, белок лактоферрин и панкреатин. Некоторые представители рода в качестве единственного источника азота могут использовать только органический азот, другие только соли аммония. Также бифидогенными факторами, которые активизируют их рост и участвуют в поддержании жизнеспособности, являются некоторые олиго- и полисахариды, например инулин и олигофруктоза [62-64].

Пробиотическое действие бифидобактерий основывается на многих их свойствах. Основным положительным эффектом является синтез различных биологически активных соединений. Например, способность бифидобактерий продуцировать молочную и уксусную кислоту, а также бактериоцины,

способствует антагонистической активности против патогенной микрофлоры [65, 66]. Также бифидобактерии выполняют витаминообразующую функцию, синтезируют ряд незаменимых аминокислот, улучшают показатели белкового, липидного и минерального обмена [67]. Доказано, что бифидобактерии усиливают фагоцитоз, оказывают протективное действие на синтез иммуноглобулина А, повышают образование интерлейкинов и g-интерферона [68, 69]. Наличие в их клетках активных компонентов – гликоконъюгатов, к которым относятся различные гликопротеины, полисахариды, гликолипиды, соединения с липотейхоевыми кислотами и белками, обладают иммуностимулирующей и противоопухолевой активностью [70].

1.6. Использование зернового сырья для производства пробиотических функциональных продуктов питания

Одним из перспективных направлений в пищевой биотехнологии является использование зерновых в качестве субстрата для пробиотических бактерий с получением новых функциональных продуктов питания. Известно, что зерновые культуры обладают богатым химическим составом, который может удовлетворить не только питательные потребности пробиотических микроорганизмов, но и наличие в его составе некоторых веществ, например арабиноксиланов, может также оказать положительные эффекты на организм человека. Продукты на основе зерновых и злаковых компонентов дают возможность включить в рацион питания человека не только пробиотики, но и пребиотики и клетчатку. Одной из причин увеличения интереса к пробиотическим продуктам на основе зерновых также является наличие данных по корреляции между потреблением цельного зерна и пользой от этого для здоровья, которая заключалась в снижении риска развития диабета 2 типа, сердечно-сосудистых заболеваний, ожирения и некоторых видов рака [71].

Применение ферментации для производства и сохранения продуктов питания на основе зерновых является общепринятым для стран Средней Азии,

Ближнего Востока, Африки и Балкан. В большинстве этих продуктов ферментация является естественной и включает смешанные культуры дрожжей, бактерий и грибов. Обычно ферментирующие бактерии являются представителями видов *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Micrococcus* и *Bacillus*. В определенных продуктах встречаются грибы родов *Aspergillus*, *Paecilomyces*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Penicillium* и *Trichothecium*. Из дрожжей наиболее употребительны виды *Saccharomyces*. Однако ферментация злаковых продуктов молочнокислыми бактериями является наиболее распространенной и способствует увеличению срока годности и питательности, а также их безопасности и приемлемости [72].

Положительная роль молочнокислого брожения была подтверждена в некоторых зерновых продуктах. Антибиоз, получаемый посредством МКБ, объясняется производством кислот, перекиси водорода и бактериоцинов. Производство органических кислот снижает рН в продуктах до уровня ниже 4,0, что затрудняет выживание некоторых организмов, присутствующих в злаках и вызывающих их порчу [73, 74]. Противомикробный эффект обусловлен действием кислот на мембранный потенциал в бактериальной цитоплазматической мембране, что приводит к ингибированию активного транспорта. Помимо способности вырабатывать органические кислоты, МКБ обладают способностью вырабатывать перекись водорода, которая накапливается в среде и также ингибирует рост некоторых организмов [75]. Другое преимущество молочнокислого брожения заключается в том, что ферментированные продукты с участием МКБ обладают противовирусным [76] и противоопухолевым действием [77].

Ряд традиционных ферментированных продуктов на основе злаков представлен в таблице 1.6.1. В некоторых из них зерновые используются в сочетании с бобовыми, что повышает количество и улучшает общее качество белка в ферментированном продукте. Богатые цистеином и метионином злаки дополняются богатыми лизином бобовыми.

Таблица 1.6.1.

Традиционные ферментированные напитки на основе зерновых [78]

Название	Зерновое сырье	Микроорганизмы	Вид продукта	Регион
Boza	Ячмень, овес, рожь, просо, кукуруза, пшеница, рис	<i>Lactobacillus, Saccharomyces cerevisiae, Leuconostoc</i>	Густой, сладкий, слегка кислый напиток	Албания, Турция, Болгария, Румыния
Кесар	Пшеница, соя	<i>Aspergillus oryzae, Lactobacillus, Hansenula, Saccharomyces</i>	Жидкий ароматизатор	Индонезия
Chicha	Кукуруза	<i>Aspergillus, Penicillium</i> , дрожжи, бактерии	Губчатый твердый продукт, потребляемый с овощами	Перу
Naria	Рис	Дрожжи, плесневые грибки, МКБ, <i>Bifidobacterium spp.</i>	Ферментированный напиток	Бенгалия и Восточно- Центральная Индия

Продолжение таблицы 1.6.1.

Ogi	Сорго или просо	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Candida</i> <i>mycoderma</i> , <i>Aerobacter</i> , <i>Cephalosporium</i> , <i>Rhodotorula</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Aspergillus</i>	Паста	Нигерия, Западная Африка
Pozol	Кукуруза	МКБ, дрожжи и плесневые грибки	Губчатое тесто, сформированное в шары	Юго-восток Мексики
Tobwa	Кукуруза, сорго, просо	МКБ	Неалкогольный напиток	Зимбабве
Nasha	Сорго	<i>Streptococcus</i> , <i>Lactobacillus</i> , <i>Candida</i> , <i>Saccharomyces</i> <i>cerevisiae</i>	Каша	Судан
Dhokla	Рис или пшеница	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Streptococcus faecalis</i> , <i>Torulopsis candida</i> , <i>T. pullulans</i>	Обработанный паром сладкий пирог на завтрак или закуска	Северная Индия

Продолжение таблицы 1.6.1.

Seketeh	Пупавка	<i>Saccharomyces cerevisiae, S. elegans, S. chevalieri, L. lactis, Lactobacillus plantarum, Bacillus subtilis, A. flavus, Aspergillus niger, Mucor rouxii</i>	Алкогoльный напиток	Нигерия
Takju	Рис, пшеница	<i>LAB, Saccharomyces cerevisiae</i>	Алкогoльный напиток	Корея
Tapuy	Рис	<i>Saccharomyces, Mucor, Rhizopus, Aspergillus, Leuconostoc, Lactobacillus plantarum</i>	Кисло-сладкий алкогoльный напиток	Филиппины
Tauco	Зерновые и соя	<i>Rhizopus oligosporus, Aspergillus oryzae</i>	Приправа	Западная Ява (Индонезия)
Torani	Рис	<i>Hansenula anomala, Candida quilliermondii, C. tropicalis, Geotrichum candidum</i>	Жидкость как приправа к овощам	Индия
Vada	Зерновые/бобовые	<i>Pediococcus, Streptococcus, Leuconostoc</i>	Закуска	Индия

Помимо традиционных ферментированных продуктов, которые часто используются в рационах питания населения в странах Африки и Азии, некоторые коммерческие пробиотические напитки уже присутствуют на рынке функциональных продуктов. Например, пробиотический напиток на основе овса с добавлением солодового ячменя, ферментированный *L. plantarum* 299v, выпущенный компанией Skane Dairy в 1994 г в Швеции. Продукт содержит до 10^{12} КОЕ/л активных жизнеспособных лактобактерий [79]. Вторым коммерческим функциональным продуктом является овсяный пудинг, который получают из водной суспензии овсяных отрубей путем ферментации пробиотическими бактериями *L. acidophilus* LA 5 и *B. lactis* Bb 12, под торговой маркой Yosa. Потребляется он в основном в Финляндии и других скандинавских странах [78]. Еще одним продуктом является Grainfields Wholegrain Liquid. Он производится из зерна, бобов и семян различных сельскохозяйственных культур, ферментированных лактобациллами *L. acidophilus*, *L. delbrueckii* и дрожжами *S. boulardii* и *S. cerevisiae* и представляет собой шипучий освежающий напиток [80].

Экспериментальные пробиотические функциональные продукты на основе овса

Одним из наиболее часто используемых зерновых злаков для культивирования пробиотических микроорганизмов является овес. Овес – один из основных источников β – глюкана – полисахарида клеточной стенки, признанного диетическим волокном, регулирующим уровень холестерина и глюкозы в крови [81]. Более того β – глюкан обладает потенциальным антиканцерогенным свойством, уменьшая количество соединений – возбудителей рака толстой кишки [82] и снижая артериальное давление [83]. Его потенциал в качестве субстрата для пробиотических продуктов часто рассматривался в различных исследованиях.

Так авторами Gokavi et al. на основе овсяной муки, инулина, сахара и концентрата сывороточного белка был получен симбиотический напиток, содержащий *L. plantarum*, *L. paracasei ssp. casei* и *L. acidophilus*. При этом он обладал приемлемыми органолептическими свойствами, а содержание пробиотических бактерий в течение 10 недель хранения при 4 °С оставалось на уровне $10^7 - 10^8$ КОЕ/мл [84].

Авторами Angelov et al. был разработан функциональный напиток на основе цельного зерна овса путем его сбраживания молочнокислой культурой *L. plantarum* B28. Были оптимизированы условия по концентрации инокулята, сахарозы и овсяной муки таким образом, чтобы ферментация оканчивалась за 8 ч. Содержание клеток лактобактерий составляло $7,5 \times 10^{10}$ КОЕ/мл. При этом внесение дополнительных подсластителей не влияло на процесс ферментации и жизнеспособность клеток лактобактерий при хранении [85].

В исследовании Luana et al. для получения пробиотического напитка, ферментированного *L. plantarum* LP09, использовали овсяные хлопья в оптимальной концентрации 25 % (масс. / масс.), который предварительно обрабатывали амилолитическими ферментными препаратами. Гидролиз амилазами позволял сократить время достижения pH 4,2 до 8 ч. Ферментация *L. plantarum* LP09 увеличивала биодоступность полифенолов и антиоксидантную активность (соответственно на 25 и 70 %), а интенсивность аромата и вкуса по сравнению с неферментированным контролем была значительно выше [86].

В работе Gupta et al. немолочный напиток, содержащий пробиотики *L. plantarum*, получали на основе овсяной муки с добавлением сахарозы, для поиска оптимального соотношения которых использовали план Бокса-Бенкена с варьированием трех факторов (концентрации овса, сахарозы и стартовой культуры). Были установлены их оптимальные значения (5,5% овса, 1,25% сахара и 5% инокулята), при которых концентрация жизнеспособных лактобактерий в ферментированном напитке составляла $10,4 \log$ (КОЕ/мл). При

этом β -глюканы оставались неизменными как во время ферментации, а так и в течение 21 дня хранения [87].

Авторами Bernat et al. был разработан функциональный пробиотический напиток на основе овсяного молока, которое получали путем замачивания и измельчения овса в соотношении с водой 8:100 (масс. / об.). Ферментацию овсяного молока проводили пробиотическими микроорганизмами *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 и *Streptococcus thermophilus* СЕСТ 986, при этом в продукт дополнительно вводили глюкозу, фруктозу и инулин. С помощью центрального композиционного плана авторами были определены оптимальные параметры для получения функционального напитка: содержание глюкозы 0,65 г/100 мл, фруктозы 0,65 г/100 мл, инулина 0,4 г/100 мл и 3 мл/100 мл смешанного инокулята. Значение рН 4,37 в напитке достигалось за 3,5 ч при 40 °С с содержанием микроорганизмов около 9 log (КОЕ/мл) [88].

Пробиотические функциональные продукты на основе других зерновых культур

В работе Charalampopoulos et al. в качестве субстрата для культивирования молочнокислых бактерий *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus reuteri* и *Lactobacillus plantarum* использовали пророщенное и не пророщенное зерно ячменя или пшеницы. Исследование роста пробиотических культур проводили в течение 36 ч на питательных средах, полученных смешиванием солодовой, пшеничной или ячменной муки с водопроводной водой (10 % масс.), центрифугированием суспензий при 6000 об/мин в течение 30 мин и последующей стерилизацией. В результате было установлено, что рост всех штаммов молочнокислых бактерий был выше на солодовых питательных средах (8,1 – 10,1 Log₁₀ КОЕ/мл), что связано с высокими начальными концентрациями редуцирующих веществ (15 г/л) и свободных аминокислот (80 мг/л). Содержание МКБ в средах с не пророщенным зерном было значительно ниже, как и содержание основных питательных веществ (3-4 г/л и 15-27 мг/л) [89].

В работе Rathore et al. ферментировали молочнокислыми бактериями *L. plantarum* (NCIMB 8826) и *L. acidophilus* (NCIMB 8821) питательные среды на основе отдельных или смешанных зерновых субстратов – муки ржи, ячменя или их смеси (5 % масс.). Крахмал в ферментационной среде частично гидролизovali, удерживая суспензии на водяной бане при 95,5 °С в течение 1,5 ч, после чего перед стерилизацией постепенно охлажденную суспензию фильтровали через бумажный фильтр. В результате было обнаружено, что после 48 ч инкубации рост пробиотических бактерий был выше на питательных средах на основе ржаной муки. Концентрация клеток 7,9 – 8,5 Log₁₀ КОЕ/мл и рН ниже 4,0 достигались в течение 6 ч после начала ферментации, а концентрация молочной кислоты после 28 ч ферментации составляла 3,5 г/л. При этом было установлено, что конечное содержание молочной кислоты при ферментации на смешанных субстратах было выше, таким образом путем изменения состава субстрата можно изменять органолептические и функциональные свойства [90].

Авторами Nassani et al. был разработан пробиотический напиток на основе сорго, полученный путем ферментации *Lb. acidophilus* LA5. Установленные оптимальные параметры процесса соответствовали температуре 33 °С, оптической плотности посевного материала 0,8 OD₆₀₀ и рН 5,3. Содержание живых клеток в функциональном напитке составляло 8,0 log₁₀ (КОЕ/мл), конечный рН 3,7, концентрации молочной кислоты 3,2 г/л и общих сахаров 52,7 г/л [91].

Пробиотический продукт на основе риса и проса с добавлением тыквы и кунжутного молока был разработан авторами Hassan et al. Ферментацию проводили с использованием культур АВТ – 2 (*S. thermophilus*, *L. acidophilus* и *Bifidobacterium* ВВ-12) в течение 16 ч. Концентрация клеток в продукте составляла 4,3×10⁹ КОЕ/мл [92].

В исследовании Matejčková et al. для получения функциональных продуктов ферментировали молочнокислыми бактериями Fresco DVS 1010 и

Lactobacillus rhamnosus GG гречневые пюре. Ферментация проводилась в течение 8 ч при 37 °С. Культура Fresco показала хороший рост во всех вариантах пюре. Количество клеток *L. rhamnosus* GG в продукте составляло 8,4-9,0 Log (КОЕ/мл) [93].

Таким образом, использование зерновых в качестве основы для функциональных пробиотических продуктов является перспективным.

1.7. Технология глубокой переработки зерна

В мировой практике растет роль глубокой переработки зерна, заключающейся в выделении его компонентов с получением высокотехнологичных продуктов как для пищевой, так и химической промышленности, и других отраслей. В России также существуют все благоприятные условия для развития данной технологии, благодаря наличию зерновых ресурсов и в последнее время становится все больше предприятий ее реализующих [94].

Глубокая переработка зерна представляет собой совокупность технологических процессов, обеспечивающих последовательное выделение различных ценных компонентов из крахмалосодержащего сырья для их наиболее эффективного использования. Данная технология предполагает более полную реализацию потенциала зернового сырья с получением таких продуктов, как крахмал, глютен и т. д. Пример схемы глубокой переработки зерновых культур представлен на рисунке 2.



Рисунок 2. Пример схемы глубокой переработки зерновых культур [95]

При этом использование более углубленной переработки с применением биотехнологий позволяет получить множество биопродуктов с высокой добавленной стоимостью (рисунок 3).

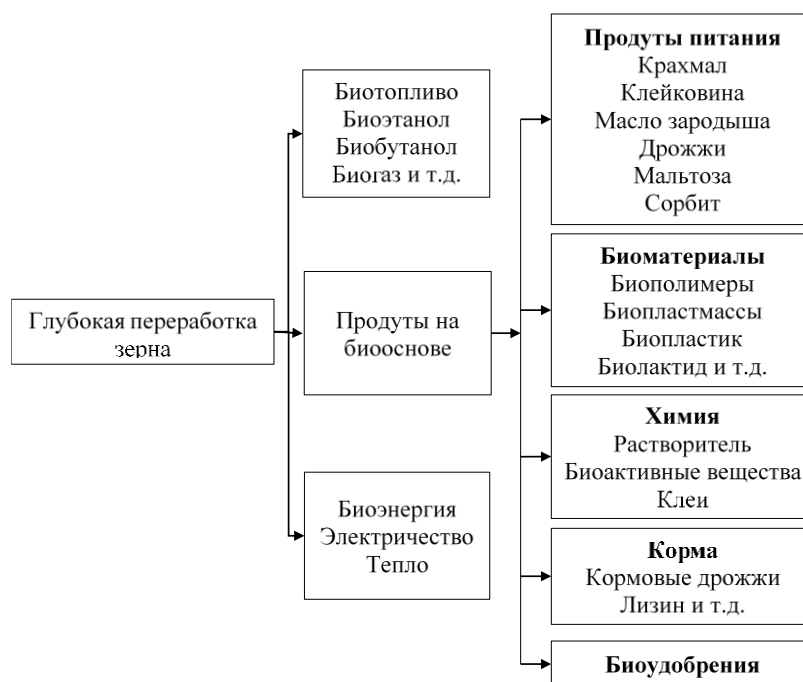


Рисунок 3. Продукты технологии глубокой переработки зерновых культур [96].

В настоящее время одно из ведущих мест в экономике стран с развитой промышленностью занимает производство крахмала и крахмалопродуктов.

Повышение спроса на сахаристые продукты, химически модифицированные крахмалы, пищевые патоки, глюкозу и биоразлагаемые полимерные материалы привели к резкому росту выработки крахмала из различного зернового сырья.

Технологические схемы производства пшеничного крахмала и глютена разнообразны, но все они включают следующие стадии: смешивание муки с водой с последующим разделением крахмала и клейковины; очистка крахмала от примесей; освобождение клейковины от крахмала. Разделение крахмала и глютена осуществляется или вымыванием крахмала из теста, или разделением суспензии способами, основанными на разности плотностей крахмала и клейковины. Отделение от крахмала примесей – белка, мезги и растворимых веществ – осуществляется с использованием ситовых аппаратов, центробежных сепараторов, фильтрования, отстаивания [97]. Принципиальная технологическая схема представлена на рисунке 4.



Рисунок 4. Принципиальная технологическая схема переработки пшеничной муки [97]

Наиболее распространенными являются способы Мартин, Баттер и Альфа-Лаваль-Райсио.

Мартин-способ заключается в отделении крахмала от клейковины из пшеничного теста путем промывки во вращающихся барабанах и последующем высушивании очищенной сконцентрированной крахмальной суспензии. Основным отличием Баттер-способа является то, что для этих целей используют сотрясательные сита. В результате интенсивного перемешивания образуются взвешенные хлопья клейковины, которые легко удаляются [98]. Райсио-способ предусматривает использование осадительных центрифуг. При этом используется трехфазная декантерная технология, позволяющая эффективно отделять крахмал, глютен и пентазановую фракции [99].

Несмотря на высокий технический уровень применяемого оборудования, у данных технологий есть ряд недостатков: большие энергетические затраты на упаривание и сгущение жидких побочных продуктов и значительная масса сточных вод с большим содержанием растворимых веществ и взвешенных частиц [100]. Для создания безотходного производства в настоящее время осуществляется поиск эффективных путей утилизации образуемых побочных продуктов, таких как отруби и жидкой легкой фракции, содержащей пентозаны и зерновую мезгу. Наиболее перспективными направлениями являются использование отходов на кормовые цели или для получения спирта.

1.8. Использование побочных продуктов глубокой переработки зерна в биотехнологии

Основными побочными продуктами глубокой переработки зерна пшеницы являются отруби, которые образуются на стадии очистки и дробления зерна, и пентозан – содержащая фракция – на стадии отмывки крахмала и клейковины. При этом нужно отметить, что общепринятого названия для пентозан-содержащей фракции не существует, а под ней могут

подразумеваться как сточные воды крахмального производства, так и побочный продукт, обогащенный некрахмальными полисахаридами.

1.8.1. Использование отрубей

Отруби представляют собой многослойный композиционный материал, образованный из разных гистологических слоев зерна пшеницы (наружного околоплодника, внутреннего околоплодника, семенной оболочки зерна, гиалинового слоя и алейронового слоя), составляющий около 15% от массы зерна после помола [101].

Внешний и внутренний околоплодники содержат в основном разветвленные гетероксиланы, целлюлозу и лигнин с многочисленными поперечными связями между полимерными цепями [102, 103]. Семенная оболочка зерна представляет собой гидрофобный слой богатый лигнином. Алейроновый слой состоит из живых клеток, окруженных толстыми клеточными стенками,

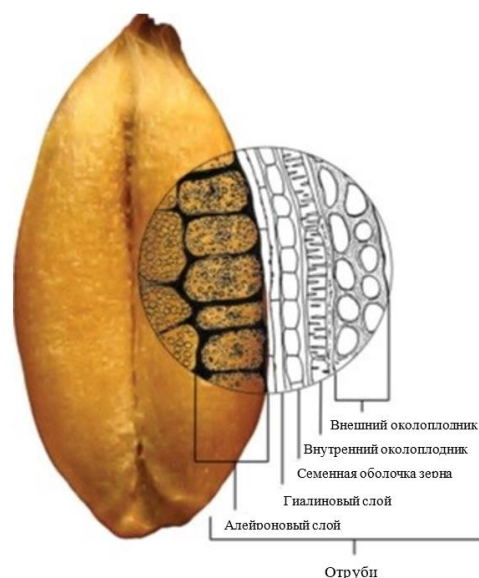


Рисунок 5. Гистологическое

представление основных конститутивных слоев пшеничных отрубей [103,104]

состоящими из относительно линейных арабиноксиланов и глюканов, а также нескольких белков [103, 104]. По сравнению с зерном отруби содержат всего 11 – 24 % крахмала, 15 – 18 % белка и большое количество пентозанов – до 20,64 % [105]. Отруби богаты полезными для здоровья биологически активными компонентами, такими как фенольные соединения и другие антиоксиданты, содержат значительное количество пищевых волокон, которые выступают в качестве пребиотиков в нижней части кишечника [106, 107]. Они являются

ценным сырьем при производстве кормовых добавок, однако в последнее время все чаще используются в качестве источника питательных веществ для культивирования пробиотических бактерий с целью производства новых ферментированных продуктов питания. При этом доказано, что брожение увеличивает содержание биологически активных компонентов в отрубях [108].

Так, авторами Radenkova V. et al была рассмотрена возможность применения пшеничных отрубей в качестве источника питательных веществ для культивирования бифидобактерий *Bifidobacterium lactis* Bb-12. Ферментацию проводили как на суспензиях с необработанными пшеничными отрубями, так и на гидролизатах, полученных обработкой α -амилазой из *Bacillus amyloliquefaciens* и ферментным препаратом Вискозим L, включающим целлюлазу, арабиназу, β -глюканазу, ксиланазу и гемицеллюлазу из *Aspergillus aculeatus*. Затем культуральную жидкость подвергали лиофильному высушиванию. Полученное количество жизнеспособных клеток бифидобактерий после 18 ч ферментации на гидролизатах составляло $1,69 \pm 0,71 \times 10^5$ КОЕ/г, а на необработанных суспензиях – $4,04 \pm 0,40 \times 10^4$ КОЕ/г. Таким образом дополнительная обработка ферментами зернового субстрата стимулировала и способствовала росту бифидобактерий, однако при этом вместе с уменьшением общего содержания крахмала и пищевых волокон снижалась энергетическая ценность продукта [109].

В работе Переваловой Ю.В. и др. исследовали и сравнивали ростовые характеристики различных штаммов бифидобактерий *B. bifidum* 1, *B. bifidum* 791, *B. longum* 379 при их культивировании на питательных средах, содержащих гидролизат ферментированных отрубей и наиболее часто используемые углеводы (глюкозу, лактозу). При этом было установлено, что добавление гидролизата ферментированных отрубей к питательным средам – гидролизатно-молочной и среде Блаурокка, вызывало увеличение конечного титра бифидобактерий, при этом также повышалась выживаемость культуры при хранении. Получаемый гидролизат отрубей может применяться в качестве

комплексной добавки, как к питательным средам, так и к основам, используемым для производства функциональных продуктов питания (например, молоку). Использование гидролизата отрубей позволит получать обогащенные продукты, в которых будут сочетаться лучшие их свойства без отрицательного побочного действия [110].

Существует множество работ, в которых пшеничные отруби используются в качестве субстрата для культивирования лактобактерий. Авторами Naveena V.J. et al была изучена твердофазная ферментация *Lactobacillus amylophilus* GV6, обладающего амилолитической активностью, на пшеничных отрубях для производства молочной кислоты. При этом была доказана высокая эффективность процесса при высокой концентрации субстрата. Выход молочной кислоты составлял 36 г на 100 г пшеничных отрубей, содержащих 54 г крахмала [111].

В работе John R. P. для ферментации молочнокислых бактерий *Lactobacillus casei* и *Lactobacillus delbrueckii* использовали пшеничные отруби с содержанием крахмала 65 %, которые предварительно обрабатывали протеазами. Максимальный выход молочной кислоты после оптимизации составил 123 г/л с продуктивностью процесса 2,3 г / (л × ч), что соответствовало конверсии 0,95 г лактата на грамм крахмала через 54 ч. При этом обработка протеазами позволила снизить количество используемого дорогостоящего дрожжевого экстракта в питательной среде с увеличением уровня производства [112].

В исследовании Zheng Li et al. для ферментации лактобактерий *Lactobacillus rhamnosus* и производства молочной кислоты использовали гидролизаты пшеничных отрубей, полученные предварительной обработкой при 80 °С в течение 20 ч серной кислотой. Максимальный выход молочной кислоты составлял 0,99 г/г [113].

1.8.2. Использование пентозановой фракции

Пентозаны, преимущественно арабиноксиланы – это не крахмальные полисахариды, в основном состоящие из β – 1,4 – связанных D – ксилопиранозильных остатков в качестве основной цепи, замещенных арабинозой. Часть арабинозы может содержать феруловую кислоту [114]. Из-за того, что они не перевариваются эндогенными секретами пищеварительного тракта человека, их также называют пищевыми волокнами. Они широко встречаются в больших количествах в клеточных стенках зерновых, где они участвуют в поддержании её структурной целостности. Пентозаны особенно часто распространены в пшенице, где обычно составляют около 2% от массы измельченного зерна, и в зерне ржи – около 9%. Их можно разделить на водорастворимую и нерастворимую с более высокой молекулярной массой фракцию [115].

Пентозаны образуются при переработке пшеницы как побочный продукт выделения крахмала и глютена в составе сточных вод, где их содержание может достигать более 10 %. Типичная композиция содержит 10-45% пентозанов, 5-20 % белка и 20-70 % крахмала. При сравнении питательной ценности белка в легкой жидкой фракции, образуемой при производстве крахмала с помощью декантерной центрифуги, с пшеничной мукой и глютенем, авторами Ma X., Xiong J. было показано, что аминокислотный и химический показатель белка в легкой жидкой фракции были выше. При этом индекс незаменимых аминокислот составлял 0,95, биологическая ценность – 92,06, коэффициент различия аминокислотного сора – 73,73, перевариваемость белка *in vitro* – 85,4 %, коэффициент эффективности протеина – 1,89 и аминокислотный коэффициент усвояемости белков – 0,43. Кроме того проксимальная степень белка в легкой фазе, рассчитанная с помощью режима нечеткой идентификации (Fuzzy Logic Toolbox), составляла 0,85 и была выше, чем у пшеничной муки и глютена [116].

Наиболее распространенной областью применения и примером пентозан-содержащего побочного продукта является «жидкий корм» (пшеничный крахмал С Cerestar), продаваемый в кормовой промышленности для свиней с составом около 7% белка, 13% пентозанов и 60% крахмала [117]. В тоже время из-за низкого содержания белка такой корм считается малоценным, но высокое количество в нем углеводных компонентов делает его перспективной сырьевой базой для биотехнологических производств.

Так, авторами Palmarola-Adrados В. et al. был исследован побочный продукт (обогащенный полисахаридами) комбинированного завода по производству крахмала и этанола из пшеницы, обозначенный как волокна пшеничного крахмала и используемый в настоящее время в качестве низкоценного корма для животных. В составе продукта содержались крахмал, целлюлоза и гемицеллюлоза, а также растворенные моносахариды. В работе был исследован гидролиз некрахмальных углеводов с целью применения его в качестве возможного сырья для производства этанола. Безкрахмальные волокна подвергали термической обработке с последующим ферментативным гидролизом целлюлозы и гемицеллюлозы до мономеров. Термическая обработка в микроволновой печи эффективно увеличивала растворимость полисахаридов и делала материал более доступным для целлюлолитических и гемицеллюлолитических ферментов. Максимальный выход сахара после ферментативного гидролиза с предварительной термической обработкой при 170 °С в течение 40 мин составлял 34,1 г на 100 г безкрахмальных полисахаридов, включая 12,8 г глюкозы, 13,9 г ксилозы и 7,4 г арабинозы, что соответствовало 66 %, 71 % и 51 % от теоретического выхода, соответственно [118].

В работе Xue F. et al. сточные воды от производства крахмала из кукурузы были использованы в качестве питательной среды для культуры дрожжей *Rhodotorula glutinis* с целью производства липидов. Были определены оптимальные условия роста: температура 30-37 °С и химическое потребление

кислорода (ХПК) более 30 000 мг/л. Культивирование в 5-литровом ферментере позволяло получить более 60 г/л биомассы с 30 % содержанием липидов через 60 ч. Опытное производство с использованием крахмальных сточных вод без стерилизации и регулирования рН при культивировании в 300-литровом ферментере позволило получить биомассу дрожжей с концентрацией 40 г/л с содержанием липидов 35% через 30-40 ч. Получаемые липиды могут быть использованы в производстве биодизеля [119].

В исследовании Luo W. et al. была определена целесообразность использования сточных вод производства пшеничного крахмала без процессов расщепления ферментами или каких-либо других предварительных обработок субстрата для ферментации *Clostridium acetobutylicum* и производства биобутанола. Было установлено, что сточные воды переработки пшеницы содержали большое количество крахмала и других органических веществ, что характеризовало его как субстрат, обладающий высоким потенциалом для производства бутанола. Высоконцентрированные крахмальные сточные воды могут быть использованы непосредственно для ферментации клостридий, при этом добавление муки маниоки, неорганических солей и дрожжевого экстракта стимулировало рост культуры и конечное содержание бутанола [120].

В патенте ЕС № 1090929 пентозан-содержащая фракция, образуемая в крахмалоперерабатывающей промышленности, использовалась для выделения и утилизации пентозанов, которые можно применять в качестве связующих веществ, в частности, покровных материалов для почвы или для твердофазных ферментаций, а также в качестве суперабсорбентов или их компонентов для папиросной бумаги, гигиенических продуктов и наполнителей лотков для кошек. Способ включает в себя нагревание пентозан-содержащей фракции пшеницы до 40-120 °С, предпочтительно выше 60 °С, обработку щелочью, добавление фосфатного реагента, нейтрализацию продукта кислотой и сбор обработанных пентозанов [117].

Анализ научной и научно-технической литературы показал, что несмотря на достаточно высокий питательный состав, примеров использования пентозансодержащего сырья – побочного продукта глубокой переработки пшеницы на крахмал и глютен – в биотехнологических процессах представлено в промышленности не так много, а основное его применение после концентрирования и упаривания сводится к производству биоэтанола и кормовых добавок, характеризующихся низким содержанием белковых веществ. В тоже время по данным Всероссийского научно-исследовательского института кормов ежегодный дефицит белка в кормах составляет более 1,8 млн тонн, в том числе в объемистых – 1068 тыс. тонн, в концентрированных – 750 тыс. тонн [121]. Как следствие, недостаточное количество протеина сказывается на продуктивности сельскохозяйственных животных и ведет к ее снижению, ухудшается качество продукции, неуклонно растет себестоимость получаемых продуктов. Неэффективность использования кормов для производства животноводческой продукции приводит к их перерасходу в несколько раз. Стандартные системы кормопроизводства, опирающиеся на базу кормовых культур, уже не в состоянии полностью обеспечить растущие потребности, к тому же растительные корма имеют ряд недостатков, таких как несбалансированность белков по аминокислотному составу, витаминам, минеральным веществам.

Наиболее перспективным методом восполнения дефицита протеина в рационах кормления моногастричных животных является микробиологическая ферментация различного сырья [122]. В качестве микроорганизмов-продуцентов используются штаммы дрожжей и грибов. Дрожжевые культуры используются чаще, так как характеризуются значительной скоростью роста, высоким содержанием белка, относительной простотой культивирования [123].

В нашей стране накоплен богатый опыт получения кормового протеина на углеводородах нефти и природном газе, низших спиртах, гидролизных отходах целлюлозно-бумажной и лесохимической промышленности [124]. У

данных производств есть ряд недостатков: в биомассе кормовых дрожжей, полученной на углеводородах, накапливается значительное количество примесей углеводородной фракции, обладающих канцерогенными свойствами [123]; производства кормовых дрожжей на природном газе и низших спиртах чрезвычайно взрывоопасны и требуют повышенного внимания к ведению технологического процесса.

В последнее время наибольший интерес в качестве субстрата для производства кормового белка представляют углеводы крахмалосодержащего зернового сырья.

Известен способ выращивания дрожжей на питательной среде, приготовленной на основе целого зерна злаковых и/или бобовых культур. Субстрат увлажняют, подвергают тепловому воздействию в инфракрасном поле, измельчают и готовят суспензию. Проводят ферментативный гидролиз измельченного сырья воздействием препарата альфа-амилазы и бета-глюканазы, затем воздействием препаратов целлюлазы и целлобиазы. В ферментированную суспензию вносят раствор минеральных солей. На полученной питательной среде культивируют дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* [125].

Коллективом авторов предложен способ получения питательной среды для выращивания дрожжей смешиванием крахмалосодержащего сырья с водой (например, муки злаковых), нагреванием полученной смеси, последовательным гидролизом амилосубтилином, глюкававорином и целлюлолитическим ферментом. В гидролизат вносят источники минерального азота, фосфора, ростовых веществ и микроэлементов [126].

Известен способ комплексной переработки зернового сырья на спирт и кормовые продукты, обогащенные лизином, на основе биоконверсии полимеров зернового сырья. Комплексная обработка субстрата осуществляется экзогенными ферментами, катализирующими гидролиз крахмала, некрахмальных полисахаридов и белковых веществ. Зерновое сусло

используется для получения этанола. На основе послеспиртовой зерновой барды готовят питательную среду с внесением минеральных солей, факторов роста и проводят культивирование микроорганизмов-продуцентов с получением кормовой добавки [127].

Предложен способ получения белкового продукта на основе муки злаковых культур, подвергнутых предобработке роторно-пульсационным кавитационным аппаратом. В качестве продуцентов белка используют смесь дрожжей-сахаромицетов и/или бактерий, обладающих амилолитическими ферментами, и грибов, утилизирующих органические кислоты при содержании последних 20-30%. Питательная среда содержит один минеральный компонент (источник азота в виде одной соли аммония). В качестве дрожжей-сахаромицетов используют штамм *Saccharomyces cerevisiae (diastaticus)* ВКПМ У-1218, в качестве бактерий – штамм *Acinetobacter calcoaceticus* О-1. Готовый кормовой продукт содержит повышенное количество сырого протеина и истинного белка [128].

Для получения кормового протеина также могут использоваться отходы мукомольной и спиртовой промышленности, а также смеси послеспиртовой барды с отходами зернового сырья [129-131]. В качестве культур-продуцентов в перечисленных изобретениях используют дрожжеподобные несовершенные грибы рода *Candida*.

Предложен способ производства кормовых дрожжей на основе аспирационных пылей, собираемых аспирационными системами на зерноперерабатывающих и комбикормовых предприятиях. Способ включает в себя гидролиз растительного сырья при нагревании с 1 – 5 % раствором серной кислоты в течение 85-95 минут, нейтрализацию гидролизата, добавление питательных солей и выращивание дрожжей *Candida tropicalis* [132].

Исходя из результатов обзора литературных данных по использованию зернового сырья и продуктов его переработки можно сказать, что применение пентозан-содержащей фракции, богатой питательными веществами для

получения высокобелковых кормов, обогащенных микробным протеином, является целесообразным, а его доступность и низкобюджетность позволит снизить затраты на производство.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Глава 2. Материалы и методы исследования

2.1. Объекты исследования

2.1.1. Крахмалосодержащее зерновое сырье и побочный продукт его переработки

В работе использовали муку различных сельскохозяйственных культур, а именно пшеницы, ржи, гречихи, гороха и жидкий побочный продукт переработки зерна пшеницы – пентозановую фракцию, полученную от ЗАО «Завод Премиксов №1».

2.1.2. Микробные объекты исследования

Исследования проводили со штаммами культур дрожжей, бифидо- и лактобактерий, полученных из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПИМ): *B. adolescentis* AC-1662 (DSM 20083, ATCC 15703), *B. longum* AC-1665 (DSM 20219, ATCC 15707), *B. longum infantis* AC-1912 (DSM 20218), *B. pseudolongum* AC-1785 (DSM 20099, ATCC 25526), *B. breve* AC-1911 (DSM 20091, ATCC 15698), *L. paracasei* B-4079, *L. rhamnosus* B-8238, *L. salivarius* B-2214, *L. helveticus* B-2370, *L. fermentum* B-7573, *L. plantarum* B-7583, *L. bulgaricus* Lb 14 B-4626, *L. acidophilus* B-2105, *P. fermentans* Y-264, *P. guilliermondii* Y-780, *L. scottii* OH-1 Y-796, *L. scottii* kc-1 Y-246, *L. scottii* kc-2 Y-247, *L. scottii* Y-1537, *C. utilis* VSB-651 Y-277, *C. utilis* P-1 Y-13, *C. utilis* Y-3348, *C. utilis* K-83 Y-624; *B. bifidum* №1, выделенный из пробиотического препарата, и коллекции кафедры биотехнологии РХТУ имени Д. И. Менделеева: *S. cerevisiae*, *P. membranifaciens*, *R. glutinis*, *C. tropicalis*, *C. utilis*, *C. maltosa*, *C. guilliermondii*.

2.1.3. Ферментные препараты

В работе использовали ферментные препараты (ФП) с амилолитической, протеолитической и ксиланазной активностями.

Амилолитические ФП:

«*Duozyme*» (АО «*Novozymes A/S*», Дания) – жидкий комплексный препарат, в состав которого входит несколько амилаз и амилоглюкозидаза, полученных с использованием генетически модифицированных микроорганизмов (*Bacillus licheniformis* и *Aspergillus niger*). Основной областью применения является спиртовая промышленность. Преимущество ФП заключается в простоте использования – одновременно протекают два процесса: разжижение и осахаривание. Активность по ГОСТ 20264.4-89, 20264.2-89 при 30°C - 9000 ед ГЛС/см³ и 500 ед АС/см³ соответственно. Оптимальные условия действия ферментативного препарата находятся в интервале T = 30-75°C, pH 3,0-6,0 [133].

Протеолитические ФП:

«*Protex 40E*» («*Дженекор Даниско*», Бельгия) представляет собой гранулированную щелочную протеазу, полученную с помощью генетически модифицированного штамма бактерий *Bacillus subtilis*. Рабочий интервал pH 7.0 – 12.0, оптимум pH 8.6. Рабочий интервал температур от 35°C до 65°C, оптимальная температура 60°C. Количество вносимого фермента 0.05 – 0.5% от содержания протеина в субстрате. Активность 38000 GSU/kg. Препарат может применяться для промышленной переработки белковых соединений, обработки белоксодержащих вторичных продуктов, очистки фильтров, экстракции гепарина и хондроитинсульфата из тканей животных [134].

«*Olexa HS FG*» (АО «*Novozymes A/S*», Дания) представляет собой жидкий мультиэнзимный препарат, содержащий в качестве основного фермента грибную эндо-протеазу. Используется для получения растворимого аминного азота с целью интенсификации процесса брожения. Препарат способен расщеплять протеин-связанный крахмал, тем самым повышая выход спирта. Рабочий интервал температур 28 – 60 С, рабочий интервал pH 3,5 – 6,0 [135].

«*Протосубтилин Г_{3Х}*» – препарат нейтральной бактериальной металлопротеазы из культуры *B. subtilis*. Сопутствующие ферменты: эндо-1,3-1,4-глюканаза, ксиланаза, амилаза. Стандартная активность протеазы в

препарате 70 и 100 ед/г. Оптимальные условия действия: рН 7,0-7,5, температура 50 С. Стабилизаторы – ионы цинка и кальция, ингибиторы – хелаты, тяжелые металлы [135].

«Панкреатин» (Pancreas, Испания) – комплексный препарат животного происхождения, содержащий в своем составе в основном панкреатическую амилазу, трипсин и панкреатическую липазу. Представляет собой аморфный порошок кремового цвета со слабым специфическим запахом. Его наибольшая активность проявляется в нейтральной и слабощелочной среде. Оптимальные значения рН и температуры 8,0 и 40 °С соответственно [136].

Ксиланазные ФП:

«Целловиридин Г_{20Х}» («Русфермент», Россия) – представляет собой комплексный препарат целлюлолитических ферментов и гемицеллюлаз в виде сухого порошка, полученных с использованием культуры *T. viride*. В состав комплекса входят: эндо-1,4-глюканаза, целлобиогидралаза, целлобиаза, эндо-1,3-1,4-глюканаза, 1,3-глюканаза, ксиланаза. Оптимальные условия действия ферментного препарата: рН 4,5 – 5,5, температура 50 С [137].

«Вискоферм» (*Viscoferm*, АО «Novozymes A/S», Дания) представляет собой ферментный комплекс для снижения вязкости высококонцентрированного сусле, содержащего некрахмалистые полисахариды. Препарат содержит ксиланазу, целлюлазу и глюканазу. Рабочие условия действия: температура 30-80, рН 5,5 – 6,5.

«*Cellic HTec 2*» (АО «Novozymes A/S», Дания) содержит эндоксиланазу с высокой специфичностью в отношении растворимой гемицеллюлозы и целлюлазу. Используется для интенсификации процесса гидролиза целлюлозы в сочетании с СТес 2, для предварительной кислотной и щелочной обработки, для получения ферментируемых сахаров из гемицеллюлозы. Обеспечивает более высокий выход этанола и гибкость технологии предварительной обработки.

«*Veron SX*» (AB Enzymes GmbH, Германия) – грибной альфа-амилазный препарат с дополнительной ксиланазной активностью для обработки муки. Фермент получают из специфических культур *Aspergillus oryzae*. Представляет собой гранулированный продукт светло-бежевого цвета с ароматным запахом. Используется для обработки муки. Дозировка 10-15 г/100 кг муки.

«*Veron 393*» (AB Enzymes GmbH, Германия) – это гемицеллюлазный препарат для обработки муки. Фермент получают из специфических культур микроорганизмов *Aspergillus niger*. Представляет собой порошок светло-бежевого цвета с ароматным запахом. ФП применяется для переработки муки. Дозировка 3-10 г/100 кг муки.

«*ROHALASE Barley L*» (AB Enzymes GmbH, Германия) является ферментным препаратом, содержащим в основном, эндо-бета-глюканазную и дополнительную целлюлазную и эндо-ксиланазную активности. Получают из культур *Trichoderma reesei*. Представляет собой жидкий продукт темно-коричневого цвета с характерным запахом. Применяется для компенсации низкого качества солода, уменьшения вязкости заваренного солода и сусла, улучшения фильтрационной способности, во избежание появления мутности. Оптимальные значения: pH 5,0-6,0, температура 55-65 С. Для первых испытания рекомендуемая дозировка 20-100 г на тонну солода.

Информация по ФП *Viscoferm*, *Cellic HTec 2*, *Veron SX*, *Veron 393*, *ROHALASE Barley L* предоставлена производителем при передаче образцов ферментных препаратов.

2.2. Биохимические и физико-химические методы анализа

2.2.1. Определение сухих веществ

Метод определения содержания сухих веществ основан на высушивании образца продукта в сушильном шкафу в бюксе при температуре 105°С до постоянной массы [138]. Содержание сухих веществ СВ (мас. %) рассчитывают по формуле (1):

$$CB = \frac{m_2 - m_0}{m_1 - m_0} \times 100 \quad (1)$$

где m_0 – масса пустого бюкса, г;

m_1 – масса бюкса с пробой, г;

m_2 – масса бюкса с навеской пробы после высушивания, г.

2.2.2. Определение сырого протеина методом Кьельдаля

С помощью метода Кьельдаля определяют аминный и амидный азот. Метод состоит из минерализации 98% серной кислотой навески анализируемого продукта в присутствии катализатора (селена) до образования сульфата аммония. Отгонкой аммиака в кислоту определяют количество азота в полученном сульфате аммония, по которому далее находят содержание сырого протеина [138].

Навеску образца - 0,5 г или 1-5 мл суспензии - помещают в специальную круглодонную колбу - колбу Кьельдаля, добавляют небольшое количество селенового катализатора, а затем приливают 10 мл концентрированной серной кислоты. Для сжигания образца колбу помещают на электрическую плитку, обеспечивая с помощью специальной подставки наклонное положение. Сжигание заканчивают при полном обесцвечивании раствора. Содержимое колбы остужают, количественно переносят в мерную колбу на 100 мл и доводят дистиллированной водой до метки. Тщательно перемешивают и приступают к отгонке аммиака на аппарате Кьельдаля.

Перед тем, как приступить к перегонке, в коническую колбу – приемник – объемом 50 мл вносят 10 мл реактива Конвея, содержащего борную кислоту. В перегонную грушевидную колбу вносят 10 мл пробы, к ней приливают 10 мл 40%-ного раствора гидроксида натрия. Проводят перегонку в течение 30 минут, в результате выделяющийся аммиак поглощается реактивом Конвея с образованием бората аммония. Аммиак, поглощенный реактивом, оттитровывают 0,05 н серной кислотой до изменения зеленой окраски в исходную.

Расчет содержания общего азота ($N, \%$) ведут по формуле (2):

$$N = \frac{V \cdot 0,05 \cdot 14 \cdot 100}{H \cdot 10} \cdot 100, \quad (2)$$

где N – содержание азота в пробе;

V – объем серной кислоты, израсходованной на титрование (мл);
0,05 – концентрация титранта (мг-экв/мл);
14 – количество азота (мг), которое связывает 1 мг-экв серной кислоты;
100 – объем раствора в мерной колбе (мл);
10 – количество раствора, взятого для отгона аммиака (мл);
 N – навеска материала (мг).

Количество сырого протеина рассчитывается по формуле (3):

$$X = N \cdot 6,25, \quad (3)$$

где 6,25 - эмпирический коэффициент; 5,7 - эмпирический коэффициент для пшеницы, овса и продуктов их переработки.

2.2.3. Определение массовой доли белка по Барнштейну

Метод заключается в экстракции из продукта при его обработке горячей водой водорастворимых небелковых азотсодержащих соединений, восстановлении азота оставшихся в продукте органических соединений до аммиака при его минерализации серной кислотой, определении аммиака с помощью титриметрического анализа и пересчете его количества на содержание белка по Барнштейну [139].

В химический стакан помешают 0,5 г образца продукта, приливают 100 мл кипящей дистиллированной воды. Кипятят содержимое на нагревателе в течение 2-3 мин. Не охлаждая жидкости, в стакан приливают 20 мл раствора сернокислой меди, перемешивают и добавляют 20 мл 2,5% раствора гидроксида натрия, снова перемешивают и оставляют на 1 час при комнатной температуре. Жидкость декантируют через фильтр. Оставшийся в стакане осадок промывают горячей дистиллированной водой, сливая промывные воды через тот же фильтр. Осадок переносят на фильтр и продолжают промывать горячей дистиллированной водой до исчезновения реакции на сульфат-ион в промывных водах. Для этого в пробирку отбирают несколько капель промывной жидкости и добавляют 2-3 капли раствора хлорида бария. На полноту промывки указывает отсутствие помутнения.

Промытый от сульфат-ионов осадок в сушильном шкафу при температуре не выше 105-107 °С или на воздухе и проводят определение содержания белка по методу Къельдаля.

2.2.4. Определение содержания общего жира

Сущность метода заключается в экстрагировании сырого жира из продукта органическим растворителем с последующим гравиметрическим определением его содержания по отношению к исходному образцу [138].

Из обезжиренной фильтровальной бумаги сворачивают цилиндрок, плотно закручивают его с одной стороны, помещают в него 2 небольших кусочка обезжиренной ваты и взвешивают. Один из кусочков ваты помещают на дно цилиндрика и вносят навеску анализируемого образца продукта массой 2,5 – 3 г, помещая сверху второй кусочек ваты. Затем его заворачивают с другой стороны и взвешивают. После чего бумажный цилиндрок с образцом помещают в аппарат Сокслета. Круглодонную перегонную колбу заполняют растворителем (этанол: хлороформ, 1:2) в количестве 150 мл, собирают аппарат Сокслета и накрывают его асбестовым полотном. Нагревают в течение 2 – 3 ч с использованием электрической плитки, обеспечивая в колбе равномерное кипение растворителя. Экстракцию считают законченной через 2 ч. По окончании аппарат разбирают и переливают растворитель в исходную емкость.

Массовую долю сырого жира в сухом образце X_1 (%) вычисляют по формуле (4):

$$X_1 = \left(1 - \frac{(m_3 - m_1)}{(m_2 - m_1) \cdot \omega}\right) \cdot 100, \quad (4)$$

где m_1 – масса фильтра, г;

m_2 – масса фильтра с навеской до экстракции, г;

m_3 – масса фильтра с навеской после экстракции, г;

ω – содержание сухих веществ в биомассе.

2.2.5. Определение массовой доли нуклеиновых кислот

Сущность метода состоит в гидролитическом отщеплении азотистых оснований от молекулы нуклеиновой кислоты при высокой температуре в

присутствии хлорной кислоты и последующей спектрофотометрической регистрации отщепленных оснований [138].

Предварительно готовят пробы биомассы с помощью гидролиза. 2 мл гидролизата биомассы вносят в пробирку и приливают 2 мл 1 н HClO_4 , после чего пробирку помещают в кипящую водяную баню и выдерживают 30 мин. В качестве контроля используют смесь дистиллированной воды и 1 н HClO_4 в тех же пропорциях и обработанную тем же способом. Охлаждают содержимое пробирок и, используя кварцевые кюветы с толщиной поглощенного слоя 10 мм, измеряют поглощение на спектрофотометре при 270 и 290 нм против контроля.

Расчет концентрации нуклеиновых кислот (мг/мл) проводят по формуле (5):

$$[\text{НК}] = (A_{270} - A_{290}) \times P \times 2 \times 54,21, \quad (5)$$

где A_{270} и A_{290} – поглощение при 270 и 290 нм;

2 – разведение анализируемого раствора при добавлении хлорной кислоты;

P – разведение без учета добавления хлорной кислоты;

54,21 – эмпирический коэффициент.

2.2.6. Определение содержания углеводов модифицированным методом Бертрана

Модифицированный метод Бертрана основан на способности редуцирующих сахаров восстанавливать соли окиси меди в щелочной среде в закись меди красного цвета [138].

В термоустойчивую коническую колбу объемом 25 мл наливают по 5 мл раствора Фелинга I и раствора Фелинга II. Ставят на нагретую электрическую плитку и доводят содержимое до кипения. Предварительно приготовленной необходимого разведения пробой титруют кипящий раствор до перехода фиолетовой окраски растворов Фелинга в бледно-желтую. В момент, когда окраска смеси станет желтой или желто-зеленой, фиксируют объем пробы, пошедший на титрование. При нехватке объема пробы дотитровку проводят стандартным раствором глюкозы (1 мг/мл).

Расчет проводят по формуле (6):

$$\%РВ = \frac{(T_{\text{глюкозы}} - V_{\text{глюкозы}} \cdot c_{\text{глюкозы}})}{10 \cdot V_{\text{пробы}}} \cdot П, \quad (6)$$

где $T_{\text{глюкозы}}$ – титр растворов Фелинга по глюкозе, мг;

$V_{\text{глюкозы}}$ – объем глюкозы, пошедший на дотитровку, мл;

$c_{\text{глюкозы}}$ – концентрация глюкозы, мг/мл;

$V_{\text{пробы}}$ – объем анализируемой пробы, пошедший на титрование, мл.

Необходимо провести не менее 3-х параллельных определений. Количество анализируемого раствора, пошедшего на титрование, не должно отличаться более чем на 0,1-0,2 мл.

Титр медно-щелочного раствора устанавливают отдельным титрованием по любому интересующему редуцирующему веществу. Титр медно-щелочного раствора – это количество глюкозы (мг), идущее на восстановление 10 мл медно-щелочного раствора при данных условиях титрования.

2.2.7. Определение содержания олиго- и полисахаридов методом Бертрана-Шорля

В случае если анализируемый раствор содержит олиго- и полисахариды, то их определение осуществляют методом Бертрана-Шорля [138]. Метод аналогичен методу Бертрана, но анализируемая проба предварительно гидролизуется на кипящей водяной бане с 2Н НСl в соотношении 1:1 при определении содержания олигосахаридов – 10 мин, а при определении полисахаридов – 40 мин. После чего проводят определение концентрации сахаров методом Бертрана. Калибровочная кривая строится по необходимому стандарту (сахарозе, мальтодекстрину и т. д.), раствор которого также подвергается предварительному гидролизу.

2.2.8. Определение общего содержания углеводов методом Дюбуа

Анализируемые пробы продукта вносят пипеткой в термостойкие пробирки из пирекса. Объем каждой пробы доводят до 1 мл дистиллированной водой. В то же время готовят контрольный образец, содержащий 1 мл дистиллированной воды, а также серию стандартных растворов глюкозы с

концентрацией от 10 до 100 мкг/мл. Далее во все пробирки вносят по 1 мл фенольного реактива, перемешивают тщательно встряхиванием, а затем добавляют по 5 мл концентрированной серной кислоты. Также перемешивают и оставляют на 15 мин в темном месте для развития окрашивания. После чего снимают показания оптической плотности против контрольного образца при 488 нм. Строят калибровочную кривую. Концентрацию глюкозы в пробе определяют по калибровочной кривой. При необходимости учитывают разведение пробы [138].

2.2.9. Колориметрический метод определения белка по Лоури

Метод основан на образовании окрашенных продуктов синего цвета, образующихся в результате 2-х самостоятельных реакций: биуретовой реакции белка с ионами меди в щелочной среде и реакции восстановления фосфорномолибденовой и фосфорновольфрамовой солей реактива Фолина тирозиновыми, триптофановыми и фенилаланиновыми радикалами, присутствующими в испытуемом растворе [140].

Вносят в пробирки по 0,4 мл анализируемого раствора необходимого разведения, затем добавляют 2 мл раствора, представляющего собой смесь двух в соотношении 50:1 (20% Na_2CO_3 в 0,1 н NaOH и 0,5% раствор сульфата меди в 0,1% растворе сегнетовой соли), перемешивают и выдерживают 10 мин. После чего вносят 0, 2 мл реактива Фолина - Чокальтеу. Тщательно перемешивают содержимое пробирок и выдерживают в темноте 30 мин. Контроль содержит 0,4 мл 0,1 н NaOH и все реактивы. Измеряют оптическую плотность растворов против контроля.

Определяют концентрацию белка по калибровочному графику (по клейковине или альбумину) и умножают найденное значение на разведение анализируемого раствора (7):

$$P = c \cdot N, \quad (7)$$

где P – содержание белковых веществ, мг/л;

c – концентрация белковых веществ, найденная по калибровочному графику, мг/л;

N – разведение анализируемого раствора.

2.2.10. Определение концентрации водорастворимых пентозанов

Приготовление рабочего раствора: ледяная уксусная кислота 110 мл, концентрированная соляная кислота 2 мл, 20% раствор флороглюцина в этаноле 5 мл, 1,75% раствор глюкозы 1 мл.

К 2 мл исследуемого образца различной степени разведения добавляют 10 мл свежеприготовленного рабочего раствора. Одновременно готовят контрольный образец, содержащий 2 мл дистиллированной воды и 10 мл рабочего раствора. Пробирки помещают в ванну с кипящей водой и выдерживают в течение 25 мин. Пробы охлаждают и как можно быстрее измеряют оптическую плотность при длине волны 558 нм и 505 нм. Рассчитывают разницу величин оптической плотности при 505 нм и 558 нм. Содержания пентоз определяют по калибровочной кривой. Для построения калибровочной кривой проводят анализ стандартных образцов, содержащих растворы ксилозы и арабинозы с концентрацией 0,05, 0,1, 0,2, 0,4 мг/мл.

Пробоподготовка. Пентозан-содержащее сырье смешивают в соотношении 1:1 с 2 н ТХУ или HCl и помещают в ванну с кипящей водой на 60 минут. Центрифугируют в течение 10 мин при 6000 об/мин. Осадок отбрасывают, надосадочную жидкость используют для дальнейших исследований [141].

2.2.11. Определение аминного азота формольным титрованием

Аминные группы аминокислот вступают в реакцию с формальдегидом с образованием метиленовых соединений (метиленаминокислот) [142].

Метиленаминокислоты обладают более сильными кислотными свойствами, чем аминокислоты, и легко оттитровываются щелочью. Таким образом, содержание азота аминогрупп можно рассчитать по количеству щелочи, пошедшему на титрование. При этом принимается допущение, что количество карбоксильных групп, оттитрованных щелочью, эквивалентно количеству аминогрупп, прореагировавших с формальдегидом, что справедливо лишь для моноаминомонокарбоновых аминокислот. Например,

аминокислота аргинин не реагирует с формальдегидом, поэтому в реакции не участвует. При титровании тирозина со щелочью взаимодействуют не только карбоксильная, но и фенольная группа [142].

В стакан емкостью 50 мл внести 17 мл дистиллированной воды и 3 мл питательной среды. Погрузить в полученную смесь электроды рН – метра.

При постоянном перемешивании титровать рН смеси 0,1 Н раствором едкого натра до рН 7,0.

Добавить в полученный раствор 2 мл смеси формалина с фенолфталеином и при постоянном перемешивании титровать 0,1 Н раствором едкого натра до рН 9,2. Отметить количество мл 0,1 Н едкого натра, пошедшего на титрование.

Повторить испытание питательной среды. Одновременно провести контрольное испытание, добавив вместо 3 мл питательной среды 3 мл дистиллированной воды для проверки реактивов. Отметить количество мл 0,1 Н едкого натра, пошедшего на титрование контрольной пробы.

Рассчитать содержание аминного азота при испытании среды в двух параллельных определениях (X_1 и X_2) по формуле (8):

$$X_{\text{мг}\%} = (V - V_1) * K * 1,4 * 100/3, \quad (8)$$

где V – количество 0,1 Н раствора едкого натра, израсходованного на титрование испытуемой пробы, мл

V_1 – количество 0,1 Н раствора едкого натра, израсходованного на титрование контрольной пробы, мл

K – поправочный коэффициент к 0,1 Н раствору едкого натра

1,4 – количество азота, соответствующее 1 мл 0,1 Н раствору едкого натра, мг

3 – количество испытуемой питательной среды, взятое на анализ, мл

Допускается расхождение между результатами параллельных определений не более $\pm 3\%$.

Рассчитать среднее арифметическое результатов, полученных при проведении двух параллельных определений аминного азота в питательной среде (полуфабрикаты среды), по формуле (9):

$$X_{\text{ср. мг}\%} = (X_1 + X_2)/2, \quad (9)$$

Среднее арифметическое значение, полученное из двух параллельных исследований содержания аминного азота в питательной среде, является окончательным результатом [65].

2.2.12. Определение концентрации молочной кислоты потенциометрическим титрованием

Определение концентрации молочной кислоты проводят потенциометрическим титрованием анализируемой пробы 1 % раствором NaOH в изопропанол.

В стакан емкостью 50 мл вносят 25 мл изопропанола и 1 мл анализируемой пробы. Погружают в полученную смесь электроды рН – метра.

При постоянном перемешивании титруют смесь 1 % раствором едкого натра. Регистрируют потенциал индикаторного электрода относительно электрода сравнения в зависимости от количества прибавленного титранта, а титрование продолжают после достижения предполагаемой точки эквивалентности. Конечной точке титрования отвечает максимальное значение изменения потенциала (ΔE) к приращению объема прибавленного титранта (ΔV).

Конечную точку титрования находят графически методом касательных по кривой зависимости потенциала индикаторного электрода от количества прибавленного титранта, или расчетным методом по максимальному значению $\Delta E/\Delta V$, или по точке разрыва (смене знака) второй производной $\Delta(\Delta E/\Delta V)$.

Выход молочной кислоты и степень потребления углеводов вычисляют по формулам (10, 11):

$$W_{\text{МК}}(\%) = \frac{\text{Молочная кислота (г)}}{\text{потребленные углеводы (г)}} \cdot 100\%, \quad (10)$$

$$\text{Степень потребления углеводов (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Остаточное содержание углеводов}}{\text{Начальное содержание углеводов}} \right) \cdot 100\%, \quad (11)$$

2.2.13. Определение протеолитической активности

Данный метод определения протеолитической активности является модификацией метода Kunitz M. et al. [143].

В качестве субстрата используют 2% раствор казеина по Гаммерстену в 1/15 М растворе К-На фосфатного буфера, рН 8,0 (25°C). Казеин перемешивают до полного растворения при температуре 25 °С и хранят не более 10 дней в темноте при температуре 5÷7°C. Непосредственно перед анализом доводят рН раствора казеина до необходимого значения концентрированным раствором гидроксида натрия.

К заданному объему раствора фермента приливают раствор 1/15М фосфатного буфера до объема 2,5 мл и помещают в жидкостной термостат на 10 минут при температуре 37 °С. После этого быстро добавляют 2-х % раствор казеина по Гаммерстену объемом 2,5 мл. Реакцию останавливают через 30 минут, приливая 5 мл 10% раствора ТХУ. Через 15 мин раствор фильтруют через среднефильтрующий бумажный фильтр (синяя полоса). Оптическую плотность фильтрата определяют на спектрофотометре при 280 нм.

В качестве контрольных образцов используют пробы, в которых была изменена последовательность внесения реактивов: к раствору фермента сначала добавляли раствор фосфатного буфера (в соотношении аналогичном опытным пробам), затем 5 мл раствора ТХУ, смесь выдерживали при 37 °С после чего добавляли 2,5 мл раствора казеина.

Спектрофотометр настраивают по раствору, состоящему из равных частей фосфатного буфера и 10% раствора ТХУ.

Протеолитическую активность (ПЕ/мг) рассчитывают по формуле (12):

$$ПА = \frac{(D_{оп} - D_{к}) \cdot \Sigma V \cdot V_{к}}{g \cdot K_{т} \cdot V_{ф} \cdot t}, \quad (12)$$

где $D_{оп}$ – оптическая плотность опытной пробы;

$D_{к}$ – оптическая плотность контрольной пробы;

$\Sigma V = (V_{ф} + V_{фб} + V_{каз} + V_{тху})$ – сумма объемов растворов: фермента, фосфатного буфера, казеина, ТХУ ($\Sigma V = 10$ мл);

$V_{к}$ - объем колбы, в которой растворяли навеску фермента массой g мг;

$K_{т}$ - тирозиновый коэффициент = 1,20 опт. Ед_{280нм} · мл/мкМ тирозина;

t - время инкубации в минутах.

За единицу протеолитической активности (ПЕ) принимают количество фермента, которое за 1 мин при 37 °С катализирует переход в неосаждаемое 5% ТХУ состояние такого количества казеина, которое содержит 1 мкМоль тирозина.

2.3. Микробиологические методы

2.3.1. Питательные среды

Для восстановления лиофилизированных культур лактобацилл и получения инокулята использовали питательную среду MRS следующего состава (г/л):

–	$K_2HPO_4 \times 3H_2O$	2,0
–	$CH_3COONa \times 3H_2O$	5,0
–	Цитрат аммония	0,2
–	$MgSO_4 \times 7H_2O$	0,2
–	$MnSO_4 \times 4H_2O$	0,05
–	Пептон	20,0
–	Дрожжевой экстракт	5,0
–	Глюкоза	20,0
–	Вода дистиллированная	до 1 л
–	рН среды	7,0

Для приготовления агаризованной среды MRS после доведения рН в нее вносили агар из расчета 20 г/л.

Для культивирования культур лактобацилл в условиях эксперимента использовали гидролизаты возобновляемого крахмалосодержащего зернового сырья, полученные обработкой протеолитическими и амилолитическими ферментными препаратами.

Для восстановления лиофилизированных культур бифидобактерий и получения инокулята использовали питательную среду MRS-C следующего состава (г/л):

–	$K_2HPO_4 \times 3H_2O$	2,0
–	$CH_3COONa \times 3H_2O$	5,0
–	Цитрат аммония	0,2
–	$MgSO_4 \times 7H_2O$	0,2
–	$MnSO_4 \times 4H_2O$	0,05
–	Пептон	20,0
–	Дрожжевой экстракт	5,0
–	Глюкоза	20,0
–	L – цистеин	0,5
–	Аскорбиновая кислота	0,5
–	Вода дистиллированная	до 1 л
–	pH среды	7,0

Для определения количества жизнеспособных клеток использовали «Бифидум-среду» состава (г/л):

–	Панкреатический гидролизат казеина	30,0
–	$CH_3COONa \times 3H_2O$	5,0
–	$NaCl$	2,5
–	$MgSO_4 \times 7H_2O$	0,5
–	Дрожжевой экстракт	5,0
–	Лактоза	2,5
–	L – цистеин	0,5
–	Аскорбиновая кислота	0,5
–	Глюкоза	7,5
–	Агар	1,6
–	Вода дистиллированная	до 1 л

- рН среды 7,0

Для культивирования культур бифидобактерий в условиях эксперимента использовали питательные среды, приготовленные на основе фильтрата гидролизатов крахмалосодержащего зернового сырья, полученных обработкой протеолитическими ферментными препаратами, с добавлением компонентов среды MRS, MRS - C или Бифидум без внесения белковых компонентов животного происхождения.

Для восстановления лиофилизированных культур дрожжей и получения инокулята использовали дрожжевую питательную среду следующего состава (г/л):

- аммоний сернокислый 3,5
- аммоний фосфорнокислый однозамещенный 0,8
- калий хлористый 0,5
- магний сернокислый 7-водный 0,25
- железо (II) сернокислое 7-водное 0,15
- цинк сернокислый 7-водный 0,015
- марганец (II) сернокислый 5-водный 0,015

2.3.2. Культивирование микроорганизмов

Лактобактерии культивировали в глубинных условиях в среде MRS и в глубинных гетерофазных условиях в гидролизатах зернового сырья в колбах Эрленмейера объемом 100 и 250 см³ (объем среды 50 и 100 см³) при температуре 37 °С без перемешивания и поддержания рН в течение 24 часов в микроаэрофильных условиях (без ограничения доступа кислорода). Бифидобактерии – в пробирках 15 см³ и во флаконах объемом 250 см³ (объем среды 10 см³ и 50 см³) в анаэробных условиях при температуре 37 °С без перемешивания и поддержания рН в течение 24 часов. Дрожжи – в аэробных условиях в колбах Эрленмейера объемом 250 см³ (объем среды 100 см³) в

течение 48 часов при температуре 25 – 30 °С при постоянном встряхивании с интенсивностью 180-200 об/мин.

Культивирование микроорганизмов проводили в лабораторном ферментере Minifors (INFORS HT, Швейцария) объемом 5 л. Ферментер заполняли 3 л питательной среды и стерилизовали паром в автоклаве при температуре 112°С 30 мин. Процесс культивирования лактобактерий проводили при температуре 37 °С и перемешивании с частотой от 250 до 450 об/мин без аэрации. Процесс культивирования бифидобактерий проводили при температуре 37 °С и перемешивании с частотой от 250 до 450 об/мин в атмосфере аргона. В ходе культивирования поддерживали рН в ферментере в области 6,5–6,9 для бактерий и 5,0-5,2 для дрожжей. Процесс культивирования дрожжей проводили при температуре 30 °С и перемешивании с частотой об/мин в аэробных условиях. Для подтитровки использовали 25 % растворы аммиака или 10 % раствор гидроксида натрия.

2.3.3. Определение количества жизнеспособных клеток лактобактерий методом Коха

Метод Коха позволяет вести учет численности жизнеспособных клеток различных видов бактерий. При этом принимается, что каждая колония образуется при размножении одной клетки, а результаты выражают в так называемых колониеобразующих единицах (КОЕ) [144].

При анализе берут стерильно 0,1 мл суспензии и помещают в 0,9 мл стерильной дистиллированной воды или физиологического раствора, затем последовательно автоматической пипеткой переносят по 0,1 мл в ряд пробирок типа Эппендорф с 0,9 мл стерильной дистиллированной воды.

Степень разведения определяется предполагаемым количеством микроорганизмов в образце, и соответственно число разведений тем больше, чем больше микроорганизмов в исходном субстрате.

Из предварительно тщательно перемешанных разведений производят высев на поверхность стерильной агаризованной питательной среды в чашки Петри. Посев производят автоматической пипеткой по 0,005 мл, начиная с наибольшего разведения, при этом может применяться для посева один стерильный наконечник (носик) для пипетки.

Засеянные среды в чашках Петри помещают в термостат при определенной благоприятной для развития учитываемых микроорганизмов температуре.

Колонии микроорганизмов подсчитывают через 2 суток инкубации. Подсчет проводят, не открывая чашек Петри, отмечая каждую просчитанную колонию для удобства точкой на наружной стороне дна чашки.

Результаты параллельных высевок из одного и того же разведения суммируют и определяют среднее число колоний, выросших при высеве из разведения на одной чашке.

Количество клеток в 1 мл исследуемого субстрата вычисляют по формуле (13):

$$N = \frac{(a \pm 2\sigma_a) \cdot K}{V}, \quad (13)$$

где N – количество микроорганизмов в 1 мл суспензии;

K – разведение, из которого проведен посев;

a – среднее количество колоний на чашке Петри при разведении K ;

V – объем суспензии, взятый для посева, мл;

2 – критерий при 9% уровне значимости;

σ_a – среднее квадратичное отклонение, равное $\pm \frac{\sqrt{\sum a}}{n}$;

n – число повторностей.

2.3.4. Определение количества жизнеспособных клеток бифидобактерий

Метод предельных разведений с последующим высевом в полужидкие питательные среды используется для учета численности жизнеспособных

клеток анаэробных микроорганизмов без использования специального оборудования [145]. Как и в методе Коха принимают, что каждая колония образуется при размножении одной клетки. Результаты количественного определения микроорганизмов выражают в условных, так называемых колониобразующих единицах (КОЕ).

Из разведений препарата $10^{-6}, 10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9}, 10^{-10}$, степень которого зависит от количества КОЕ в испытуемом образце, высевают по 1 мл микробной суспензии в пробирки, содержащие по 9 мл полужидкой питательной среды. Отмечают, из какого именно разведения сделан посев. Разведение 10^{-6} препарата в 0,9 % растворе хлорида натрия соответствует разведению 10^{-6} в питательной полужидкой среде.

Посевы инкубируют при температуре $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ в зависимости от вида микроорганизма. Инкубация проводится в течение 1–6 суток, в зависимости от скорости роста колоний. По окончании инкубации отмечают разведения, в которых имеется рост типичных колоний для данного вида микроорганизмов, в этих разведениях производится подсчет колоний.

2.3.5. Определение выживаемости штаммов молочнокислых бактерий в условиях воздействия желчи

Для определения чувствительности различных штаммов лактобактерий к желчи был использован метод Klaenhammer и Kleeman (1981) [146]. Конечные концентрации 0,6%, 1,2% и 1,8% (масс. / объем) добавляли к 24 ч культуральным жидкостям лактобактерий и образцы инкубировали в течение 6 часов. Аликвоты объемом 100 мкл отбирали каждые 3 ч и определяли количество жизнеспособных клеток как описано выше.

2.3.6. Определение выживаемости штаммов молочнокислых бактерий в условиях имитации кислотности желудка

Для приготовления искусственного желудочного сока 2,0 г NaCl растворяли в 7,0 мл 1,0 н. HCl и смесь доводили до 1 л дистиллированной водой (рН 1,2). В колбы с 20 мл искусственного желудочного сока добавляли по 5 мл 24 ч культуральных жидкостей лактобактерий. Инкубацию проводили при 37 °С. Жизнеспособность клеток исследовали каждые 30 мин [146].

2.3.7. Определение выживаемости штаммов лакто- и бифидобактерий в условиях длительного хранения при 4 °С

Выживаемость клеток лакто- и бифидобактерий, как в суспензиях, так и в лиофилизированном продукте, контролировали в течение 5-6 недель с интервалом в 1 неделю и в течение 5,5 мес, соответственно. Скорость гибели определяли по графику зависимости $\log(N/N_0)$ от времени в неделях, где N_0 – начальное содержание клеток КОЕ/мл или КОЕ/г, N – содержание клеток КОЕ/мл или КОЕ/г в процессе хранения [146].

2.3.8. Определение количества клеток дрожжей путем прямого подсчета в счетных камерах

Метод прямого подсчета проводится в камере Горяева и используется для дрожжей, грибов и одноклеточных водорослей, а также всех относительно крупных микроорганизмов [144].

Камера представляет собой толстое предметное стекло, в центральной части которого содержится выемка с нанесенной сеткой. Углубление с сеткой покрывают специальным покровным стеклом и притирают к сторонам камеры. Камеру заполняют исследуемой суспензией микроорганизмов с помощью пипетки или капилляра и помещают на столик микроскопа. Подсчитывают число клеток в 10 больших или 20 малых квадратах сетки, следуя по диагонали. Учитывают клетки как в квадрате сетки, так и пересекающие верхнюю и

правую стороны квадрата. Подсчет повторяют 3-5 раз, каждый раз заново заполняя камеру.

Количество клеток в 1 мл исследуемой суспензии вычисляют по формуле (14):

$$M = \frac{a \cdot 10^3}{hS} \cdot n, \quad (14)$$

где M – количество клеток в 1 мл суспензии;

a – среднее количество клеток в квадрате сетки;

h – высота камеры, мм;

S – площадь квадрата сетки, мм²;

10^3 – коэффициент перевода [см³] в [мм³];

n – коэффициент разведения исследуемой суспензии.

2.3.9. Определение наличия живых клеток продуцента

Навеску продукта массой 10 г вносят в стерильную коническую колбу вместимостью 250 мл и заливают стерильным физиологическим раствором или водопроводной водой объемом 90 мл, тщательно перемешивают и инкубируют колбу при температуре 30-32 °С в течение 18-22 ч [139]. 1 мл суспензии из колбы вносят на стерильную чашку Петри и заливают расплавленным и охлажденным до температуры 40-45 °С сусло-агаром, осторожно перемешивая. После застывания агара чашки Петри переворачивают крышками вниз и инкубируют в термостате при температуре 36-38 °С в течение 48 ч.

Оценку результатов проводят через 48 ч. Если нет роста колоний продуцента, то дается заключение об отсутствии живых клеток.

2.3.10. Определение острой токсичности БКД с применением тест-культуры инфузорий *Tetrachymena pyriformis*

Определение острой токсичности проводят с применением в качестве тест-культуры инфузорий *Tetrachymena pyriformis* [139].

Готовят ряд навесок анализируемого продукта с массами (m), которые по содержанию соответствуют заданным количествам азота 3, 6, 10, 15 и 20 мг, вычисленным по формуле (15):

$$m = (A \times 100)/N, \quad (15)$$

где A – заданные количества азота в навеске продукта, мг;

100 – коэффициент пересчета содержания азота в 100 г продукта;

N – массовая доля азота в продукте, %.

Полученные навески переносят в конические колбы с углеводносолевой дрожжевой средой (1,5 г D-глюкозы, 0,1 г морской соли, 0,1 г дрожжевого экстракта на 100 мл дистиллированной воды), проверяют рН и затем засевают 0,2 мл инокулята 3-4-суточной культуры инфузорий. Инкубируют в термостате при температуре 24-26 °С в течение 72 ч. Для лучшей аэрации колбы встряхивают 2-3 раза в сутки. В качестве контроля за состоянием культуры используют казеин в заданных концентрациях азота: 3, 6, 10, 15 и 20 мг.

Через 72 ч в исследуемых пробах просматривают культуру инфузорий в капле на предметном стекле (каплю берут пастеровской пипеткой или стеклянной палочкой) под микроскопом в 5-6 полях зрения.

В случае гибели инфузорий в течение учетного времени хотя бы в одной из концентраций или наличия единичных (до пяти клеток) в поле зрения при одновременном снижении активности тест-культуры в двух последних концентрациях продукт считается токсичным.

2.3.11. Определение острой и субхронической токсичности, кожно-резорбтивного и аллергенного действия белковой кормовой добавки

Препарат вводили в желудок белых крыс в диапазоне доз 1,5-7,0 г/кг [147-150]. Исходный вес животных колебался в пределах 25-300 г. В опыт брали клинически здоровых животных, которых предварительно выдерживали на 15-дневном карантине. Статистические группы состояли из 6 животных. Одна группа служила контролем. Во время опыта поддерживали условия содержания и кормления в соответствии с рационом для крыс. Поение не ограничивали. При проведении опыта придерживались этических норм обращения с животными.

В течение 2-х недель после введения за животными вели наблюдения, отмечая сроки выздоровления или гибели. Учитывали общее состояние животных, аппетита, дыхания, сохранение двигательных функций, состояние шерстного покрова и реакцию на внешние раздражители.

2.4. Методы исследования

2.4.1. Методика проведения ферментативного гидролиза

Перед проведением ферментативного гидролиза муку зерновых культур суспендировали в дистиллированной воде, помещали в термостатируемую водяную баню с перемешиванием магнитной мешалкой и добавляли ферментный препарат. Для сред не предназначенных для осахаривания, значение гидромодуля подбирали исходя из степени клейстеризации крахмала, для остальных случаев значение гидромодуля варьировалось от 5 до 40.

При выборе дозировки ферментных препаратов исходили из рекомендаций производителя и экономической целесообразности их использования. Дозировку ферментных препаратов варьировали от 0,05 до 4 % как от массы субстрата, так и содержания, подвергаемых гидролизу, веществ.

Продолжительность гидролиза не превышала 150 мин при проведении гидролиза в термостате и 240 мин – в биореакторе. Температура гидролиза устанавливалась индивидуально для каждого ферментного препарата в соответствии с паспортными данными производителя, как и начальное значение pH в гидролизуемой суспензии. Для доведения pH среды до требуемого значения использовали 10% растворы NaOH и H₂SO₄.

2.4.2. Методика определения концентрации молочной, уксусной и пропионовой кислоты методом ВЭЖХ

Определение концентрации молочной, уксусной и пропионовой кислоты в анализируемых образцах проводили на жидкостном хроматографе марки Agilent серии 1220 Infinity LC, оснащенный колонкой Zorbax [151].

Пробоподготовку осуществляли центрифугированием 1 мл культуральной жидкости при 14000 об/мин в течение 5 мин. Надосадочную жидкость фильтровали и помещали в пробирки типа Эппендорф.

Хроматографию проводили при температуре 25° С изократическим элюированием фосфатным буфером (10 mM, pH 3,0) и ацетонитрилом в объемном соотношении 95:5 при расходе элюента 1 мл/мин. Вводимый объем пробы 50 мкл. Длина волны 210 нм.

Для построения калибровочного графика готовили стандартные растворы молочной, уксусной или пропионовой кислоты путем последовательных разведений стандартного раствора подвижной фазой. Подвижную фазу готовили путем растворения 1,36 г KH_2PO_4 в 980 мл деионизированной воды. pH 3,0 доводили добавлением к раствору H_3PO_4 . Объем доводили до 1000 мл деионизированной водой, чтобы приготовить 10 mM раствор. Раствор элюента получали смешением 2,5 мл ацетонитрила и 47,5 мл 10 mM фосфатного буфера (pH 3,0).

2.4.3. Методика проведения лиофильного высушивания

Культуральную жидкость, содержащую клетки бифидобактерий, центрифугировали при 6000 об/мин, ресуспендировали со стерильным 0.9 % -ным раствором NaCl в буфере до $\frac{1}{2}$ исходного объема и смешивали со стерильными защитными средами (обезжиренное молоко или гидролизат пшеничной муки, полученный при обработке панкреатином) в соотношении 1:1 для лиофильной сушки.

Сушка проводилась в аппарате CoolSafe 110 (ScanLaf, Дания). Режим сушки: предварительная заморозка при -20 °С – 12 часов, заморозка в камере – 5 часов, включение вакуума, нагрев до +10 °С – 24 часа (градиент), нагрев до +25 °С – 12 часов (градиент), удаление связанной воды – 12 часов.

Полученные лиофилизаты хранили при температуре от +3 до +6 °С.

2.4.4. Методика проведения органолептического анализа

Для оценки органолептической ценности были выбраны 12 параметров, которые наиболее полно описывали потребительские свойства продукта, включающие в себя внешний вид, запах и вкус. Показатели оценивали 12 человек по шкале от 0 (не нравится/слабо выражено) до 10 (нравится/сильно выражено).

2.5. Методы математической обработки результатов

2.5.1. Полный факторный эксперимент и его обработка

При планировании по схеме полного факторного эксперимента (ПФЭ) составляют все возможные комбинации факторов для выбранного числа уровней [152]. Количество опытов N при ПФЭ определяется по формуле (16):

$$N = n^k, \quad (16)$$

где n – количество уровней; k – число факторов.

Варьируемые факторы нормируют при помощи линейного преобразования (17):

$$x_j = \frac{z_j + z_j^0}{\Delta z_j}, \quad (17)$$

где x_j – нормированное значение фактора; z_j – значение фактора в натуральном масштабе; z_j^0 – координаты центра плана; Δz_j – интервал варьирования фактора по оси j .

Для любого фактора z_j (18, 19):

$$z_j^0 = \frac{z_j^{\max} + z_j^{\min}}{2}, \quad j = 1, 2, \dots, k \quad (18)$$

$$\Delta z_j = \frac{z_j^{\max} - z_j^{\min}}{2} \quad (19)$$

Все возможные комбинации факторов на всех выбранных уровнях образуют матрицу планирования. Матрица планирования для ПФЭ обладает следующими свойствами (20-22):

$$\sum_{i=1}^N x_{ui} x_{uj} = 0; \quad u \neq j; \quad u, j = 1, 2, \dots, k \quad (20)$$

$$\sum_{i=1}^N x_{ji} = 0; \quad j = 1, 2, \dots, k; \quad i \neq 0 \quad (21)$$

$$\sum_{i=1}^N x_{ji}^2 = N; \quad j = 0, 1, \dots, k \quad (22)$$

Уравнение регрессии (23):

$$\hat{y} = b_0 + b_1 x_1 + b_2 x_2 + \dots + b_k x_k + b_{12} x_1 x_2 + \dots + b_{123} x_1 x_2 x_3 + \dots \quad (23)$$

Коэффициенты уравнения регрессии определяют по формулам (24-26):

$$b_j = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_{ji} y_i \quad (24)$$

$$b_{ju} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x_j x_u)_i y_i \quad (25)$$

$$b_{jug} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x_j x_u x_g)_i y_i \quad (26)$$

Дисперсию воспроизводимости, значимость коэффициентов по критерию Стьюдента и адекватность регрессионного уравнения по критерию Фишера определяют по формулам (27, 28):

$$t_j = \frac{|b_j|}{s_{b_j}} > t_{1-p}(f) \quad (27)$$

$$F = \frac{s_{\text{ост}}^2}{s_{\text{воспр}}^2}, \quad (28)$$

$$\text{где } s_{\text{ост}}^2 = \frac{\sum_{i=1}^N (y_i - \hat{y}_i)^2}{N-l}.$$

Все коэффициенты определяются с одинаковой точностью (29):

$$s_{b_j} = \frac{s_{\text{воспр}}}{\sqrt{N}} \quad (29)$$

2.5.2. Ротатабельный центральный композиционный план и его обработка

При соблюдении некоторых условий центральные композиционные планы приобретают свойства ротатабельности [152]. Матрица РЦКП не ортогональна, коэффициенты при этом коррелированы между собой и свободным членом.

Коэффициенты уравнения множественной регрессии определяют методом наименьших квадратов и оценивают с разными дисперсиями (30-37):

$$b_0 = a_1 \sum_{i=1}^N y_i - a_2 \sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^N x_{ji}^2 y_i \quad (30)$$

$$b_j = a_3 \sum_{i=1}^N y_{ji} y_i, j = 1, 2, \dots, k \quad (31)$$

$$b_{uj} = a_4 \sum_{i=1}^N x_{ui} x_{ji} y_i, u \neq j, u, j = 1, 2, \dots, k \quad (32)$$

$$b_{jj} = a_5 \sum_{i=1}^N x_{ji}^2 y_i + a_6 \sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^N x_{ji}^2 y_i - a_7 \sum_{i=1}^N y_i \quad (33)$$

$$s_{b_0}^2 = a_1 s_y^2 \quad (34)$$

$$s_{b_j}^2 = a_3 s_y^2 \quad (35)$$

$$s_{b_{uj}}^2 = a_4 s_y^2 \quad (36)$$

$$s_{b_{jj}}^2 = (a_5 + a_6) s_y^2 \quad (37)$$

Значимость коэффициентов b определяют по критерию Стьюдента, а адекватность регрессионного уравнения – по критерию Фишера. При расчете критерия Фишера нельзя принять, что $s_{\text{ад}}^2 \approx s_{\text{ост}}^2$. Дисперсию адекватности рассчитывают по формуле (38):

$$S_{ад}^2 = \frac{S_{ост}^2 f_{ост} - S_{воспр}^2 f_{воспр}}{f_{ост} - f_{воспр}} \quad (38)$$

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Выбор типа зернового сырья, ферментных препаратов для его гидролиза и исследование роста лактобактерий

3.1.1. Выбор типа зернового сырья для ферментации лактобактерий

На первом этапе для оценки ростовых свойств питательных сред, содержащих в качестве единственного источника органических и минеральных веществ зерновое сырье, было проведено глубинное гетерофазное культивирование тестового штамма *L. paracasei* на суспензиях муки, необработанных ферментными препаратами. Подбор гидромодуля осуществляли исходя из степени клейстеризации крахмала в суспензии после термической обработки. Для пшеничной и ржаной муки был выбран гидромодуль 40, для гречневой муки – 20, для гороховой – 10. Культивирование проводили в течение 24 ч (таблица 3.1.1.1).

Таблица 3.1.1.1.

Ферментация *L. paracasei* на необработанных суспензиях различных сельскохозяйственных культур

Параметры	Пшеничная мука	Ржаная мука	Гречневая мука	Гороховая мука
Начальное содержание общих углеводов, г/л	12,9±0,4	11,5±0,3	3,4±0,1	13,1±0,4
log (КОЕ/мл)	6,3±0,13	7,8±0,16	6,2±0,19	-
Конечный pH	3,87	4,23	4,14	5,14

Анализ результатов ферментации лактобактерий показал, что ростовые свойства питательных сред, содержащих муку различных зерновых культур, не полностью удовлетворяли потребностям микроорганизмов, а конечная концентрация бактерий не превышала 10^7 КОЕ/мл. В тоже время содержание лактобактерий, как и снижение pH, были наибольшими для питательной среды с ржаной мукой. Из литературы известно, что белковые фракции зерна ржи в основном представлены водорастворимым альбумином и проламином [12],

которые, вероятно, являлись более доступным субстратом для питания МКБ, чем белковые фракции пшеничной и гороховой муки. Также ржаная мука, по сравнению с мукой остальных культур, характеризуется наибольшим содержанием в составе витаминов группы В, что также, вероятно, способствовало росту микроорганизмов [12].

В большинстве исследований по культивированию пробиотических бактерий зерновое сырье рассматривается только как источник углеводов [89, 90, 109, 110]. Известно, что наличие в питательной среде белков различной степени полимеризации усиливает рост молочнокислых бактерий [45, 46]. Поэтому на втором этапе для повышения биодоступности протеина зернового крахмалосодержащего сырья и создания благоприятного состава питательной среды суспензии пшеничной, ржаной, гречневой и гороховой муки подвергали ферментативному гидролизу протеолитическим препаратом Protex 40E как с дополнительной обработкой амилазами Duozyme, так и без. Культивирование *L. paracasei* проводили в тех же условиях (таблица 3.1.1.2.).

Таблица 3.1.1.2.

Ферментация *L. paracasei* на гидролизатах муки различных сельскохозяйственных культур

Ферментные препараты	log (КОЕ/мл) лактобацилл/ конечный pH			
	Гороховая мука	Ржаная мука	Гречневая мука	Пшеничная мука
Protex 40E	8,4±0,17/4,85	9,5±0,09/3,73	8,4±0,17/4,40	9,4±0,19/4,07
Duozyme + Protex 40E	9,0±0,11/4,21	9,2±0,14/3,36	8,9±0,18/3,36	8,9±0,21/3,40

В результате было показано, что предварительная обработка суспензий муки зерновых протеолитическим ферментным препаратом оказывала положительное влияние на рост микроорганизмов, повышая их содержание, по сравнению с необработанными суспензиями, на порядок в каждом случае. Также после ферментативной обработки протеина наблюдалось увеличение в

среде начальной концентрации общих углеводов, что предположительно связано с гидролизом запасных белков, прочно связанных с поверхностью крахмальных зерен и частичным высвобождением олигосахаридов в среду (на 30-40%). Ферментативная обработка амилазами позволила увеличить в питательной среде содержание молочной кислоты, о чем можно судить по конечному рН, однако на титр лактобактерий она большого влияния не оказала.

Исходя из полученных результатов, наилучшими из рассмотренных субстратов для культивирования лактобактерий являлись ржаная и пшеничная мука. Окончательный выбор зерновой культуры для дальнейших исследований осуществили исходя из следующих соображений. С одной стороны, цена за 1 тонну зерна пшеницы по данным на 2018 год составляла около 12 тыс. руб., что в 1,3 раза дороже 1 тонны ржи. С другой стороны, выход РВ со 100 г пшеничной муки выше, чем со 100 г ржаной, в 1,2 раза. Также, полученный после осахаривания ржаной муки гидролизат, является, при визуальном определении, гораздо более вязким, нежели гидролизат пшеницы, предположительно, из-за высокого содержания в зерне ржи гумми-веществ и слизей. Выбранный для предварительных исследований гидромодуль по этой же причине является предельно возможным для ржаной муки, в то время как для пшеничной его можно понизить, повысив концентрацию ростовых факторов в среде. Данные особенности будут усложнять технологические операции с гидролизатом ржаной муки. К тому же именно пшеница занимает существенную долю посевных площадей в структуре зернового клина России, а ее производство заметно возрастает с каждым годом.

Таким образом, дальнейшие исследования проводили с использованием в качестве основного компонента питательной среды для культивирования лактобактерий пшеничной муки, суспензии которой предварительно подвергали обработке протеолитическими и амилолитическими ферментными препаратами.

3.1.2. Выбор протеолитического ферментного препарата и его дозировки

В предварительных исследованиях по подбору протеолитического ферментного препарата и его оптимальной концентрации для культивирования лактобактерий сравнили конечное содержание бактерий после 48 ч роста на гидролизатах, полученных при обработке различных типов пшеничной муки в диапазоне концентраций ферментов 0,05 – 4%. В качестве ферментных препаратов использовали Протосубтилин Г_{3х}, Protex 40Е и Olexa. При этом гидролиз с Протосубтилином и Protex 40Е из-за различия в рекомендованных условиях проводили последовательно с гидролизом амилазами, с Olexa – совместно с амилолитическим препаратом. Результаты культивирования представлены в таблицах 3.1.2.1., 3.1.2.2. и 3.1.2.3.

Таблица 3.1.2.1.

Культивирование лактобактерий на гидролизатах пшеничной муки, полученных при обработке ФП Protex 40Е

Параметры	Концентрация Protex 40Е, % от содержания протеина									
	Обойная пшеничная мука					Пшеничная мука в. с.				
	0,05	0,1	0,5	1	2	0,05	0,1	0,3	0,5	1
Начальное содержание РВ, г/л	61,2	61,2	61,2	62,5	62,5	59,9	59,6	59,9	59,9	59,9
Начальная концентрация белка по Лоури, г/л	4,1	5,5	12,1	12,1	12,2	16,9	19,4	21,4	21,5	22,1
После 48 ч ферментации <i>L. paracasei</i>										
рН	3,22	3,19	3,16	3,20	3,19	3,04	3,15	3,29	3,34	3,39
Log (КОЕ/мл)	8,6	8,7	8,9	8,8	8,8	8,1	8,0	8,2	8,5	8,3
Содержание РВ, г/л	42,9	42,9	40,5	42,9	42,9	54,0	54,0	54,0	54,0	54,0

Анализ результатов гидролиза субстрата ФП Protex 40Е показал, что для достижения максимальной экстракции белков обойной пшеничной муки в раствор необходима дозировка ферментного препарата от 0,5 % и выше (% от

содержания белка), достигаемая концентрация белковых веществ при этом 12,3 г/л. Для пшеничной муки высшего сорта – от 0,3 % и выше с конечной концентрацией белковых веществ 21, 4 г/л. Дальнейшее повышение дозировки не оказывало сильного влияния на экстракцию белков пшеничной муки в раствор. Содержание аминного азота во всех случаях не превышало 60 мг%.

Спустя 48 ч культивирования лактобактерий на гидролизатах, полученных обработкой ферментным препаратом Protex 40E, установлено, что конечное содержание лактобацилл на гидролизатах обойной пшеничной муки было выше, чем на гидролизатах пшеничной муки высшего сорта. Значения pH во всех случаях находились в диапазоне от 3,04 до 3,39.

Для достижения концентрации белковых веществ 12,3 г/л в гидролизате из обойной пшеничной муки потребовалась дозировка Протосубтилина Г_{3х} – 2% и выше от массы субстрата, из пшеничной муки высшего сорта – 3 % и выше. Содержание жизнеспособных клеток лактобактерий, как и в случае с Protex 40 E, также было выше на гидролизате обойной пшеничной муки и составляло 8,6-8,7 log (КОЕ/мл).

Таблица 3.1.2.2.

Культивирование лактобактерий на гидролизатах пшеничной муки, полученных при обработке ФП Протосубтилин Г_{3х}

Параметры	Концентрация Протосубтилина Г _{3х} , % от содержания протеина									
	Обойная пшеничная мука					Пшеничная мука в. с.				
	0,5	1	2	3	4	0,5	1	2	3	4
Начальное содержание РВ, г/л	59,3	59,3	59,3	57,9	63,8	58,5	58,3	58,5	58,9	61,0
Начальная концентрация белка по Лоури, г/л	10,2	10,0	12,3	12,3	12,4	8,8	8,9	10,5	12,2	14,9

Продолжение таблицы 3.1.2.2.

После 48 ч ферментации <i>L. paracasei</i>										
рН	3,37	3,28	3,25	3,26	3,27	3,19	3,21	3,15	3,16	3,20
Log (КОЕ/мл)	8,6	8,7	8,7	8,7	8,6	8,1	8,2	8,2	8,3	8,3
Содержание РВ, г/л	50,0	47,4	48,2	48,2	48,2	51,2	49,3	49,8	50,1	49,8

При обработке субстрата ФП Olexa повышался выход редуцирующих веществ для обойной пшеничной муки до 65,2 г/л, для пшеничной муки высшего сорта до 71,6 г/л. Концентрация белковых веществ в растворе не превышала 10,5 г/л в случае с обойной пшеничной мукой без влияния повышения дозировки ферментного препарата, в случае с пшеничной мукой высшего сорта концентрация белковых веществ возрастала до 24,8 г/л при дозировке 0,5 % от содержания протеина в муке.

Таблица 3.1.2.3.

Культивирование лактобактерий на гидролизатах пшеничной муки,
полученных при обработке ФП Olexa

Параметры	Концентрация Olexa, % от содержания протеина							
	Обойная пшеничная мука				Пшеничная мука в. с.			
	0,15	0,2	0,3	0,5	0,15	0,2	0,3	0,5
Начальное содержание РВ, г/л	65,2	65,2	65,2	65,2	71,6	71,6	71,6	71,6
Начальная концентрация белка по Лоури, г/л	10,5	10,5	10,5	10,4	17,2	19,8	23,9	24,8
После 48 ч ферментации <i>L. paracasei</i>								
рН	3,53	3,47	3,45	3,48	3,15	3,15	3,17	3,19
Log (КОЕ/мл)	8,41	8,49	8,66	8,45	7,85	7,68	7,60	8,08
Концентрация РВ, г/л	55,3	55,3	55,3	55,3	67,4	67,4	67,4	68,2

Анализ результатов культивирования показал, что содержание лактобактерий спустя 48 ч на гидролизате обойной пшеничной муки было выше, чем на гидролизате пшеничной муки высшего сорта, 8,4 – 8,7 log (КОЕ/мл) и 7,6 – 8,1 log (КОЕ/мл), соответственно.

Таким образом, для всех рассмотренных ферментных препаратов и их дозировок лучшие варианты были получены при использовании обойной пшеничной муки. Необходимо отметить, что существенных отличий по выходу белка не было установлено, как и в показателях роста *L. paracasei*, конечное содержание которых также варьировалось в недостаточно широких пределах, чтобы достоверно подтвердить преимущества одного из рассмотренных ферментных препаратов. Тем не менее, подобранные концентрации ФП Протосубтилиин Г_{3х} были больше, чем для ФП Protex 40Е и ФП Олева.

Предварительная технико-экономическая оценка с учетом расхода ферментных препаратов на 1 кг муки показала, что стоимость на обработку 1 кг муки Протосубтилином составляет 6,4 руб, а ФП Protex 40Е и Олева около 1,5 руб. Таким образом, использование этих ферментных препаратов наиболее целесообразно.

На следующем этапе для оценки ростовых свойств полученных гидролизатов обойной пшеничной муки, полученных при обработке Protex 40Е или Олева в подобранных дозировках 0.5 % и 0.3 % от содержания протеина в муке, соответственно, провели культивирование нескольких штаммов молочнокислых бактерий по отдельности *L. rhamnosus*, *L. salivarius*, *L. helveticus* и *L. paracasei* (таблица 3.1.2.4.). Установлено, что наименьшее количество жизнеспособных клеток лактобактерий наблюдалось у штамма *L. salivarius*. Количества клеток не превышали 4.0×10^7 КОЕ/мл как на суспензиях, обработанных ФП Protex 40 Е, так и ФП Олева. Содержание клеток *L. helveticus* на гидролизате, полученном при помощи ФП Protex 40 Е, было на порядок выше, чем на гидролизате, полученном при помощи ФП Олева. Наилучшими показателями роста в данных условиях характеризовались штаммы *L. rhamnosus* и *L. paracasei* (титр составлял не менее 3×10^8 КОЕ/мл). При этом конечные концентрации молочной и уксусной кислоты в культуральной жидкости *L. rhamnosus* были несколько выше.

Таблица 3.1.2.4.

Культивирование МКБ на суспензиях обойной пшеничной муки, обработанных амилазами и протеазами

Параметры	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>		<i>Lactobacillus salivarius</i>		<i>Lactobacillus helveticus</i>		<i>Lactobacillus paracasei</i>	
	Olexa	Protex 40E	Olexa	Protex 40E	Olexa	Protex 40E	Olexa	Protex 40E
Начальное содержание РВ, г/л	71,6±0,2	69,0±0,1	71,6±0,2	69,0±0,1	71,6±0,2	69,0±0,1	71,6±0,2	69,0±0,1
Содержание белка по Лоури, г/л	10,5±0,2	12,1±0,4	10,0±0,2	12,0±0,2	10,3±0,3	11,9±0,2	10,7±0,3	12,1±0,2
рН	3,55	3,54	3,38	3,54	3,66	3,67	3,45	3,16
log (КОЕ/мл)	8,5±0,17	8,3±0,15	7,6±0,15	7,1±0,14	7,7±0,16	8,3±0,17	8,7±0,20	8,9±0,19
Конечное содержание РВ, г/л	54,8±0,1	53,3±0,2	50,4±0,2	54,8±0,4	58,8±0,1	60,0±0,2	52,3±0,3	52,8±0,2
Содержание молочной кислоты, г/л	19,0	17,5	16,9	18,5	13,6	15,1	12,1	17,2
Содержание уксусной кислоты, г/л	1,8	1,9	2,1	н/о	2,4	1,5	н/о	н/о

Примечание: н/о – не обнаружено.

3.1.3. Исследование роста лактобактерий на гидролизатах пшеничной муки в биореакторе

Исследование роста лактобактерий на гидролизатах пшеничной муки, полученных по различным схемам обработки (только протеазами или протеазами и амилазами) проводили в лабораторном ферментере Minifors общим объемом 5 л с рабочим объемом среды 3 л в периодическом режиме с целью оценить возможность переноса технологии в опытно-промышленный масштаб. На первом этапе в качестве питательной среды использовали отфильтрованный через бельтинг гидролизат пшеничной муки, полученный обработкой только протеазами Protex 40E. На втором этапе использовали гидролизат пшеничной муки, полученный последовательной обработкой амилазами Duozyme и протеазами Protex 40E. В ходе культивирования осуществляли автоматическую подтитровку 25% раствором аммиака до значений pH среды 6,6 – 6,8. Каждую ферментацию проводили в течение 24 ч. Основные результаты эксперимента представлены в таблице 3.1.3.1.

Таблица 3.1.3.1.

Результаты культивирования лактобактерий на гидролизатах пшеничной муки в ферментере

Параметры	Duozyme	Duozyme и Protex 40E
Концентрация углеводов, г/л	15,6±0,3	57,1±0,2
Концентрация аминного азота, г/л	0,13	0,36
Концентрация белка, г/л	9,9±0,08	21,0±0,13
Концентрация углеводов, г/л	4,0±0,4	<0,5
После 24 ч культивирования <i>L. paracasei</i>		
Концентрация белка, г/л	3,7±0,11	10,4±0,08
log (КОЕ/мл)	9,1±0,05	9,5±0,03
Концентрация молочной кислоты, г/л	13,0	64,2
Степень потребления углеводов, %	74,4	~100
Выход молочной кислоты, г/Г _s	~1	~1

При культивировании лактобактерий на суспензиях муки, обработанных протеазами, лаг-фаза практически отсутствовала. Удельная скорость составляла $0,07 \text{ ч}^{-1}$. Стационарная фаза роста наступала на 15 ч ферментации. Спустя 24 ч концентрация общих углеводов составляла 4 г/л, титр лактобактерий – $1,9 \times 10^9$ КОЕ/мл, концентрация молочной кислоты по ВЭЖХ – 13,0 г/л. Степень потребления углеводов таким образом была 74 %.

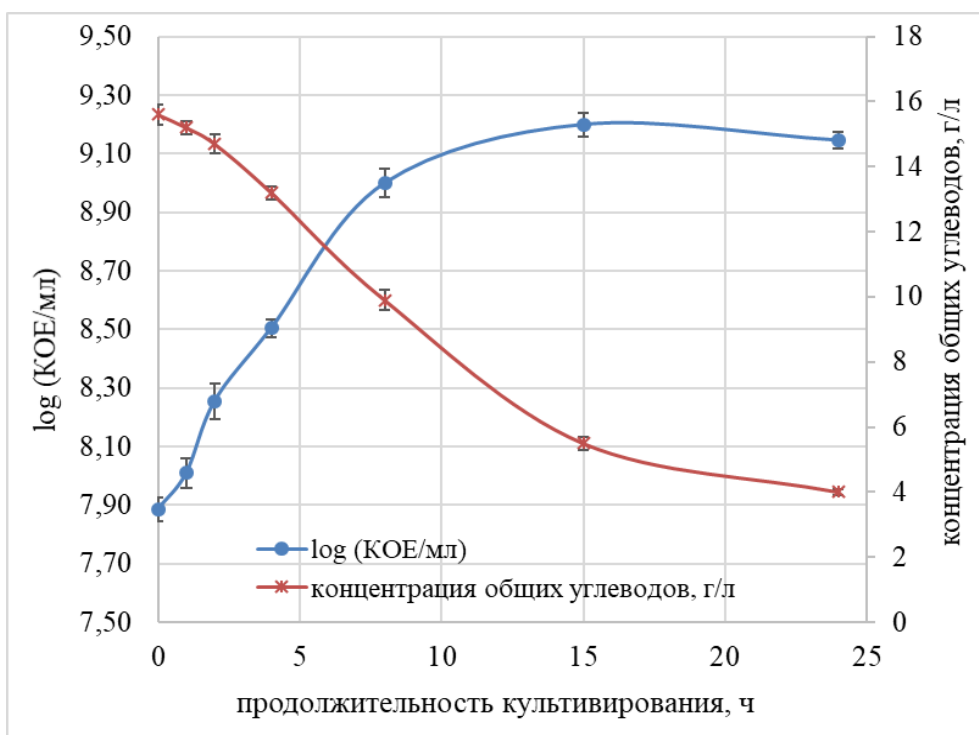


Рисунок 6. Кривые роста и потребления РВ при культивировании *L. paracasei* на гидролизате пшеничной муки, полученного при обработке протеазами

При культивировании *L. paracasei* на гидролизате пшеничной муки, полученном при последовательной обработке амилазами и протеазами, лаг-фаза также отсутствовала. Удельная скорость роста культуры составляла $0,14 \text{ ч}^{-1}$. Стационарная фаза наступала на 15 ч культивирования. Спустя 28 часов все редуцирующие вещества были потреблены микроорганизмами и в культуральной жидкости не обнаруживались.

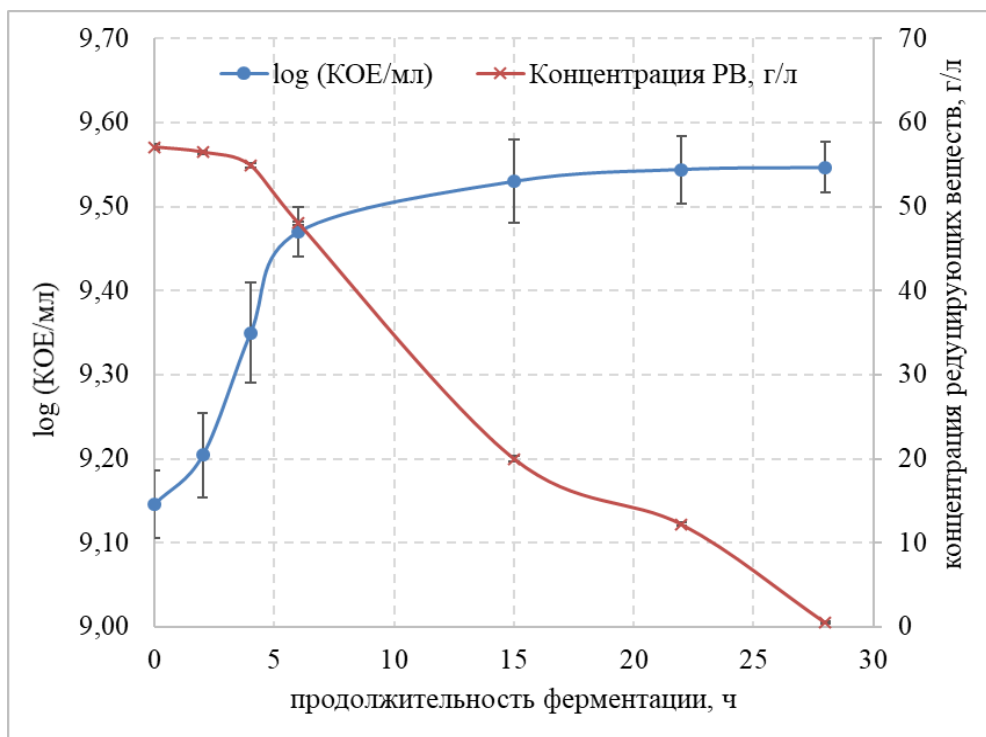


Рисунок 7. Кривые роста и потребления РВ при культивировании *L. paracasei* на гидролизате пшеничной муки, полученного при обработке амилазами и протеазами

При этом содержание жизнеспособных лактобактерий в среде составляло $3,0 \times 10^9$ КОЕ/мл, а концентрация молочной кислоты по результатам ВЭЖХ – 64,2 г/л. Таким образом, предложенная схема обработки может быть применена не только для получения биосуспензий с высоким содержанием лактобактерий, но и для сверхпродукции молочной кислоты, что, однако, требует дальнейших исследований.

3.1.4. Оптимизация условий предварительной обработки суспензий пшеничной муки протеазами для культивирования лактобактерий

С учетом результатов, полученных при исследовании концентрации белковых веществ, и культивированию лактобацилл (количеству жизнеспособных клеток после 48 ч роста), установлено, что гидролизаты после обработки ФП Protex 40E показали лучшие ростовые свойства при ферментации выбранных штаммов молочнокислых бактерий. Для дальнейших исследований была выбрана культура *L. rhamnosus*. С целью

определения оптимальной дозировки протеолитического ферментного препарата Protex 40E и гидромодуля для достижения максимальной продуктивности лактобацилл по содержанию жизнеспособных клеток провели серию экспериментов с применением центрального композиционного ротатабельного планирования (ЦКРП). Факторами для варьирования были выбраны гидромодуль и дозировка протеолитического ферментного препарата. Уровни варьирования представлены в таблице 3.1.4.1.

Необходимо отметить, что выбор минимального гидромодуля был обусловлен значительным ухудшением реологических свойств суспензии муки при значении фактора менее 5, что затрудняло обработку питательной среды. При этом в плане были охвачены все исследованные ранее концентрации протеаз. Гидролиз проводили в оптимальных условиях, рекомендованных производителем.

Таблица 3.1.4.1.

Уровни варьирования факторов

Фактор		Значения				
		- α	-1	0	1	+ α
X ₁	Гидромодуль	5	9,4	20	30,6	35
X ₂	Концентрация ФП Protex 40E, % от содержания белка в муке	0,1	0,66	2	3,34	3,9

Результаты планирования ЦКРП представлены в таблице 3.1.4.2.

Таблица 3.1.4.2.

Матрица планирования ЦКРП и его результаты

Номер опыта		Факторы						Результаты	
		Z_0	Z_1	Z_2	Z_1^2	Z_2^2	Z_1Z_2	Lg (КОЕ/мл)	
								Эксп.	Расч.
Ядро плана	1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	7,65	7,66
	2	+1	+1	-1	+1	+1	-1	7,76	7,66
	3	+1	-1	+1	+1	+1	-1	8,69	8,60
	4	+1	-1	-1	+1	+1	+1	8,60	8,60
Звездные точки	5	+1	+1,414	0	+2	0	0	7,76	7,81
	6	+1	-1,414	0	+2	0	0	9,10	9,14
	7	+1	0	+1,414	0	+2	0	7,65	7,79
	8	+1	0	-1,414	0	+2	0	7,85	7,79
Центр плана	9	+1	0	0	0	0	0	8,00	8,01
	10	+1	0	0	0	0	0	7,93	8,01
	11	+1	0	0	0	0	0	8,04	8,01
	12	+1	0	0	0	0	0	8,08	8,01
	13	+1	0	0	0	0	0	8,00	8,01
b_j		8,01	-0,47	-0,04	0,23	-0,11	-0,05	Оценка значимости коэффициентов	
t_j		0,07	0,05	0,05	0,06	0,06	0,08		

В результате после исключения незначимых коэффициентов было получено уравнение для подсчета количества молочнокислых бактерий в 1 мл культуральной жидкости (39):

$$\hat{y} = 8,010 - 0,472X_1 + 0,232X_1^2 - 0,11X_2^2 \quad (39)$$

где $\hat{y} = \lg(\text{КОЕ/мл})$

Поверхность функции отклика имела седловидную форму (рисунок 8). Так как коэффициент парного взаимодействия и коэффициент при X_2 оказались незначимыми, поверхность функции отклика была симметрична относительно соответствующей оси.

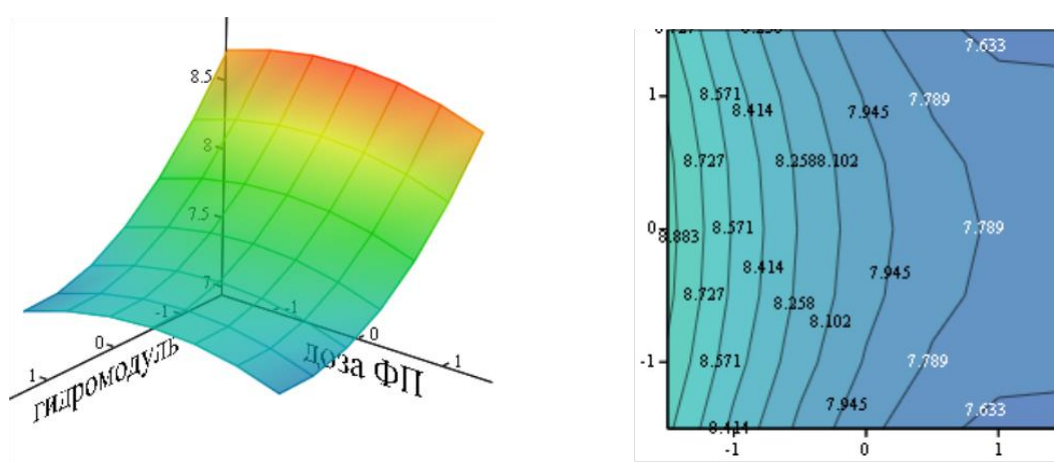


Рисунок 8. Поверхность и линии уровня функции отклика $\log(\text{КОЕ/мл})$ от гидромодуля и дозы ферментного препарата

Из анализа модели следует, что оптимальные значения дозировки ферментного препарата находились в центре плана, в то время как фактически данный фактор оказывал слабое влияние на количество лактобактерий. При этом с увеличением гидромодуля в выбранном диапазоне $\log(\text{КОЕ/мл})$ возрастало более чем на единицу. В данном случае необходимо скорректировать план взяв меньшие значения указанного фактора, что, однако, затруднительно на практике. Таким образом, полученная модель позволяет установить оптимальные значения выбранных параметров процесса гидролиза, которые соответствовали звездной точке. Оптимальными значениями выбранных параметров являлись гидромодуль – 5, концентрация ФП – 2% от содержания белка в муке.

3.1.5. Сравнение роста *L. rhamnosus* на гидролизатах обойной пшеничной муки, полученных в оптимальных условиях, и на среде MRS

В качестве стандартной среды для глубинной ферментации лактобактерий традиционно используют среду MRS с богатым питательным составом [153]. Для оценки ростовых свойств гидролизатов пшеничной муки, получаемых в оптимизированных условиях, рост лактобактерий сравнили с ростом в стандартной среде MRS.

При сопоставлении кривых роста *L. rhamnosus* в среде MRS и в гидролизате обойной пшеничной муки установлено, что они не имели значительных различий (рисунок 9). Удельная скорость роста лактобактерий на среде MRS составляла $0,39 \text{ ч}^{-1}$, а на гидролизате пшеничной муки $0,40 \text{ ч}^{-1}$. Близкие значения этой величины были получены ранее при ферментации растительного сырья [154]. Динамика pH в обоих случаях также было сходна, а продолжительность лаг-фазы, как в одном, так и в другом случае была минимальна.

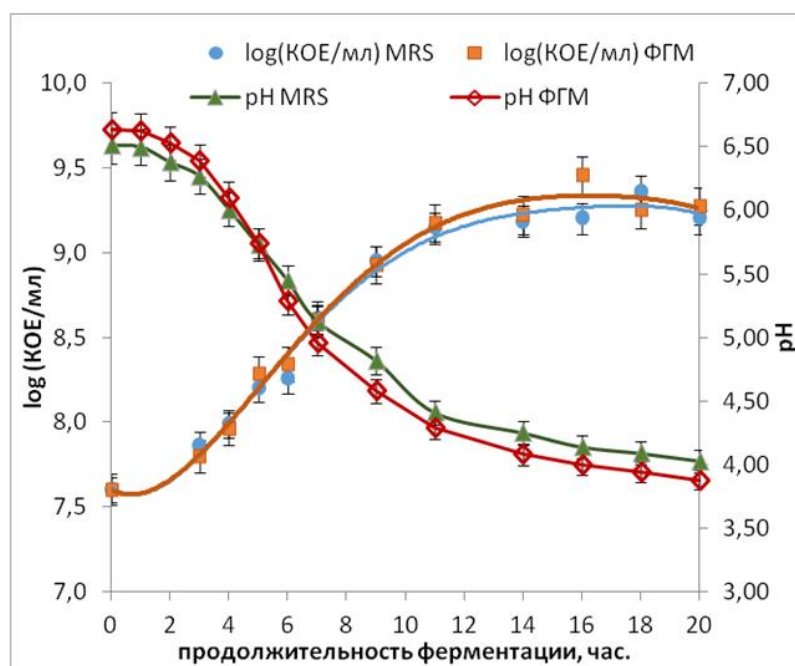


Рисунок 9. Кривые роста культуры *L. rhamnosus* и динамика pH на стандартной среде MRS и ферментативном гидролизате пшеницы

Таким образом, не установлено значительных различий в динамике численности лактобактерий и pH, что указывает на сопоставимые ростовые

свойства обеих питательных сред и высокий биологический потенциал гидролизата обойной пшеничной муки для культивирования лактобацилл.

3.1.6. Получение пробиотических функциональных напитков из гидролизатов пшеничной муки

Основываясь на представленных в обзоре литературы данных по использованию зернового сырья и развитию рынка функциональных продуктов, гидролизаты пшеничной муки, получаемые с помощью протеаз и амилаз по разработанной схеме, целесообразно использовать для получения функциональных напитков, ферментированных пробиотическими микроорганизмами. Микробными объектами были выбраны выделенные от человека штаммы видов лактобактерий, наиболее часто используемые в качестве пробиотиков. Ферментированные напитки оценивали как по конечному содержанию жизнеспособных бактерий, рН, концентрации молочной кислоты, титруемой кислотности, так и по органолептическим показателям, для определения приемлемости и предпочтения с точки зрения потребителей. Результаты представлены в таблицах 3.1.6.1. и 3.1.6.2.

Таблица 3.1.6.1.

Ферментация лактобактерий на гидролизате обойной пшеничной муки

Культура	Log (КОЕ/мл)	Конечный рН	Концентрация молочной кислоты, г/л	Титруемая кислотность, °Т
<i>L. paracasei</i>	9,0±0,33	3,44	9,7	127,75
<i>L. plantarum</i>	9,0±0,21	3,37	9,0	134,75
<i>L. bulgaricus</i>	8,4±0,26	3,68	5,5	104,67
<i>L. rhamnosus</i>	9,0±0,30	3,55	10,2	113,75
<i>L. acidophilus</i>	8,4±0,14	3,47	7,2	138,25

Оценка каждого из продуктов на основе результатов анализа восприятия органов чувств показала, что по всем использованным показателям средние значения практически не отличались. Однако, самым сладким из образцов был напиток, ферментированный *L. bulgaricus*, самым

кислым - *L. plantarum*, наибольшая интенсивность аромата наблюдалась у образцов с *L. rhamnosus* и *L. paracasei*.

Таблица 3.1.6.2.

Результаты органолептического анализа зернового продукта, ферментированного лактобактериями

	<i>L. rhamnosus</i>	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. bulgaricus</i>	<i>L. paracasei</i>	<i>L. plantarum</i>
Внешний вид	4,8	4,4	4,4	4,6	4,8
Цвет	5,6	5,2	5,0	5,0	5,3
Запах	5,0	6,7	6,4	4,8	6,5
Общая интенсивность аромата	6,5	5,3	4,6	6,4	4,9
Хлебный аромат	4,2	5,5	4,7	3,9	4,8
Сладость	5,3	5,2	5,9	3,6	4,0
Горечь	3,7	3,0	3,1	3,9	3,0
Кислинка	5,9	5,2	3,7	7,0	7,6
Вяжущий вкус	2,2	2,5	2,4	2,9	2,7
Солоноватость	2,0	1,6	1,7	1,8	1,9
Однородность массы	3,9	3,8	4,0	4,2	4,1
Хлебный вкус	2,4	2,8	2,6	2,0	2,3

На рисунке 10 представлено графическое изображение сенсорных характеристик органолептического анализа пробиотического напитка на основе гидролизатов обойной пшеничной муки. Видно, что продукты, ферментированные *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. bulgaricus*, были сходны по запаху, общей интенсивности аромата, хлебному аромату и сладости, а образцы с *L. rhamnosus* и *L. paracasei* – по цвету, запаху, общей интенсивности аромата, хлебному аромату, сладости и горечи.

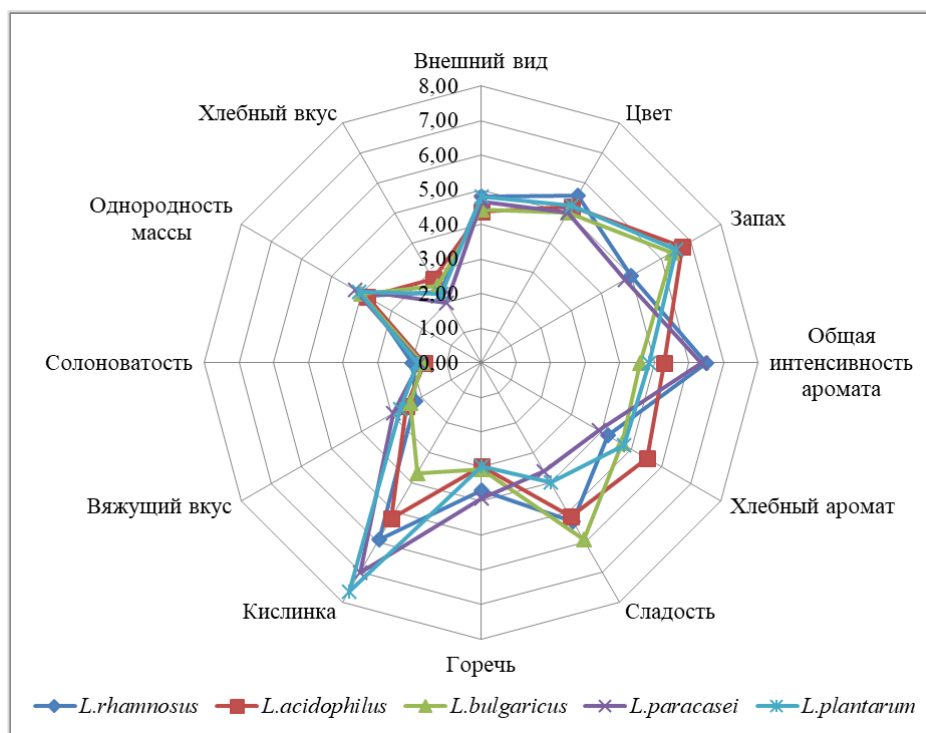


Рисунок 10. Сенсорный профиль функциональных пробиотических зерновых напитков

Таким образом, получаемые на основе гидролизатов пшеницы пробиотические напитки характеризовались высоким содержанием живых лактобактерий (10^8 – 10^9 КОЕ/мл) и обладали приемлемыми для потребителей сенсорными показателями качества.

3.1.7. Исследование стабильности лактобацилл в функциональном напитке при хранении и в условиях, моделирующих прохождение через желудочно-кишечный тракт

Кроме органолептических показателей к основным показателям качества пробиотических функциональных продуктов относятся такие параметры, как стабильность лактобактерий при хранении, а также их выживаемость в условиях, моделирующих прохождение через желудочно-кишечный тракт (процесс пищеварения человека). Для определения показателей выживаемости МКБ была использована система *in vitro*, в которой жизнеспособные клетки подвергались воздействию искусственного желудочного сока и желчи.

При исследовании влияния кислотности среды на выживаемость лактобактерий, идентичной кислотности желудка (рН 1,25), установлено, что после 1 ч инкубации при 37 °С количество жизнеспособных клеток уменьшилось примерно на 2-3 порядка. Наиболее устойчивой культурой к воздействию кислого рН была культура *L. bulgaricus*. Однако уже после 4,5 ч инкубации содержание живых клеток для каждой культуры было практически одинаковым (таблица 3.1.7.1) и не превышало $3,0 \times 10^4$ КОЕ/мл.

Таблица 3.1.7.1.

Выживаемость МКБ в искусственном желудочном соке (рН 1,25)

Культура МКБ		Время инкубации, час					
		0	0,5	1	1,5	4	4,5
log (КОЕ/мл)	<i>L. plantarum</i>	8,0	7,7	5,3	5,1	4,7	4,3
	<i>L. bulgaricus</i>	7,4	7,4	6,3	5,2	4,9	4,1
	<i>L. acidophilus</i>	7,7	7,4	5,1	4,6	4,0	4,0
	<i>L. rhamnosus</i>	8,1	6,1	4,9	4,3	4,1	4,0
	<i>L. paracasei</i>	8,3	7,7	5,2	4,7	4,6	4,2

После прохождения желудка микроорганизмы попадают в верхний отдел кишечника, где выделяется желчь. Концентрация желчных солей в двенадцатиперстной кишке резко возрастает после приема пищи до 15 ммоль/л, а затем постепенно снижается до 10 ммоль/л. В подвздошной кишке концентрация падает ниже 4 ммоль/л [155, 156]. Так как концентрация желчных солей в кишечнике не является статичной, а изменяется со временем и в разных частях тонкого кишечника, были использованы концентрации желчи в диапазоне от 0 до 1,8 % (масс./об.). При исследовании влияния различных концентраций желчи на выживаемость МКБ от времени инкубации установлено, что наименьшей восприимчивостью к ее воздействию обладала культура *L. plantarum*, а наибольшей *L. bulgaricus* (рисунок 11-15).

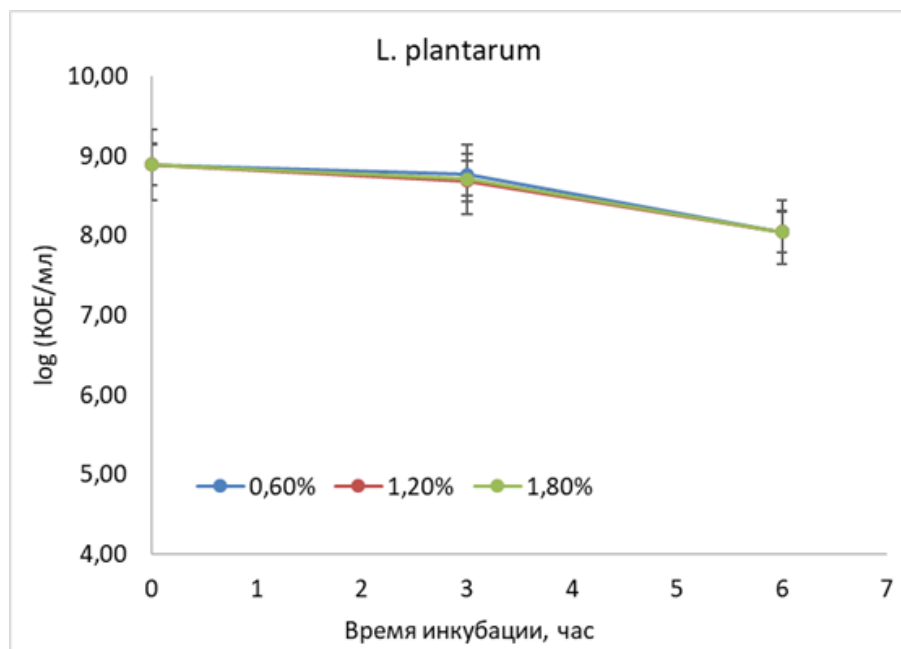


Рисунок 11. Выживаемость *L. plantarum* в зависимости от концентрации желчи и времени инкубации

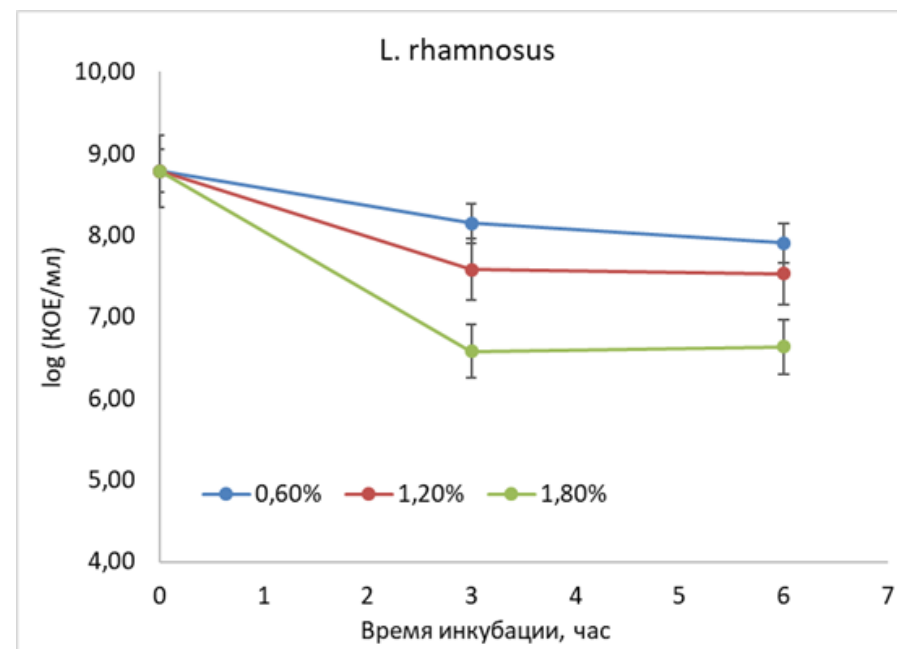


Рисунок 12. Выживаемость *L. rhamnosus* в зависимости от концентрации желчи и времени инкубации

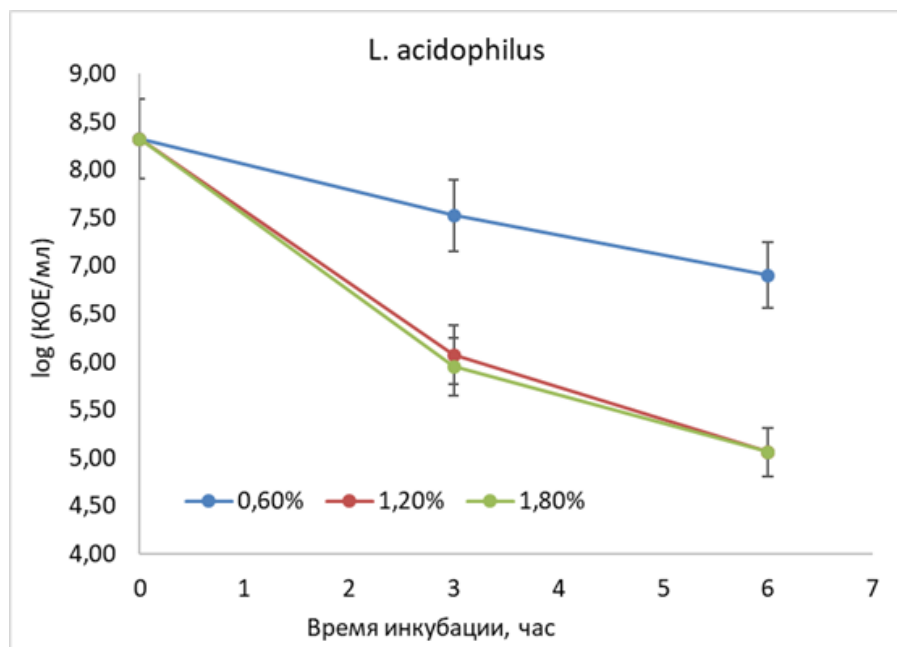


Рисунок 13. Выживаемость *L. acidophilus* в зависимости от концентрации желчи и времени инкубации

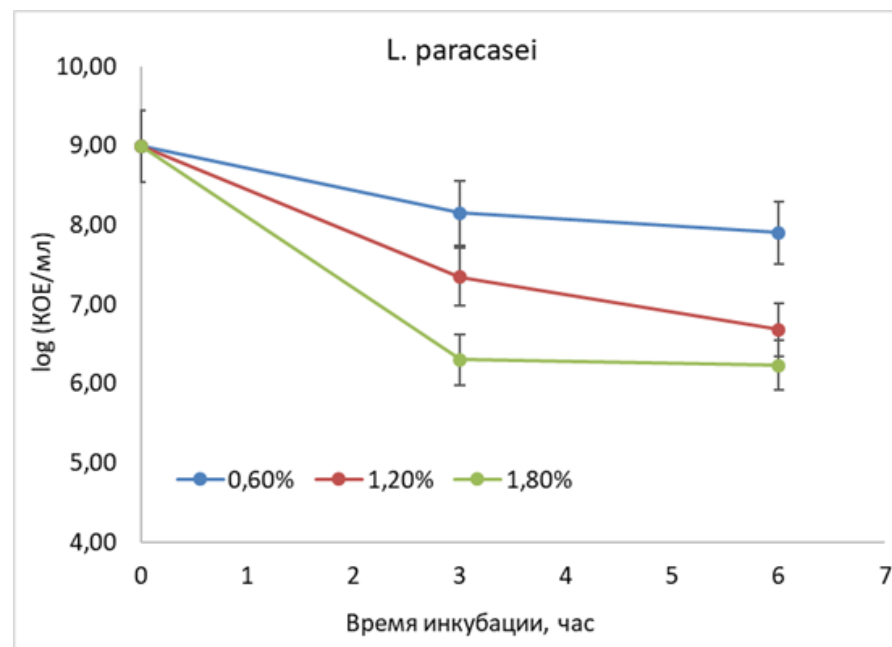


Рисунок 14. Выживаемость *L. paracasei* в зависимости от концентрации желчи и времени инкубации

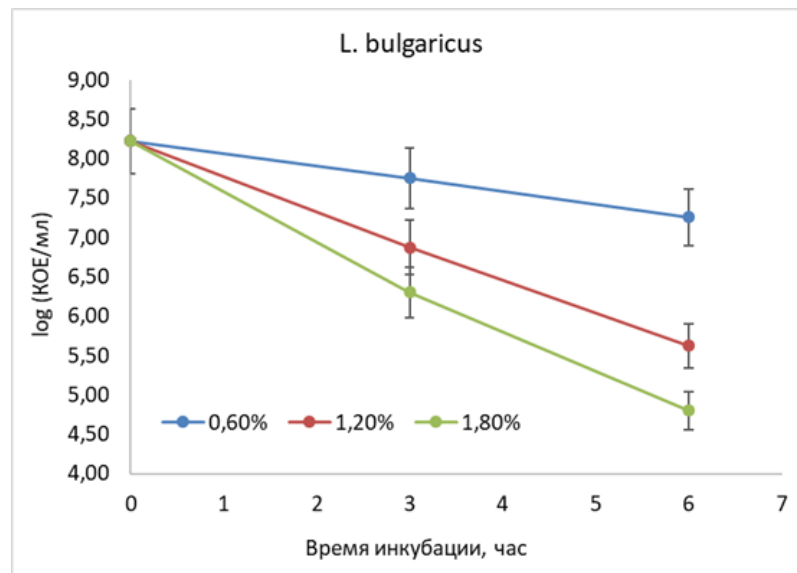


Рисунок 15. Выживаемость *L. bulgaricus* в зависимости от концентрации желчи и времени инкубации

Исследование стабильности молочнокислых бактерий в зерновом напитке при хранении в течение 5 недель при температуре от +3 до +6 °С показало, что наименьшая стабильность наблюдалась у культуры *L. bulgaricus* со скоростью гибели 0,17 log (КОЕ/мл) в неделю, а наибольшая – у культуры *L. rhamnosus* со скоростью гибели 0,04 log (КОЕ/мл) в неделю (рисунок 16).

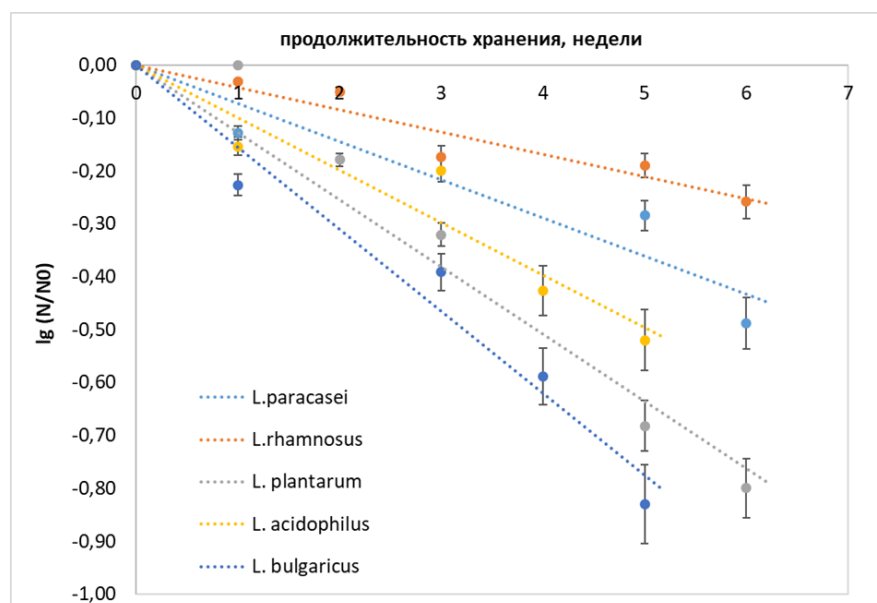


Рисунок 16. Исследование стабильности МКБ при хранении в функциональном напитке при температуре от +3 до +6 °С

3.2. Выбор ферментных препаратов для гидролиза пшеничной муки, состава питательных сред и исследование роста бифидобактерий

3.2.1. Выбор состава питательных сред для ферментации бифидобактерий

В исследованиях с бифидобактериями, которые, как известно, более требовательны к составу питательных сред, гидролизаты пшеничной муки использовали в качестве основного источника азота вместо дорогостоящих компонентов животного происхождения с добавлением к среде дрожжевого экстракта, аскорбиновой кислоты, L-цистеина, минеральных солей и глюкозы. Для гидролиза пшеничной муки использовали протеолитические ферментные препараты панкреатин и Protex 40E. В качестве микробных объектов использовали штаммы бифидобактерий *B. bifidum* №1 и *B. adolescentis* ATCC 15703. При этом сравнивали рост микроорганизмов на трех вариантах сред с добавлением или без добавления аскорбиновой кислоты (таблица 3.2.1.1).

Таблица 3.2.1.1.

Ферментация бифидобактерий на питательных средах
на основе гидролизата пшеничной муки

Ферментные препараты	Log (КОЕ/мл) / pH					
	<i>B. bifidum</i> №1			<i>B. adolescentis</i> ATCC 15703		
	MRS	MRS-C	Бифидум	MRS	MRS-C	Бифидум
Панкреатин	8,7/4,62	7,9/3,91	8,0/3,80	Отс./6,92	8,2/3,54	7,6/4,17
Protex 40E	7,9/4,07	7,8/3,84	7,7/3,72	Отс./6,81	7,7/3,79	7,6/3,98

После 20 ч культивирования *B. bifidum* №1 и *B. adolescentis* на питательных средах на основе гидролизата пшеничной муки установлено, что наибольшей способностью стимулировать рост бифидобактерий обладала белковая фракция пшеничной муки, полученная при обработке панкреатином. В то же время в среде без добавления аскорбиновой кислоты рост *B. adolescentis* отсутствовал.

Исходя из полученных результатов для дальнейших исследований был выбран штамм *B. adolescentis* и питательная среда на основе панкреатического гидролизата пшеничной муки с добавлением компонентов среды MRS-C.

3.2.2. Оптимизация условий гидролиза суспензии пшеничной муки для культивирования бифидобактерий методом факторного эксперимента

Предварительные исследования показали, что пептидная фракция пшеничной муки, полученная при обработке водных суспензий панкреатином, обладала наибольшим биологическим потенциалом для ее применения в качестве основного источника азота для культивирования бифидобактерий. Исследование влияния условий предварительной ферментативной обработки суспензий пшеничной муки протеолитическим ферментным препаратом на конечный титр жизнеспособных бифидобактерий проводили в два этапа: в соответствии с полным факторным экспериментом (ПФЭ) для выявления наиболее сильно влияющих на процесс параметров и по плану второго порядка для определения оптимальных значений (ЦКРП).

При проведении ПФЭ варьировали концентрацию ФП (от 0,66% до 3,34% от содержания белка в сырье) – X_1 , гидромодуль (от 9,4 до 30,6) – X_2 , начальный pH (от 7,5 до 8,5) – X_3 и температуру гидролиза (от 40 до 50 °C) – X_4 . Длительность проведения гидролиза 2 часа. После гидролиза проводили культивирование бифидобактерий *B. adolescentis* на питательных средах на основе гидролизата в течение 18-20 ч. Оптимизацию проводили по параметру численности жизнеспособных бифидобактерий, выросших на экспериментальных питательных средах, содержащих гидролизаты в качестве основного источника азота (КОЕ/мл) – Y . Уровни варьирования факторов и матрица планирования эксперимента представлены соответственно в таблицах 3.2.2.1. и 3.2.2.2.

Таблица 3.2.2.1.

Уровни варьирования факторов ПФЭ 2^4

Уровни варьирования	Факторы			
	X_1 – концентрация ФП, %	X_2 - гидромодуль	X_3 - рН	X_4 - температура
Основной (нулевой)	2	20	8	45
Нижний (-1)	0,66	9,4	7,5	40
Верхний (+1)	3,34	30,6	8,5	50
Интервал варьирования	1,34	10,6	0,5	5

По результатам эксперимента было получено уравнение регрессии – формула (40):

$$\hat{y} = 7,6724 - 0,0024Z_1 - 0,0604Z_2 + 0,0253Z_3 + 0,0209Z_4 + 0,0351Z_1Z_2 + 0,0131Z_1Z_3 + +0,0336Z_1Z_4 + 0,0323Z_2Z_3 + 0,0358Z_2Z_4 + 0,0817Z_3Z_4 + +0,0183Z_1Z_2Z_3 + 0,015Z_1Z_2Z_4 - -0,1153Z_1Z_3Z_4 - 0,0216Z_2Z_3Z_4 - 0,0241Z_1Z_2Z_3Z_4 \quad (40)$$

где $\hat{y} = \lg(\text{КОЕ/мл})$

После стандартной процедуры исключения незначимых коэффициентов с использованием критерия Стьюдента уравнение регрессии приняло вид (41):

$$\hat{y} = 7,6724 - 0,0604Z_2 + 0,0817Z_3Z_4 - 0,1153Z_1Z_3Z_4 \quad (41)$$

Результаты полного факторного эксперимента 2^4 представлены в таблице 3.2.2.2.

Таблица 3.2.2.2.

Матрица планирования ПФЭ 2^4 ферментативного гидролиза суспензии пшеничной муки высшего сорта для ферментации бифидобактерий и его результаты

№ п/п	План																Результаты	
	Z ₀	Z ₁	Z ₂	Z ₃	Z ₄	Z ₁ Z ₂	Z ₁ Z ₃	Z ₁ Z ₄	Z ₂ Z ₃	Z ₂ Z ₄	Z ₃ Z ₄	Z ₁ Z ₂ Z ₃	Z ₁ Z ₂ Z ₄	Z ₁ Z ₃ Z ₄	Z ₂ Z ₃ Z ₄	Z ₁ Z ₂ Z ₃ Z ₄	lg (КОЕ/мл)	
																	Эк.	Рас.
1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	7,76	7,58
2	+1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	+1	-1	-1	-1	-1	7,71	7,65
3	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	+1	-1	-1	+1	-1	-1	-1	7,74	7,65
4	+1	+1	+1	-1	-1	+1	-1	-1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	+1	+1	7,37	7,58
5	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	-1	-1	7,70	7,70
6	+1	+1	-1	+1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	7,67	7,77
7	+1	+1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	+1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	+1	7,70	7,77
8	+1	+1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	-1	-1	7,72	7,70
9	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	7,81	7,80
10	+1	-1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	-1	+1	7,40	7,42
11	+1	-1	+1	-1	+1	-1	+1	-1	-1	+1	-1	+1	-1	+1	-1	+1	7,36	7,42
12	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	-1	7,74	7,81
13	+1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	+1	7,93	7,93
14	+1	-1	-1	+1	-1	+1	-1	+1	-1	+1	-1	+1	-1	+1	+1	-1	7,61	7,54
15	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	7,54	7,54
16	+1	-1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	-1	+1	8,00	7,93
b _j	7,672	-0,002	-0,060	0,025	0,021	0,035	0,013	0,034	0,032	0,036	0,082	0,018	0,015	-0,115	-0,022	-0,024	Оценка значимости коэффициентов	
t _j	453,2	-0,14	-3,57	1,49	1,23	2,08	0,78	1,98	1,91	2,12	4,82	1,08	0,89	-6,81	-1,28	-1,42		

Z_1-Z_4 – кодированные значения факторов X_1-X_4

На рисунке 17 представлены поверхности отклика для полученного уравнения регрессии.

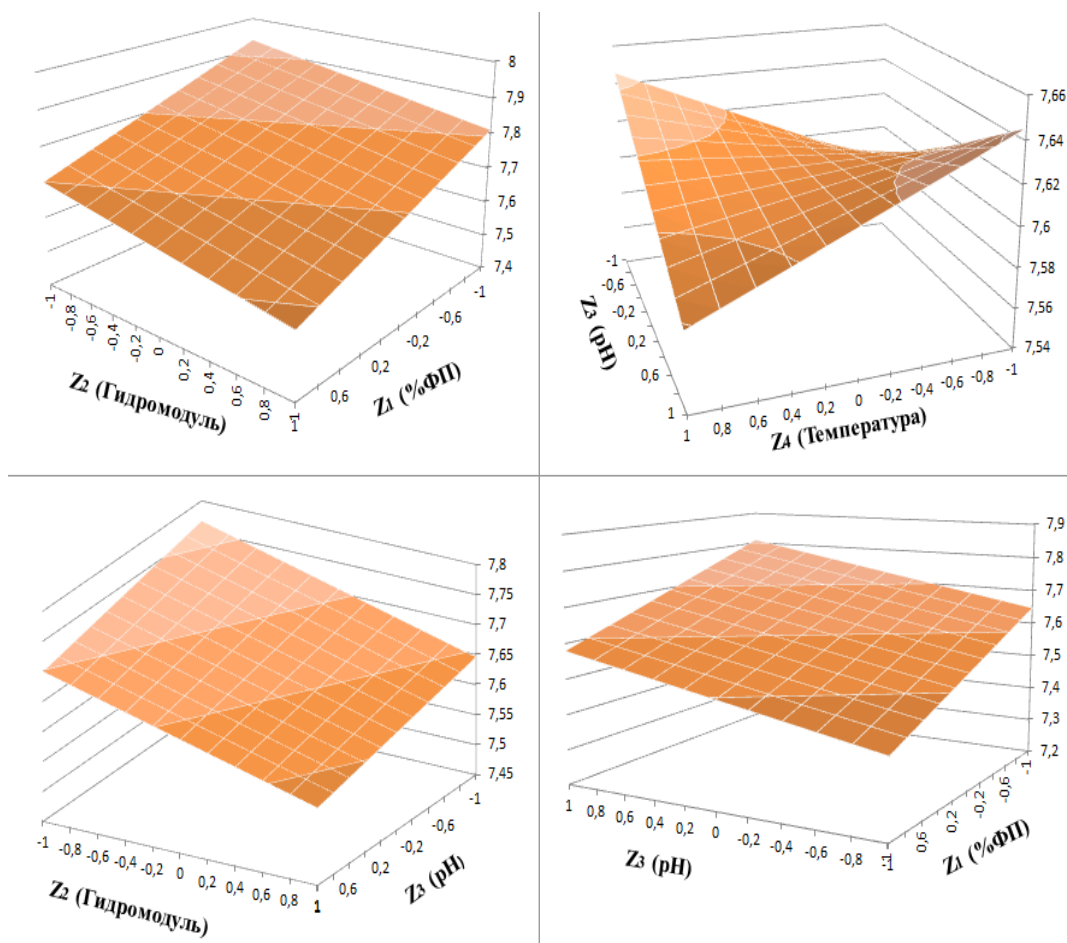


Рисунок 17. Поверхности отклика уравнения регрессии для ПФЭ 2⁴

В результате было установлено, что наиболее сильное влияние на рост бифидобактерий в процессе ферментативной обработки оказывал гидромодуль и эффект парного взаимодействия температуры и рН, а также эффект тройного взаимодействия концентрации ферментного препарата, рН и температуры. Хотя по полученным результатам нельзя однозначно утверждать об отсутствии влияния какого-либо параметра в выбранном интервале на функцию отклика, тем не менее, можно отметить, что гидромодуль оказывал на нее наибольшее влияние.

Для решения задачи оптимизации с технико-экономической точки зрения важным фактором является установление не только оптимальной концентрации сырья, но и ферментного препарата. Поэтому на втором этапе для нахождения оптимальных параметров гидролиза по параметру конечного

содержания жизнеспособных клеток бифидобактерий использовали центральный композиционный ротатабельный план эксперимента (ЦКРП) с варьированием концентрации ферментного препарата и гидромодуля при минимальной температуре (40°C) и среднем значении pH (8,0). При этом значения гидромодуля в звездных точках составляли 5 и 35, а концентрации ферментного препарата – 0,1 и 3,9. Уровни варьирования вышеуказанных факторов представлены в таблице 3.2.2.3.

Таблица 3.2.2.3.

Уровни варьирования факторов ЦКРП

Уровни варьирования	Факторы и их значения	
	X ₁ - гидромодуль	X ₂ – концентрация ФП, %
Основной (нулевой)	20	2
Нижний (-1)	9,4	0,66
Верхний (+1)	30,6	3,34
Интервал варьирования	10,6	1,34

Условия эксперимента в ядре плана частично совпадали с условиями полного факторного эксперимента. Условия эксперимента в центре плана одинаковы, по их результатам рассчитывалась дисперсия, необходимая для дальнейших расчетов и проверки адекватности модели. Матрица планирования ЦКРП, а также результаты эксперимента представлены в таблице 3.2.2.4.

Полученное уравнение регрессии после исключения незначимых коэффициентов имело вид (42):

$$\hat{y} = 7,658 - 0,191Z_1 - 0,071Z_1^2 - 0,083Z_2^2 \quad (42)$$

где $\hat{y} = \log(\text{КОЕ/мл})$

Коэффициенты при квадратах обоих параметров оказались значимыми и меньше нуля. Поверхность отклика имела параболическую форму, а максимальное значение было найдено аналитическим путем.

Таблица 3.2.2.4.

Матрица и результаты ЦКРП

Номер опыта		Факторы						Результаты	
		Z_0	Z_1	Z_2	Z_1^2	Z_2^2	$Z_1 Z_2$	Lg (КОЕ/мл)	
								Эксп.	Расч.
Ядро плана	1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	7,46	7,31
	2	+1	+1	-1	+1	+1	-1	7,44	7,31
	3	+1	-1	+1	+1	+1	-1	7,72	7,70
	4	+1	-1	-1	+1	+1	+1	7,85	7,70
Звездные точки	5	+1	+1,414	0	+2	0	0	7,10	7,25
	6	+1	-1,414	0	+2	0	0	7,71	7,79
	7	+1	0	+1,414	0	+2	0	7,34	7,49
	8	+1	0	-1,414	0	+2	0	7,42	7,49
Центр плана	9	+1	0	0	0	0	0	7,66	7,66
	10	+1	0	0	0	0	0	7,64	7,66
	11	+1	0	0	0	0	0	7,57	7,66
	12	+1	0	0	0	0	0	7,68	7,66
	13	+1	0	0	0	0	0	7,74	7,66
b_j		7,658	-0,191	-0,028	-0,071	-0,083	0,038	Оценка значимости коэффициентов	
t_j		0,077	0,061	0,061	0,065	0,065	0,086		

Z_1 и Z_2 – кодированные значения X_1 и X_2 соответственно

Поверхность отклика для уравнения регрессии представлена на рисунке 18. Коэффициенты парного взаимодействия и при Z_2 были незначимы, поэтому функция отклика симметрична относительно оси Z_2 (доза ферментного препарата), а оптимальное значение для дозы ФП соответствовало центру плана.

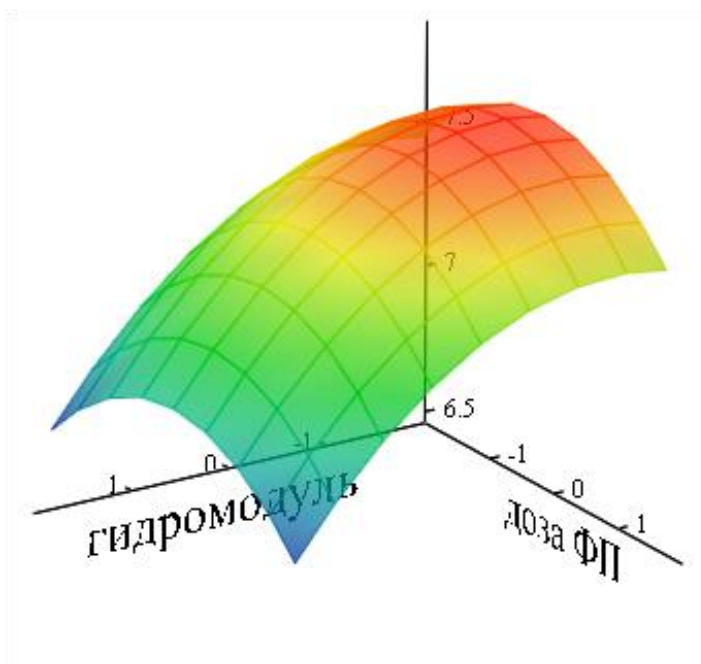


Рисунок 18. Поверхность отклика уравнения регрессии для ЦКРП

Таким образом, с помощью ПФЭ и эксперимента второго порядка (ЦКРП) были определены оптимальные условия проведения ферментативного гидролиза пшеничной муки для культивирования бифидобактерий: концентрация ФП – 2% от концентрации белка в муке; гидромодуль – 5,43; рН – 8,0; температура – 40 °С.

Материальный баланс гидролиза

На следующем этапе провели исследование биохимического состава исходного сырья (пшеничной муки), гидролизата, полученного в оптимизированных условиях ($T = 40$ °С; $\tau = 2$ часа; рН 8,0; гидромодуль 5,43; % ФП = 2), а также осадка, отделяемого при центрифугировании ферментализата (таблица 3.2.2.5).

Таблица 3.2.2.5.

Биохимический состав муки, гидролизата и осадка

Показатель	Мука		Гидролизат		Осадок	
	% СВ	г/100г муки	% СВ	г/в пересчете на 100г муки*	% СВ	г/в пересчете на 100г муки*
Общие углеводы	80,02	68,5	48,9	7,6	87,0	60,9
Сырой протеин	10,75	9,2	46,1	7,2	2,86	2
Жиры	1,29	1,1	–	–	1,57	1,1
СВ	–	85,6	–	15,62	–	69,98

В результате было установлено, что почти 80 % содержащегося протеина в муке в процессе гидролиза расщеплялось до растворимых в воде белковых веществ. В осадке оставалось около 20% негидролизованного белка. Таким образом, белковые вещества составляли около 46% сухого веса полученного гидролизата.

Углеводы составляли около 49% сухого веса гидролизата (14 г/л). Причем, редуцирующих веществ содержалось около 4 г/л. Жиры в гидролизат не экстрагировались.

3.2.3. Исследование роста бифидобактерий на питательных средах на основе гидролизата пшеничной муки для получения пробиотического ингредиента

Периодическое культивирование бифидобактерий без поддержания рН

Для изучения роста культуры *B. adolescentis* на питательной среде на основе гидролизата пшеничной муки, полученного в оптимизированных условиях, и используемого в качестве основного источника белковых веществ с добавлением к среде глюкозы, дрожжевого экстракта, аскорбиновой кислоты, L-цистеина и минеральной основы MRS, проводили

периодическое глубинное культивирование бифидобактерий в анаэробных условиях (атмосфере аргона) без поддержания рН при постоянном перемешивании. Кривые роста и потребления углеводов, а также динамика изменения рН в процессе культивирования представлены на рисунке 19.

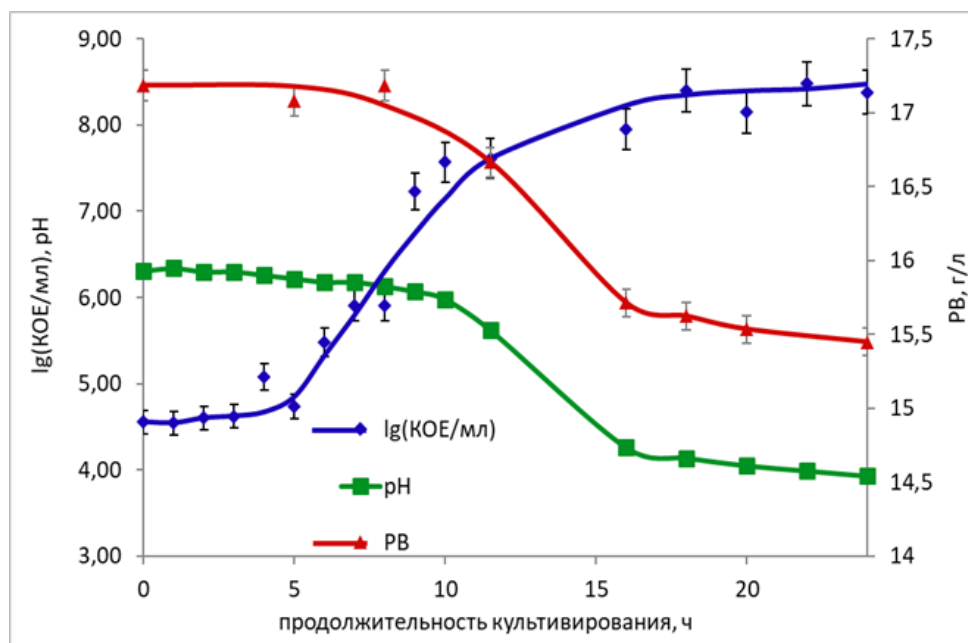


Рисунок 19. Кривые роста, потребления РВ и динамика рН при ферментации *B. adolescentis* без поддержания рН

Продолжительность лаг-фазы составляла около 4 часов. Стационарная фаза роста наступала на 18-22 час культивирования. Удельная скорость роста в экспоненциальной фазе составляла $0,53 \text{ ч}^{-1}$. Концентрация жизнеспособных клеток спустя 24 ч роста составляла 3×10^8 КОЕ/мл при конечном рН 3,8, что соответствовало титру клеток, полученному при культивировании в аналогичных условиях на стандартной среде MRS-C. Таким образом, ростовые свойства экспериментальной среды и стандартной среды MRS-C для данного штамма бифидобактерий практически идентичны.

По результатам ВЭЖХ на момент окончания ферментации в культуральной жидкости содержалось (г/л): молочной кислоты – 3,8; уксусной кислоты – 3,5.

Известно, что пшеничная мука содержит в своем составе до 8 % арабиноксиланов, которые как показал обзор литературы, оказывают

положительный эффект на рост пробиотических микроорганизмов [63]. Поэтому в гидролизате и полученной спустя 24 ч культуральной жидкости определяли содержание моносахаридов – пентоз и легко гидролизуемых арабиноксиланов (таблица 3.2.3.1).

Таблица 3.2.3.1.

Определение пентоз в КЖ и исходной питательной среде

	Концентрация моносахаридов, г/л	Общая концентрация моно- и полисахаридов, г/л
Питательная среда	0,25±0,14	0,51±0,17
КЖ	0,17±0,09	0,34±0,12

Таким образом, в ходе роста культурой было потреблено 0,17 г/л содержащихся в гидролизате пентоз, причем, помимо моносахаридов, потреблялись и полимеры. Можно сделать вывод, что данный штамм бифидобактерий обладает способностью потреблять не только пентозы, но и имеет ферментативную активность по отношению к арабиноксиланам зерна пшеницы.

Периодическое и отъемно-доливное культивирование бифидобактерий в условиях поддержания рН

С целью отработки режима получения суспензии жизнеспособных клеток бифидобактерий на экспериментальной питательной среде и изучения их кинетики роста провели культивирование штамма *B. adolescentis* в ферментере в анаэробных условиях (атмосфере аргона) при поддержании оптимального для роста рН. Для ферментации бифидобактерий использовали питательную среду на основе гидролизата пшеничной муки, полученного в определенных ранее оптимальных условиях (концентрация ФП – 2% от концентрации белка в муке; гидромодуль – 5,43; рН – 8,0; температура – 40 °С) панкреатином с добавлением к среде глюкозы, дрожжевого экстракта, аскорбиновой кислоты, L-цистеина и минеральной основы MRS. Значение рН поддерживали на уровне 6,8. При этом для поддержания рН использовали

раствор аммиака, который по литературным данным обеспечивает поступление дополнительного азота [157]. Кривая роста и потребления углеводов в условиях периодического режима представлена на рисунке 20.

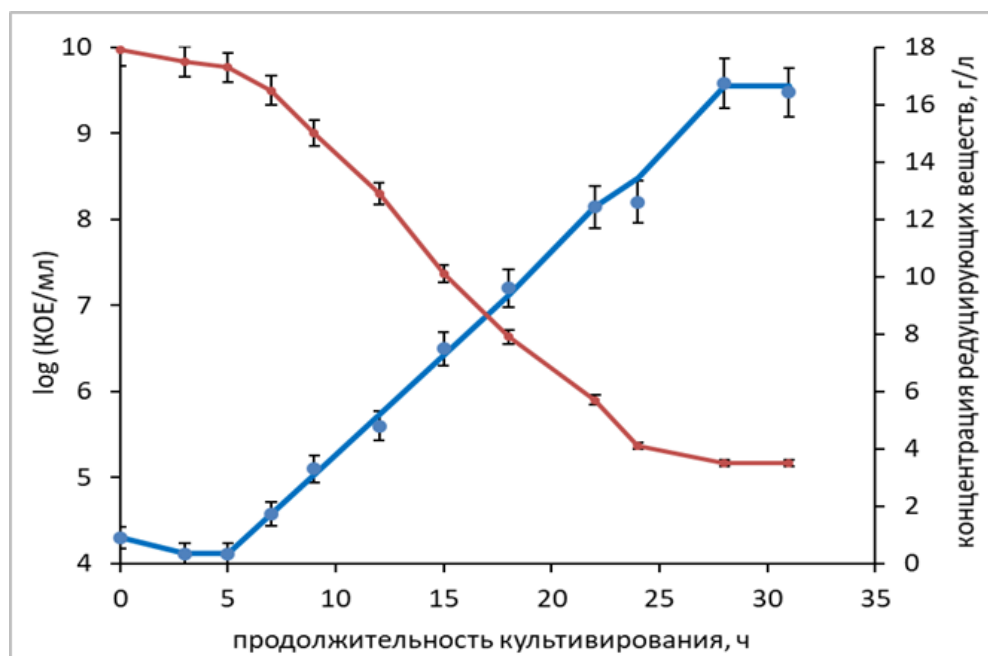


Рисунок 20. Периодическое культивирование *B. adolescentis* в ферментере

Продолжительность лаг-фазы составляла около 5 ч, стационарная фаза наступала на 27 ч культивирования. Активный рост бифидобактерий происходил в течение 12 ч. Максимальная удельная скорость роста в процессе ферментации достигала $0,53 \text{ ч}^{-1}$.

Конечное содержание клеток бифидобактерий составляло $3,0 \times 10^9$ КОЕ/мл, что превышало результаты культивирования, полученные без поддержания pH на порядок, а концентрация редуцирующих веществ на конец ферментации – 3,5 г/л.

На следующем этапе провели культивирование бифидобактерий в полунепрерывных условиях – в отъемно-доливном режиме. Ферментацию бифидобактерий проводили при скорости протока $0,5 \text{ ч}^{-1}$. Всего было проведено два цикла отъема-долива (рисунок 21).

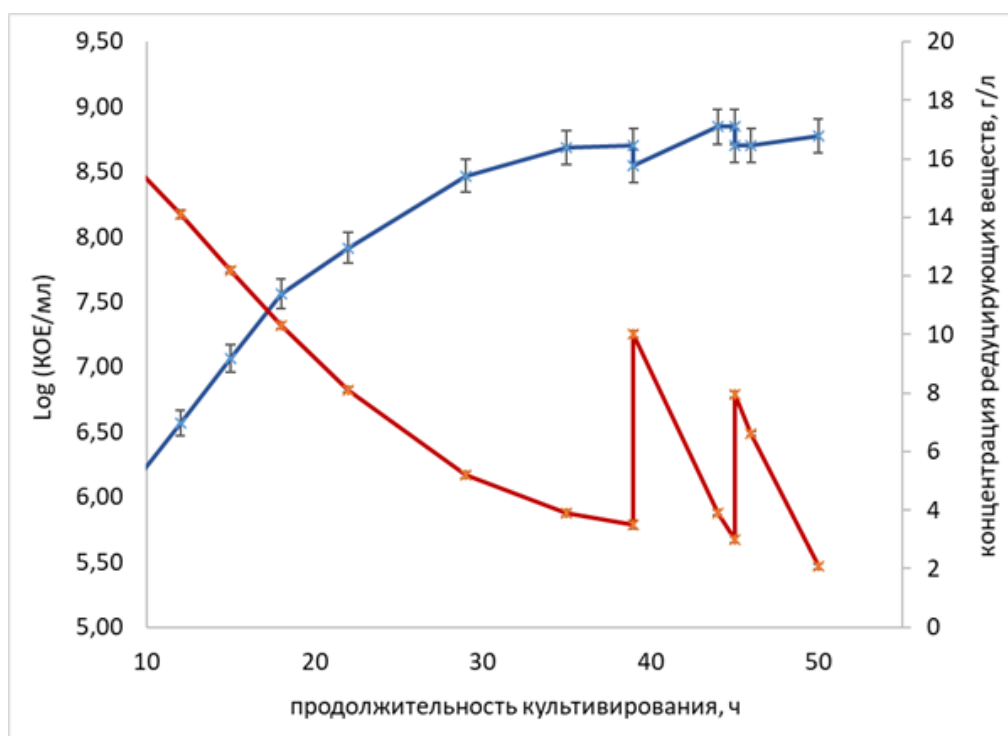


Рисунок 21. Культивирование бифидобактерий в отъемно-доливном режиме

Установлено, что при данной скорости потока концентрация бифидобактерий к завершению каждого цикла оставалась практически на одном уровне, как и конечная остаточная концентрация редуцирующих веществ, однако уже на втором цикле наблюдалось снижение скорости роста. Таким образом, целесообразнее использовать периодический режим культивирования.

3.2.4. Лиофильное высушивание *B. adolescentis*

Полученную культуральную жидкость бифидобактерий хранили при температуре 5 °С в течение нескольких недель.

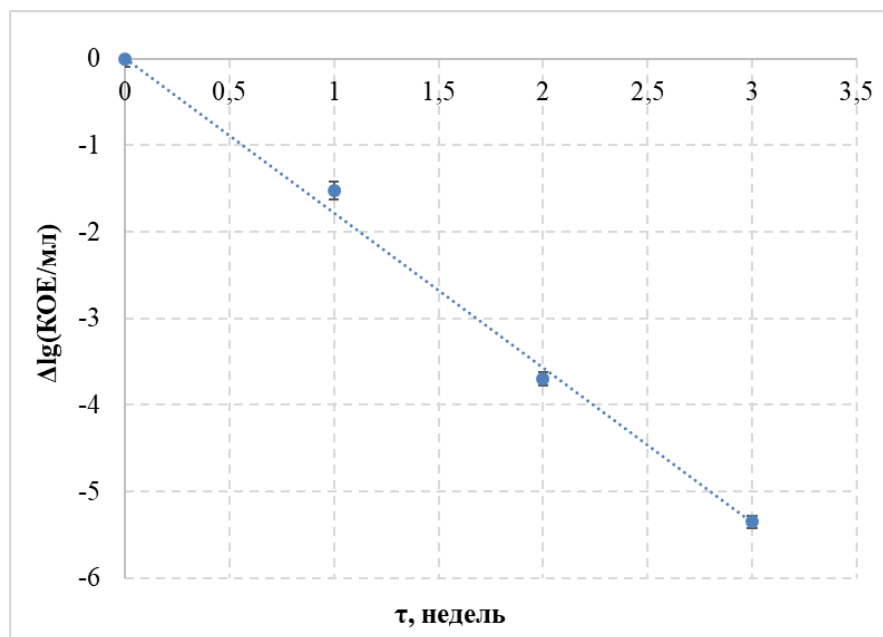


Рисунок 22. Выживаемость бифидобактерий при длительном хранении в суспензии при температуре от +3 до +6 °C

В результате установлено, что спустя 4 недели хранения при температуре от +3 до +6 °C жизнеспособные клетки бифидобактерий в суспензии отсутствовали.

Из литературных данных известно, что сухие формы пробиотических препаратов обеспечивают сохранение жизнеспособности клеток бифидобактерий в процессе хранения значительно дольше, чем жидкие суспензии [158]. Поэтому для увеличения срока хранения пробиотического функционального ингредиента, содержащего бифидобактерии, использовали сублимационную (лиофильную) сушку. Для эффективного протекания процесса в качестве криопротекторов использовали обезжиренное молоко (в качестве стандартной защитной среды) и гидролизат пшеничной муки, полученный обработкой панкреатином в определенных ранее оптимизированных условиях, без отделения твердой фазы. Было сделано предположение, что содержащиеся в гидролизате пептиды, крахмал и декстрины, а также пребиотические вещества (арабиноксиланы), могут способствовать повышению выживаемости культуры в процессе лиофильной

сушки. Данные о выживаемости бифидобактерий в различных криопротекторах после лиофилизации представлены в таблице 3.2.4.1.

Таблица 3.2.4.1.

Начальное количество живых клеток и показатель выживаемости культуры *B. adolescentis*, лиофильно высушенной с различными криопротекторами

Криопротектор	Количество живых клеток (КОЕ)		Выживаемость, %	Количество живых клеток после высушивания, КОЕ/г
	до	после		
–	$1,2 \times 10^{12}$	$3,2 \times 10^{11}$	26,8	$2,30 \times 10^{10}$
Обезжиренное молоко	$6,0 \times 10^{11}$	$5,6 \times 10^{11}$	93,3	$1,24 \times 10^{10}$
Гидролизат муки	$6,0 \times 10^{11}$	$5,4 \times 10^{11}$	90,0	$1,00 \times 10^{10}$

Сохранение жизнеспособности бифидобактерий без использования защитной среды для лиофильного высушивания составляло 26,8 %. Показатели выживаемости бифидобактерий в гидролизате пшеничной муки и обезжиренном молоке были близки и составляли около 90%. По внешнему виду оба варианта представляли собой порошок бежевого цвета, растворимый в воде (рисунок 23).

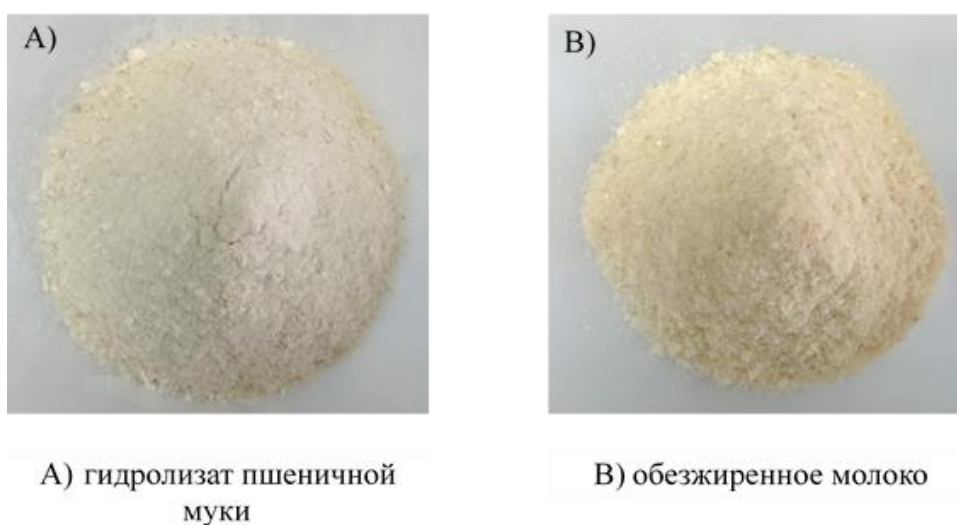


Рисунок 23. Лиофилированная форма функционального ингредиента, содержащего бифидобактерии

Исследование стабильности жизнеспособности бифидобактерий в сухих лиофилизированных формах в условиях длительного хранения при температуре от +3 до +6 °С показало, что скорость гибели микроорганизмов в гидролизате муки была сопоставима со скоростью гибели в обезжиренном молоке (0,13 log КОЕ/мес).

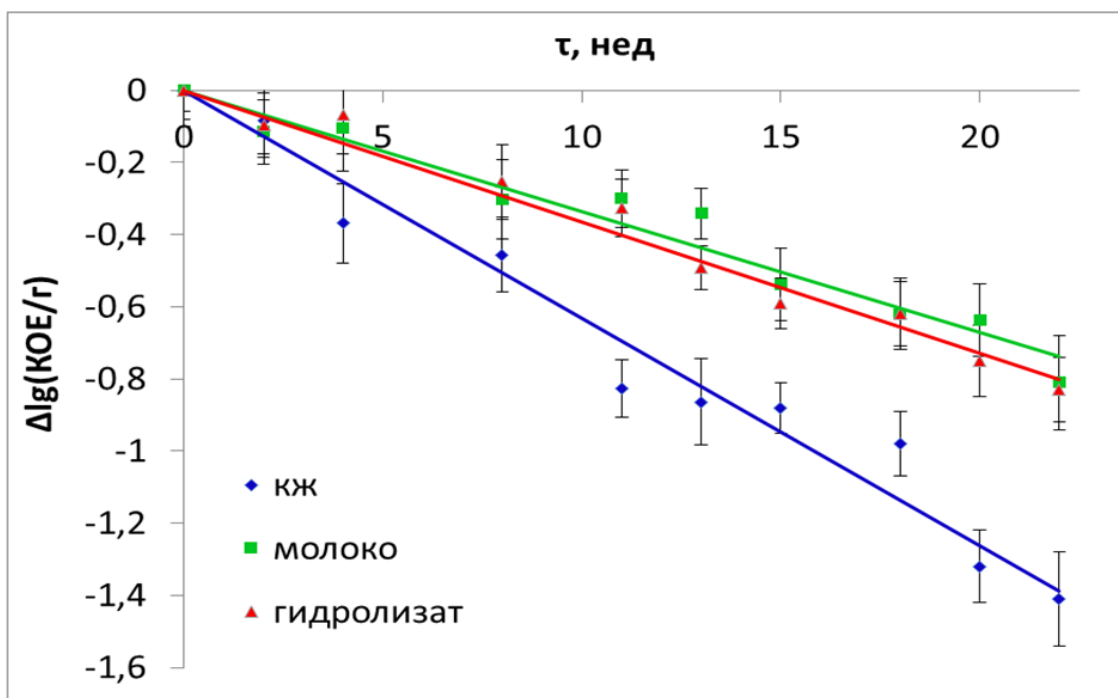


Рисунок 24. Влияние криопротектора на выживаемость бифидобактерий при длительном хранении при температуре от +3 до +6 °С

Таким образом, гидролизат пшеничной муки, полученный при обработке панкреатином, использованный в качестве криопротектора при лиофильном высушивании бифидобактерий, по свойствам не уступает одному из наиболее распространенных протекторов – обезжиренному молоку, и его применение является достаточно перспективным.

3.2.5. Оценка пригодности питательной среды на основе гидролизата пшеничной муки для роста различных видов бифидобактерий

Для оценки пригодности белковых гидролизатов пшеничной муки, полученных с использованием панкреатина в оптимизированных условиях, как основного источника азота в составе питательной среды MRS-C и их

способности обеспечивать питательные потребности пробиотических микроорганизмов, проводили культивирование различных видов бифидобактерий в течение 24 ч без поддержания pH. Результаты эксперимента представлены на рисунке 25.

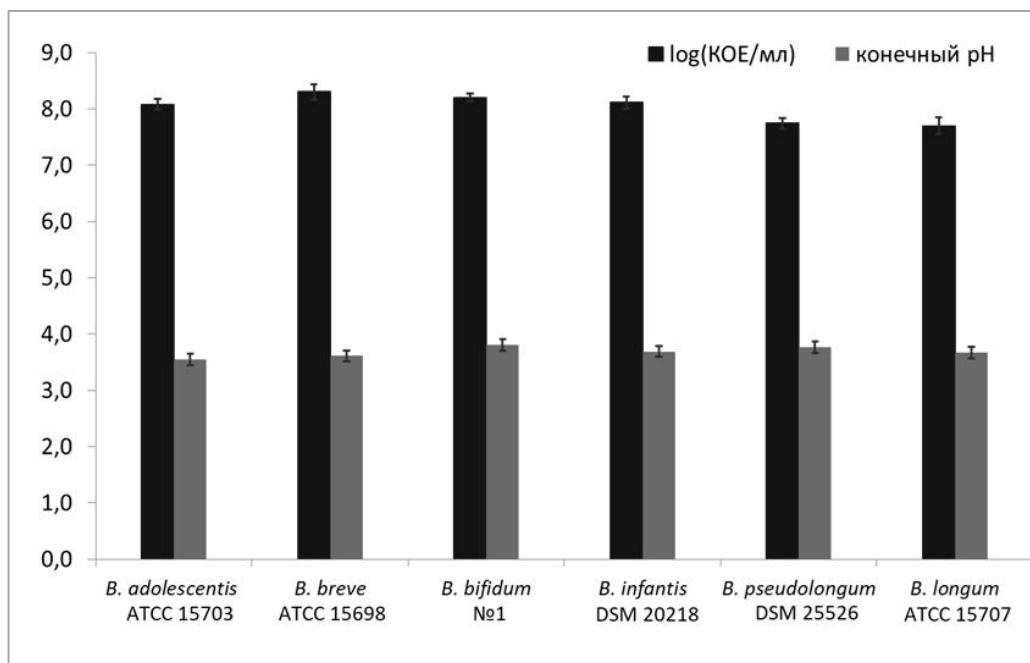


Рисунок 25. Ферментация различных видов *Bifidobacterium* в средах на основе гидролизата пшеничной муки

Было установлено, что наибольшая численность жизнеспособных клеток на конец культивирования наблюдалось у штаммов *B. breve* ATCC 15698, *B. bifidum* №1 и *B. longum infantis* DSM 20218 и составляла около $1,3-2 \times 10^8$ КОЕ/мл. Наименьший конечный титр клеток наблюдался у штаммов *B. pseudolongum* 25526 и *B. longum* ATCC 15707 (около 5×10^7 КОЕ/мл).

Результаты культивирования позволяют предположить, что экспериментальная питательная среда, содержащая панкреатический гидролизат пшеничной муки в качестве основного источника пептидов, обладает высокой питательной ценностью для различных штаммов бифидобактерий, наиболее часто используемых в качестве пробиотиков.

3.2.6. Технологическая схема переработки зерна пшеницы с получением пробиотических функциональных продуктов/добавок питания

На основе полученных данных была разработана принципиальная технологическая схема получения пробиотических функциональных продуктов и добавок (рисунок 26), а также рассчитаны технико-экономические показатели процессов (см. таблицу 3.2.6.1).

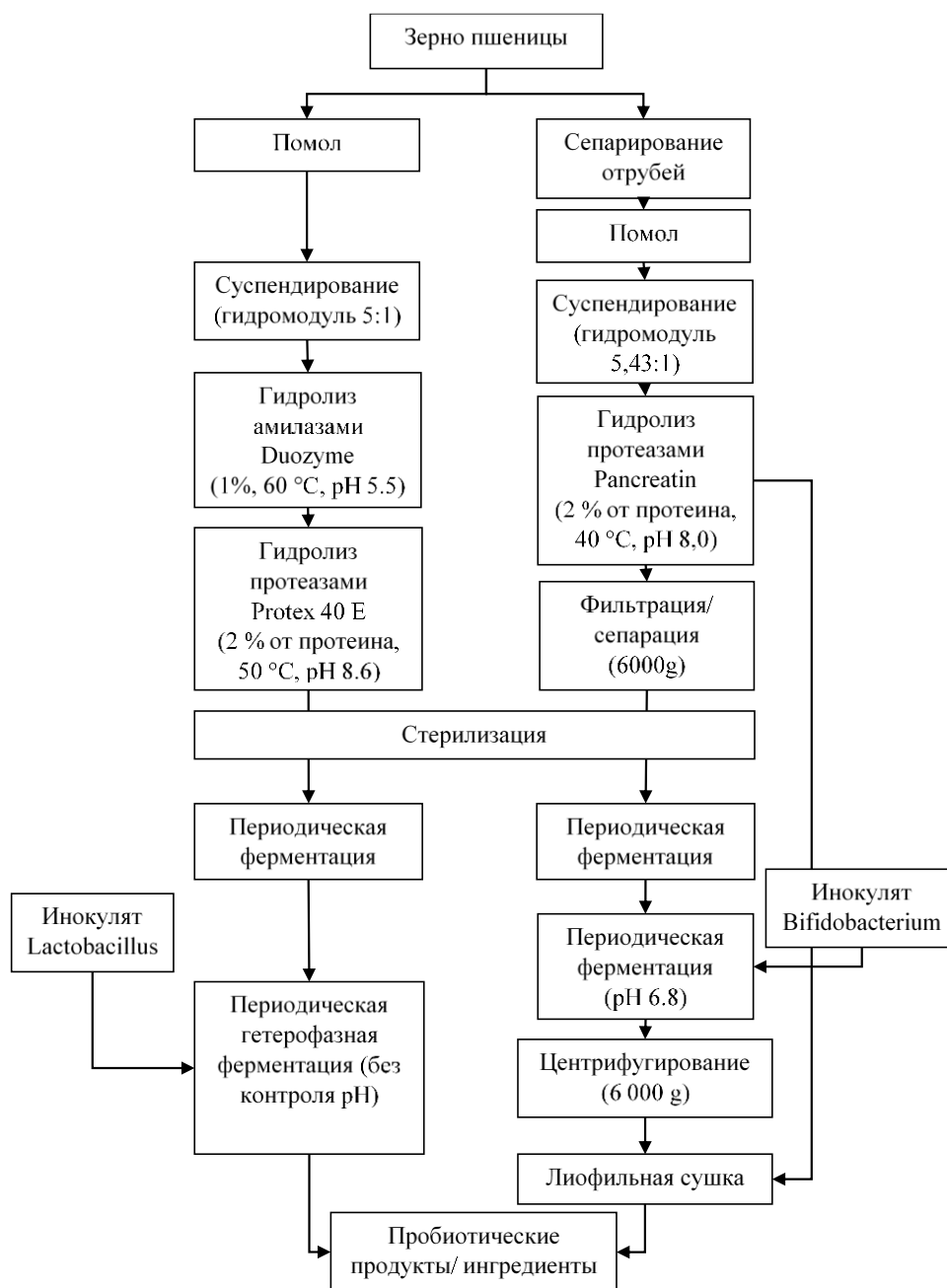


Рисунок 26. Технологическая схема переработки зерна пшеницы в пищевые продукты/ингредиенты, содержащие пробиотики

Таблица 3.2.6.1.

Технико-экономические показатели технологии переработки муки
пшеницы с получением пробиотических продуктов

№ п/п	Наименование показателя	Единица измерения	Значение показателей	
			Напиток	Ингредиент
1.	Годовой выпуск продукции в натуральном выражении	т	600	8,5
2.	Годовой выпуск продукции в денежном выражении	тыс. руб.	120000	340000
3.	Капитальные затраты	тыс. руб.	28509	66672
4.	Полная себестоимость годового выпуска	тыс. руб.	76276	78729
5.	Себестоимость единицы продукции	тыс. руб./т	127,3	9262
6.	Прибыль годовая	тыс. руб.	43724	261270
7.	Рентабельность			
	а) производственных фондов	%	35	89,45
	б) продукции	%	57	331,86
8.	Срок окупаемости капитальных вложений	год	2,6	1,0

3.3. Разработка технологии получения БКД путем микробиологической конверсии пентозановой фракции – побочного продукта переработки пшеницы

3.3.1. Исследование химического состава пентозановой фракции

Любое растительное сырье, используемое как в технических, так и в продовольственных целях подвергается стандартизации по различным отдельным биохимическим показателям – важным для той или иной области. Так, зерно злаковых культур стандартизуется с учетом различных факторов: места произрастания, климата, почвы, сорта и т. д., отражающим его качество. В то же время вторичные продукты его переработки, как правило, не обладают стандартным химическим составом, который может варьироваться в широком диапазоне. Поэтому для правильной постановки микробиологических процессов биконоверсии на первом этапе необходимо определить точный химический состав сырья, так как все микроорганизмы-продуценты чувствительны к сбалансированности состава по основным питательным веществам, в частности источникам углерода и азота.

В работе были использованы образцы различных партий пентозановой фракции – побочного продукта комплексной переработки зерна пшеницы, полученных от ЗАО «Завод Премиксов №1».

Пентозановая фракция представляет собой жидкую фракцию, образуемую на стадии сепарации и отмывки крахмала А и глютена, и содержит в себе крахмал С, некрахмальные полисахариды, мезгу, белковые вещества и т. д. [100]. Таким образом, в составе содержится как пул органических водорастворимых, так и нерастворимых веществ, которые могут представлять питательную ценность для микроорганизмов-продуцентов.

Одним из основных компонентов, обуславливающих проведение процесса биологической конверсии, является углеводная фракция, которая является ценным источником углерода и энергии, обеспечивающим процессы жизнедеятельности дрожжей. Известно, что активность роста дрожжей зависит от качественного состава углеводов и их соотношения с

азотом [159]. В связи с этим были определены значимые для культивирования дрожжей показатели биохимического состава сырья, такие как содержание олиго- и полисахаридов, редуцирующих веществ, качественный состав углеводной фракции, а также содержание сухих и азотистых веществ (таблица 3.3.1.1).

Таблица 3.3.1.1.

Химический состав и основные показатели биотехнологического потенциала пентозановой фракции

Показатель	Значение
Содержание СВ, %	14,04±0,03
в т.ч. в жидкой фазе, %	12,63±0,03
Содержание протеина (N×5,7), %	1,82±0,08
Содержание олиго- и полисахаридов (по мальтодекстрину DE18), %	12,42±0,59
в т.ч. содержание РВ (по глюкозе), %	5,14±0,09
Общее содержание пентозанов (в т.ч. свободные пентозы), %	2,07±0,29
Содержание растворенных пентозанов (в т.ч. свободные пентозы), %	0,75±0,02

В результате было установлено, что основная доля веществ приходится на олиго- и полисахариды. При этом качественная реакция на крахмал с йодом показала его отсутствие в образце, как и продуктов его деполимеризации, таких как амилоза и амилопектин, дающих с йодом также специфическую окраску. Очевидно, основная часть олигосахаридов пентозановой фракции представлены мальтозой, мальтодекстринами и ахродекстринами, которые не окрашивают растворы йода в синий и сине-фиолетовый цвета [160].

При гидролизе пробы пентозановой фракции с 1 н соляной кислотой в течение 40 мин содержание редуцирующих веществ в растворе увеличивалось практически в 3 раза по сравнению с начальным содержанием свободных РВ, что также подтверждало наличие в составе углеводных полимеров.

Исследование качественного углеводного состава гидролизованных проб методом ТСХ показало, что в образце содержались помимо глюкозы, пентозы – ксилоза и арабиноза. При этом в нативном сырье пентозы не

определялись. Таким образом, углеводная фракция пентозанового сырья содержала арабиноксиланы, которые также, как и продукты частичной деполимеризации крахмала, гидролизовались в кислых условиях до моносахаридов (Приложение 1).

Анализ состава углеводов пентозановой фракции методом ВЭЖХ показал, что в негидролизованном сырье концентрация ксилозы составляла 7,8 г/л, глюкозы – 23,8 г/л, мальтозы – 6,9 г/л, галактозы – 1,8 г/л, сахарозы – 1,6 г/л (Приложение 2).

Азотный компонент в пентозановой фракции представлен органическими белками (до 24 г/л по Лоури), что осложняет его использование для питания дрожжей и требует введения в среду дополнительного минерального источника азота.

Таким образом, в результате проведенного анализа был определен биотехнологический потенциал пентозановой фракции. Установлено, что для дальнейшего подбора микроорганизмов-продуцентов белка и наиболее эффективного использования сырья необходимо применять штаммы микроорганизмов, способных утилизировать не только глюкозу, но и ксилозу и арабинозу. При этом также необходимо подобрать минеральный состав, который сможет обеспечить питательные потребности микроорганизмов в азоте.

3.3.2. Скрининг штаммов дрожжей для биоконверсии пентозановой фракции

Анализ качественного углеводного состава сырья показал, что помимо глюкозы в нем присутствовали еще ксилоза и арабиноза. Поэтому подбор микроорганизмов-продуцентов для биоконверсии пентозановой фракции осуществляли в два этапа: 1) по способности дрожжей метаболизировать не только гексозы, но и пентозы; 2) по конечному количеству клеток дрожжей в глубинной культуре на питательной среде с пентозановой фракцией.

Из литературных данных известно, что способность метаболизировать пентозы, широко распространена среди различных видов дрожжей, и

наибольшей активностью обладают дрожжи рода *Candida* [161]. Первичный скрининг на агаризованных питательных средах, содержащих в качестве единственного источника углерода ксилозу или арабинозу, проводили среди штаммов микроорганизмов, отобранных из коллекций кафедры биотехнологии РХТУ им. Д. И. Менделеева (7 штаммов) и ВКПМ (10 штаммов) с помощью игольчатого репликатора. Активность культуры в отношении углеводного субстрата оценивали после 7 суток культивирования по визуализации колоний: «+» - наличие роста, «-» - отсутствие роста. В качестве стандарта использовали штамм *Saccharomyces cerevisiae* (РХТУ), у которого, как известно [162], отсутствует способность усваивать ксилозу и арабинозу. Результаты исследования представлены в таблице 3.3.2.1.

Таблица 3.3.2.1.

Скрининг штаммов микроорганизмов для биоконверсии пентозановой фракции по способности метаболизировать ксилозу и арабинозу

Культура	Ксилоза	Арабиноза
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , РХТУ	-	-
<i>Pichia membranifaciens</i> , РХТУ	-	-
<i>Rhodotorula glutinis</i> , РХТУ	-	-
<i>Candida tropicalis</i> , РХТУ	+	+
<i>Candida utilis</i> , РХТУ	+	-
<i>Candida maltosa</i> , РХТУ	+	+
<i>Candida guilliermondii</i> , РХТУ	+	-
<i>Pichia fermentans</i> , ВКПМ Y-264	-	+
<i>Pichia guilliermondii</i> , ВКПМ Y-780	+	+
<i>Leucosporidium scottii</i> ОН-1, ВКПМ Y-796	+	+
<i>Leucosporidium scottii</i> кс-1, ВКПМ Y-246	+	-
<i>Leucosporidium scottii</i> кс-2, ВКПМ Y-247	+	-
<i>Leucosporidium scottii</i> , ВКПМ Y-1537	+	-
<i>Candida utilis</i> VSB-651, ВКПМ Y-277	-	+
<i>Candida utilis</i> P-1, ВКПМ Y-13	+	-
<i>Candida utilis</i> , ВКПМ Y-3348	+	+
<i>Candida utilis</i> К-83, ВКПМ Y-624	+	-

В результате для дальнейших исследований с учетом способности метаболизировать ксилозу и арабинозу были отобраны 5 штаммов дрожжей:

C. tropicalis (РХТУ), *P. guilliermondii* (ВКПМ), *L. scottii* ОН-1 (ВКПМ), *C. maltosa* (РХТУ), *C. utilis* Y-3348 (ВКПМ). Стоит отметить, что визуализация колоний штаммов *C. utilis* Y-3348 и *L. scottii* ОН-1 на агаризованной среде с пентозами происходила уже на вторые сутки роста.

На втором этапе осуществляли культивирование отобранных штаммов на питательных средах с пентозановой фракцией в глубинной культуре и проводили сравнительное исследование динамики роста и потребления углеводов с целью отбора микроорганизмов с наибольшим накоплением биомассы и продуктивностью после 7 суток роста (таблица 3.3.2.2).

Таблица 3.3.2.2.

Глубинное культивирование отобранных штаммов в питательных средах с пентозановой фракцией

Штамм	Источник углеводов	Накопление биомассы, млн. кл./мл, потребление субстрата, г/л, при продолжительности культивирования, час						Продуктивность, г биом./ (л*ч)
		0	24	48	72	144	168	
1	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>C. tropicalis</i>	ПФ	1,2±0,2	193,8±32,9	205,2±34,9	225,3±38,3	359,0±61,0	314,0±53,4	0,05
		24,8±0,3	7,9±0,2	6,0±0,1	5,9±0,1	6,1±0,1	6,1±0,1	
<i>C. maltosa</i>	ПФ	1,3±0,2	47,5±8,1	181,3±30,8	188,3±32,0	235,4±40,0	204,7±34,8	0,04
		24,9±0,3	12,3±0,2	9,1±0,1	9,4±0,1	9,6±0,1	9,6±0,1	
<i>P. guilliermondii</i>	ПФ	2,5±0,4	109,7±18,6	171,9±29,2	159,4±27,1	225,3±38,3	245,0±41,7	0,04
		24,0±0,3	23,8±0,3	20,8±0,3	19,6±0,3	16,5±0,2	15,1±0,2	
<i>L. scottii</i>	ПФ	2,5±0,4	79,4±13,5	304,7±51,8	509,4±86,6	875,0±148,8	912,5±155,1	0,08
		26,9±0,4	25,6±0,3	20,2±0,3	12,2±0,2	13,1±0,3	6,2±0,2	
<i>C. utilis</i>	ПФ	2,5±0,4	156,3±26,6	393,8±66,9	512,5±87,1	787,5±133,9	1068,8±181,7	0,15
		24,0±0,3	20,6±0,3	11,8±0,2	11,0±0,2	8,3±0,1	6,9±0,1	

Наибольшую степень потребления углеводов из питательной среды с пентозановой фракцией наблюдали у дрожжей *C. tropicalis*, *L. scottii* ОН-1, *C. utilis* Y-3348, а максимальную концентрацию клеток у – *L. scottii* ОН-1 и *C. utilis* Y-3348.

С целью возможности повышения утилизации углеводов и продуктивности культивирования по биомассе провели исследования по сравнению показателей отдельного и совместного культивирования дрожжей *L. scottii* ОН-1 и *C. utilis* Y-3348. Установлено, что при совместном культивировании содержание клеток спустя 48 ч было выше, как и степень потребления углеводов. Результаты представлены в таблице 3.3.2.3.

Таблица 3.3.2.3.

Результаты исследования отдельного и совместного культивирования дрожжей в питательных средах с пентозановой фракцией

Культура	<u>Накопление биомассы, млн. кл./ мл,</u> <u>концентрация РВ, г/л,</u> <u>концентрация углеводов по Бертрану-Шорлю, г/л,</u> при продолжительности культивирования, час			
	0	24	36	48
<i>Leucosporidium scottii</i>	9,0±0,3	310,3±42,3	751,9±111,2	869,0±145,2
	11,1±0,3	7,2±0,3	4,8±0,1	4,0±0,2
	32,5±0,4	31,7±0,2	19,5±0,3	19,2±0,3
<i>Candida utilis</i>	8,7±0,6	276,3±39,5	655,9±97,1	765,2±132,6
	11,3±0,2	7,4±0,1	3,9±0,1	3,6±0,1
	32,5±0,3	30,7±0,3	18,0±0,2	17,8±0,2
Смешанная культура дрожжей	16,2±0,5	325,0±56,5	920,2±153,3	982,5±161,8
	11,3±0,2	9,1±0,2	3,6±0,1	2,5±0,1
	32,5±0,3	34,3±0,3	17,2±0,2	16,3±0,2

На основании анализа результатов исследований по совокупности факторов, определяющих эффективность биоконверсии пентозановой

фракции, таких как накопление биомассы, степень потребления углеводов, способность метаболизировать ксилозу и арабинозу, для дальнейшей работы были отобраны штаммы *L. scottii* ОН-1 и *C. utilis* Y-3348 для культивирования в смешанной культуре.

3.3.3. Исследование способов предварительной обработки пентозановой фракции для повышения эффективности ее биоконверсии дрожжами

По результатам анализа химического состава пентозановой фракции было установлено, что существенная доля углеводов в ней представлена в виде биополимеров (более 50%). Одним из способов интенсификации процесса ферментаций является предварительная обработка сырья, которая повышает биодоступность субстрата для микробной культуры.

Исходя из литературных данных, наиболее часто используемыми способами деполимеризации углеводов растительного сырья является гидролиз минеральными кислотами, а также ферментами. На первом этапе исследовали гидролиз пентозановой фракции в составе питательной среды серной кислотой. При этом эффективность кислотного гидролиза оценивали по таким критериям, как выход РВ, степень гидролиза олиго- и полисахаридов, а также по накоплению биомассы дрожжей *L. scottii* ОН-1 и *C. utilis* Y-3348 в смешанной культуре, как показателю биологической ценности получаемых гидролизатов.

Гидролиз серной кислотой проводили в течение 30 мин при различных значениях рН и температуре 116 °С. В качестве контрольного образца использовали питательную среду без добавления кислот (рН 5,0), обработанную в тех же условиях. Результаты гидролиза представлены на рисунке 27.

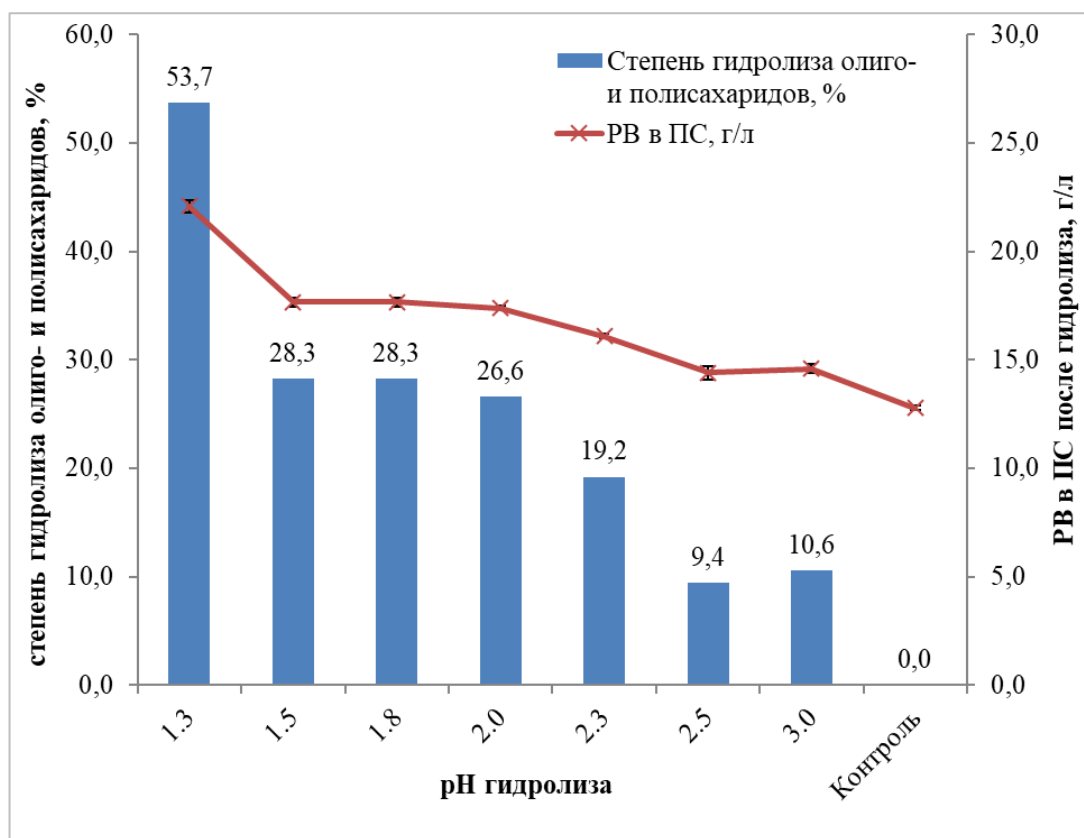


Рисунок 27. Гидролиз питательной среды на основе пентозановой фракции серной кислотой

Установлено, что гидролиз питательной среды на основе пентозановой фракции серной кислотой позволял увеличить начальное содержание РВ в питательной среде (при рН 1,3 концентрация РВ увеличивалась в 1,7 раз по сравнению с контролем). Заметная деполимеризация углеводов начиналась при рН ниже 2,3, причем резкое увеличение выхода РВ наблюдали при наиболее кислом значении рН – 1,3. В то же время полного гидролиза углеводной фракции не происходило.

Результаты оценки биологической ценности гидролизатов и влияния кислотности на качество получаемого субстрата представлены в таблице 3.3.3.1. Накопление биомассы дрожжей спустя 168 ч ферментации было значительным на необработанной питательной среде, а остаточное содержание РВ наименьшим (рисунок). Вероятно, предварительная обработка кислотой при рН ниже 1,8 приводила к образованию побочных продуктов, ингибирующих рост дрожжей.

Таблица 3.3.3.1.

Влияние рН гидролиза серной кислотой пентозановой фракции
на рост смешанной культуры дрожжей

рН гидролиза	Накопление биомассы, млн. кл. / мл, концентрация РВ, г/л, концентрация углеводов по Бертрану-Шорлю, г/л, при продолжительности культивирования, час					
	0	24	48	120	144	168
1,3	9,0±0,4	203,4±31,9	522,9±87,8	848,8±152,3	850,9±154,6	770,0±132,9
	22,1±0,2	17,2±0,2	12,3±0,2	3,0±0,1	3,0±0,1	3,1±0,1
	30,4±0,3	25,5±0,3	20,2±0,2	11,0±0,2	9,7±0,2	8,4±0,2
1,5	9,0±0,4	158,4±28,3	592,2±91,2	955,0±145,2	934,1±138,1	875,0±149,7
	17,7±0,3	12,8±0,1	9,9±0,2	2,9±0,1	2,9±0,1	2,9±0,1
	30,4±0,4	25,2±0,3	22,2±0,3	15,4±0,3	13,4±0,3	11,5±0,2
1,8	9,0±0,5	198,8±35,2	751,6±131,0	875,0±149,0	966,9±138,3	945,0±146,1
	17,7±0,3	12,8±0,1	8,7±0,2	2,6±0,1	2,7±0,1	2,8±0,1
	30,4±0,4	25,3±0,2	20,7±0,3	15,0±0,3	13,5±0,2	11,9±0,2
2,0	9,0±0,4	225,9±38,2	756,3±133,5	875,0±151,1	918,8±156,1	934,1±159,2
	17,4±0,2	12,5±0,2	9,5±0,3	2,5±0,1	2,5±0,1	2,6±0,1
	30,4±0,2	25,0±0,3	22,1±0,3	15,2±0,3	13,6±0,2	12,0±0,2
2,3	9,0±0,4	188,4±32,3	748,2±137,4	916,6±156,7	905,6±147,9	893,8±137,3
	16,1±0,2	11,2±0,2	8,8±0,2	2,3±0,1	2,2±0,1	2,2±0,1
	30,4±0,3	25,1±0,3	24,4±0,3	16,3±0,3	14,2±0,3	12,1±0,2
2,5	9,0±0,4	171,6±28,9	634,4±95,2	846,6±139,2	834,7±127,5	826,9±143,6
	14,4±0,3	9,5±0,1	7,3±0,1	2,3±0,1	2,2±0,1	2,0±0,2
	30,4±0,3	25,4±0,3	21,2±0,2	18,0±0,2	15,0±0,3	12,1±0,2
3,0	9,0±0,4	205,3±36,7	635,9±97,1	940,6±147,8	1039,1±168,2	998,4±167,1
	14,6±0,3	9,7±0,2	7,2±0,2	2,3±0,1	2,1±0,1	1,9±0,1
	30,4±0,3	25,2±0,3	22,4±0,3	17,8±0,3	15,0±0,3	12,1±0,2
контроль	9,0±0,4	300,0±49,9	903,1±151,2	1065,0±176,2	1100,3±179,2	1095,6±181,2
	12,8±0,2	7,9±0,1	4,9±0,1	2,2±0,2	1,9±0,1	1,7±0,1
	30,4±0,3	25,0±0,2	16,4±0,3	11,4±0,2	11,6±0,3	11,8±0,3

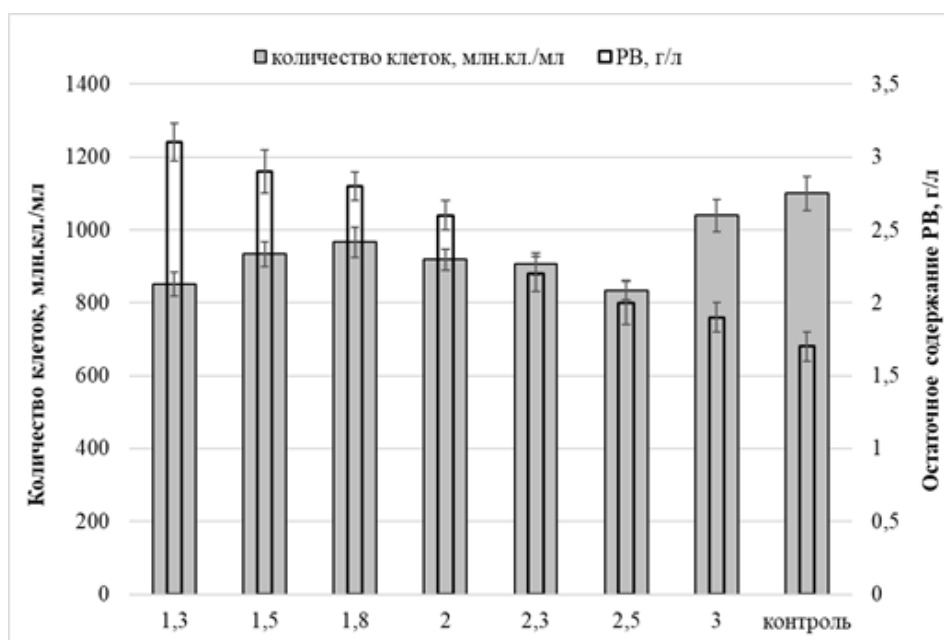


Рисунок 28. Рост дрожжей на гидролизатах питательной среды на основе пентозановой фракции

Ростовые характеристики гидролизатов, полученных при различных значениях рН, такие как накопление биомассы дрожжей, степень потребления РВ практически не отличались от контроля. Степень потребления пентозанов возрастала незначительно.

Таблица 3.3.3.2.

Влияние кислотности гидролиза на потребление углеводов пентозановой фракции дрожжами (168 ч)

рН гидролиза	1.3	1.5	1.8	2.0	2.3	2.5	3.0	Контроль
Степень потребления РВ, %	85,9	83,3	84,2	85,3	84,7	87,3	87,4	86,8
Степень потребления углеводов по Бертрану-Шорлю, %	72,1	61,8	60,5	60,3	59,7	59,7	59,7	60,8
Пентозаны по Дугласу, г/л	-	-	2,6	-	-	-	2,7	3,0
Степень потребления пентозанов, %	-	-	49,8	-	-	-	47,8	42,0

Таким образом, применение гидролиза серной кислотой для предварительной обработки пентозановой фракции и интенсификации процесса биоконверсии является нецелесообразным.

Исходя из полученных результатов по характеристикам роста дрожжей на кислотных гидролизатах пентозановой фракции, на которые отрицательно повлияли высокая температура и низкое значение рН, на следующем этапе был исследован ферментативный гидролиз углеводов, который был проведён с помощью с гемицеллюлаз и ксиланаз в более мягких условиях, не приводящим к образованию побочных продуктов. Эффективность гидролиза оценивали по выходу редуцирующих веществ, степени гидролиза, а также по ростовым характеристикам смешанной культуры (накопление биомассы, степень утилизации субстрата).

В результате установлено, что увеличение выхода РВ при обработке арабиноксиланов ферментами было незначительным и не превышало 15%.

Таблица 3.3.3.3.

Гидролиз ПС на основе пентозановой фракции ферментными препаратами

Ферментный препарат	Viscoferm	Cellic CTec	Целловиридин	Veron 393	Veron SX	Rohalase
РВ в ПС после гидролиза, г/л	16,8	17,1	16,4	16,9	17,7	17,5
Степень гидролиза олиго- и полисахаридов, %	17,2	11,6	15,7	15,7	25,5	14,3
Пентозаны по Дугласу, г/л	3,0	2,8	2,8	2,8	2,4	2,8
Прирост концентрации пентозанов в среде, %	13,4	8,2	8,4	6,2	1,8	8,9

Лучшие результаты по экстракции пентозанов из твердой фазы в раствор и выходу мономеров – ксилозы и арабинозы, показали ферментные препараты Viscoferm, Cellic CTec, Целловиридин. Однако конечная

концентрация РВ в питательных средах была ниже, чем в результате кислотного гидролиза.

Для культивирования смешанной культуры дрожжей использовали только питательные среды, полученные обработкой ФП Viscoferm, Cellic СТес, Целловиридин. Результаты представлены в таблице.

Таблица 3.3.3.4.

Влияние условий ферментативной обработки на рост дрожжей при глубинном культивировании в ПС на основе пентозановой фракции

Ферментный препарат	<u>Накопление биомассы, млн. кл. / мл,</u> <u>концентрация РВ, г/л,</u> <u>концентрация углеводов по Бертрану-Шорлю, г/л,</u> <u>при продолжительности культивирования, час</u>					
	0	24	48	120	144	168
Viscoferm	9,0±0,4	337,5±56,2	457,8±74,5	920,3±157,6	910,0±154,8	1065,0±185,1
	12,8±0,2	11,3±0,2	8,3±0,2	3,1±0,1	н/о ¹	н/о
	30,4±0,3	28,6±0,3	28,1±0,3	14,7±0,3	12,9±0,2	12,9±0,2
Cellic НТес2	9,0±0,4	298,4±47,5	475±75,1	756,6±128,9	945±173,3	970±183,4
	12,8±0,2	11,6±0,2	5,9±0,1	2,5±0,2	н/о	н/о
	30,4±0,3	28,6±0,3	26,9±0,3	12,9±0,3	13,1±0,2	12,6±0,3
Целловиридин	9,0±0,4	360,9±53,1	662,5±94,2	845,3±140,8	1095±187,9	1046,7±184,4
	12,8±0,2	12,3±0,3	7,9±0,1	2,5±0,1	н/о	н/о
	30,4±0,3	30,2±0,4	29,2±0,2	14,7±0,2	13,2±0,3	13,3±0,2
Контроль	9,0±0,4	329,7±47,8	715,6±113,2	984,4±176,1	1125±196,1	1162,5±194,2
	12,8±0,2	11,4±0,2	6,3±0,2	н/о	н/о	н/о
	30,4±0,3	29,3±0,3	25,2±0,3	14,1±0,2	13,4±0,3	12,9±0,2

Примечания

1 – ниже предела чувствительности метода

Анализ результатов показал, что накопление биомассы на 7-е сутки культивирования был выше на непродобработанной питательной среде.

Следовательно, применение ферментативного гидролиза не оказало существенного влияния на содержание дрожжей.

Таким образом, ни кислотный гидролиз, ни обработка гемицеллюлазами не оказали существенного влияния на повышение биодоступности пентозановой фракции. Целесообразно проводить разработку технологических операций культивирования дрожжей на необработанном сырье.

3.3.4. Подбор минерального состава питательной среды с пентозановой фракцией

В предыдущих исследованиях для культивирования дрожжей использовали минеральный состав стандартной питательной среды следующего состава (г/л):

– аммоний сернокислый	3,5
– аммоний фосфорнокислый однозамещенный	0,8
– калий хлористый	0,5
– магний сернокислый 7-водный	0,25
– железо (II) сернокислое 7-водное	0,15
– цинк сернокислый 7-водный	0,015
– марганец (II) сернокислый 5-водный	0,015

При разработке крупнотоннажных микробиологических производств важной задачей является сокращение расхода минеральных компонентов, которые влияют на структуру себестоимости. Из литературных данных известно, что добавление солей аммония, калия, сульфатов и фосфатов в питательные среды на основе гидролизатов древесины обеспечивало активный рост дрожжевых культур [162]. В работе для культивирования дрожжей на питательной среде на основе гидролизата муки использовали только сульфат аммония в количестве 1-3 г/л [163].

Таким образом, для исследования были выбраны три варианта среды:

а) среда, содержащая 4,5 г/л сульфата аммония и 2 г/л фосфат калия (по [162]);

б) среда, содержащая 2 г/л сульфата аммония (по [163]);

в) среда без дополнительного внесения солей.

В качестве контроля использовали питательную среду полного состава. Результаты культивирования представлены в таблице.

Таблица 3.3.4.1.

Влияние состава питательной среды на рост дрожжей при глубинном культивировании в ПС на основе пентозановой фракции

Состав среды	Накопление биомассы, млн. кл./мл, концентрация РВ, г/л, концентрация углеводов по Бертрану-Шорлю, г/л, при продолжительности культивирования, час					Степень потребления углеводов, %
	0	24	48	120	144	
Без солей	93±05	216,7±40,1	450,0±73,2	660,0±95,3	648,8±98,9	42,7
	11,3±02	7,7±03	4,5±02	1,9±0,1	н/о ¹	
	32,5±03	30,9±04	23,8±03	20,1±02	18,6±02	
(NH ₄) ₂ SO ₄ 2 г/л	93±04	362,5±62,1	963,8±169,2	1177,5±186,3	1185,0±184,2	57,6
	11,1±02	7,2±02	н/о	н/о	н/о	
	32,5±03	31,7±03	15,7±03	15,6±03	13,8±03	
(NH ₄) ₂ SO ₄ 4,5 г/л KH ₂ PO ₄ 2 г/л	93±04	248,2±42,3	1001,3±177,8	1123,1±178,2	1115,0±187,1	57,1
	11,3±02	7,4±02	н/о	н/о	н/о	
	32,5±03	30,7±03	15,8±03	13,7±03	13,9±02	
Контроль (полная среда)	93±04	345,3±61,2	982,5±173,2	1075,0±170,9	1062,5±169,3	57,9
	11,3±02	7,9±02	н/о	н/о	н/о	
	32,5±04	34,3±03	16,1±03	14,5±03	13,7±03	

Примечания

1 – ниже предела чувствительности метода

Сравнение концентрации дрожжей спустя 6 суток культивирования на средах с различным минеральным составом показало, что по накоплению биомассы и потреблению субстрата существенных различий между ними не наблюдали. Наименьшей биологической ценностью обладала питательная среда без минеральных компонентов. Таким образом, целесообразно проводить культивирование смешанной культуры дрожжей на питательной среде с пентозановой фракцией пшеницы, содержащей в качестве единственного минерального компонента сульфат аммония в концентрации 2 г/л.

3.3.5. Изучение и подбор режима культивирования смешанной культуры дрожжей на питательной среде с пентозановой фракцией

Для интенсификации процесса биоконверсии с получением высокого выхода биомассы дрожжей и конечного продукта с наилучшими физико-химическими показателями проводили изучение и подбор режимов культивирования смешанной культуры дрожжей *C. utilis* и *L. scottii* при глубинном гетерофазном культивировании на необработанных питательных средах оптимизированного состава с пентозановой фракцией. На первом этапе были изучены кинетика роста и потребление субстрата в условиях периодического культивирования. Начальное содержание клеток составляло 47,8 млн. кл. / мл. В результате была получена кривая роста смешанной культуры дрожжей *C. utilis* и *L. scottii* (рисунок 29) и определены основные ростовые характеристики (таблица 3.3.5.1).

Таблица 3.3.5.1.

Ростовые характеристики смешанной культуры дрожжей *C. utilis* и *L. scottii* на питательных средах с пентозановой фракцией

Параметры культивирования	Пентозан-содержащее сырье
Длительность лаг-фазы, ч	8 ч
Удельная скорость роста, ч ⁻¹	0,17 ч ⁻¹
Степень потребления субстрата, %	61 %

Анализ кривой роста показал, что удельная скорость роста смешанной культуры дрожжей составляла $0,17 \text{ ч}^{-1}$. Снижение концентрации редуцирующих веществ и олиго- и полисахаридов по Бертрану-Шорлю происходило практически идентично. Из результатов видно, что преимущественно дрожжи потребляли редуцирующие вещества, поэтому можно предположить, что ферментативные системы для активного потребления сложных олиго- и полисахаридов зернового сырья у них отсутствуют.

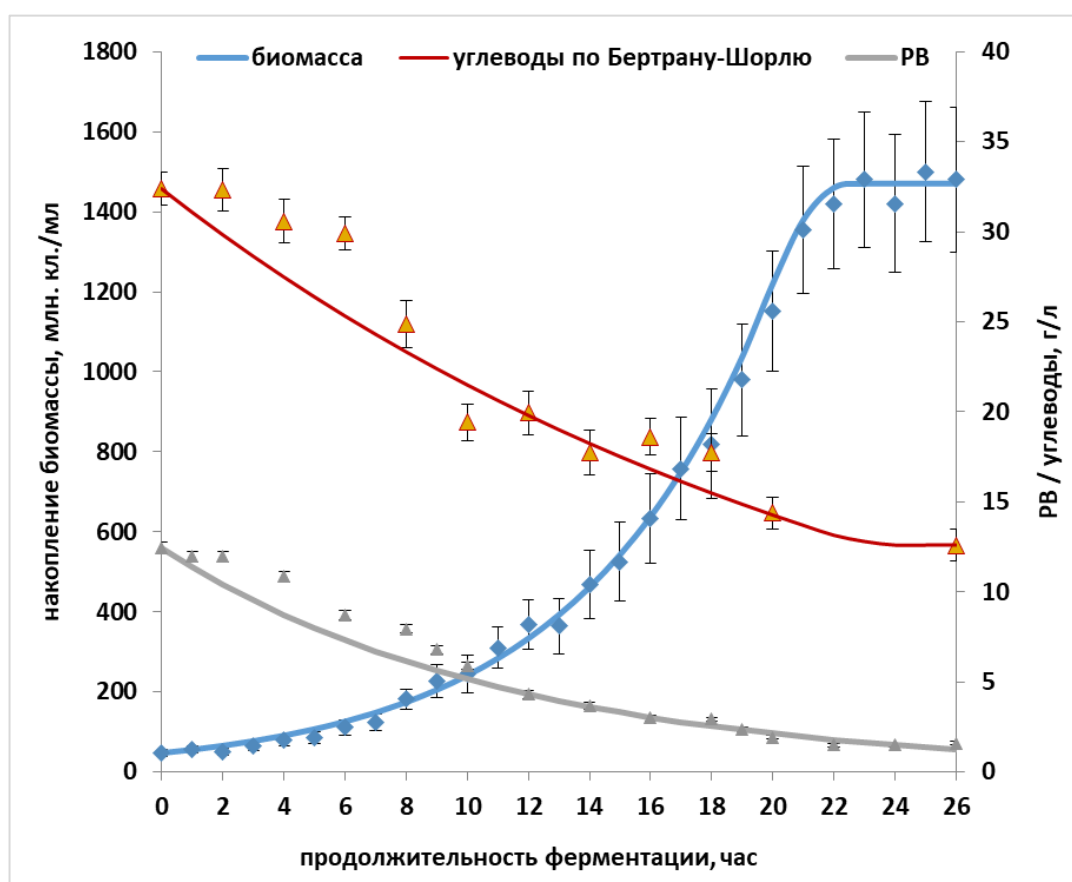


Рисунок 29. Кинетика роста смешанной культуры дрожжей на оптимизированных питательных средах с пентозан-содержащим сырьем

Для повышения продуктивности процесса в результате увеличения удельной скорости роста, а также степени потребления субстрата с наиболее полной биоконверсией растительного сырья проводили обработку поли- и олигосахаридов пентозановой фракции амилолитическим ферментным препаратом Duozyme (Novozymes), содержащим глюкоамилазу и α -амилазу.

Ранее было установлено, что для культивирования дрожжей сахаромисетов на суспензиях муки зерновых культур оптимальной дозой ферментного препарата для культивирования являлся 1 % от массы сухого вещества в сырье [164]. В связи с этим для культивирования смешанной культуры дрожжей в отъемно-доливном и непрерывном режимах в питательную среду вносили амилолитический ферментный препарат в дозировке 1% от содержания сухого вещества в пентозановой фракции.

Культивирование в отъемно-доливном режиме проводили при разбавлениях, соответствующих скоростям протока: $0,22 \text{ ч}^{-1}$, $0,27 \text{ ч}^{-1}$ и $0,32 \text{ ч}^{-1}$. Всего было проведено 4 цикла отъема-долива. Результаты культивирования представлены на рисунке 30.

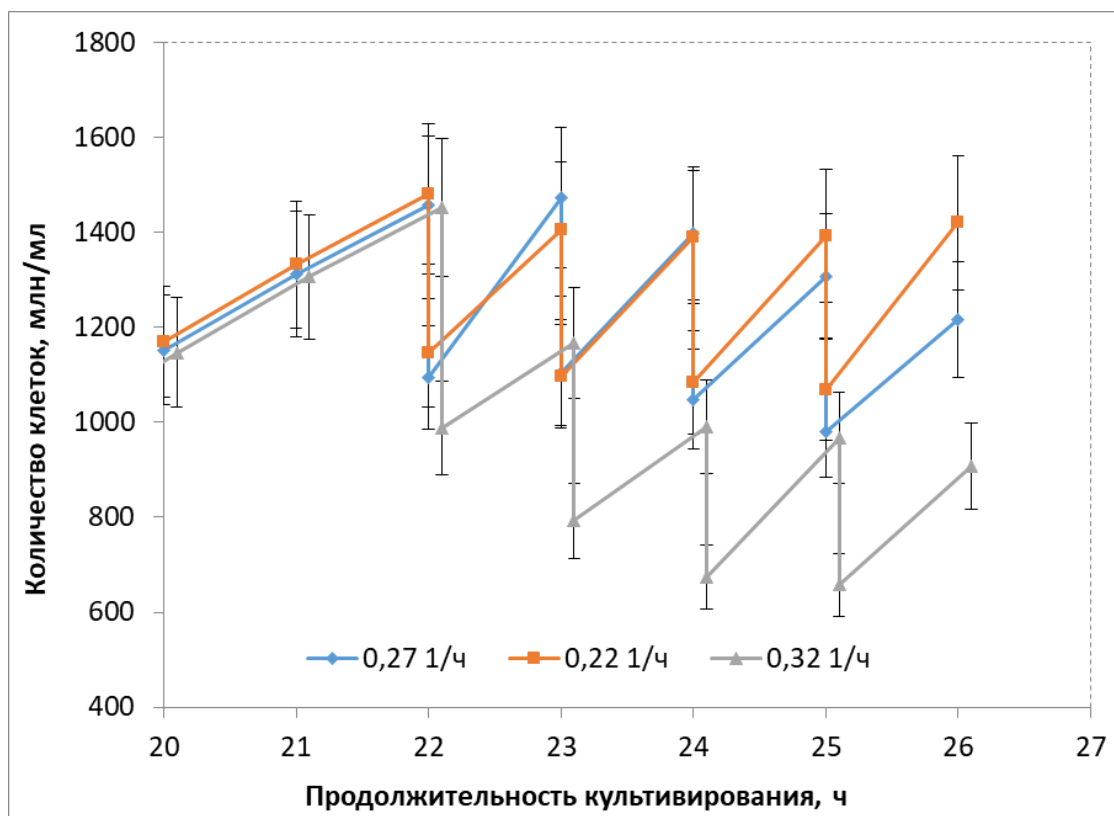


Рисунок 30. Культивирование смешанной культуры дрожжей на питательной среде с пентозан-содержащим сырьем в отъемно-доливном режиме с различными скоростями протока

Установлено, что при скоростях протока $0,27$ и $0,32 \text{ ч}^{-1}$ происходило постепенное снижение количества клеток с каждым циклом отъема-долива, в то время как при скорости протока $0,22 \text{ ч}^{-1}$ концентрация клеток дрожжей к

завершению каждого цикла оставалась практически на одном уровне. Исходя из полученных результатов, процесс культивирования в режиме хемостата осуществлялся при скорости протока $0,22 \text{ ч}^{-1}$. Результаты культивирования представлены на рисунке 31.

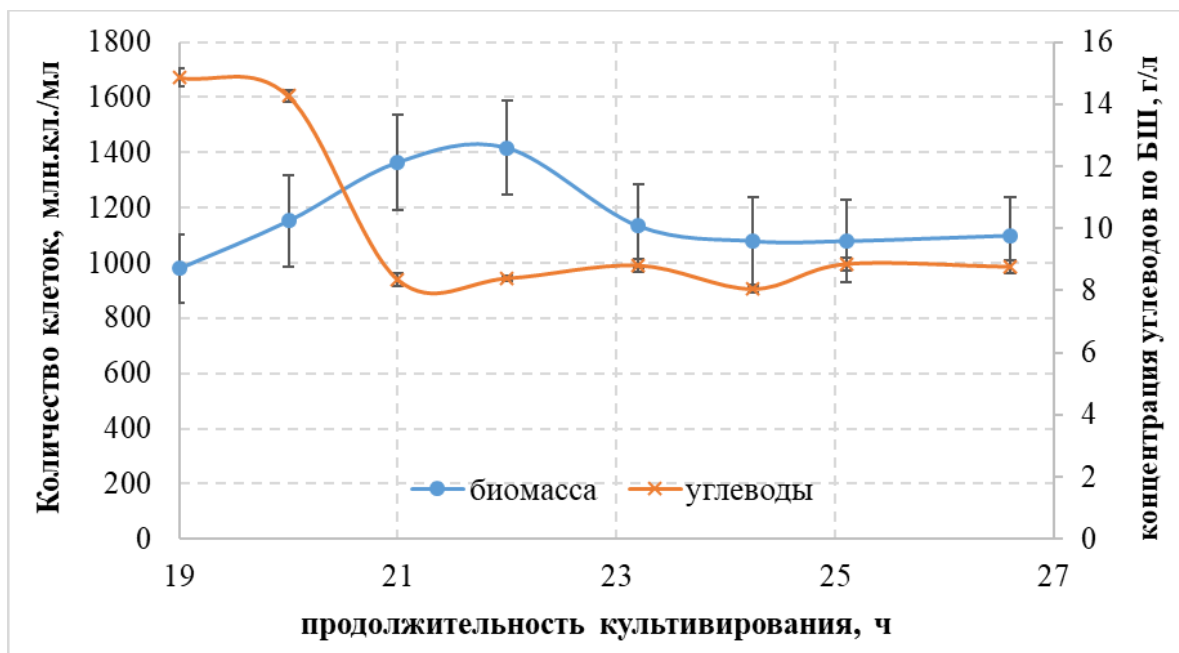


Рисунок 31. Динамика концентрации клеток дрожжей при культивировании на питательной среде с пентозан-содержащим сырьем в режиме хемостата

В результате исследования культивирования смешанной культуры дрожжей на питательной среде с пентозан-содержащим сырьем при скорости протока $0,22 \text{ ч}^{-1}$ наблюдался устойчивый режим, в котором концентрация клеток и углеводов оставалась постоянной.

Сравнительная характеристика режимов культивирования показана в таблице 3.3.5.2.

Таблица 3.3.5.2.

Сравнение показателей различных режимов культивирования смешанной культуры дрожжей в питательной среде с пентозановой фракцией для получения БКД

Показатель	Периодическое культивирование	Непрерывный режим			
		Отъемно-доливной режим со скоростью протока			Хемостат
		0,22 ч ⁻¹	0,27 ч ⁻¹	0,32 ч ⁻¹	
Биомасса дрожжей, г/л КЖ	8,6	9,5	7,9	7,8	10,84
Продуктивность г АСБ/(л·час)	0,39	2,8	2,1	2,5	1,94
Пентозаны по Дугласу, г/л	3,2	2,6	-	-	2,5
Состав БКД					
Сырой протеин, %	51,92	53,42	53,94	52,42	53,84
Сырой жир, %	4,29	9,75	8,75	9,20	8,24

Было установлено, что режим культивирования не оказывал значительного влияния на состав конечного продукта. Содержание сырого протеина в белковой кормовой добавке находилось в интервале от 51,9 до 53,9 %. Однако существенно отличались такие показатели как продуктивность и выход белковой кормовой добавки.

3.3.6. Исследование основных показателей качества и безопасности белковой кормовой добавки

Одним из показателей, определяющих безопасность белковой кормовой добавки, является отсутствие живых клеток продуцента в конечном продукте, которая обеспечивается полной инактивацией дрожжей при тепловой обработке. Определение наличия в продукте живых клеток проводили в соответствии с п. 17 ГОСТ 28178–89 [139]. Установлено, что из всех разведений суспензии белковой кормовой добавки, высеванных на сусло-

агар, роста дрожжей не происходило, что свидетельствовало об отсутствии живых клеток дрожжей.

Исследование биохимического состава и биологической ценности показало, что белковая кормовая добавка характеризовалась высоким содержанием белковых веществ. Содержание сырого протеина в БКД составляло от 54,25 до 56,44%, белка по Барнштейну (истинного белка) – от 45,57 до 47,41%.

Исследования стабильности белковой кормовой добавки по показателям «массовая доля сырого протеина», «массовая доля сырого жира» и «массовая доля нуклеиновых кислот» в течение 6 месяцев в начальной и конечной точке хранения показали, что их значения находились в пределах ошибки метода и не менялись, что в свою очередь свидетельствует о стабильности продукта (таблица 3.3.6.1).

Таблица 3.3.6.1.

Исследование стабильности белковой кормовой добавки

Контролируемый показатель	Продолжительность хранения, мес.	
	0	6
Массовая доля сырого протеина, %	53,4±0,3	54,6±0,3
Массовая доля сырого жира, %	9,8±0,2	9,9±0,1
Массовая доля нуклеиновых кислот, %	4,3±0,2	4,2±0,2

Таким образом, белковая кормовая добавка получаемая биоконверсией пентозановой фракции смешанной культурой дрожжей *C. utilis* и *L. scottii* характеризуется высокой биологической ценностью, сохранением показателей качества в течение срока хранения и отсутствием токсичности.

Исследования по острой и субхронической токсичности, кожно-резорбтивного и аллергенного действия БКД были проведены сторонней организацией – Всероссийским научно-исследовательским институтом ветеринарной санитарии, гигиены и экологии (ФГБНУ «ВНИИВСГЭ»). Были

испытаны дозы – 1,5; 3,0 и 7,0 г/кг массы тела. В результате введения препарата в желудок крысам в указанном диапазоне, гибели животных выявлено не было. Таким образом, дозу – 7,0 г/кг следует считать максимально-переносимой дозой препарата в однократном опыте. Эта доза является и максимально возможной для введения в желудок, так как более высокую дозу ввести затруднительно и не физиологично для животных.

Клиническая картина интоксикации животных в пределах действия доз 1,5 – 7,0 г/кг, не выражена. Все опытные животные были активны, подвижны и практически не отличались от контрольных.

Проведенные исследования по изучению острой токсичности белковой кормовой добавки при ее пероральном введении в максимально возможной дозе показали, что она не вызывала изменения в общем состоянии и поведении животных, а также их гибели. Установлено, что белковая кормовая добавка является малотоксичным веществом. LD₅₀ при пероральном введении рассчитать не удалось из-за отсутствия гибели животных при использовании максимально допустимых объемов.

Таким образом, белковая кормовая добавка, согласно классификации (ГОСТ 12.1.007-76), относится к 4 классу опасности (малоопасное соединение) в условиях перорального введения.

3.3.7. Технологическая схема переработки пентозановой фракции пшеницы с получением белковой кормовой добавки для животных

На основе полученных результатов исследований была разработана принципиальная технологическая схема получения белковой кормовой добавки для животных путем биоконверсии побочного продукта переработки зерна пшеницы – пентозановой фракции, смешанной культурой дрожжей *S. utilis* и *L. scottii* (рисунок 32), а также рассчитаны технико-экономические показатели процесса (см. таблицу 3.3.7.1).

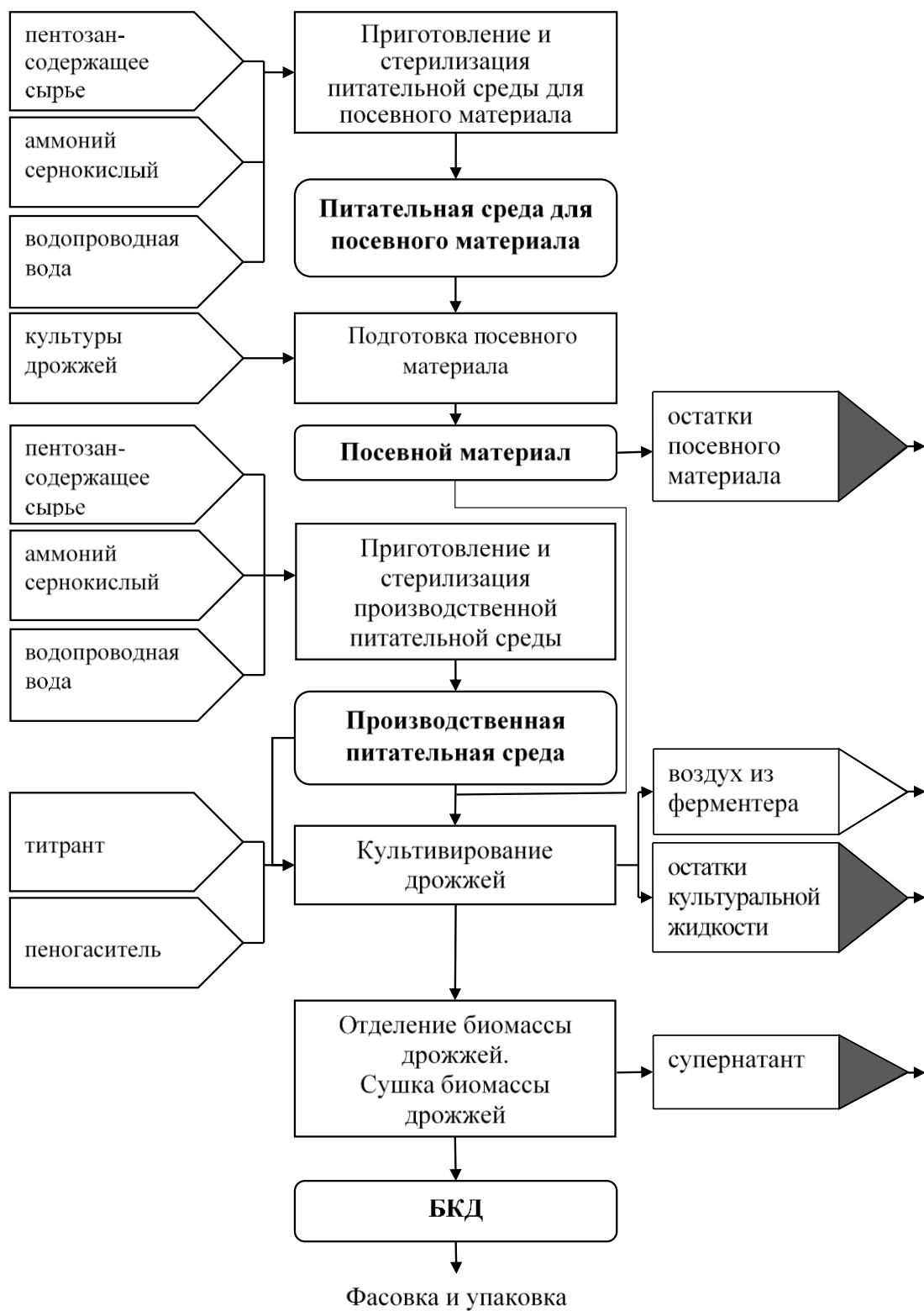


Рисунок 32. Технологическая схема процесса получения БКД из побочного продукта переработки пшеницы – пентозановой фракции

Таблица 3.3.7.1.

Технико-экономические показатели технологии переработки
пентозановой фракции (20 000 тонн/год) с получением БКД для животных

№ п/п	Наименование показателя	Единица измерения	Значение показателей
1.	Годовой выпуск продукции в натуральном выражении - БКД для животных	т	637
	Годовой выпуск продукции в натуральном выражении - БКД для животных	тыс. руб.	13367
2.	Капитальные затраты	тыс. руб.	22667
3.	Полная себестоимость годового выпуска	тыс. руб.	7970,2
4.	Себестоимость единицы продукции - БКД для животных	тыс. руб./т	12,5
5.	Прибыль годовая	тыс. руб.	5396
6.	Рентабельность		
	а) производственных фондов	%	8,7
	б) продукции	%	67,7
7.	Срок окупаемости капитальных вложений	год	10,5

ВЫВОДЫ

1. Показано, что при обработке протеолитическими ферментными препаратами зерновое сырье может быть использовано в качестве единственного источника питательных веществ для глубинного культивирования лактобактерий, а также в качестве основного источника азота для бифидобактерий.

2. Определены оптимальные условия обработки муки пшеницы по гидромодулю и дозировке протеаз для достижения максимальной численности лактобактерий (гидромодуль 5; концентрация ФП Protex 40E 2% от белка в сырье). Ферментация полученных в оптимальных условиях гидролизатов типовыми штаммами основных видов лактобактерий, относимых к пробиотикам, позволяет получить биосуспензию с не менее 8,0 log (КОЕ/мл).

3. Определены оптимальные условия обработки муки пшеницы для достижения максимальной численности бифидобактерий (гидромодуль 5,43; концентрация панкреатина 2 % от протеина в сырье; pH 8,0; температура 40°C). Ферментация полученных в оптимальных условиях гидролизатов типовыми штаммами основных видов бифидобактерий, относимых к пробиотическим, позволяет получить биосуспензию с не менее 7,1 log (КОЕ/мл).

4. С применением в качестве тестового штамма *B. adolescentis* ATCC 15703 установлено, что при использовании гидролизата пшеничной муки в качестве криопротектора выживаемость бифидобактерий после лиофильного высушивания составила 90 %, а скорость гибели в ходе длительного хранения 0,13 log КОЕ/мес., что сопоставимо с результатами, полученными при применении в качестве криопротектора обезжиренного молока.

5. Получены лабораторные образцы пробиотического зернового напитка, содержащего не менее 10^8 КОЕ/мл лактобактерий, и

пробиотического ингредиента – лиофильно высушенной биомассы бифидобактерий, содержащей не менее 10^{10} КОЕ/г.

6. Разработана технология получения БКД с содержанием не менее 54 % сырого протеина путем биоконверсии питательной среды на основе пентозановой фракции, обработанной амилазами, с добавлением 2 г/л сернокислого аммония смешанной культурой дрожжей *S. utilis* и *L. scottii* при периодическом или отъемно-доливном режиме культивирования.

7. Оценка технико-экономических показателей предлагаемых технологий при мощностях производства:

- по пробиотическому напитку 600 тонн/год показала, что себестоимость продукта составляет 127,3 тыс. руб./т.
- по пробиотическому ингредиенту 8,5 тонн/год показала, что себестоимость продукта составляет 9 262 тыс. руб./т.
- по перерабатываемому сырью – пентозановой фракции 20 000 тонн/год показала, что себестоимость БКД составляет 12,5 тыс.руб./т.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Food Outlook (October 2016) [Электронный ресурс] // FAO. Режим доступа: <http://www.fao.org/3/a-i6198e.pdf>, свободный. – (Дата обращения: 02.12.2018).
2. Водяников В. Т., Юсеф А. А. О., Боргуль С. В. Современное состояние и тенденции мирового производства зерна // Вестник Федерального государственного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Московский государственный агроинженерный университет им. В. П. Горячкина». – 2013. – №. 3 – С. 90-95.
3. Гусманов Р. У., Сайтов А. Х. Пути повышения объемов производства зерна и его экономической эффективности в почвенных зонах Республики Башкортостан // Агропродовольственная политика России. – 2013. – №. 2. – С. 48-50.
4. Шамилев Р.В., Шамилев С.Р. Оценка и анализ динамики и эффективности производства некоторых растениеводческих культур в РФ [Электронный ресурс] / Р. В. Шамилев, С. Р. Шамилев // Современные проблемы науки и образования. – 2011. - № 6. – С. 1 – 9. – Режим доступа: <http://www.science-education.ru/pdf/2011/6/275.pdf>, свободный. – (Дата обращения: 02.12.2018).
5. Федеральный закон от 14.05.1993 г. № 4973-1 «О зерне» (в ред. Федеральных законов от 02.12.1994 № 53-ФЗ, от 10.01.2003 № 15-ФЗ, от 02.02.2006 № 19-ФЗ, от 16.03.2006 №41-ФЗ, с изменениями внесенными Указом Президента РФ от 21.12.1993 №2232).
6. Федеральная Служба Государственной Статистики (Росстат). Россия в цифрах. 2018: Краткий статистический сборник [Электронный ресурс] / Росстат – М., 2018 – С. 522. – Режим доступа: http://www.gks.ru/free_doc/doc_2018/rusfig/rus18.pdf, свободный. – (Дата обращения: 02.12.2018).

7. Генералов И. Г., Суслов С. А. Производство зерна в России и в мире [Текст] / И. Г. Генералов, С. А. Суслов // Вестник НГИЭИ. – 2014. – №. 9 (40). – С. 3-11.
8. Карлова Н. Российский зерновой рынок: рекорды 2013/2014 МГ и перспективы нового сезона [Электронный ресурс] / Н. Карлова // Экономическое развитие России. – 2014. - №9. – С. 34 – 36. – Режим доступа: <http://www.iep.ru/files/RePEc/gai/ruserr/253Karlova.pdf>, свободный. – (Дата обращения: 02.12.2018).
9. Российский зерновой союз. Концепция развития рынка зерна России на среднесрочную перспективу, Москва, 2017 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.grun.ru/documents/concept2017.pdf>, свободный. – (Дата обращения: 02.12.2018).
10. Савкин В., Прока Н. Продовольственная безопасность государства: состояние и прогноз // Проблемы теории и практики управления. – 2013. – №. 1. – С. 25-37.
11. Кретович В. Л. Биохимия зерна и хлеба. Наука, 1991. 136 с.
12. Плешков Б. П. Биохимия сельскохозяйственных растений. М.: Колос, 1980. 496 с.
13. Козьмина Н. П. Зерно и продукты его переработки. Изд-во техн. и экон. лит-ры по вопросам заготовок, 1961. 521 с.
14. Mellentin J., Heasman M. The functional foods revolution: healthy people, healthy profits. Routledge, 2014. 313 pp.
15. Stowell J. D. Prebiotic potential of polydextrose // Prebiotics and probiotics science and technology. – Springer, New York, NY, 2009. – P. 337-352.
16. Crowe K. M., Francis C. Position of the academy of nutrition and dietetics: functional foods // Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics. – 2013. – Vol. 113. – №. 8. – P. 1096-1103.
17. European Commission. Functional foods [Электронный ресурс]. Режим доступа: ftp://ftp.cordis.europa.eu/pub/fp7/kbbe/docs/functional-foods_en.pdf. Accessed October 24, 2012, свободный.

18. Lee S. C., Foo M. H. Functional Foods and Its Biomarkers // Introduction to Functional Food Science: Textbook. – 2014.
19. Shimizu T. Health claims on functional foods: the Japanese regulations and an international comparison // Nutrition research reviews. – 2003. – Vol. 16. – №. 2. – P. 241-252.
20. ГОСТ Р. 52349-2005. Продукты пищевые. Продукты пищевые функциональные. Термины и определения // М.: Изд-во стандартов. – 2006.
21. Горева Е. А., Петренко А. В. Пребиотики как функциональные компоненты питания // Непрерывное медицинское образование и наука. – 2015. – Т. 10. – №. 1. – С. 32-36.
22. Amara A. A., Shibl A. Role of Probiotics in health improvement, infection control and disease treatment and management //Saudi pharmaceutical journal. – 2015. – Vol. 23. – №. 2. – P. 107-114.
23. F. Vergio. Anti- und Probiotika. Hippocrates, 1954. P. 116-119.
24. Lilly D. M., Stillwell R. H. Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms // Science. – 1965. – Vol. 147. – №. 3659. – P. 747-748.
25. Parker R.B. Probiotics, the other half of the antibiotic story // Anim. Nutr. Health. – 1974. – Vol. 29. – P. 4-8.
26. Fuller R. Probiotic in man and animals //J. Appl. Bacteriol. – 1989. – Vol. 66. – P. 131-139.
27. Report of a Joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food. – Cordoba, 2001. – 34 p. [электронный ресурс]: http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf свободный. - (Дата обращения: 12.01.2019).
28. Блинов В. А., Буршина С. Н., Ковалёва С. В. Пробиотики в пищевой промышленности и сельском хозяйстве // Саратов: ИЦ" Наука. – 2011. – 171 с.

29. Morelli L. et al. In vitro selection of probiotic lactobacilli: a critical appraisal //Current Issues in Intestinal Microbiology. – 2000. – Vol. 1. – №. 2. – P. 59-67.
30. Collins J. K., Thornton G., Sullivan G. O. Selection of probiotic strains for human applications //International dairy journal. – 1998. – Vol. 8. – №. 5-6. – P. 487-490.
31. Cammarota M. et al. In vitro evaluation of *Lactobacillus plantarum* DSMZ 12028 as a probiotic: emphasis on innate immunity // International journal of food microbiology. – 2009. – Vol. 135. – №. 2. – P. 90-98
32. Oelschlaeger T. A. Mechanisms of probiotic actions—a review //International Journal of Medical Microbiology. – 2010. – Vol. 300. – №. 1. – P. 57-62
33. Hilton E. et al. Efficacy of Lactobacillus GG as a diarrheal preventive in travelers //Journal of travel medicine. – 1997. – Vol. 4. – №. 1. – P. 41-43.
34. Isolauri E. Dietary modification of atopic disease: Use of probiotics in the prevention of atopic dermatitis //Current allergy and asthma reports. – 2004. – Vol. 4. – №. 4. – P. 270-275.
35. Benchimol E. I., Mack D. R. Probiotics in relapsing and chronic diarrhea // Journal of pediatric hematology/oncology. – 2004. – Vol. 26. – №. 8. – P. 515-517.
36. Bazzoli F. et al. In vivo Helicobacter pylori clearance failure with Lactobacillus acidophilus //Gastroenterology. – 1992. – Vol. 102. – P. A38.
37. Aiba Y. et al. Lactic acid-mediated suppression of Helicobacter pylori by the oral administration of Lactobacillus salivarius as a probiotic in a gnotobiotic murine model //The American journal of gastroenterology. – 1998. – Vol. 93. – №. 11. – P. 2097-2101.
38. Macfarlane G. T., Cummings J. H. Probiotics, infection and immunity //Current opinion in infectious diseases. – 2002. – Vol. 15. – №. 5. – P. 501-506.

39. Mego M. et al. Intramucosal bacteria in colon cancer and their elimination by probiotic strain *Enterococcus faecium* M-74 with organic selenium // *Folia microbiologica*. – 2005. – Vol. 50. – №. 5. – P. 443.
40. Thirabunyanon M., Boonprasom P., Niamsup P. Probiotic potential of lactic acid bacteria isolated from fermented dairy milks on antiproliferation of colon cancer cells // *Biotechnology letters*. – 2009. – Vol. 31. – №. 4. – P. 571-576.
41. Hlivak P. et al. One-year application of probiotic strain *Enterococcus faecium* M-74 decreases serum cholesterol levels // *Bratisl Lek Listy*. – 2005. – Vol. 106. – №. 2. – P. 67-72.
42. Martinez R. C. R. et al. Improved treatment of vulvovaginal candidiasis with fluconazole plus probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *Lactobacillus reuteri* RC-14 // *Letters in applied microbiology*. – 2009. – Vol. 48. – №. 3. – P. 269-274.
43. Hawrelak J. Probiotics: choosing the right one for your needs // *J. Aust. Traditional-Med. Soc.* – 2003. – Vol. 9. – №. 2. – P. 67-75.
44. Peter H. A. S. Regular, Nonsporing, Gram-Positive Rods // *Bergey's manual of systematic bacteriology*. – 1986. – Vol. 2. – P. 1235-1245
45. Квасников Е. И. Молочнокислые бактерии и пути их использования / Е. И. Квасников – М.: Наука, 1975. – 395 с, Гусев М. В., Минеева Л. А. Молочнокислые бактерии // *Микробиология*. — 2004. — № 4. — С. 15-19.
46. Банникова Л. А. Селекция молочнокислых бактерий и их применение в молочной промышленности / Л. А. Банникова. – М.: Пищевая промышленность, 1975. – 255 с
47. Felis G. E., Dellaglio F. Taxonomy of lactobacilli and bifidobacteria // *Current issues in intestinal microbiology*. – 2007. – Vol. 8. – №. 2. – P. 44.
48. Walter J. The microecology of lactobacilli in the gastrointestinal tract // *Probiotics and prebiotics: scientific aspects*. – 2005. – P. 51-82.
49. Heilig H. G. H. J. et al. Molecular diversity of *Lactobacillus* spp. and other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific

- amplification of 16S ribosomal DNA // Applied and environmental microbiology. – 2002. – Vol. 68. – №. 1. – P. 114-123.
50. Mackie R. I., Sghir A., Gaskins H. R. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract // The American journal of clinical nutrition. – 1999. – Vol. 69. – №. 5. – P. 1035-1045.
51. De Keersmaecker S. C. J. et al. Strong antimicrobial activity of *Lactobacillus rhamnosus* GG against *Salmonella typhimurium* is due to accumulation of lactic acid // FEMS Microbiology Letters. – 2006. – Vol. 259. – №. 1. – P. 89-96.
52. Eijsink V. G. H. et al. Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; an example of biological warfare and communication // Antonie Van Leeuwenhoek. – 2002. – Vol. 81. – №. 1-4. – P. 639-654.
53. Velraeds M. M. et al. Inhibition of initial adhesion of uropathogenic *Enterococcus faecalis* by biosurfactants from *Lactobacillus* isolates // Applied and environmental microbiology. – 1996. – Vol. 62. – №. 6. – P. 1958-1963.
54. Johnson Henry K. C. et al. Surface-layer protein extracts from *Lactobacillus helveticus* inhibit enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 adhesion to epithelial cells // Cellular microbiology. – 2007. – Vol. 9. – №. 2. – P. 356-367.
55. Mack D. R. et al. Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of *Lactobacillus* strains to intestinal epithelial cells in vitro // Gut. – 2003. – Vol. 52. – №. 6. – P. 827-833.
56. Petrof E. O. et al. Probiotics inhibit nuclear factor- κ B and induce heat shock proteins in colonic epithelial cells through proteasome inhibition // Gastroenterology. – 2004. – Vol. 127. – №. 5. – P. 1474-1487.
57. Tao Y. et al. Soluble factors from *Lactobacillus* GG activate MAPKs and induce cytoprotective heat shock proteins in intestinal epithelial cells // American Journal of Physiology-Cell Physiology. – 2006. – Vol. 290. – №. 4. – P. 1018-1030.

58. Yan F. et al. Soluble proteins produced by probiotic bacteria regulate intestinal epithelial cell survival and growth // *Gastroenterology*. – 2007. – Т. 132. – №. 2. – С. 562-575.
59. Tissier H. Repartition des microbes dans l'intestin du nourisson // *Ann Inst Pasteur*. – 1905. – Vol. 19. – P. 109-13
60. Duranti S. et al. Evaluation of genetic diversity among strains of the human gut commensal *Bifidobacterium adolescentis* // *Scientific reports*. – 2016. – Vol. 6. – P. 23971
61. Захарова Ю. В., Леванова Л. А. Современные представления о таксономии, морфологических и функциональных свойствах бифидобактерий // *Фундаментальная и клиническая медицина*. – 2018. – Т. 3. – №. 1. – С. 90 – 101
62. Whitman W. B. et al. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Vol. 5): The Actinobacteria (Bergey's Manual/Systemic Bacteriology)*. – 2012. – 2031 pp.
63. Gibson G. R. et al. *Prebiotics: development & application*. – Chichester: John Wiley & Sons, 2006. – Vol. 466. – 256 p
64. Sannohe Y. et al. Comparison of the growth of bifidobacteria in two culture media containing either 1-kestose (GF2) or nystose (GF3) // *Bioscience and microflora*. – 2008. – Vol. 27. – №. 1. – P. 13-17.
65. Шендеров Б. А. *Медицинская микробная экология и функциональное питание*. – М.: ГРАНТЬ. – 1998
66. Бондаренко В. М., Грачева Н. М., Мацулевич Т. В. *Дисбактериозы кишечника у взрослых*. – М.: КМК Scientific Press. – 2003. – 224 с.
67. Функ И. А., Иркитова А. Н. Биотехнологический потенциал бифидобактерий // *Acta Biologica Sibirica*. – 2016. – Т. 2. – №. 4. – С. 67-79
68. Лянная А. М., Интизаров М. М., Донских Е. Е. Биологические и экологические особенности микробов рода *Bifidobacterium*

- //Бифидобактерии и их использование в клинике, медицинской промышленности и сельском хозяйстве. – 1986. – С. 32-38.
69. Асташкина А. П. Современные взгляды на биологическую роль бифидо- и лактобактерий //Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2010. – №. 1. – С. 133-139.
70. Новик Г. И. Бифидобактерии: научные основы практического использования // Проблемы здоровья и экологии. – 2006. – №. 3 (9). – С. 144-151
71. Clemens R., Pressman P. Heyday in grain land // Food technology-champaign then Chicago – 2006. – Vol. 60. – №. 11. – P. 18.
72. Conway P. L. Selection criteria for probiotic microorganisms // Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition. – 1996. – Vol. 5. – P. 10-14.
73. Daly C. Lactic acid bacteria and milk fermentations // Journal of Chemical Technology & Biotechnology. – 1991. – Vol. 51. – №. 4. – P. 544-548.
74. Oyewole O. B. Lactic fermented foods in Africa and their benefits // Food control. – 1997. – Vol. 8. – №. 5-6. – P. 289-297.
75. Caplice E., Fitzgerald G. F. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation // International journal of food microbiology. – 1999. – Vol. 50. – №. 1-2. – P. 131-149.
76. Esser P., Lund C., Clemmesen J. Antileukemic effects in mice fermentation products of *Lactobacillus bulgaricus* //Milchwissenschaft. – 1983.
77. Seo J. S. et al. Aroma components of traditional Korean soy sauce and soybean paste fermented with the same meju // Journal of Microbiology and Biotechnology. – 1996. – Vol. 6. – №. 4. – P. 278-285.
78. Blandino A. et al. Cereal-based fermented foods and beverages // Food research international. – 2003. – Vol. 36. – №. 6. – P. 527-543.
79. Molin G. Probiotics in foods not containing milk or milk constituents, with special reference to *Lactobacillus plantarum* 299v– // The American journal of clinical nutrition. – 2001. – Vol. 73. – №. 2. – P. 380-385.

80. Superfoods. (2006). Available at www.livesuperfoods.com (accessed in 11 July 2006)
81. AACC, 2001. The definition of dietary fibre. *Cereal Food World* 46, 112.
82. Butt M. S. et al. Oat: unique among the cereals // *European journal of nutrition*. – 2008. – Vol. 47. – №. 2. – P. 68-79.
83. Maki K. C. et al. Effects of consuming foods containing oat β -glucan on blood pressure, carbohydrate metabolism and biomarkers of oxidative stress in men and women with elevated blood pressure // *European journal of clinical nutrition*. – 2007. – Vol. 61. – №. 6. – P. 786.
84. Gokavi S. et al. Oat-based Symbiotic Beverage Fermented by *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus paracasei* ssp. *casei*, and *Lactobacillus acidophilus* // *Journal of Food Science*. – 2005. – Vol. 70. – №. 4. – P. 216-223.
85. Angelov A. et al. Development of a new oat-based probiotic drink // *International journal of food microbiology*. – 2006. – Vol. 112. – №. 1. – P. 75-80.
86. Luana N. et al. Manufacture and characterization of a yogurt-like beverage made with oat flakes fermented by selected lactic acid bacteria // *International journal of food microbiology*. – 2014. – Vol. 185. – P. 17-26.
87. Gupta S., Cox S., Abu-Ghannam N. Process optimization for the development of a functional beverage based on lactic acid fermentation of oats // *Biochemical Engineering Journal*. – 2010. – Vol. 52. – №. 2-3. – P. 199-204.
88. Bernat N. et al. Optimisation of oat milk formulation to obtain fermented derivatives by using probiotic *Lactobacillus reuteri* microorganisms // *Food Science and Technology International*. – 2015. – Vol. 21. – №. 2. – P. 145-157.
89. Charalampopoulos D., Pandiella S. S., Webb C. Growth studies of potentially probiotic lactic acid bacteria in cereal-based substrates // *Journal of applied microbiology*. – 2002. – Vol. 92. – №. 5. – P. 851-859.
90. Rathore S., Salmerón I., Pandiella S. S. Production of potentially probiotic beverages using single and mixed cereal substrates fermented with lactic acid

- bacteria cultures //Food Microbiology. – 2012. – Vol. 30. – №. 1. – P. 239-244.
91. Hassani A., Zarnkow M., Becker T. Optimisation of fermentation conditions for probiotication of sorghum wort by *Lactobacillus acidophilus* LA 5 // International journal of food science & technology. – 2015. – Vol. 50. – №. 10. – P. 2271-2279.
92. Hassan A. A., Aly M. M., El-Hadidie S. T. Production of cereal-based probiotic beverages // World Applied Sciences Journal. – 2012. – Vol. 19. – №. 10. – P. 1367-1380.
93. Matejčková Z., Liptáková D., Valík Ľ. Functional probiotic products based on fermented buckwheat with *Lactobacillus rhamnosus* // LWT-Food Science and Technology. – 2017. – Vol. 81. – P. 35-41.
94. Проекты Грэйнтек [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://graintek.ru/proizvoditeli/>, свободный (Дата обращения: 20.12.2018).
95. Сорокоумова Т. Что такое глубокая переработка зерна [Текст] / Т. Сорокоумова // Информационно-рекламная аграрная газ. – 2013. – 22 мая.
96. Тихонравов В. С. и др. Глубокая переработка биомассы и отходов сельскохозяйственного производства: науч. анализ. обзор // М.: ФГБНУ «Росинформагротех. – 2014. – 252 с.
97. Апостолов С. А. Новый справочник химика и технолога. Сырье и продукты промышленности органических и неорганических веществ [Текст]: в 2 т. Т. 2 / С. А. Апостолов [и др.]. – СПб.: АНО НПО «Профессионал», 2005, 2007. – 1142 с.
98. Егоров Г. А. Технология муки. Технология крупы [Текст]: учеб. пособие / Г. А. Егоров. – 4-е изд., перераб. и доп. – М.: КолосС, 2005. – 296 с.
99. Патент России 2284121. Способ получения пищевого клейковинного продукта. Сорочинский В. Ф., Мелешкина Е. П., Кизим В. П. Заявл. 15.02.2005; опубл. 27.09.2006.

100. Осетров Сергей. Технология пшеничного крахмала и клейковины [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.sergey-osetrov.narod.ru/Projects/Starch/VNIIC/3.htm>, свободный. – (Дата обращения: 10.01. 2019).
101. Hemery Y. M. et al. Influence of water content and negative temperatures on the mechanical properties of wheat bran and its constitutive layers //Journal of Food Engineering. – 2010. – Vol. 98. – №. 3. – P. 360-369.
102. Fincher G. B. Cell walls and their components in cereal grain technology // Advances in cereal science and technology. – 1986. – Vol. 8. – P. 207-295.
103. Pomeranz Y. Chemical composition of kernel structures // Wheat: Chemistry and Technology. – 1988. – Vol. 4. – P. 97-158.
104. Basic A., Stone B. A. Chemistry and organization of aleurone cell wall components from wheat and barley // Functional Plant Biology. – 1981. – Vol. 8. – №. 5. – P. 475-495.
105. Валева Р. Т., Понкратов А. С., Красильникова О. В. Высокотемпературный гидролиз пшеничных отрубей серной кислотой // Вестник Казанского технологического университета. – 2014. – Т. 17. – №. 3. – С.
106. Kim K. H. et al. Phenolic acid profiles and antioxidant activities of wheat bran extracts and the effect of hydrolysis conditions //Food Chemistry. – 2006. – Vol. 95. – №. 3. – P. 466-473.
107. Carter J. W., Madl R., Padula F. Wheat antioxidants suppress intestinal tumor activity in Min mice //Nutrition research. – 2006. – Vol. 26. – №. 1. – P. 33-38.
108. Katina K. et al. Bran fermentation as a means to enhance technological properties and bioactivity of rye //Food Microbiology. – 2007. – Vol. 24. – №. 2. – P. 175-186.
109. Radenkovs V., Klava D., Juhnevica K. Wheat bran carbohydrates as substrate for Bifidobacterium lactis development //International Journal of Biological,

- Food, Veterinary and Agricultural Engineering. – 2013. – Vol. 7. – №. 7. – P. 320-325.
110. Перевалова Ю. В., Цапок П. И., Колеватых Е. П. Использование гидролизата ферментированных отрубей в производстве продуктов функционального питания // Фундаментальные исследования. – 2006. – № 1. – С. 82-83.
111. Naveena B. J. et al. Direct fermentation of starch to L (+) lactic acid in SSF by *Lactobacillus amylophilus* GV6 using wheat bran as support and substrate: medium optimization using RSM // *Process Biochemistry*. – 2005. – Vol. 40. – №. 2. – P. 681-690.
112. John R. P., Nampoothiri K. M., Pandey A. Simultaneous saccharification and L - (+)-lactic acid fermentation of protease-treated wheat bran using mixed culture of lactobacilli // *Biotechnology letters*. – 2006. – Vol. 28. – №. 22. – P. 1823-1826.
113. Li Z. et al. Fermentative production of l-lactic acid from hydrolysate of wheat bran by *Lactobacillus rhamnosus* // *Biochemical Engineering Journal*. – 2010. – T. 49. – №. 1. – С. 138-142.
114. Courtin C. M., Delcour J. A. Arabinoxylans and endoxylanases in wheat flour bread-making // *Journal of cereal science*. – 2002. – Vol. 35. – №. 3. – P. 225-243.
115. Alphamalt ТТС–фермент, подсушивающий тесто / Хлебопродукты. – 2009. – № 4. – С. 34.
116. Ma X., Xiong J. Nutrition evaluation of protein in light liquid phase produced during the process of wheat starch production by decanter centrifuge // *Science and Technology of Food Industry*. – 2011. – Vol. 9. – P. 009.
117. CERESTAR HOLDING B.V. Isolation and utilisation of pentosans from by-products of the starch industry. Patent EP № 1090929, 2000.
118. Palmarola Adrados B. et al. Hydrolysis of Nonstarch Carbohydrates of Wheat Starch effluent for ethanol production // *Biotechnology progress*. – 2004. – T. 20. – №. 2. – С. 474-479.

119. Xue F. et al. Pilot-scale production of microbial lipid using starch wastewater as raw material // *Bioresource technology*. – 2010. – Vol. 101. – №. 15. – P. 6092-6095.
120. Luo W. et al. Feasibility of butanol production from wheat starch wastewater by *Clostridium acetobutylicum* // *Energy*. – 2018. – Vol. 154. – P. 240-248.
121. Косолапов В. М. Кормопроизводство в сельском хозяйстве, экологии и рациональном природопользовании (теория и практика) [Текст] / В. М. Косолапов, И. А. Трофимов, Л. С. Трофимова. – М.: ГНУ ВНИИ кормов, 2014. – 135 с.
122. Леснов А. П. Производство белка для моногастричных животных [Текст] / А. П. Леснов, Э. П. Кудзиев, А. Г. Пузанков // *Ценовик*. – 2006. – № 12. – С. 15
123. Стахеев И. В. Биотехнология малотоннажного производства микробного протеина [Текст] / И. В. Стахеев, Э. И. Коломиец, Н. А. Здор. – Минск: «Навука і тэхніка», 1991. – 264 с.
124. Быков В. А. Биотехнология: производство белковых веществ [Текст]: в 8 т. Т. 5 / В. А. Быков, М. Н. Манаков, В. И. Панфилов и др. – М.: Высш. шк., 1987. – 142 с.
125. Патент России 2522006 С1. Способ выращивания дрожжей. Чернуха А. Б., Кошелев Ю. А., Боджаков И. Н., Козликин А. Т., Фисинин В. И., Сеницын А. П., Панфилов В. И., Елькин И. Н. Заявл. 25.01.2013; опубл. 10.07.2014, Бюл. № 19.
126. Патент России 2205870 С1. Способ получения питательной среды для выращивания дрожжей. Денисенко А. А., Щербаков Ю. Е., Садков В. В., Пахтуев А. И., Чегодаев Ф. Н. Заявл. 01.08.2002; опубл. 10.06.2003.
127. Патент России 2396007. Способ комплексной переработки зернового сырья на спирт и кормовой продукт. Римарева Л.В., Оверченко М. Б., Игнатова Н. И., Серба Е. М., Поляков В. А. Заявл. 30.03.2009; опубл. 10.08.2010, Бюл. № 22.

128. Патент России 2220590. Способ получения коромового белкового продукта на основе зернового сырья. Воробьева Г. И., Пономарева Т. А., Сильченко Н. В., Морщакова Г. Н., Капотина Л. Н., Матвеев В. Е., Захарычев А. П., Стрельникова Т. Л. Заявл. 04.04.2002; опубл. 10.01.2004.
129. Патент России 2159287. Способ получения белковой кормовой добавки. Винаров А. Ю., Заикина А. И., Захарычев А. П., Зобнина В. П., Сидоренко Т. Е., Ковальский Ю. В., Рогачева Р. А., Зорина Л. В. Заявл. 03.04.2000; опубл. 20.11.2000.
130. Патент России 2140449. Способ биоконверсии растительного сырья. Колесов А. И. Заявл. 24.02.1998; опубл. 27.10.1999.
131. Патент России 2054881. Способ получения белковой добавки. Коваленко Ю. Ф., Зеленков Г. П., Вагичев А. И., Соболев Н. Н., Грахов В. А., Миловидов Ю. В. Заявл. 29.06.1995; опубл. 27.02.1996.
132. Патент России 2399291. Способ производства кормовых дрожжей. Карпова Г. В., Зайнутдинов Р. Р., Зайнутдинова Т. К. Заявл. 28.07.2008; опубл. 20.09.2010, Бюл. № 26.
133. Новоферм. Ферментные препараты для производства спирта [Электронный ресурс] // Режим доступа: <http://www.novoferm.org/product.html>, свободный. - (Дата обращения: 04.04.2015).
134. Баурин Д. В. Комплексная технология переработки шрота подсолнечника с получением изолята белка и углеводно-белкового корма [Текст]: дис. ... канд. тех. наук. М., 2014. 160 с.
135. Симбио. Белки и ферменты [Электронный ресурс] // Режим доступа: <http://symbiotech.ru/products/proizvodstvo-spirta/oleksa/>, свободный. – (Дата обращения: 10.01.2019).
136. ГОСТ 28880 – 90. Пряности и приправы. Определение посторонних примесей [Электронный ресурс] // Режим доступа:

<http://base.consultant.ru/cons/cgi/online.cgi?req=doc;base=ESU;n=24066>,
свободный. – (Дата обращения: 13.05.2015).

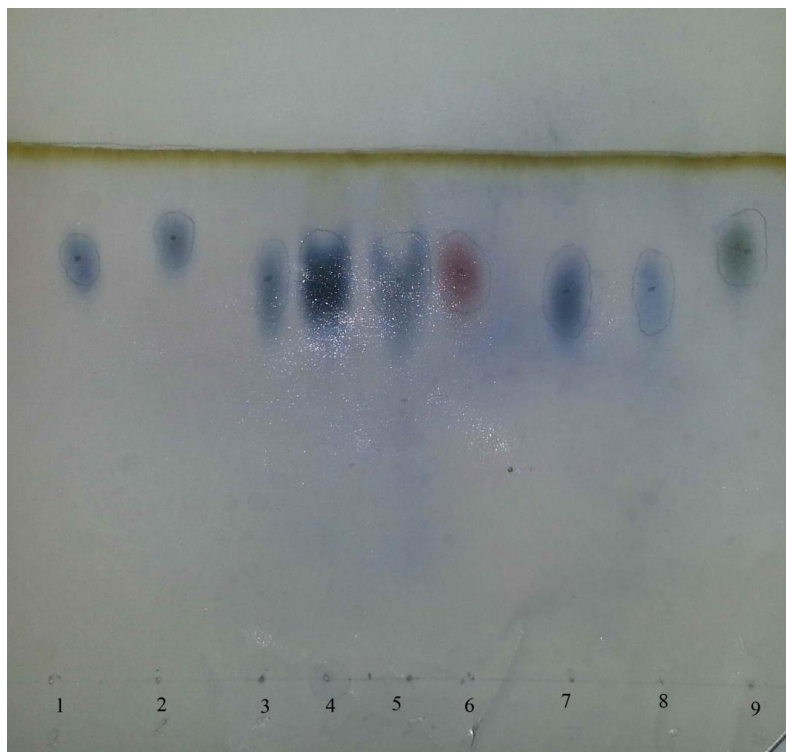
137. Чешкова А.В. Ферменты и технологии для текстиля, моющих средств, кожи, меха: учеб. пособие для вузов. – И.: ГОУВПО ИГХТУ, 2007. – 282 с.
138. Шакир И.В., Красноштанова А. А., Парфенова Е. В., Суясов Н. А., Бабусенко Е. С., Смирнова В. Д. Общая биотехнология. Лабораторный практикум: учебное пособие / М.: РХТУ им. Д. И. Менделеева, 2008. – 120 с.
139. ГОСТ 28178-89 Дрожжи кормовые. Методы испытаний [Электронный ресурс] // Режим доступа: <http://docs.cntd.ru/document/gost-28178-89>, свободный. – (Дата обращения: 10.01.2019).
140. Lowry O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent // Journal of biological chemistry. – 1951. – Vol. 193. – №. 1. – P. 265-275.
141. Douglas S. G. A rapid method for the determination of pentosans in wheat flour // Food Chemistry. - 1981. - V. 7. - P. 139-145.
142. Збарский Б. И. Практикум по биологической химии [Текст]: учеб. пособие /Б. И. Збарский, И. Б. Збарский, А. И. Солнцев. – М.: Медгиз, 1954. – 348 с.
143. Белов А. А. Разработка промышленных технологий получения новых медицинских материалов на основе модифицированных волокнообразующих полимеров, содержащих биологически активные белковые вещества: дисс. на соис. ученой степ. доктора технич. наук. М.: РХТУ, 2009. 385 с.
144. Практикум по микробиологии / А. И. Нетрусов, М. А. Егорова, Л. М. Захарчук, Н. Н. Колотилова и др. – М.: Академия, 2005. – 608 с.
145. Лысак В. В. Микробиология. Практикум: пособие // Мн.: БГУ. – 2015. – 115 с.

146. Song S. H., Cho Y. H., Park J. Microencapsulation of *Lactobacillus casei* YIT 9018 using a microporous glass membrane emulsification system // *Journal of food science*. – 2003. – Vol. 68. – №. 1. – P. 195-200.
147. Оценка токсичности и опасности дезинфицирующих средств. Методические указания. – М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2002. – 36 с.
148. ГОСТ 12.1.007-76. «ССБТ Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности», Гос. стандарт., М., 1976.
149. «Методы лабораторных исследований и испытаний дезинфекционных средств для оценки их эффективности и безопасности» Р 4.2 2643-10, М. 2011.
150. ГОСТ Р ИСО 10993-11-2009-Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 11. Исследования общетоксического действия.
151. Kishore G. et al. Development of RP-HPLC method for simultaneous estimation of lactic acid and glycolic acid // *Der Pharma Chemica*. – 2013. – Vol. 5. – №. 4. – P. 335-340.
152. Измерения. Статистическая обработка результатов пассивного и активного экспериментов в биотехнологии / М. Г. Гордиенко, Д. В. Баурин, Б. А. Кареткин, И. В. Шакир, В. И. Панфилов – М.: РХТУ им. Д. И. Менделеева, 2014. – 107 с.
153. De Man J. C., Rogosa M., Sharpe M. E. A medium for the cultivation of lactobacilli // *Journal of applied Bacteriology*. – 1960. – Vol. 23. – №. 1. – P. 130-135.
154. Mercier P. et al. Kinetics of lactic acid fermentation on glucose and corn by *Lactobacillus amylophilus* // *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. – 1992. – Vol. 55. – №. 2. – P. 111-121.
155. Northfield T. C., McColl I. Postprandial concentrations of free and conjugated bile acids down the length of the normal human small intestine // *Gut*. – 1973. – Vol. 14. – №. 7. – P. 513-518.

156. Wright R. Liver and biliary disease: pathophysiology, diagnosis, management. – 1979. – pp. 1345.
157. Deguchi Y. et al. Selection of ammonia-assimilating bifidobacteria and their effect on ammonia levels in rat caecal contents and blood //Microbial ecology in health and disease. – 1993. – Vol. 6. – №. 2. – P. 85-94.
158. Гордиенко П. А. и др. Научное обоснование создания новых лекарственных форм пробиотиков (обзор литературы и результаты собственных экспериментов) // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация. – 2015. – Т. 32. – №. 22 (219).
159. Быков В. А. Биотехнология: учеб. пособие для вузов. В 8 кн. Кн. 5. Производство белковых веществ // М.: Высшая школа. – 1987. – 142 с.
160. Петрушевский В. В., Бондарь Е. Г., Винокурова Е. В. Производство сахаристых веществ // К.: Урожай. – 1989. – 168 с.
161. N. J. W. Kreger-Van Rij. The Yeasts: a taxonomic study – Elsevier Science Publishers, 1984 – 1082 p.
162. Шарков В. И., Сапотницкий С.А., Дмитриева О. А., Туманова И. Ф. Технология гидролизных производств. – М.: «Лесная промышленность», 1973 – 408 с.
163. Хромова Н.Ю., Смирнова В. Д., Шакир И.В., Панфилов В. И. Биотехнологические способы модификации кормового продукта на основе пшеничной и гороховой муки // В сборнике: «Международная научно-практическая конференция «Биотехнология и качество жизни» Материалы конференции. 2014. С. 323-324.

ПРИЛОЖЕНИЯ

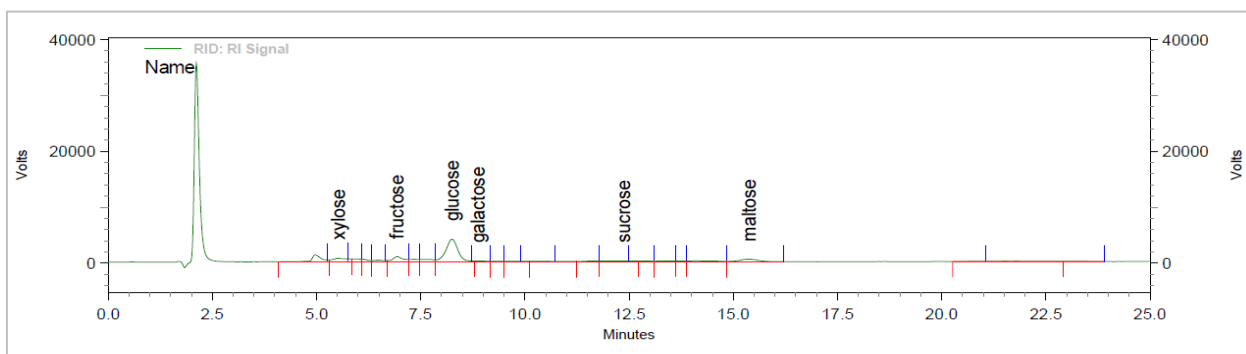
Приложение 1



- 1 – глюкоза (стандарт),
- 2 – ксилоза (стандарт),
- 3 – арабиноза (стандарт),
- 4 – образец пентозановой фракции,
- 5 – образец пентозановой фракции (разведение в 4х),
- 6 – фруктоза (стандарт),
- 7 – галактоза (стандарт),
- 8 – мальтоза (стандарт),
- 9 – манноза (стандарт).

Хроматограмма гидролизованного с 1 н соляной кислотой образца пентозан-содержащего сырья

Приложение 2



Хроматограмма образца пентозановой фракции

Форма № 94 ИЗ, ПМ, ПО-2016

Федеральная служба по интеллектуальной собственности
Федеральное государственное бюджетное учреждение

«Федеральный институт промышленной собственности»
(ФИПС)

Бережковская наб., 30, корп. 1, Москва, Г-59, ГСП-5, 125993

Телефон (8-499) 240-60-15 Факс (8-495) 531-63-18

УВЕДОМЛЕНИЕ О ПРИЕМЕ И РЕГИСТРАЦИИ ЗАЯВКИ

11.12.2018	072978	2018143793
<i>Дата поступления</i>	<i>Входящий №</i>	<i>Регистрационный №</i>

<p align="center">Заявление о выдаче патента Российской Федерации на изобретение</p>		
<p>ФИПС Ф И П С Ф И П С</p> <p>ДАТА (для регистрации) оригинала документа заявки 11.12.2018</p>	(21) РЕГИСТРАЦИОННЫЙ №	ВХОДЯЩИЙ №
(85) ДАТА ПЕРЕВОДА международной заявки на национальную фазу		
(86) КИСЕЛЕВА Е.А.	<p>АДРЕС ДЛЯ ПЕРЕПИСКИ</p> <p>Патентный отдел Миусская пл., д. 9, Москва, 125047</p> <p>Телефон: 8 (499) 978 85 50 Факс: Адрес электронной почты: patent@fiips.ru</p> <p>АДРЕС ДЛЯ СЕКРЕТНОЙ ПЕРЕПИСКИ</p>	
<p><input type="checkbox"/> (87)</p> <p><input type="checkbox"/> (96)</p> <p><input type="checkbox"/> (97)</p>		
<p>ЗАЯВЛЕНИЕ о выдаче патента Российской Федерации на изобретение</p>		<p>В Федеральную службу по интеллектуальной собственности Бережковская наб., д. 30, корп. 1, г. Москва, Г-59, ГСП-5, 125993, Российская Федерация</p>
(54) НАЗВАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ		
СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ БИФИДО- И ЛАКТОБАКТЕРИЙ		
(71) ЗАЯВИТЕЛЬ	ИДЕНТИФИКАТОРЫ ЗАЯВИТЕЛЯ	
<p>Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева» (РХТУ им. Д.И. Менделеева)</p> <p>Адрес места нахождения: Россия, 125047, г. Москва, Миусская пл., д. 9</p>	<p>ОГРН 1027739123224</p> <p>КПП 770701001</p> <p>ИНН 7707072637</p> <p>СНИЛС</p>	
<p><input checked="" type="checkbox"/> изобретение создано за счет средств федерального бюджета</p> <p><input type="checkbox"/> государственным заказчиком <input type="checkbox"/> муниципальным заказчиком</p> <p>исполнитель работ</p>	<p>ДОКУМЕНТ</p> <p>КОД СТРАНЫ</p> <p>RU</p>	
<p><input checked="" type="checkbox"/> исполнителем работ по:</p> <p><input type="checkbox"/> государственному контракту <input type="checkbox"/> муниципальному контракту</p> <p>РНФ</p> <p>Контракт от 7 мая 2016 г. № 16-19-10469</p>		
(74) ПРЕДСТАВИТЕЛЬ(И) ЗАЯВИТЕЛЯ	<p><input type="checkbox"/> патентный поверенный</p> <p><input type="checkbox"/> представитель по доверенности</p> <p><input type="checkbox"/> представитель по закону</p>	

Общее количество документов в листах	26	Лицо, зарегистрировавшее документы
Из них: - количество листов комплекта изображений изделия (для промышленного образца)	0	Киселева Е.А.
Количество платежных документов	0	
Сведения о состоянии делопроизводства по заявкам размещаются на сайте ФИПС по адресу « www.fiips.ru » в разделе «Информационные ресурсы / Открытые реестры»		

Для служебного пользования. Экз. №

Конфиденциальность гарантируется
получателем информации

УТВЕРЖДАЮ

И.о. проректора по научной и
инновационной деятельности
РХТУ им. Д.И. Менделеева



В.И. Панфилов

10 декабря 2015 г.

ЛАБОРАТОРНЫЙ РЕГЛАМЕНТ

на производство
белковой кормовой добавки

№ ЛР 02066492-68/2-15

Срок действия регламента
до «10» декабря 2020 г.

Форма Т2



УТВЕРЖДАЮ
Директор ЗАО «Завод Премиксов №1»

А.Г. Балановский

«13» декабря 2016 г.

АКТ №1

наработки опытной партии белковой кормовой добавки
согласно Соглашению о субсидии с Минобрнауки России
от «17» ноября 2014 г. № 14.626.21.0003

«13» декабря 2016 г.

Комиссия в составе:

Председатель	Начальник ЦЗЛ	Христоева Лариса Ильинична
члены комиссии	Начальник НИЛ Зав. отделением чистой культуры	Бурмагина Елена Николаевна Слижевская Ирина Олеговна

назначенная приказом по ЗАО «Завод Премиксов №1» от «09» декабря 2016 г. №761/1, проверила факт изготовления в период с «05» декабря 2016 г. по «09» декабря 2016 г. опытной партии белковой кормовой добавки БД-09122016.

1. Комиссии предъявлены:

- 1.1. Опытная партия белковой кормовой добавки БД-09122016 в количестве 0,560 кг, изготовленная на пилотной установке ЗАО «Завод Премиксов №1».
- 1.2. Лабораторный регламент ЛР-02066492-68/2-15.
- 1.3. Техническое задание к Соглашению о субсидии с Минобрнауки России от «17» ноября 2014г. №14.626.21.0003.

2. В результате проверки установлено:

- 2.1. Опытная партия белковой кормовой добавки БД-09122016 в количестве 0,560 кг, изготовлена на ЗАО «Завод Премиксов №1» в период с «05» декабря 2016 г. по «09» декабря 2016 г. в соответствии с Лабораторным регламентом ЛР-02066492-68/2-15 и Техническим заданием п. 4.1.7.б)
- 2.2. Опытная партия белковой кормовой добавки БД-09122016 соответствует требованиям пункта 4.1.6 ТЗ.

3. Вывод

Технологический процесс изготовления белковой кормовой добавки на основе продуктов ферментации пентозан-содержащего сырья в соответствии с Лабораторным регламентом ЛР-02066492-68/2-15 в условиях пилотной установки Индустриального партнера – ЗАО «Завод Премиксов №1» соответствуют требованиям п. 4.1.6. технического задания.

Приложение: Протокол от 12.12.2016г.

Председатель комиссии
Члены комиссии

Христоева Л.И.
Бурмагина Е.Н.
Слижевская И.О.
Христоева Л.И.
Бурмагина Е. Н.
Слижевская И. О.