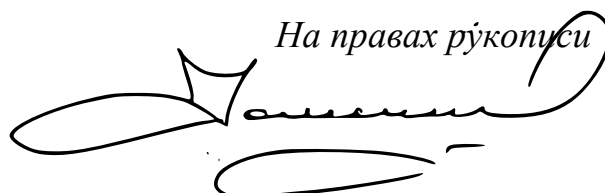


ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ПИЩЕВЫХ
ПРОИЗВОДСТВ»
(ФГБОУ ВО «МГУПП»)

На правах рукописи



ФОМЕНКО ИВАН АНДРЕЕВИЧ

**КОМПЛЕКСНАЯ БИОКОНВЕРСИЯ ПОДСОЛНЕЧНОЙ ЛУЗГИ В
ПРЕПАРАТЫ КОРМОВОГО И ПИЩЕВОГО НАЗНАЧЕНИЯ**

Специальность: 05.18.07 – Биотехнология пищевых продуктов и
биологически активных веществ

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата технических наук

Научный руководитель:
доктор технических наук, профессор
Иванова Людмила Афанасьевна

Москва – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ	2
ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1 Обзор литературы.....	11
1.1 Белок в рационе человека.....	11
1.2 Подсолнечник как пищевое сырье	21
1.3 Переработка лузги подсолнечника.....	27
1.4 Потенциал микробной биоконверсии подсолнечной лузги.....	31
1.5 Лигнин и фитомеланины из подсолнечной лузги.....	33
1.6 Дрожжевой белок сельскохозяйственного назначения.....	38
Заключение к обзору литературы.....	42
ГЛАВА 2 Материалы и методы.....	43
2.1 Объекты исследования	43
2.2 Методы исследования.....	46
ГЛАВА 3 Разработка технологии гидролиза подсолнечной лузги.....	63
3.1 Предобработка подсолнечной лузги	64
3.1.1 Механическая предобработка.....	64
3.1.2.1 Делигнификация.....	70
3.1.2.2 Обработка серной кислотой.....	74
3.2 Ферментативный гидролиз подсолнечной лузги	75
3.2.1 Выбор целлюлолитических ферментов	75
3.2.2 Гидролиз подсолнечной лузги с использованием коммерческий ФП.....	78
3.2.2.1 Ферментные препараты компании Novozymes.....	78
3.2.2.2 Ферментные препараты компании Adisseo France S.A.S.....	81

3.2.2.3 Ферментные препараты компании ООО «Сиббиофарм»	82
3.2.3 Обоснование выбора ферментного препарата для ферментативного гидролиза подсолнечной лузги.....	84
3.3 Оптимизация процесса биокаталитической деструкции полимеров лузги с помощью методов математического моделирования.....	85
3.4 Технология получения ферментолизата подсолнечной лузги.....	88
3.5 Характеристика ферментолизата подсолнечной лузги	89
ГЛАВА 4 Разработка технологии промышленного получения дрожжевой биомассы на основе ферментолизата подсолнечной лузги	90
4.1 Скрининг дрожжевых культур	91
4.2 Оптимизация технологии культивирования отобранных штаммов	101
4.2.1 Определение рациональной концентрации азота в питательной среде	102
4.2.2 Определение рационального значения рН культивирования.....	103
4.3 Характеристика дрожжевой биомассы	104
ГЛАВА 5 Получение белковых ингредиентов для пищевой промышленности на основе дрожжевой биомассы	107
5.1 Обезжиривание дрожжевой биомассы.....	107
5.2 Денуклеинизация дрожжевой биомассы	110
5.3 Технология получения белкового концентрата из биомассы <i>Kluyveromyces marxianus</i> Y-4557	112
5.4 Биохимический состав белкового концентрата	113
ГЛАВА 6 Разработка малоотходной технологии	116
6.1 Разработка технологии получения субстанции фитомеланинов.....	116

6.2 Разработка технологии получения кормового ферментного препарата	118
6.3 Технология биоконверсии подсолнечной лузги	122
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	126
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	128
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	129
ПРИЛОЖЕНИЕ 1 Проект ТУ производства «Сухие кормовые дрожжи «КД-Км-60» (ТУ 10.91.10-007-02068634-2021)	147
ПРИЛОЖЕНИЕ 2 Проект ТИ производства «Сухие кормовые дрожжи «КД-Км-60» (к ТУ 10.91.10-007-02068634-2021)	148
ПРИЛОЖЕНИЕ 3 Акт производственных испытаний технологии на базе ОАО «Биохиммаш»	149
ПРИЛОЖЕНИЕ 4 Акт производственных испытаний технологии на базе ООО «ПромБит»	154
ПРИЛОЖЕНИЕ 5 Протоколы испытаний промышленных образцов	156

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. По прогнозам, к 2050 году население мира достигнет примерно 9,7 млрд. человек. Такому населению потребуется 1250 млн. т мяса и молочных продуктов в год для нормального обеспечения белком животного происхождения при текущих уровнях потребления. Растущий спрос заставит человечество искать альтернативные источники белка, которые смогут заменить или дополнить растительные белки, которые в настоящее время используются в качестве корма для животных.

Одним из решений этой проблемы является использование микробных белков, синтезируемых грибами, дрожжами или бактериями. Дрожжевые белки считаются хорошо сбалансированными по аминокислотному составу и являются источником витаминов (в основном группы В и D). Дрожжи быстро растут, накапливают большое количество белка, по сравнению с мицелиальными грибами имеют низкий риск загрязнения спорами и их легко отделять от питательной среды. Также они содержат меньшее количество нуклеиновых кислот (5–12 %), чем бактерии (8–14 %), что упрощает очистку белка для применения при производстве пищевых продуктов. Показано также, что некоторые виды дрожжей могут оказывать положительное воздействие на здоровье сельскохозяйственных моногастричных животных и рыбы благодаря присутствию биоактивных и иммуностимулирующих соединений, таких как β -глюканы и α -маннан.

Сырьем для дрожжевой биоконверсии могут служить различные растительные отходы пищевой и перерабатывающей промышленности. Основные требования к сырью – низкая стоимость, а также бесперебойность поставок его больших партий. Одним из вариантов сырья может быть лузга подсолнечника, в значительных количествах накапливающаяся на Российских маслоэкстракционных заводах. В зависимости от сорта

масличной культуры, лужистость семени может достигать 30 % от массы неочищенного семени.

По данным ИКАР урожайность подсолнечника в России в 2020 году составила 13,8 – 13,9 млн т, экспорт составил 1,6 млн. т, то есть около 12 млн т подсолнечника было переработано внутри страны. После лущения семян образовалось около 3 млн. т лузги. В настоящее время перерабатывается 40 % образующейся лузги, остальные 60 % захоранивают или утилизируют путем сжигания. Использование подсолнечной лузги в качестве субстрата для получения белкового продукта на основе дрожжей позволит сократить количество образующихся отходов.

Степень разработанности проблемы. Существенный вклад в исследование возможности ферментативной биоконверсии целлюлозных отходов перерабатывающих предприятий в белковые препараты внесли отечественные и зарубежные ученые: Иванова Л.А., Грачева И.М., Сеницын А.П., Бирюков В.В., Канарский А.В., Римарева Л.В., Гернет М.В., Градова Н.Б., Войно Л.И., Волкова Г.С., Бутова С.Н., Борисенко Е.Г., Воробьева Г.И., Hendriks A., Khan A., Matassa S., Boon N., Pikaar I., Verstraete W. Тем не менее, данные, приведенные в литературных источниках, содержат мало сведений о возможности комплексной биоконверсии подсолнечной лузги в препараты пищевого и кормового назначения.

Целью настоящего исследования явилось решение комплекса научно-практических задач, направленных на разработку ресурсосберегающей технологии биоконверсии подсолнечной лузги в белковые препараты для сельского хозяйства и пищевой промышленности.

Для достижения цели были поставлены следующие **основные задачи**:

- 1) разработать способ предобработки подсолнечной лузги;
- 2) разработать технологию ферментативного гидролиза предобработанной лузги;
- 3) разработать технологию получения кормового белкового препарата на основе ферментолизата подсолнечной лузги;

4) разработать технологию получения белкового ингредиента пищевого назначения (белкового концентрата) на основе биомассы дрожжей;

5) разработать ресурсосберегающие технологии утилизации отходов, образующихся при осуществлении основных технологических процессов.

Научная новизна работы. Научно обоснованы и экспериментально подтверждены параметры процесса щелочной делигнификации и ферментативного гидролиза полисахаридов подсолнечной лузги, заключающиеся в последовательном измельчении, обработке 4 %-ным раствором гидроксида натрия и коммерческим ФП «ЦеллоЛюкс-Ф».

С применением методов математического моделирования выявлены рациональные условия биокаталитической деструкции полимеров подсолнечной лузги. Показано, что использование биокаталитического метода обработки делигнифицированной подсолнечной лузги позволяет получить ферментолитат, содержащий 3,4 % РВ, из которых глюкоза – 73,65 %; целлобиоза – 12,49 %; олигосахариды – 13,86 %.

Выявлено, что последовательное обезжиривание и дenuклеинизация дрожжевой биомассы *Kluyveromyces marxianus* Y-4557 позволяет получить белковый ингредиент для пищевой промышленности (концентрат), сбалансированный по незаменимым аминокислотам и отвечающий требованиям, предъявляемым к белковым концентратам (не менее 60 % белка, не более 2 % липидов и нуклеиновых кислот).

Теоретическая и практическая значимость работы. Основные положения и выводы диссертационного исследования являются основой для разработки биотехнологий белковых препаратов для сельского хозяйства и пищевой промышленности на основе трудноутилизируемых биополимеров.

Определены рациональные параметры механической, химической и биокаталитической предобработки подсолнечной лузги, позволяющие получить основу питательной среды (ферментолитат) для дрожжевых культур.

Разработаны и апробированы технологии получения кормовых дрожжей на основе штаммов *Kluyveromyces marxianus* Y-4557 и *Candida parapsilosis* D-18 с содержанием сырого протеина не менее 55 %, перевариваемостью в условиях *in vitro* более 95 % за 3 ч.

Разработаны технологические решения по получению белковых концентратов на основе микробной биомассы *Kluyveromyces marxianus* Y-4557 с содержанием истинного белка 65 %, липидов и нуклеиновых кислот менее 2 %.

Разработаны ресурсосберегающие технологии получения водорастворимой субстанции фитомеланинов и ферментного препарата кормового назначения на основе штамма *Myceliophthora thermophila* F-859.

Разработан комплект технической документации (ТУ и ТИ) на получение сухих кормовых дрожжей «КД-Км-60» (Приложение 1 и 2).

Получен патент РФ на изобретение № 2762425. Проведена опытно-промышленная апробация разработанных технологий на базе технологического отдела ООО «ПромБит» (г. Ефремов, Россия) и отдела № 2 ОАО Институт «Прикладной биохимии и машиностроения» (г. Москва, Россия) (Приложение 3 и 4).

Отдельные положения работы использованы при издании 2-х учебных пособий (лабораторный практикум по дисциплине «Биотехнология ферментных препаратов» (2020 г.) и учебное пособие «Микробиологическая оценка качества сырья и биотехнологической продукции молекулярно-генетическими и протеомными методами» (2020 г.)), рекомендованных для студентов, обучающихся по направлениям 19.03.01 Биотехнология (бакалавриат) и 19.04.01 Биотехнология (магистратура)-

Методология и методы исследования. В основе организации и проведении исследований лежат труды российских и зарубежных ученых, направленные на изучение способов биоконверсии различных целлюлозосодержащих субстратов в кормовые и пищевые добавки.

В работе использовались методы промышленной биотехнологии, прикладной энзимологии и аналитической химии. Все определения выполнялись с использованием современных методов анализа и на современном оборудовании, позволяющем получать результаты с высокой достоверностью.

Основные положения, выносимые на защиту:

- 1) Способ предобработки (механической и химической) и биокаталитической деструкции полимеров подсолнечной лузги.
- 2) Способ получения кормовых дрожжей на ферментолизате подсолнечной лузги;
- 3) Способ получения дрожжевого концентрата на основе культуры *Kluyveromyces marxianus*, используемого в качестве пищевого ингредиента.
- 4) Способ получения субстанции водорастворимых фитомеланинов, обладающих адсорбционной и антиоксидантной активностями и кормового целлюлолитического ферментного препарата на основе мицелиального гриба *Myceliophthora thermophila*, как побочных продуктов биоконверсии подсолнечной лузги.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности.

Диссертация соответствует пунктам 2, 4, 6 Паспорта специальности 05.18.07 «Биотехнология пищевых продуктов и биологически активных веществ».

Степень достоверности результатов. Достоверность полученных результатов подтверждена применением современных физико-химических и биологических методов анализа, актом проведения испытаний разработанных технологий в отделе технологий препаратов на основе бактериальных и грибных культур (отдел № 2) ОАО «Биохиммаш» (г. Москва) и в опытно-промышленном цехе ООО «ПромБит» (г. Ефремов) (Приложение 3 и 4). Основные продукты, полученные по разработанным технологиям, проанализированы в испытательной лаборатории ОАО Институт «Прикладной биохимии и машиностроения» (Приложение 5).

Результаты экспериментов представлены как средние (M) при 3-кратной повторности со стандартными ошибками средних (\pm SEM). Разность двух средних величин признавалась статистически значимой при отсутствии перекрытия их доверительных интервалов. Для обработки результатов исследований применялись методы математической статистики. Данные анализировались в программном пакете «Statistica» (версия 12.6, StatSoft). При статистической обработке полученных данных определяли доверительный интервал среднего арифметического для $p = 0,05$.

Личный вклад диссертанта заключается в проведении сбора и анализа литературных данных, планировании и реализации научных экспериментов, обобщении и систематизации полученных результатов, оформлении диссертации, представлении полученных результатов на конференциях и в виде научных публикаций.

Апробация результатов работы. Основные положения диссертации представлены на международной конференции «Современные вызовы и актуальные проблемы науки, образования и производства» (X Международная научно-практическая конференция, Киев, 2020 г.), международном форуме «Биотехнология: состояние и перспективы развития» (Москва, 2020 г.), международной конференции «Инновационные технологии, экономика и менеджмент в промышленности» (VIII Международная научная конференция, Волгоград, 2021 г.), международной конференции «Теоретические и практические вопросы современной науки» (77я Международная научная конференция, Москва, 2021 г.), международной конференции «Приоритетные направления инновационной деятельности в промышленности» (VIII Международная научная конференция, Казань, 2021 г.), международной конференции «Продовольственная безопасность: биотехнология и цифровизация АПК» (Международная научно-практическая конференция в рамках Глобального продовольственного форума, Москва, 2021 г.)

ГЛАВА 1 Обзор литературы

1.1 Белок в рационе человека

Питание человека – важная часть поддержания нормальной жизни. Состав пищи должен быть сбалансированным, содержащим компоненты, необходимые для удовлетворения потребностей организма в белках, жирах, углеводах, макро- и микроэлементах.

Проблемы глобального дефицита белка становятся с каждым годом все актуальнее, поскольку население планеты растет с каждым годом. Возникают трудности его обеспечения продуктами, богатыми полноценным белком [51].

Суточная потребность в белке составляет приблизительно 80 г, а среднее потребление – 60 г. Большая часть населения испытывает недостаток в полноценном белке [59]. Недостаток белка был признан следствием экономических и социальных проблем. Именно поэтому не все могут позволить себе продукты, богатые цельным белком [25]. Общий дефицит белка на нашей планете составляет около 20 миллионов т в год [75].

Ученые убеждены, что существует необходимость оптимизации химического состава продуктов питания за счет их обогащения белками [34]. Традиционные способы получения белка являются дорогостоящими по сравнению с микробным синтезом. Этот факт является ключевым во многих странах, где наблюдается картина его дефицита [119].

Одной из причин дефицита животного белка является недостаток растительного сырья, используемого для кормления. Однако, ВОЗ, несмотря на полноценность и отличную усвояемость животного белка, относит мясные изделия к группе продуктов, вызывающих канцерогенные заболевания. В связи с этим мировые исследования сейчас направлены на поиск альтернативных источников белка, например, растительных или микробных биологически активных добавок [36, 37].

Нельзя не упомянуть проблему «парникового эффекта» от ведения сельскохозяйственной деятельности [137]. В частности, скотом выбрасывается в атмосферу около 10 % углекислого газа от общего количества выбросов остальными загрязнителями [155].

При недостаточном потреблении белоксодержащей пищи у человека диагностируется заболевание – «белковая недостаточность», влияющая на нормальную жизнедеятельность организма [31].

У молодых людей данное заболевание ведет к задержке в развитии и замедлению роста. Лица более старшего возраста находятся в группе риска [62, 145].

Выделяют несколько причин дефицита белка [62]:

1. Высокая стоимость белковых продуктов питания
2. Тенденция потребления углеводной пищи взамен белковой
3. Ограниченность ресурсов для производства растительного и животного белка.

Одним из способов интенсификации процессов получения белка является совершенствование сельскохозяйственной отрасли: увеличение урожайности растений, продуктивности животных или поиск новых источников белка, таких как бактерии, дрожжи, грибы [182].

1.1.1 Растительный белок

Большинство продуктов питания по своему аминокислотному составу сильно отличаются от рассчитанного «эталонного белка» ФАО/ВОЗ. Это препятствует обеспечению человечества полноценным белком [163].

Для решения данной проблемы страны ищут альтернативные источники получения белка с высокой биологической ценностью.

Соя успешно используется в качестве источника белка в рационе не только животных, но и человека [15]. Ее добавляют в мясные продукты.

По сравнению с другими растительными источниками белка, соя является лидером и содержит незаменимые аминокислоты в нужном для человека количестве (таблица 1.1).

Таблица 1.1 – Сравнительная характеристика содержания аминокислот в сое, пшенице, говядине, свинине [15]

Название аминокислоты	Содержание аминокислоты в г на 100 г белка				
	Свинина, г	Говядина, г	Пшеница, г	Соя, г	«Эталонный белок» ФАО/ВОЗ, г
Аргинин	6,6	6,4	4,83	8,5	4,5
Валин	5,7	5,0	5,59	5,3	4,0
Гистидин	2,9	3,2	2,47	3,3	2,0
Изолейцин	5,1	2,9	4,96	5,5	2,8
Лейцин	8,4	7,5	8,52	9,1	6,6
Лизин	8,4	7,8	2,8	7,0	5,5
Метионин	2,3	2,5	1,83	1,4	2,5
Треонин	4,0	5,1	3,15	4,3	4,0
Фенилаланин	4,0	4,1	6,09	0,1	5,5

По данным таблицы ясно, что в сое недостаточно серосодержащих аминокислот. Растительный белок не уступает животному по качественному составу аминокислот. Поэтому из растительных источников в странах Запада широкое применение получила соя. Однако, использование сои в рационе вызывает аллергические реакции и возникновение онкологических заболеваний [68].

Данные факты вызывают споры о возможном вреде сои для организма человека, поскольку используются генетически модифицированные сорта сои. Тем не менее, к общему мнению научное сообщество не пришло, поэтому многие страны все еще используют эту культуру.

На западе соевые бобы используются как заменитель животного белка. В настоящее время ассортимент соевых продуктов достаточно широк: молоко, творог, сыр тофу, «соевое мясо». Соя также добавляется в корм для животных, чтобы увеличить прибавку в весе молодняка.

США достаточно долгое время занимали первое место по выращиванию сои. Однако, с 2019 г Бразилия является лидером по производству сои в мире – 124 млн. т. против 96,8 млн. т. в США. По данным «Kleffmann Group» [158], крупнейшей компании на мировом рынке маркетинговых услуг в сельском хозяйстве, производство сои в 2019 году составило 330 млн. тонн. В России и Беларуси ежегодно увеличивается объем производимой сои [15, 88, 97].

Соя занимает первое место среди всех других бобовых культур по объему годового урожая. Такое внимание к сое приковано из-за высокого содержания практически всех незаменимых аминокислот в нужном количестве. Кроме того, соя насыщает почву азотом, что увеличивает ее плодородие. По литературным данным, монополистами по производству сои в России являются ЗАО «Содружество Соя», ООО «Амурагроцентр» и ОАО «Эфирное» [28, 91]. Кроме того, согласно этим статьям, импорт соевых бобов в Россию увеличивается, что еще раз подчеркивает проблему белкового дефицита. Здесь следует отметить, что в России собирают намного меньше сои с гектара, чем в других странах, в том числе в Канаде, которая находится в примерно схожих климатических условиях. Это связано с запретом выращивания генетически модифицированных сортов сои на территории Российской Федерации. России идти по этому пути довольно сложно: соевые бобы в наших условиях растут плохо, а импорт убыточен из-за ежегодного роста цен на соевый белок [49, 102].

Также стоит понимать, что в наших климатических условиях соя не приживется так же хорошо, как в Южной Америке, а соевые продукты являются нетрадиционными. Аналог сои - горох, содержание белка в котором в среднем составляет 85 – 88 %. «Гороховый протеин» усваивается практически полностью, на 96 % [107].

Для России традиционной культурой является горох, который, аналогично сое, содержит большое количество белка и по аминокислотному составу близок к «эталонному белку». Это подтверждают данные белкового

анализа двух сортов зерен гороха, выращенных в Оренбургской области [14]. Был рассчитан аминокислотный скор, который показал, что белок гороха в целом соответствует требованиям ФАО / ВОЗ по всем незаменимым аминокислотам, но серосодержащие аминокислоты являются лимитирующими, что типично для всех растений [49].

Грибы базидиомицеты – отличный заменитель соевого белка. Сегодня существует множество различных технологий выращивания шампиньонов, вешенок и других съедобных грибов, которые, в свою очередь, накапливают довольно большое количество белка – примерно до 40 % [23]. Доказано, что урожайность грибных культур в десятки раз превышает урожай овощных культур [95]. Преимущество выращивания базидиомицетов заключается в возможности создания производства с отсутствием отходов. Для базидиомицетов субстратом могут служить вторичные сырьевые ресурсы пищевой, сельскохозяйственной и лесной промышленности. Базидиомицеты являются источниками меланинов [100]. Отработанная среда может использоваться как удобрение, а также как корм для скота. Но, с другой стороны, минусом грибных технологий является накопление тяжелых металлов, которые попадают в грибы через субстрат и в результате становятся опасными для человеческого организма [17]. Кроме того, возможность выращивания грибов в искусственных условиях существует не для всех видов, поскольку многие из них имеют симбиотические отношения с высшими растениями [95].

Водоросли являются источником полноценного белка, содержание которого достигает 40 %. Главное преимущество водорослей – это их невысокая себестоимость. Отмечается также высокое качество содержащихся в них белков. Кроме того, они способны синтезировать витамины и накапливать минеральные вещества. Несомненно, такой продукт имеет высокую биологическую ценность [73]. Добыча и производство водорослей в России составляет около 1000 т в год, что является небольшим объемом с учетом богатых морских запасов нашей страны. Однако водоросли, как и

грибы, накапливают тяжелые металлы и другие токсичные соединения [42]. Учитывая частые антропогенные чрезвычайные ситуации, происходящие в морях и океанах, этот источник белка нельзя назвать «надежным».

Разработаны технологии, которые позволяют получать белковый концентрат из молочных отходов – молочной сыворотки [65]. Также определены условия безопасного производства белковых биологически активных веществ на основе молочной сыворотки. Такой продукт богат белком, но ресурсы молока ограничены, а значит, данная технология позволяет только утилизировать отходы, но никак не способна обеспечить население белком.

Другой вариант решения глобальной проблемы дефицита белка – это выращивание аквакультуры в естественных и искусственных условиях [25]. Белок рыбной муки имеет высокую степень усвояемости (до 80 %). Однако улов некоторых видов рыб носит сезонный характер, к тому же моря и океаны очень часто страдают от антропогенного загрязнения, в результате чего в организме рыб накапливаются различные токсичные соединения.

Таким образом, на текущий момент существует множество подходов к решению глобальной проблемы нехватки белка. Страны повышают урожайность сельскохозяйственных культур, выводят новые сорта высокоурожайных растений и новые породы сельскохозяйственных животных. Все эти методы, несомненно, позволяют обеспечить человека белковыми веществами, но не следует забывать о заключении ВОЗ о связи мяса и возникновении онкологических заболеваний, а также необходимо учитывать, что растительный белок может удовлетворить потребность человека во всех незаменимых аминокислотах лишь частично. Как показывает практика, чаще всего в растительном белке не хватает серосодержащих аминокислот.

1.1.2 Дрожжи как источник полноценного белка в рационе человека

Абсолютно все живые организмы содержат тысячи белков, ответственных за поддержание определенных функций. Организм человека не обладает способностью к синтезу таких протеиногенных аминокислот как триптофан, лизин, метионин, валин, лейцин, изолейцин, фенилаланин и треонин, поэтому для восполнения белковой недостаточности их необходимо получать с пищей. Источниками полноценного белка для человека служат продукты животного происхождения. Растительные белки не способны закрыть потребность организма в восполнении дефицита незаменимых аминокислот, в связи с чем их принято считать несбалансированными [47].

Один из наиболее перспективных способов решения проблемы обеспечения населения полноценным белком – получение биомассы дрожжей.

Имеются научные сведения, опираясь на которые дрожжи можно рассматривать не только в качестве продуцента кормового белка для сельскохозяйственных животных, но и в качестве полноценной белковой добавки в рационе человека [5]. Дрожжи необходимы при производстве многих продуктов питания и напитков, таких как вино, хлеб, кефир и пиво [78, 93, 129, 141, 162], а также участвуют в созревании некоторых сыров [122].

Дрожжи широко используются в пищевой промышленности, особенно в традиционных заквасках, которые считаются безопасными [45]. Они могут проявлять устойчивость к антибактериальным препаратам, что является предпосылкой для их дальнейшего применения не только в качестве источника микробного белка, но и пробиотиков, и способны передавать гены лекарственной устойчивости другим микроорганизмам [138].

В отличие от растительного, микробный белок содержит в своем составе незаменимые аминокислоты практически в полном составе, что доказано многочисленными анализами аминокислотного состава дрожжевого

белка [6, 34, 72, 79]. Белок микробного происхождения сопоставим с составом «эталонного белка», принятого ФАО/ВОЗ. Нельзя не отметить значительного преимущества, заключающегося в сверхпродуктивности микроорганизмов, в разы превосходящей прирост массы растительных или животных источников белка [23]. Для получения одинакового количества белка из растений и животных, в сравнении с микроорганизмами необходимо затратить значительное количество времени, тогда как микробный белок получают за несколько дней [57].

По данным многолетних исследований доказано, что дрожжи способны синтезировать не менее 60 % сырого протеина в пересчете на сухие вещества. Помимо всего они содержат большое количество различных витаминов, например, витамина D₂- эргокальциферола [71].

Однако, не все штаммы дрожжей возможно использовать для получения микробного белка для пищевых целей. К ним предъявляются строгие требования по безопасности. Разрешается использование дрожжей, входящих в состав FDA и GRAS [120].

Ряд клинических и доклинических исследований показывают, что пищевые дрожжи являются не только источниками органических, но и неорганических веществ – хрома, селена, цинка, железа, магния, меди, марганца. Хром необходим для поддержания нормального уровня глюкозы в крови, а селен способствует нормальной работе иммунной системы [93].

В дрожжевой биомассе помимо всего накапливаются липиды и нуклеиновые кислоты, которые необходимо удалять [36]. Липиды влияют на органолептические показатели продукта, окисляются, образуя токсины, опасные для человеческого организма. Избыточное количество нуклеиновых кислот способствует накоплению азота, поступающего и откладывающегося в органах человека [23, 36].

Большое количество нуклеиновых кислот в рационе человека увеличивает уровень мочевой кислоты в крови, что приводит к ее отложению в тканях суставов. Исследования показали, что безопасное потребление

нуклеиновой кислоты человека составляет 2 г в сутки, что составляет 20 г сухих дрожжей в день, исходя из 10 % нуклеиновой кислоты, содержащейся в дрожжах. Увеличение содержания дрожжей в рационе требует снижения содержания нуклеиновых кислот в самих дрожжах; это значение фактически может быть уменьшено [168].

В связи с этим, содержание в дрожжевой биомассе отмеченных выше компонентов строго нормируется. Количество липидов и нуклеиновых кислот не должно быть выше 2 %.

Биологически активные вещества, получаемые из дрожжевой биомассы, делятся на 3 группы [37]:

1. Дезинтеграты клеток
2. Концентраты
3. Изоляты

Многие европейские страны используют все виды БАВ, но в России к добавкам такого рода предъявляются жесткие требования, поскольку их разрешено применять в пищевых целях. Поэтому в пищевой промышленности используют концентраты и изоляты.

Концентраты и изоляты дрожжей очень похожи по составу (белок не менее 60 %, липиды не более 1 % и нуклеиновые кислоты 2 % – для концентрата; не менее 80 % белка, не более 1 % липидов, 2 % нуклеиновых кислот и 5 % углеводов – для изолята) [36, 37].

Принципиальное отличие концентратов от изолятов заключается в их технологии. При получении концентрированного белка клеточная стенка частично разрушается, и извлекаются только нежелательные компоненты (нуклеиновые кислоты и липиды). Для получения изолята полностью разрушается клеточная стенка, экстрагируется белок и большая часть внутриклеточных компонентов, далее экстрагированный белок освобождают от сопутствующих веществ [37].

С каждым годом интерес к использованию микробного белка в качестве пищевой добавки набирает обороты. Продукт содержит достаточно

большое количество аминокислот: лизина, триптофана, глутаминовой кислоты [161].

Россия не исключение: ученые ведут исследования и внедрение белковых дрожжевых добавок в пищевые продукты. Проводились исследования по внедрению микробного белка в состав злаковых батончиков [40]. При этом наблюдалось повышение содержания в них белка в 2 раза.

В пищевой промышленности используют и дрожжевые экстракты [180]. Их получают на основе осадочных пивных дрожжей [72]. Основными питательными компонентами дрожжевых экстрактов являются: гидролизат белков со свободными аминокислотами, микроэлементы и витамины группы В [183]. Так же их используют в качестве заменителей пищевой соли [181], отмечая их положительные стороны, в отличие от соли, вызывающей гипертонию [153], задержку воды [179], сердечно-сосудистые заболевания [151], почечную недостаточность и отеки [185]. Обогащенные дрожжами экстракты, содержащие достаточное количество белка тиоредоксина, можно использовать в функциональных продуктах питания для облегчения пищевой аллергии [180, 188] и активации иммунной системы [116].

По результатам многочисленных исследований отмечается, что микробный белок безвреден и может быть использован в качестве альтернативного источника полноценного белка [47]. Кроме того, для использования белка в пищевых целях его следует избавлять от потенциально опасных для человека веществ, поэтому целесообразно использовать в пищевых производствах очищенные концентраты и изоляты.

1.1.3 Дрожжевые препараты пищевого назначения

Среди БАД имеются функциональные добавки пребиотического действия. В настоящее время из их ассортимента, представленного на рынке, можно выделить: Фервитал, Эубикор, Рекицен-РД. Рекицен-РД – БАД на основе пшеничных отрубей, прошедших ферментативную обработку

культурой винных дрожжей (*Saccharomyces cerevisiae vini*). Фервитал и Эубикор производятся по похожей технологии и обладают схожим действием. Однако, в отличие от Рекицен-РД и Эубикора, для производства Фервитала используют штамм дрожжей *Saccharomices cerevisiae* (ВКПМ У-511), выделенный из ягод винограда [60, 135].

Дрожжи после накопления биомассы инактивируют термической обработкой, они остаются в готовом продукте и повышают суммарное количество белка до 20 %. Благодаря наличию клеточных стенок дрожжей препараты сорбируют токсичные вещества, выводя их из организма, а пшеничные отруби участвуют в восстановлении кишечной нормофлоры и усилении её перистальтики. В связи с этим они находят широкое применение при гастроэнтерологических, стоматологических, инфекционных заболеваниях и действии неблагоприятных производственных факторов [60].

Другие дрожжи, *Torula* (*Candida utilis*, переименованные в *Pichia jadinii*) в качестве пищевого продукта для коммерческого производства впервые были предложены немецкими учеными в Институте ферментации и биотехнологии (Берлин) во время Первой мировой войны. Этот вид дрожжей может расти на недорогих субстратах, таких как меласса или жидкие отходы целлюлозно-бумажной промышленности. Биомасса микроорганизмов после обработки может использоваться в пищевой промышленности. Из-за большого содержания белка (и большого содержания глутаминовой кислоты) находят применение в качестве замены глутамата натрия и в качестве ароматизатора [150, 171].

1.2 Подсолнечник как пищевое сырье

Подсолнечник – растение, которое относится к семейству сложноцветных, принадлежит роду *Helianthus*, включающему более 70 видов. Подсолнечник состоит из большой круглой корзины желтого цвета с семенами, волосатого стебля и длинного стержневого корня.

Оптимальная температура роста подсолнечника 20 – 25° С, характерная для Северной Америки, откуда в дальнейшем он был завезен в Европу [84]. Чаще всего подсолнечник выращивают летом в условиях достаточного количества осадков. Подсолнечник считается одной из наиболее экономичных и прибыльных масличных культур. Однако урожайность данной культуры зависит от почвенных и климатических условий, но в отличие от зерновых его можно выращивать в условиях относительной засухи и при более высоких температурах без особых потерь урожая. Это достигается за счет длинной корневой системы, которая позволяет переносить подсолнечнику условия засухи [140].

Примерно 87 % растительного масла во всем мире изготавливается из подсолнечника. Кроме пищевого масла, подсолнечник можно употреблять в пищу как сырым [29], так и жареным.

Подсолнечник культивируют двух видов: масличный и кондитерский типы. Из названий следует, что масличные содержат большее количество масла, а их семена черного цвета с тонкой оболочкой; кондитерский тип имеют больший размер, семена – черные с белыми полосами [84, 140]. В своем составе растительные масла содержат пищевые волокна, минералы, витамины и антиоксиданты. Растительные жиры более полезные, чем жиры животного происхождения за счет присутствия в них большого количества полиненасыщенных жирных кислот.

1.2.1 Питательная ценность подсолнечника

Большой спрос на растительные масла обусловлен тягой людей к употреблению сбалансированной пищи, предотвращающей возникновение ожирения, неврологических и сердечно-сосудистых заболеваний.

Масличные культуры содержат полифенолы, способствующие предотвращению окисления липидов. В качестве антиокислительного агента в семенах подсолнечника выступает хлорогеновая кислота [152]. Также

семена подсолнечника богаты флавоноидами и жирными кислотами, такими, как пальмитиновая, олеиновая, линолевая, стеариновая и линоленовая.

В состав подсолнечника входят белки, антиоксиданты, блокирующие образование свободных антиоксидантов, тем самым предотвращая повреждение клеток и снижая развитие хронических заболеваний [29].

1.2.2 Производство масличных культур в Российской Федерации

Растительные масла – товары с высокой добавленной стоимостью. Масла обладают хорошим потенциалом для получения прибыли от экспорта. С этой целью на территории РФ повышается сбор семян масличных и их переработка [39].

Масличные культуры используют в качестве источника растительного масла, а также кормового белка. Масличные культуры применяются в таких отраслях промышленности, как: химическая, мыловаренная, лакокрасочная и т.д. [33].

Количество получаемого масла с каждым годом растет. С 2005 года урожайность масличных культур увеличилась более чем на 200 % [66]. Каждый год в США один среднестатистический человек потребляет 9,6 кг масла, в Европе 37,8 кг, а в России 13,5 кг [84]. Пропорционально увеличению урожая масличных увеличивается количество отходов, связанных с их переработкой. К основным масличным культурам относят соя, рапс, кукуруза и подсолнечник [33]. Примерно 15 % всех посевных площадей в России составляют масличные культуры, самыми распространенными которыми являются подсолнечник, соя и рапс [64].

Главной масличной культурой является подсолнечник, на долю которого приходится около 58,5 %, сои – 21,1 %, рапса – 11,3 % [70]. В таблице 1.2 приведены показатели производства масличных культур в России.

Таблица 1.2 – Производство масличных культур в России [70]

Показатели	Год				
	2000	2015	2016	2017	2018
Посевная площадь, тыс. га	5485	11517	12320	12630	13941
В том числе:					
Подсолнечника	4643	7013	7607	7994	8160
Сои	421	2131	2237	2636	2949
Рапса	232	1021	980	1005	1576
Доля масличных культур от посевной площади, %	6,5	14,6	15,5	15,8	17,5

Согласно приведенным выше данным, наибольшее количество урожая приходится на подсолнечник. С каждым годом увеличивается количество посевных площадей под подсолнечник: с 2000 года по 2018 год оно возросло с 5485 тыс. га до 13941 тыс. га.

1.2.3 Производство подсолнечника в России

Основной масличной культурой во многих славянских странах является подсолнечник. При его переработке образуется 33 % шрота, который идет на корм скоту, а также 16 – 20 % лузги от массы семян, используемой при получении этилового спирта, а также кормовых дрожжей и фурфурола.

По данным РБК [99] в 2021 году валовый сбор подсолнечника в России составил 13,3 млн. т, что соответствует 70 % урожайности всех масличных. В 2020 году сбор масличных составит 22,5 млн. т, а подсолнечника – 14 млн. т. Количество образованной шелухи подсолнечника доходит до 30 % от полной массы нативной семечки. Согласно статистике ИКАР [39], в 2020 году экспорт подсолнечника составил 1,6 млн. т.

Одним из способов использования лузги подсолнечника является формирование из нее прессованных брикетов с целью применения в качестве топлива. На брикетирование идет 40 % образующейся лузги, оставшиеся 60 % закапываются в землю либо утилизируются путем сжигания.

Альтернативным вариантом использования лузги является получение из нее ценных компонентов. Так как лузга является источником углеводов, ее можно использовать в качестве субстрата для получения дрожжевых препаратов кормового назначения.

1.2.4 Производство масличных культур в мире

Количество посевных площадей, отводимых под масличные культуры, с каждым годом в мире увеличивается. За последнее десятилетие доля масличных сельскохозяйственных угодий увеличилась почти в 3 раза. Основным поставщиком масличных культур являются азиатские страны.

Масличные культуры занимают важное место в качестве компонента рациона человека, а также как альтернатива традиционным энергетическим носителям [92]. По объему производства масличные уступают только лишь зерновым [108].

В 2018 году во всем мире засеяли 1,5 млн. га масличными. Лидерами являются Россия, Китай, Индия и США [94, 167, 186, 187]. При этом 50 % всех площадей составляет соя, 11 % – подсолнечник (рисунок 1.1).

Такое количество урожая обусловлено увеличением спроса населения на растительные масла. По прогнозам, к 2050 году спрос на масла увеличится примерно в 2 раза [186].

Среди стран, занимающихся производством сои, лидерами являются США, Бразилия, Аргентина и Китай. Она является важнейшей культурой, из которой получают муку и растительное масло. В настоящий момент активно наращивают темпы производства сои страны Южной Америки. Соя является богатым источником белка, поэтому ее активно используют для получения аналогов молочных и мясных продуктов [136].

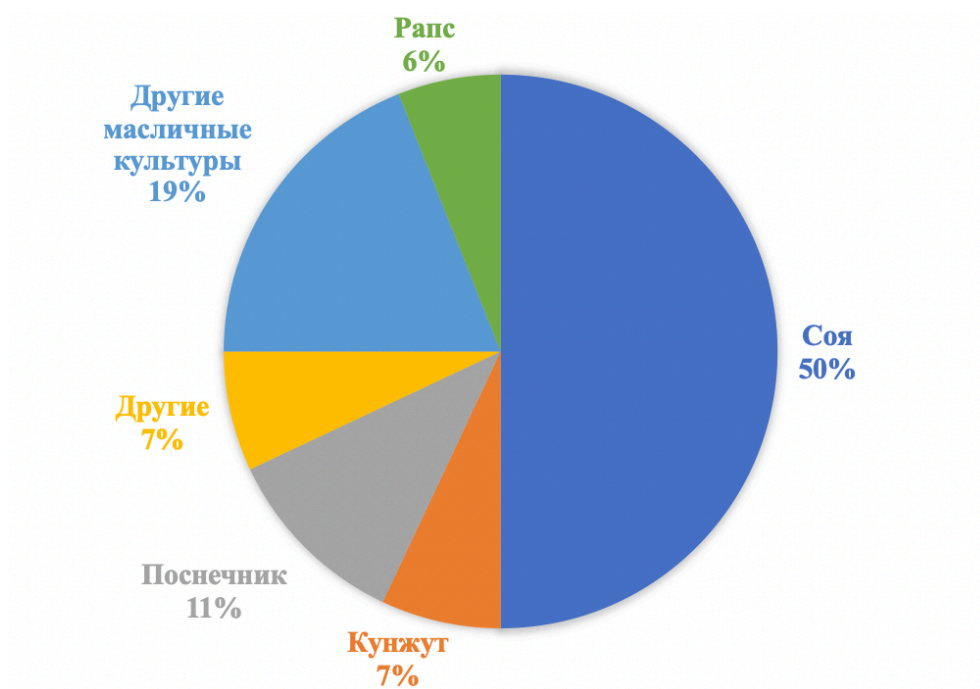


Рисунок 1.1 – Площади, отводимые под масличные культуры [94]

Второй распространенной масличной культурой является рапс. Подобно другим масличным с каждым годом увеличивается и производство рапса. Основными производителями выступают Китай, Индия, Канада и Европейский Союз. При этом основным потребителем рапсового масла является Европа. После соевого шрота рапс занимает вторую строчку [123]. Рапс в основном применяют в пищу, для кормовых целей и в промышленности в качестве биотоплива.

По данным ООН в 2017 году было произведено 479 млн. тонн масличных культур [123]. При этом большая часть пришлась на сою, далее расположились подсолнечник, кунжут, рапс и другие культуры.

В настоящий момент сдерживающим фактором производства рапса во многих странах является запрет на выращивание генетически модифицированных растений. Однако страны ЕС не в состоянии обеспечить себя белковыми кормами и энергией самостоятельно, поэтому ежегодно в них поставляется более 30 млн. тонн ГМ-сои. Альтернативной культурой, которую они могут выращивать самостоятельно является рапс [11, 56].

1.2.5 Производство подсолнечника в мире

С каждым годом увеличивается спрос на продукты растительного происхождения. Пропорционально обработанному урожаю увеличивается количество отходов, которые мало используются в биоконверсии. В рамках мирового производства жмых подсолнечника стоит на четвертом месте по количеству отходов, что составляет 19 млн. м³ в год [94].

Среди трех основных масличных культур (соя, рапс и подсолнечник) подсолнечник является основным источником высококачественного масла, которое часто применяется в кулинарии. Это важнейшая масличная культура, спрос на которую с каждым годом увеличивается пропорционально росту численности населения планеты.

Подсолнечник может использоваться в качестве источника белка вместо сои в тех странах, где ее производство затруднено.

Урожай подсолнечника вырос почти вдвое: с 10 млн. т в 1975 году до 52 млн. т в 2018 году [167]. Подсолнечник производится не в каждой стране ввиду географических и климатических условий.

1.3 Переработка лузги подсолнечника

Данная культура, с одной стороны, является конкурентом масличных культур, а с другой – бобовых. Семена подсолнечника содержат примерно 44 % масла и около 16 % белков [167]. Кроме того, семена богаты витамином Е, В1, В3, В6, фосфором, медью. За счет данных веществ семена оказывают противовоспалительное действие, способствуют детоксикации. Жмых содержит до 50 % белка, целлюлозу до 52 % и 3 % фенолов [166]. Фракция гемицеллюлозы состоит из D-глюкозы, D-маннозы, D-галактозы, D-ксилозы, L-арабинозы и L-рамнозы [125]. За счет того, что молекула гемицеллюлозы преимущественно имеет более аморфную структуру, чем целлюлоза, она лучше растворяется в воде. Целлюлоза чаще всего связана с лигнином

благодаря тому, что гемицеллюлоза выступает в качестве «клея» между этими фракциями.

Шелуха подсолнечника состоит на 4 % из сырого протеина, 5 % липидов, 50 % углеводов – целлюлоза и гемицеллюлоза, а также лигнина, 2 % золы. В золе лузги содержится 10,94 % P_2O_5 , 25,84 % K_2O , 19,07 % CaO и 18,58 % MgO [80, 108, 126].

1.3.1 Способы гидролиза подсолнечной лузги

Лузга подсолнечника состоит в основном из целлюлозы, являющейся самым распространенным биополимером на планете. Целлюлоза – это полисахарид, состоящий из остатков молекул D-глюкозы, которые связаны β – 1,4 гликозидными связями [17]. Параллельные цепочки связаны между собой водородными связями (рисунок 1.2).

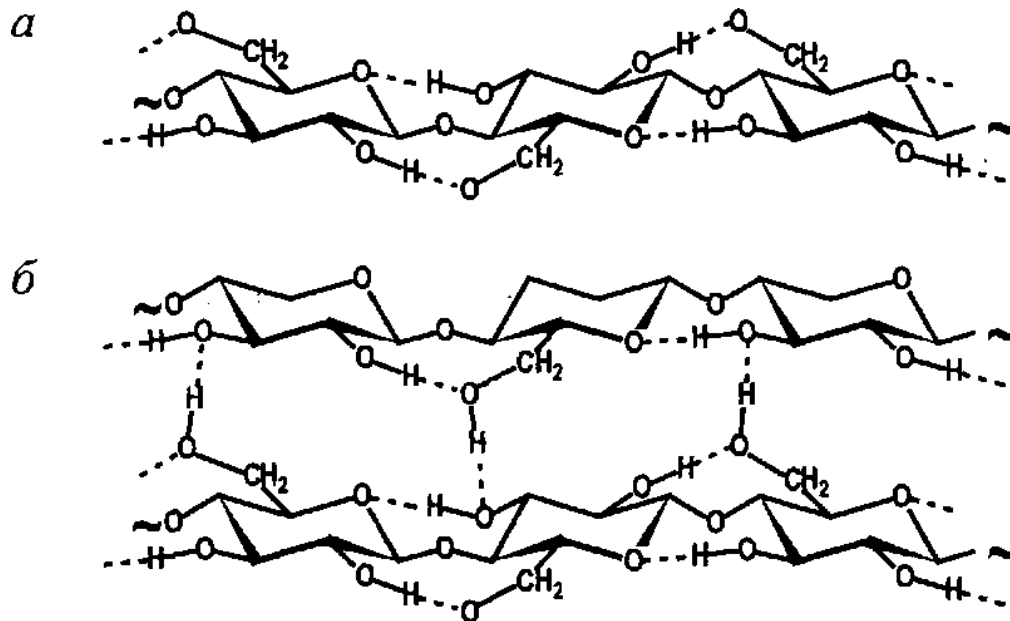


Рисунок 1.2 – Строение целлюлозы [17]

Из лузги возможно получать фурфурол и этиловый спирт [48, 178]. Фракция углеводов лузги может быть переведена в сахара, которые являются субстратом для микроорганизмов. Самым распространенным методом гидролиза является гидролиз разбавленной серной кислотой, он протекает за

относительно короткий промежуток времени. Метод гидролиза концентрированной кислотой приводит к образованию коррозии, что выводит оборудование из строя раньше времени [98].

Главным недостатком кислотного гидролиза является образование ингибиторов клеточной стенки – фурфурола.

Основными параметрами при кислотном гидролизе являются температура, концентрация кислоты и длительность гидролиза. Концентрация серной кислоты находится в диапазоне 0,5 – 1,5 %, температура - 121 – 160° С [132].

Одним из вариантов гидролиза лузги предусматривает обработку серной кислотой. Гидролиз осуществляют 0,2 Н серной кислотой при температуре 65 – 70° С. Далее полученный гидролизат нейтрализуют карбонатом кальция. При такой обработке выход редуцирующих сахаров составляет 40 – 50 % [126].

Другой способ обработки лузги подсолнечника предусматривает гидролиз серной кислотой при 120° С в две стадии. На первой стадии осуществляли гидролиз пентозанов, затем фракции целлюлозы на второй. При этом выход целлюлозы составил 79 %. На гидролизате целлюлозы выход дрожжей рода *Candida* составил 45 – 48 г на 100 г РВ [130].

1.3.2 Ферментативный гидролиз подсолнечной лузги

Существуют исследования, демонстрирующие возможность получения сахаров из лузги подсолнечника с использованием ферментов. Так, в одной из работ предлагалась предварительная обработка лузги подсолнечника 0,5 %-ной серной кислотой при температуре 140° С в течение 30 минут, после чего твердая фракция обрабатывалась ферментами [142]. Было установлено, что с повышением концентрации серной кислоты увеличивается количество образовавшегося фурфурола.

Также одним из вариантов предварительной обработки целлюлозосодержащего материала является паровой взрыв [174]. Сущность метода заключается в обработке биомассы паром под высоким давлением с последующим быстрым снижением последнего. Это позволяет сделать лигноцеллюлозную структуру менее кристалличной и тем самым увеличить доступность целлюлозных компонентов для действия ферментов. Предварительная обработка паровым взрывом при 220° С и дальнейший ферментализ позволил получить 16,7 г глюкозы на 100 г сырья [106].

Ферменты, позволяющие расщеплять целлюлозу до глюкозы приведены ниже [23]:

1. эндо-1,4-β-глюканаза; (КФ 3.2.1.4)
2. экзо-1,4-β-глюканаза; (КФ 3.2.1.91)
3. экзо-1,4-β-глюкозидаза; (КФ 3.2.1.74)
4. целлобиаза (КФ 3.2.1.21)

Схема гидролиза целлюлозы с участием ферментов с различной субстратной специфичностью представлена на рисунке 1.3.

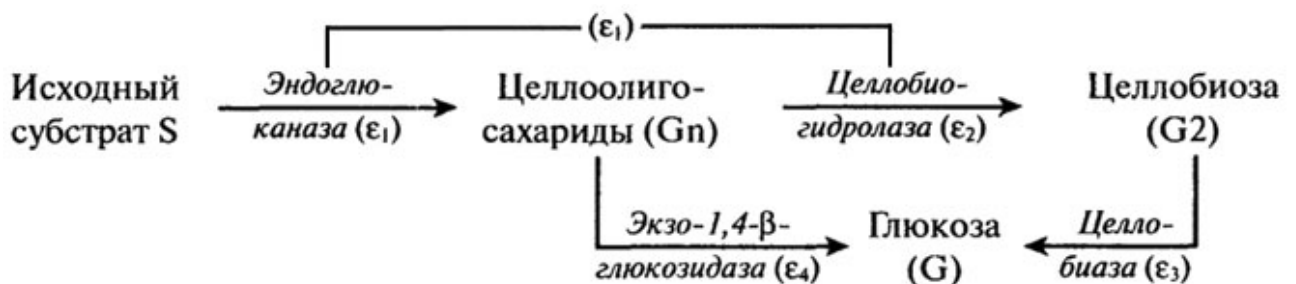


Рисунок 1.3 – Схема гидролиза целлюлозы [23]

Чаще всего используют комплексные ферментные препараты, которые содержат целлюлазы и ксиланазы, т.к. главным компонентом гемицеллюлозы является ксилан. Гидролиз ксилана осуществляется ферментами 1,4-β-D-ксиланксилогидролазой, (КФ 3.2.1.8), β-D-оксилозидазой 1,4-β-ксилозид ксилангидролазы, (КФ 3.2.1.37) [128].

При этом степень гидролиза целлюлозосодержащего материала зависит от степени «кристаллизации» субстрата, состава ферментного комплекса и удельной поверхности субстрата [143]. Удельная поверхность зависит от размера частиц, т.е., от степени полимеризации целлюлозы, которая может быть уменьшена за счет механического воздействия [172].

1.4 Потенциал микробной биоконверсии подсолнечной лузги

В настоящее время для повышения питательной ценности кормов при их производстве все чаще стали добавлять обогащенные белком переработанные отходы растительного происхождения. Это сырье содержит в своем составе большое количество целлюлозных волокон и лигнина. К нему относятся отходы масложировой промышленности - лузга, мукомольного производства - отруби, мучка и т.д [41]. Использование этих видов сырья достаточно перспективно, поскольку мировые тенденции направлены на существенное удешевление кормов за счет сокращения процентного содержания в них целых зерен и добавления вместо них заменителей, не уступающих по характеристикам и сбалансированности [2].

Перспективным направлением переработки подсолнечной лузги является микробная биоконверсия, поскольку является более дешевым и эффективным по сравнению с уже известными традиционными способами.

В качестве продуцентов используются микроорганизмы с высокой целлюлолитической активностью. В результате увеличения их биомассы перерабатываемое растительное сырье обогащается микробным белком [63].

Использование бактерий, микроскопических грибов и дрожжей для получения кормов с высоким содержанием белка из отходов является распространенным технологическим приемом.

Так, при использовании в процессе ферментации мицелиальных грибов наблюдалась тенденция увеличения содержания сырого протеина, белка и существенное снижение количества целлюлозы [7].

Биологические активные добавки, полученные в результате микробной биоконверсии субстрата, содержат большее количество протеина, чем аналоги растительного происхождения, которые недостаточно сбалансированы с точки зрения содержания в них незаменимых аминокислот. Кроме того, помимо синтеза протеинов идет активное накопление минеральных веществ и витаминов, необходимых для сохранения и поддержания нормальной жизнедеятельности человека и животных.

По мнению ученых, получение белка традиционными способами негативно влияет на окружающую среду [137, 183], в то время как микробиологический синтез позволяет решить сразу несколько задач: организацию безотходного производства, осуществляя переработку отходов растительного происхождения и удовлетворение потребностей животных и человека в незаменимых аминокислотах [161].

Существенным преимуществом микробного синтеза белков является высокая продуктивность, превосходящая продуктивности растений и животных во много раз [23] - микроорганизмы накапливают до 70 % белка от сухой массы.

В таблице 1.3 дана сравнительная характеристика скорости увеличения биомассы микроорганизмов, растений и животных в 2 раза.

Данные таблицы наглядно демонстрируют, что микроорганизмам для накопления биомассы требуется меньшее количество времени, что является их преимуществом по сравнению с животными и растениями, указывает на их высокую продуктивность и доказывает, что за несколько суток микробным синтезом можно получить количество белка микробных клеток, равное количеству белка животных и растений, при этом не затрачивая значительные силы и ресурсы в течение длительного времени.

Таблица 1.3 – Время удвоения массы микроорганизмов, растений и животных [23]

Наименование	Время
Бактерии	0,5 ч
Дрожжи	1-2 ч
Грибы и водоросли	6 ч
Лиственные растения	2 нед
Птица	6 нед
Свинья	4 нед

Микробиологический синтез белка имеет ряд преимуществ:

1. Высокая продуктивность микроорганизмов
2. Наименьшая трудоемкость процесса по сравнению с традиционными методами
3. Использование в качестве субстрата отходов растительного происхождения
4. Процесс не требует использования больших площадей, в отличие от традиционных способов получения белка
5. Процесс производства возможно реализовать в любой точке мира

При этом отмечается, что микробный белок не должен быть патогенным, должен иметь высокую пищевую ценность и невысокую стоимость [186].

Поскольку отходов растительного происхождения в нашей стране накапливается достаточно много, то технология получения белка при помощи переработки микроорганизмами - достаточно перспективное направление.

1.5 Лигнин и фитомеланины из подсолнечной лузги

Подсолнечная лузга – это отход масложировой промышленности, являющийся ценным источником некоторых продуктов природного

происхождения, в число которых входит целлюлоза, перспективная для переработки. Это отвердевшая растительная ткань с однородной структурой, переменными физико-химическими свойствами и составом. Использование подсолнечной лузги для получения высокобелковых компонентов целесообразно и выгодно. Однако, помимо целлюлозы и гемицеллюлозы в составе оболочки содержится большое количество биополимера лигнина, что усложняет процесс биоконверсии и снижает выход кормовых белковых продуктов [59, 118, 148].

Биосинтез лигнина активно способствует росту растений, развитию тканей и органов, устойчивости растений к биотическим и абиотическим факторам [154].

На рисунке 1.4 показан общий, для всех высших растений, путь биосинтеза лигнина.

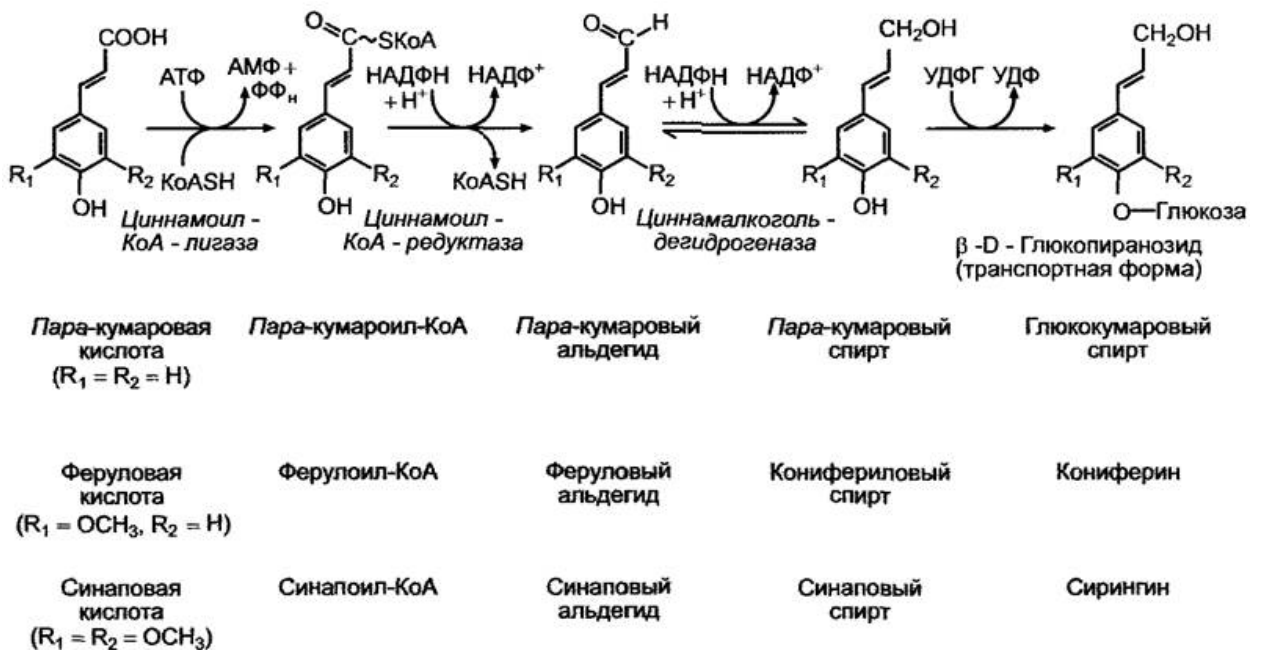


Рисунок 1.4 – Активирование и восстановление коричных кислот, которые являются предшественниками лигнина [154]

Лигнин – это аморфный и сложный по структуре и строению биополимер, широко распространенный в природе [103, 159]. Вместе с

другими биополимерами, такими как, целлюлоза и гемицеллюлоза, является частью стенки растительной клетки, которая не допускает проникновение ферментов или растворов в лигноцеллюлозную структуру [177], защищает растение от механических повреждений и образует твердый и прочный каркас [61, 146, 156].

Лигнин – это основная неуглеводная часть клеточной стенки. В отличие от других природных биополимеров, состоящих из углеводных остатков (в основном глюкозы), лигнин представляет собой серию ароматических гетерополимеров [109], называемых фенилпропановыми звеньями [110], основу которых составляют три спирта – синаповый, кониферилловый и п-кумаровый (рисунок 1.5) [96, 103, 157].

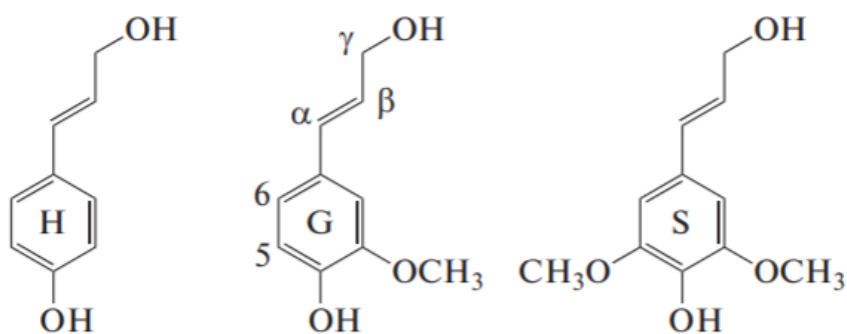


Рисунок 1.5 – Структурные звенья биополимера лигнина (слева-направо: п-кумаровый, синаповый и кониферилловый спирты) [157]

Этот биополимер был обнаружен в начале 19 века французским ученым Анселем Пайеном [27, 103]. Но, несмотря на достаточно большое количество исследований, проведенных за период со дня его открытия до настоящего времени, точная структура лигнина неизвестна [103]. Этот факт объясняется несколькими причинами, однако ученые выделяют основную, которая заключается в том, что химическая структура лигнина сложна и отсутствуют методы разделения, обеспечивающие сохранение его естественной структуры.

На вопрос о причинах химической неоднородности этого биополимера, а также его гетерогенности по молекулярной массе и химической структуре до сих пор не найдены ответы [32, 43, 90]. Благодаря этим особым свойствам исследования полимера продолжаются. Содержание лигнина в клеточной стенке может составлять треть от суммы всех компонентов [32, 157].

Лигнин, естественный барьер лигноцеллюлозной биомассы, представляет собой важный ограничивающий фактор усвояемости целлюлозосодержащего сырья. Чтобы разрушить его структуру, в качестве устойчивой и экологически чистой альтернативы традиционным физико-химическим технологиям, которые являются дорогостоящими и загрязняют окружающую среду, разрабатывают технологии предварительной биологической обработки сырья [118].

Ферменты, выделяемые микроорганизмами для деградации лигнина - биокатализаторы, которые способны эффективно преобразовывать лигноцеллюлозную биомассу в сахара, которые возможно использовать для нужд человека. Использование и конверсия целлюлозной биомассы имеет большое значение для решения многих общемировых проблем.

Ферментативный гидролиз в основном ориентирован на деградацию биомассы при различных условиях обработки, типе сырья и параметрах гидролиза. Метод ферментативного гидролиза, реализуемый в рациональных условиях, достаточно экономичен. При биоконверсии не выделяется опасных побочных продуктов по сравнению с кислотным гидролизом [117].

Помимо фосфолипидов, глицеридов, большого количества моносахаридов и аннуолидов – веществ терпеноидной природы, оказывающих аллелопатическое действие, важным компонентом лузги подсолнечника является меланин [133].

Меланины – пигменты, вступающие в окислительно-восстановительные реакции, характеризующиеся не только антиоксидантной, но и радио-, УФ-, гастро- и гепатопротекторной активностями [38]. Эти

свойства делают меланины пригодными для производства лечебно-профилактических препаратов, биологически активных веществ, антиоксидантов для пищевой и химической промышленности [44]. Вдобавок ко всему вышеперечисленному меланины можно использовать в качестве красителей [38].

В природе источниками меланинов могут служить грибы, а именно базидиомицеты [121, 170, 177], некоторые микроорганизмы, растения и животные, но выделять их достаточно сложно [86, 184]. Сейчас меланины получают преимущественно химическим синтезом, что резко отличает их свойства от природных [184].

Наиболее перспективным является метод получения меланинов при помощи микроорганизмов [160].

Существует способ экстракции меланинов растворами щелочей различной концентрации из отходов растительного происхождения, а именно из подсолнечной лузги [144].

Меланины нашли широкое применение в разных отраслях. Их используют как компоненты при производстве косметических средств, замедляющих преждевременное старение кожных покровов [134], рассматривают в качестве полупроводников, поскольку они обладают неплохими электропроводными свойствами [114]. Материал является биосовместимым и не оказывает загрязняющего воздействия на окружающую среду [131].

Помимо вышеперечисленного, меланины являются отличными природными красителями и обладают способностью замедлять процессы порчи пищевых продуктов [139], что способствует увеличению срока хранения последних. Например, в настоящее время меланоидины в составе пищевой добавки вносят в рецептуру мармелада, благодаря чему увеличивается срок хранения продукции [58]. В целом на здоровье человека меланины оказывают положительный эффект, регулируя в функции

сердечно-сосудистой системы и органов дыхания [35], способствуют стимуляции синтеза интерферонов [169].

Благодаря многочисленным исследованиям выявлены очевидные достоинства меланинов, благодаря которым целесообразно их использовать в качестве сорбентов токсичных компонентов, натуральных красящих веществ, радиопротекторов [149]. Внедрение пищевых добавок, в составе которых присутствуют меланины, значительно увеличивают сроки хранения продукции и наделяют ее свойствами, оказывающими лечебно-профилактическое действие [164].

1.6 Дрожжевой белок сельскохозяйственного назначения

В современных условиях выделяют несколько направлений повышения эффективности животноводства. Особое положение занимает сбалансированное кормление животных [30].

Кормопроизводство - масштабная и многофункциональная отрасль сельского хозяйства, по которой судят о состоянии животноводческой отрасли [55].

В рецептуре комбикорма, произведенного по классической технологии, доля зерна составляет 60 – 80 %, что влечет за собой сокращение мировых запасов этого сырья, которые невозможно восполнить, наращивая темпы производства [26].

Одна из важнейших задач кормопроизводства - изыскание и привлечение в баланс новых источников корма [52]. При расчете себестоимости животноводческой продукции основная часть затрат, около 65 – 70 %, приходится на корма [3], поэтому правильная организация кормления, а также сбалансированность кормов занимают ведущую роль в процессе интенсификации производства [5, 83].

К сожалению, существующая кормовая база животноводства не совершенна по своим качественным показателям, в основном из-за серьезной нехватки кормового белка [53, 92].

Известно, что при недостатке белка в рационе сельскохозяйственных животных уменьшается их продуктивность, снижается качество продукции [85], увеличиваются затраты на корм [5]. Корма растительного происхождения необходимо обогащать их белково-витаминными добавками [5].

Растительная биомасса – легкодоступный и возобновляемый источник, состоящий из целлюлозы, гемицеллюлозы, лигнина и пектиновых веществ [9]. Значительная часть этого сырья является высокопитательной средой для продуцентов и требует минимальных затрат при производстве кормового белка [10, 24].

С применением технологии микробного синтеза появляется возможность получать белок, отвечающий всем физиологическим потребностям скота, что определяется не только качественным, но и количественным составом кормов [74].

С экономической точки зрения микробиологический способ получения белка является самым эффективным, осуществляемым индустриальным методом и не зависящим от факторов окружающей среды.

Суть технологии биоконверсии заключается в воздействии на сырье комплексными очищенными ферментными препаратами, способными к глубокой деструкции структурных звеньев до более простых и легкоусвояемых [101]. Однако такой процесс дорог в реализации, поэтому существует способ прямой биоконверсии растительных отходов [52].

Для переработки растительной биомассы наиболее перспективным способом является конверсия с помощью микроорганизмов, к которым относятся дрожжи. Это эукариоты круглой или овальной формы. Обладают высокой скоростью деления, в среднем $\mu = 1,10^{-1} - 1,20^{-1}$ ч [4]. Данный

факт указывает на возможность получать достаточно большое количество микробного белка за небольшой промежуток времени.

Дрожжевая клетка является прекрасным источником ряда ценных элементов [89]. В своем составе она содержит витамины- тиамин, рибофлавин, фолиевую кислоту и др., превосходят рыбную муку по тиамину, пантотеновой и никотиновой кислотам [8], протеин, аминокислоты и другие ценные микроэлементы [13, 87, 147]. Дрожжевая клетка на 75 % состоит из воды и лишь на 25 % - из сухого вещества [67].

На рисунке 1.6 показан химический состав СВ дрожжевой клетки.



Рисунок 1.6 – Химический состав сухого вещества дрожжевой клетки [67]

Согласно данным рисунка, можно сделать вывод, что дрожжи преимущественно богаты белком, углеводами, а также имеют в своем составе небольшой процент неорганических веществ и нуклеиновых кислот [67].

Сельское хозяйство достаточно давно использует дрожжи как белковую биологически активную добавку. Внесение в рацион животных такого компонента существенно увеличивает привес скота на 12 – 16 % [75]. Немаловажен и экономический аспект использования дрожжей, поскольку они дают возможность заменить часть традиционного растительного сырья

на более дешевое [12]. Применение микробного белка имеет ряд преимуществ, среди которых выделяется способность получения биомассы на дешевом сырье, а именно, отходах других производств, тем самым решается проблема их утилизации [54].

Имеются технологии получения белковых концентратов кормового назначения из биомассы пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, содержащих не менее 60 % белка [37]. Кроме того, они имеют широкий интервал температур, в котором могут расти и развиваться [87].

Переработка отходов биологическим способом в продукт, используемый в практических целях, позволяет расширить кормовую базу и уменьшить влияние отходов на состояние окружающей среды [7].

Одно из исследований описывает возможность использования люпина в качестве добавки в корма для животных. Согласно автору статьи, в таком продукте содержится до 48 % СП. Внедрение люпина в качестве добавки позволило увеличить прибавку в весе у молодняка на 5% [1].

Конечно, растение семейства бобовых является многообещающей и перспективной добавкой в корм для скота, а некоторые сорта используются в пищу человеком [113].

Сырьевая база для производства кормового белка на основе дрожжей практически неограниченна [111]. Производство дрожжей для кормовых целей решает сразу несколько задач, а именно способствует получению высокоценного белка для сельскохозяйственных животных и созданию безотходных или малоотходных производственных технологических циклов.

Внедрение БВК в рацион сельскохозяйственных животных позволит расширить сырьевую базу для производства дополнительной продукции животноводства, создавать запасы кормов [50].

Заключение к обзору литературы

Одной из главных проблем человечества на сегодняшний день является недостаток как кормового, так и пищевого белка. Во многих развивающихся странах пропорционально росту населения увеличивается спрос на продукцию животноводства.

На сегодняшний день в мире существует дефицит пищевого белка и в ближайшие десятилетия он сохранится. По оценкам экспертов к 2024 г. рынок кормовых протеинов превысит 200 млрд. долларов. В России также растет производство комбикормов и спрос на высокобелковые кормовые добавки, дефицит кормовых протеинов в России составляет более 1 млн. тонн. Традиционные источники белка не в состоянии удовлетворить суточную потребность в пищевом и кормовом протеинах по экономической и социальной причинам. Недостаток белка в рационе питания влечет за собой нарушение азотистого обмена – «белковую недостаточность». Поэтому отмечается рост интереса к источникам альтернативного белка.

Показан потенциал микробной биоконверсии подсолнечной лузги в кормовые и пищевые белковые препараты. Лузга является трудноутилизируемым крупнотоннажным отходом масличного производства. Этот биополимер необходимо переработать в простые сахара, ассимилируемые микроорганизмами – продуцентами белка.

ГЛАВА 2 Материалы и методы

2.1 Объекты исследования

2.1.1 Лузга подсолнечника

В исследованиях использовали лузгу подсолнечника, полученную в процессе производства растительного масла компании ООО «БУНГЕ СНГ» (г. Воронеж, Россия). После очистки семян подсолнечника образуется лузга, в среднем, лужность семян составляет 10 – 15 %. Лузга на 79 – 90 % состоит из целлюлозы (клетчатки), лингина и гемицеллюлозы (преимущественно глюкуронооксиана), остальные 10 – 21 % представлены липидами, восками, минералами и протеином [111].

2.1.2 Микробные культуры, использованные в исследованиях

В работе исследовали культивирование различных штаммов дрожжей, полученных из коллекции Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной микробиологии (ФГБНУ ВНИИСХМ), коллекции БРЦ ВКПМ НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика и коллекции кафедры «Биотехнология и технология продуктов биоорганического синтеза» Московского государственного университета пищевых производств (ФГБОУ ВО «МГУПП»). Перечень штаммов: *Candida tropicalis* RCAM1050, *Candida blancii* RCAM3343, *Candida blancii* RCAM3360, *Candida utilis* Y-797, *Candida parapsilopsis* D-18, *Wickerhamomyces anomala* RCAM1039, *Guechomyces pollulans* RCAM03356, *Cutaneitrichosporon cutaneum* RCAM03569, *Cylerlindnera* sp. RCAM03502, *Hansenula polymorpha* D-21, *Debaryomyces hansenii* Y-2519, *Debaryomyces hansenii* Y-3863, *Debaryomyces hansenii* D-15, *Kluyveromyces lactis* Y-4444, *Kluyveromyces*

marxianus Y-4557, *Kluyveromyces marxianus* Y-4570, *Pichia membranifaciens* D-17, *Pichia kudriavzevii* Y-3918.

В качестве потенциальных продуцентов целлюлолитических ферментов рассматривали 3 штамма рода *Aspergillus*: *Asp. oryzae* 4802, *Asp. foetidus* 4803 и *Asp. awamori* 4804 из коллекции ВНИИПБТ, 1 штамм *Trichoderma viride* 4801 из коллекции культур микроскопических грибов ФГБОУ ВО «МГУПП» и 5 штаммов: *Myceliophthora thermophila* F-244, *Myceliophthora thermophila* F-859, *Chaetomium globosum* F-323, *Trichoderma reesei* F-427 и *Irpex lacteus* F-452 из БРЦ ВКПМ НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика.

2.1.3 Ферментные препараты

В качестве источника ферментов в проведенных исследованиях были использованы комплексные ферментные препараты отечественного (ООО ПО «СИББИОФАРМ») и иностранного производства (Novozymes (Дания) – ООО «Новозаймс РУС», Adisseo (Франция) – ООО «Адиссео Евразия», Tegaferm (Австрия))

ЦеллоЛюкс-Ф (ООО ПО «СИББИОФАРМ») – порошкообразный комплексный ферментный препарат, сбалансированный по ксиланазной, β-глюканазной и целлюлазной активностям. ЦеллоЛюкс-Ф производится на основе глубинного культивирования гриба *Trichoderma viride*. Действие ферментного комплекса направлено на ступенчатое расщепление целлюлозы, ксиланов и β-глюканов. Согласно нормативной документации для данного ферментного препарата заявлены следующие активности: целлюлаза – не менее 2000 ед/г; ксиланаза – до 10 000 ед/г; β-глюканаза – до 10 000 ед/г. Оптимум действия ферментного препарата – pH 4,5 – 5,0, температура – 40 – 60° С [105].

Фидбест W 2 группа (ООО ПО «СИББИОФАРМ») – порошкообразный ферментный препарат, содержит ксиланазу и β-глюканазу, обеспечивает

гидролиз некрахмальных полисахаридов (ксилана и глюкана). Выпускается в виде двух групп:

1 группа – ксиланаза – не менее 10 000 ед/г; β -глюканаза – не менее 3500 ед/г;

2 группа – ксиланаза – не менее 20 000 ед/г; β -глюканаза – не менее 7000 ед/г.

Оптимум действия фермента – pH 4,0 – 5,5, температура – 30 – 50° С [104].

Целлюкласт 1,5 Л ФГ (Celluclast 1,5 L FG – Novozymes) – жидкий ферментный препарат целлюлазы, полученный глубинным культивированием штамма гриба *Trichoderma reesei*. Ферментный препарат катализирует расщепление целлюлозы до глюкозы, целлобиозы и высших глюкозосодержащих полимеров. Плотность ферментного препарата – 1,2 г/см³, активность – 700 EGU/г (EGU – Endo-glucanase units = единицы эндо-глюканазы). Оптимум действия фермента – pH 4,5 – 5,5, температура – 60 – 70° С [124].

Шеарзим Плюс 2X (Shearzyme Plus 2X PDS – Novozymes) – жидкий ферментный препарат грибного происхождения, плотность – 1,2 г/см³. Основная ферментативная активность осуществляется целлюлазой гидролизующей (1,4)- β -D-глюкозидные связи в целлюлозе и других (1,4)- β -D-глюканах ксиланазой, гидролизующей (1,4)- β -D-ксилозидные связи в ксиланах. Активность целлюлазы – 700 EGU/г, ксиланазы – 500 FXU-S/г. Оптимум действия фермента – pH 4,0 – 5,0, температура – 25 – 40° С [124].

Вискоферм (Viscoferm – Novozymes) – жидкий ферментный препарат – сбалансированная смесь ксиланазы, β -глюканазы, α -амилазы и целлюлазы, произведенная путём глубинного культивирования штамма *Trichoderma* и генетически модифицированного штамма *Aspergillus*. В данном продукте основная ферментативная активность осуществляется эндо- β -глюканазой, гидролизующей (1,3) или (1,4) связи в β -D-глюканах. Плотность ферментного препарата составляет 1,18 г/см³, активность ксиланазы – 222

FXU-S/г. Оптимум действия наблюдается при pH 4,8 – 5,8 и температуре – 50 – 70° С [124].

Вискозим Вит НТ (Viscozyme Wheat НТ – Novozymes) – жидкий мультиэнзимный комплекс, содержащий широкий спектр карбогидролаз, включая арабиназу, целлюлазу, β -глюканазу, гемицеллюлазу и ксиланазу. Данный ферментный комплекс произведён путём глубинного культивирования селекционированного штамма *Aspergillus aculeatus*. В данном продукте основная ферментативная активность осуществляется ксиланазой, гидролизующей (1,4)- β -D-ксилозидные связи в ксиланах. Активность ксиланазы – 1760 FXU-S/г. Оптимум действия фермента pH 4,0 – 6,0, температура – 50 – 70° С [124].

Ультрафло ХЛ (Ultraflo XL – Novozymes) – это мультиактивный препарат β -глюканазы, продуцируемый штаммами *Humicola insolens* и *Bacillus*. В данном продукте основная ферментативная активность осуществляется эндо- β -глюканазой, гидролизующей (1,3) или (1,4) связи в β -D-глюканах. Активность β -глюканазы – 500 ВГУ/г. Оптимум действия ФП наблюдается при pH 5,0 – 6,5 и температуре 50 – 70° С [124].

Ровабио (Rovabio – Adisseo) – это порошкообразный ферментный комплекс, включающий 20 видов NSP-энзимов, в том числе усиленную арабинофураназидазную и ксиланазную активности. Ферментный препарат получен при глубинном культивировании гриба *Talaromyces versatilis*. Активность эндо-1,4- β -ксиланаза – 25 000 виско-ед/г; эндо -1,3(4)- β -глюканаза – 17 200 виско-ед/г и эндо -1,4- β -глюканаза (целлюлаза) – 2 400 DNS-ед/г [173].

2.2 Методы исследования

На рисунке 2.1 представлена схема проведения исследования

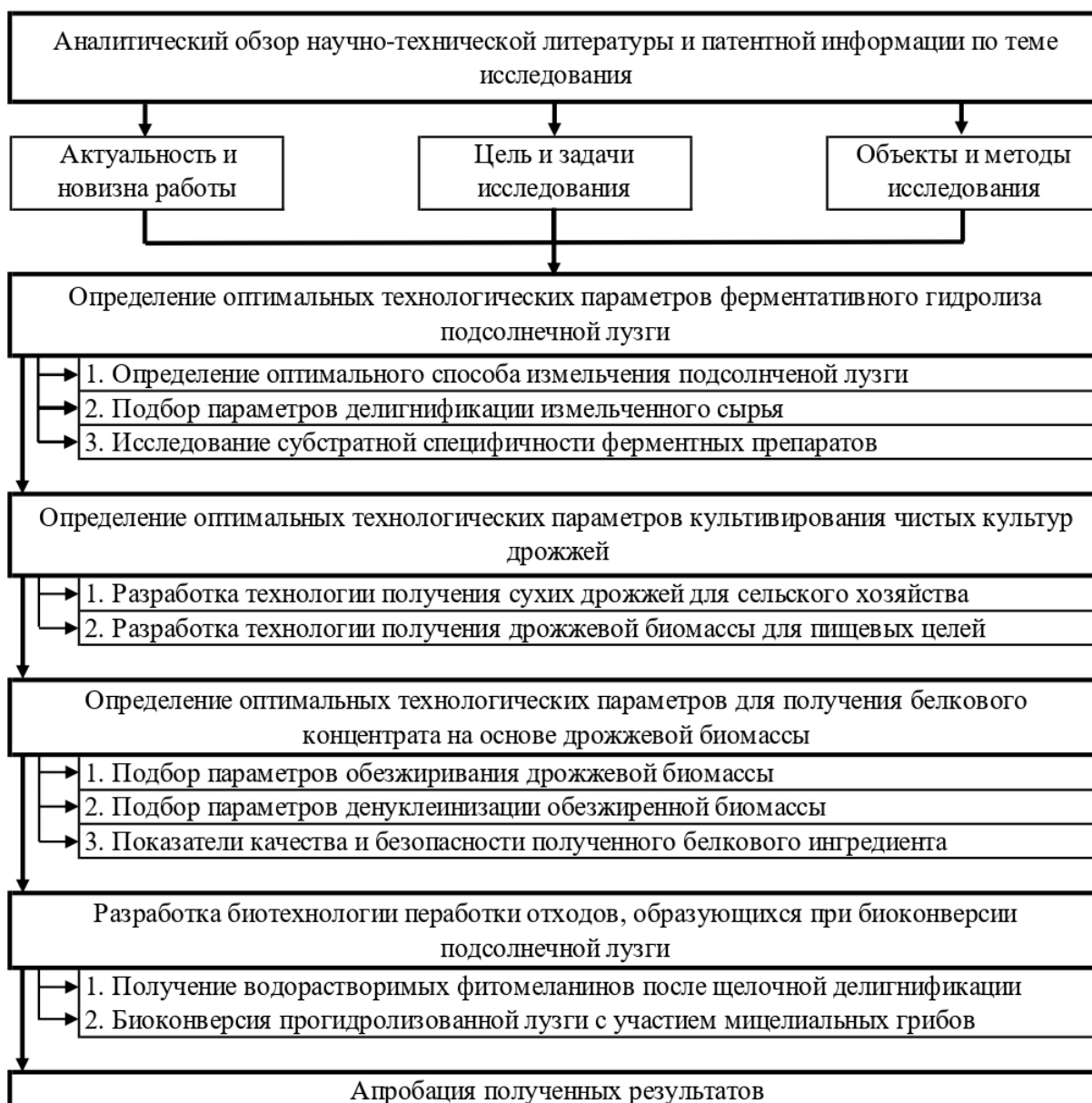


Рисунок 2.1 – Схема проведения исследования

2.2.1 Методы измельчения подсолнечной лузги

Подсушенную лузгу подсолнечника подвергали измельчению с целью увеличения площади поверхности, доступной для действия ферментов. Для измельчения использовали мельницы различного типа.

В лабораторных условиях измельчение подсолнечной лузги осуществляли на 4 различных мельницах: режущая/ударная мельница Polytron PX-MFC 90 D, роторная ударная мельница Retsch SR 200,

несерийная планетарная мельница ПМ-22 (ЗАО «Техника и технология дезинтеграции») и коллоидная мельница Figma.

Сравнение степени измельчения лузги вели рассевом на ситовом анализаторе «Вибротехник А30» с установленными ситами 30, 50, 80, 100 и 150 мкм, а также на анализаторе HELOS (H3908) & RODOS/L, R5.

Измельчение проводили согласно инструкции к соответствующему оборудованию, до размера частиц не превышающий 150 мкм.

2.2.2 Кислотный гидролиз подсолнечной лузги

Кислотный гидролиз измельченной подсолнечной лузги проводили в автоклаве в присутствии серной кислоты. Лузгу суспендировали при гидромодуле 1:8,5 в качестве дисперсной среды использовали 5, 10 или 15 %-ную серную кислоту с рН 1,0 – 1,5. Полученную суспензию выдерживали в автоклаве при температуре $(130\pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 2, 4 и 6 часов.

После выдержки суспензию нейтрализовали до рН 7,0 – 8,0 кристаллическим гидроксидом натрия и 40 %-ным раствором, после этого определяли содержание редуцирующих веществ по методу Бертрана-Шоорля.

2.2.3 Щелочная делигнификация подсолнечной лузги

Щелочную делигнификацию измельченной подсолнечной лузги вели в лабораторном автоклаве. Готовили суспензию при гидромодуле 1:9,5; 1:9,0 или 1:8,5, в качестве дисперсной среды использовали растворы гидроксида натрия (0,5 %; 1 %; 2 %; 4 %; 6 %; 8 %; 10 %; 15 %; 20 %) или тиосульфата натрия (1 %; 2 %; 3 %). Полученную суспензию выдерживали в автоклаве при температуре $(120\pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 0,5; 1 или 2 ч.

После выдержки суспензию нейтрализовали 20 %-ной серной кислотой и определяли содержание редуцирующих веществ по методу Бертрана-Шоорля.

2.2.4 Метод определения целлюлолитической активности ферментных препаратов

Определение целлюлолитической активности ферментных препаратов осуществляли в соответствии с требованиями ГОСТ Р 55293-2012 «Ферментные препараты для пищевой промышленности. Метод определения целлюлазной активности» [21].

Метод основан на количественном определении редуцирующих (восстанавливающих) сахаров, образующихся в результате действия фермента целлюлазы на субстрат натриевой соли карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ) при температуре 50° С.

За единицу целлюлолитической активности (1 ед.ЦлС) принимают такое количество фермента, которое гидролизует КМЦ с высвобождением 1 мкмоля восстанавливающих сахаров (в глюкозном эквиваленте), образующихся за 1 мин при стандартных условиях (температура 50° С и рН 5,0).

Содержание редуцирующих сахаров, образующихся в результате ферментативной реакции, определяют колориметрическим методом, основанным на взаимодействии сахаров с реактивом Шомоди-Нельсона. В результате этой реакции образуется соединение голубого или бирюзового цвета, интенсивность окраски которого пропорциональна содержанию редуцирующих сахаров, образовавшихся в процессе ферментативной реакции. Интенсивность окраски полученных растворов измеряют на фотоэлектроколориметре или спектрофотометре при длине световой волны 610 нм; активность выражается в единицах целлюлазной способности (ед.ЦлС/г или ед.ЦлС/см³) анализируемого препарата.

2.2.5 Метод определения ксиланазной активности ферментных препаратов

Определение ксиланазной активности ферментных препаратов осуществляли в соответствии с требованиями ГОСТ Р 55302-2012 «Ферментные препараты для пищевой промышленности. Метод определения ксиланазной активности» [22].

Метод основан на количественном определении редуцирующих (восстанавливающих) сахаров, образующихся в результате действия фермента ксиланазы на ксилан при температуре 50° С.

За единицу ксиланазной активности принимают количество фермента, действующего на ксилан березы с высвобождением 1 мкмоль восстанавливающих сахаров (в глюкозном эквиваленте), образующихся за 1 мин при стандартных условиях (температура 50 °С и рН 5,0).

Содержание редуцирующих сахаров, образующихся в результате ферментативной реакции, определяют колориметрическим методом, основанным на взаимодействии сахаров с реактивом Шомоди-Нельсона.

2.2.6 Метод определения числа Каппа

Определение числа Каппа осуществляли в соответствии с требованиями ГОСТ 10070-74 «Целлюлоза и полуцеллюлоза. Метод определения числа Каппа» [18].

Метод определения степени провара (делигнификации растительного сырья), выражающейся числом Каппа. Метод основан на окислении лигнина марганцовокислым калием и последующем йодометрическом определении его расхода в условиях, установленных ГОСТ 10070-74.

2.2.7 Метод определения сухих веществ в ферментолизате подсолнечной лузги

Определение сухих веществ в ферментолизате подсолнечной лузги осуществляли весовым методом. Определенный объем ферментолизата помещается в заранее просушенный и взвешенный с точностью 0,0001 г стеклянный бюкс. Фиксируется вес бюкса с навеской и высушивается в сушильном шкафу до постоянной массы при температуре 105 °С [69].

2.2.8 Ферментативный гидролиз измельченной подсолнечной лузги

Ферментативный гидролиз измельченной подсолнечной лузги вели в суспензии при гидромодуле 1:9,5; 1:9,0; 1:8,5. В качестве дисперсной среды использовали воду. Перед внесением ферментного препарата в суспензии устанавливали определенное значение рН, используя для этого 10 %-ный раствор гидроксида натрия или 10 %-ный раствор серной кислоты.

Ферментные препараты дозировали исходя из содержания СВ в полученных суспензиях и выражали в ед.ЦлС/г субстрата или ед.КС/г субстрата в зависимости от субстратной специфичности ферментного препарата.

Ферментолиз вели при перемешивании, в емкости, снабженной механической мешалкой и системой термостатирования, или колбах на качалке. Во время всего процесса поддерживали оптимальную температуру суспензии, зависящую от природы ферментного препарата. Длительность ферментолиза варьировали от 16 до 24 ч. По окончании процесса ферментолиза в фильтратах анализировали количество СВ и РВ по методу Бертрана-Шоорля.

2.2.9 Хранение чистых культур дрожжей и мицелиальных грибов

Чистые культуры дрожжей и мицелиальных грибов хранили в пробирках на скошенном сусло-агаре (неохмеленное сусло, РВ 8 %), агаре Сабуро (глюкоза – 4 %) или агаре Чапека (сахароза – 3 %) при температуре от 4 до 6° С с периодическими пересевами в течение 2 – 3 месяцев. Культивирование микроорганизмов на поверхности агара осуществляли в термостатах при температуре 30° С в течение 24 – 48 ч для дрожжей и 5 – 7 сут для мицелиальных грибов. Выросшие культуры подвергали кратковременному хранению до 3-х месяцев.

2.2.10 Скрининг дрожжей на агаризованных и жидких питательных средах

Для проведения скрининга на агаризованных питательных средах исследуемый штамм микроорганизма высевали «штрихом» на поверхность агаризованной питательной среды, учет результатов проводили визуально, рост оценивали исходя из максимума в «+++». Состав питательных сред представлен в таблице 2.1.

Таблица 2.1 – Состав агаризованных питательных сред для скрининга дрожжевых культур

Компонент питательной среды	Содержание компонента, %			
	Контроль	ПС-1	ПС-2	ПС-3
Глюкоза	2,0	–	–	1,5
Целлобиоза	–	–	2,0	0,5
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5	0,5	0,5	0,5
MgSO ₄	0,1	0,1	0,1	0,1
K ₂ HPO ₄	0,065	0,065	0,065	0,065
Дрожжевой экстракт	0,2	0,2	0,2	0,2
Агар	2,0	2,0	2,0	2,0
Ферментализат лузги (3,5 % РВ)	–	60,0	–	–
Вода водопроводная	до 100	до 100	до 100	до 100

Готовую питательную среду с рН (5,0±0,1) стерилизовали в автоклаве при температуре (121±1)° С в течение 40 мин, после стерилизации разливали в стерильные чашки Петри и остужали до полного застывания агара. Засеянные чашки Петри инкубировали в термостате при температуре (30±1)° С или (40±1)° С в течение 48 ч.

Скрининг на жидких питательных средах проводили в колбах Эрленмейера объемом 250 см³ с заполнением 50 см³. Во всех колбах была питательная среда следующего состава, %: (NH₄)₂SO₄ – 0,5; MgSO₄ – 0,1; K₂HPO₄ – 0,065; дрожжевой экстракт – 0,2; мел – 0,3; ферментолитат подсолнечной лузги (3,5 % РВ) – до 100; рН до стерилизации (5,0±0,1); стерилизовали в автоклаве при (121±1)° С в течение 40 мин. Засев колб производили петлей с поверхности скошенного агара. Колбы устанавливали на орбитальный шейкер и инкубировали при температуре (30±1)° С и (40±1)° С в течение 24 или 48 ч.

Штаммы микроорганизмов при глубинном культивировании сравнивали по выходу сухой биомассы с 1 дм³ (весовым методом), содержанию «сырого» протеина (методом Кьельдаля по ГОСТ 20083-74).

2.2.11 Метод определения сырого протеина

Массовую долю сырого протеина в дрожжевой биомассе определяли по методу Кьельдаля в соответствии с ГОСТ 20083-74 [19].

Метод основан на минерализации навески дрожжей под воздействием концентрированной серной кислоты при нагревании в присутствии катализаторов. В качестве катализаторов использовался сульфат меди и селен. При этом азот превращается в сульфат аммония. При прибавлении натрия гидроксида выделяется аммиак, который перегоняют с паром в приемник, содержащий кислоту для его поглощения: борную кислоту. Поглощенный аммиак титруют раствором серной кислоты, По результатам титрования рассчитывают содержание азота.

2.2.12 Метод определения количества редуцирующих веществ

Определение количества редуцирующих веществ осуществляли по модифицированному методу Бертрана-Шоорля [16].

Метод основан на способности веществ, имеющих свободную –ОН группу, при кипячении и в присутствии сегнетовой соли восстанавливать в щелочной среде ионы меди до закиси меди, которая затем определяется методом йодометрического титрования.

2.2.13 Метод определения истинного белка

Массовую долю белка по Барнштейну определяли в соответствии с ГОСТ 20083-74 [19].

Метод основан на денатурации и осаждении белков. В ходе проведения определения образуется осадок под действием сульфата меди в щелочной среде, который затем минерализуют и определяют в нем количество белкового азота. Для этого исследуемую навеску смешивают с горячей водой в стакане, затем обрабатывают сульфатом меди и едким натром. Смесь оставляют для образования осадка. Образовавшийся осадок промывают дистиллированной водой. Осадок минерализуют серной кислотой в присутствии перекиси водорода в качестве катализатора и определяют в нем содержание протеина по методу Кьельдаля.

2.2.14 Метод определения золы в дрожжевой биомассе

Массовую долю золы в дрожжевой биомассе определяли в соответствии с ГОСТ 20083-74 [19].

Метода основан на озолении навески дрожжей в присутствии спиртового раствора углекислого магния, который легко разлагается при нагревании.

2.2.15 Метод определения липидов в дрожжевой биомассе дрожжей

Количественное содержание липидов в дрожжевой биомассе определяли весовым методом по Фолчу [36].

Метод основан на экстракции липидов смесью этанол-ацетон и хлороформом три раза по 30 минут каждый. По окончании экстракции липидов жидкость отфильтровывают через бумажный фильтр, обезжиренную биомассу высушивают в сушильном шкафу и по разности массы до и после экстракции определяют общее количество липидов в навеске по формуле:

$$N_{\text{лип}} = \frac{M_{\text{лип}}}{M_{\text{сух.дрож}}} \times 100\%$$

где $N_{\text{лип}}$ – содержание липидов в биомассе, %;

$M_{\text{лип}}$ – масса липидов, содержащаяся в биомассе, г;

$M_{\text{сух.дрож}}$ – сухая масса дрожжей, взятая для анализа, г.

2.2.16 Метод экстракции липидов из дрожжевой биомассы

Удаление липидов из дрожжевой биомассы осуществляли под действием этилового спирта на водяной бане с обратным холодильником. Биомассу дрожжей помещали в пакет из хроматографической бумаги и опускали в колбу. К биомассе приливали этиловый спирт. Далее осуществляли удаление липидов при различных температурах, соотношении этилового спирта к биомассе и длительности экстрагирования. После экстракции липидов биомассу высушивали и весовым методом определяли количество удаленных липидов.

2.2.17 Определение массовой доли аминокислот в дрожжевой биомассе и белковом концентрате

Массовую долю аминокислот в дрожжевой биомассе и белковом концентрате определяли согласно ГОСТ 32195-2013 «Корма, комбикорма. Метод определения содержания аминокислот» [20].

Свободные формы аминокислот экстрагируют разбавленной соляной кислотой. Экстрагированные вместе с аминокислотами азотистые макромолекулы осаждают сульфосалициловой кислотой и отфильтровывают. Фильтрат доводят до значения pH 2,2.

Аминокислоты разделяют ионообменной хроматографией, проводят реакцию с нингидрином и определяют их содержание фотометрическим детектированием при длине волны 570 нм.

2.2.18 Метод определения нуклеиновых кислот в биомассе дрожжей

Количество нуклеиновых кислот в дрожжевой биомассе определяли по модифицированному методу Спирина [36].

Сущность метода заключается в гидролизе нуклеиновых кислот под действием соляной кислоты при выдерживании смеси исследуемого образца на водяной бане. Длительность выдерживания 20 минут, температура $t = 50^{\circ}$ С. После гидролиза смесь центрифугировали для отделения твердой части от жидкой. Далее на ФЭК определяли значение экстинкции в жидкости при длине волны 290 и 270 нм и рассчитывали количество нуклеиновых кислот в исследуемом образце по формуле:

$$X = \frac{A_{270} - A_{290}}{0,19} \times 10,3,$$

где A_{270} – экстинкция раствора при длине волны 270 нм;

A_{290} – экстинкция раствора при длине волны 290 нм;

10,3 – коэффициент пересчета фосфора, входящего в состав нуклеиновых кислот, мг/см³;

0,19 – удельная экстинкция;

2.2.19 Метод удаления нуклеиновых кислот из дрожжевой биомассы

Денуклеинизация биомассы осуществлялась на водяной бане при температуре от 50 до 70° С. Метод известен как «тепловой шок», суть которого заключается в активации собственных эндонуклеаз клеток. По окончании денуклеинизации определяют количество нуклеиновых кислот по методу Спирина.

2.2.20 Метод количественного определения удельной скорости роста и выхода дрожжевой биомассы

Дрожжи – это биологический материал, в котором клетки различаются как по возрасту и величине, так и по физиологическому состоянию. В этой связи обычно пользуются понятием «относительная» (удельная) скорость роста $\mu_{\text{ср}}$, определяемая по формуле:

$$\mu_{\text{ср}} = \frac{\ln m_1}{m_0} * \frac{1}{t}$$

где m_0 – количество дрожжей в начале процесса, кг; m_1 – количество дрожжей, полученных за время t , кг.

Для определения количества дрожжевой биомассы из культуральной жидкости отбирают 100 см³ суспензии и отфильтровывают через высушенный, взвешенный обеззоленный фильтр, используя колбу Бунзена и воронку Бюхнера. Фильтр помещают в сушильный шкаф и высушивают при температуре 105 °С до постоянной массы. После высушивания производят взвешивание, из полученной массы вычитают массу фильтра и результат умножают на 10. Выход дрожжевой биомассы выражают в г/дм³ [36].

2.2.21 Выделение водорастворимых фитомеланинов

Технологическая схема получения водорастворимых фитомеланинов включает в себя измельчение лузги подсолнечника на мельницах, с различной степенью измельчения продукта; суспендирование лузги подсолнечника при гидромодуле 1:9,5; 1:9; 1:8,5 в качестве дисперсной среды используются растворы едкого натра различной концентрации; экстракция при температуре 120 – 125° С в течение 1 ч; отделение нерастворимых частиц от экстрагента, содержащего фитомеланины; суспендирование осадка при гидромодуле 1:8,5 в растворе едкого натра; повторная экстракция при аналогичных условиях; объединение экстрактов; установление в экстрактах рН 1,0 – 2,0 с помощью соляной или ортофосфорной кислоты; центрифугирование полученного осадка фитомеланинов, ресуспендирование его в очищенной воде в соотношении 2:1; установление рН 7,0 и сушка полученных фитомеланинов [35].

2.2.22 Методы качественного определения фитомеланинов

Для проведения качественного определения фитомеланинов в растворе используют три основных способа, применяемых в работе [35]:

1) При добавлении к раствору фитомеланинов раствора пероксида водорода должно происходить обесцвечивание.

2) При добавлении к раствору фитомеланинов раствора перманганата калия наблюдается образование раствора с зеленой окраской, с последующим выпадением осадка и обесцвечиванием раствора.

3) При добавлении к раствору фитомеланинов хлорида железа наблюдается выпадение хлопьевидного осадка и его растворение в избытке реактива.

2.2.23 Метод определения общей антиоксидантной активности фитомеланинов

Определение антиоксидантной активности (АОА) осуществляли с использованием модельной системы, представляющей собой суспензию липопротеидов желтка (ЖЛП) куриных яиц, помещенную в среду для проведения реакции перекисного окисления липидов (ПОЛ) [46].

Для приготовления модельной системы из куриного яйца выделяли желток, подсушивали его на фильтровальной бумаге, а затем растворяли его в равном объеме фосфатного буфера (40 мМ KH_2PO_4 + 105 мМ KCl , pH 7,5). Полученную суспензию ЖЛП перед использованием разводили в 25 раз тем же буфером.

Исследование проводили следующим образом: к 0,6 г фитомеланинов добавляли 1 см³ суспензии ЖЛП, затем 3 см³ 1 %-ной ортофосфорной кислоты. Перекисное окисление липидов во всех пробах инициировали добавлением 0,1 см³ раствора сернокислого железа (30 мг $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ в 10 см³ дистиллированной воды). Контрольная проба не содержала образцов фитомеланинов. Пробы тщательно перемешивали и инкубировали в ультратермостате при 37° С в течение 20 мин.

Скорость перекисного окисления липидов определяли по количеству накопившихся ТБК-продуктов (малоновый диальдегид (МДА)), реагирующих с тиобарбитуровой кислотой (ТБК). Для этого в каждую пробирку добавляли по 1 см³ 0,6 %-ной ТБК. Содержимое пробирок снова перемешивали и помещали в кипящую водяную баню на 20 мин. Далее пробирки охлаждали, добавляли в них по 4 см³ бутанола, тщательно перемешивали и центрифугировали 10 мин при 3000 мин⁻¹. Оптическую плотность верхней (бутанольной) фазы измеряли при длине волны 540 нм с помощью фотоэлектроколориметра КФК-3, длина оптического пути – 5 мм. В качестве раствора сравнения использовали чистый бутиловый спирт. Расчет содержания продуктов, реагирующих с ТБК, проводили с учетом

коэффициента молярной экстинкции малонового диальдегида, равного $1,56 \cdot 10^5$ моль \cdot см $^{-1}$:

$$A = \frac{E_{\text{оп}} \cdot 10^6 \cdot 4}{1,56 \cdot 10^5 \cdot 0,5} = E_{\text{оп}} \cdot 51,3,$$

где A – содержание МДА (в мкмоль/л или нмоль/см 3); 4 см 3 – объем бутанольной фазы; 0,6 – масса пробы фитомеланинов; $E_{\text{оп}}$ – оптическая плотность.

Антиоксидантную активность (АОА) в процентах рассчитывали по формуле:

$$\text{АОА} = \frac{E_{\text{контр}} - E_{\text{обр}}}{E_{\text{контр}}} \cdot 100,$$

где $E_{\text{контр}}$ – оптическая плотность контрольного раствора, $E_{\text{обр}}$ – оптическая плотность испытуемого образца.

2.2.24 Метод определения адсорбционной способности фитомеланинов

Адсорбционную способность полученных фитомеланинов определяли спектрофотометрическим методом [76]. Для этого 100 мг субстанции, предварительно растертой в ступке, помещали в колбу на 100 см 3 с притертой пробкой, прибавляли 20 см 3 раствора А метиленового синего (188 мг метиленового синего в мерной колбе доводят до объема 250 см 3 дистиллированной водой), закрывали пробкой и перемешивали в течение 1 ч на магнитной мешалке. Суспензию центрифугировали в течение 15 мин при 6000 мин $^{-1}$. 1 см 3 надосадочной жидкости помещали в мерную колбу на 100 см 3 , довели раствор до метки дистиллированной водой (испытуемый раствор).

Измеряли оптическую плотность раствора Б (1 см 3 раствора А довели до 200 см 3 дистиллированной водой) и испытуемого раствора на спектрофотометре при длине волны 655 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали дистиллированную воду.

Адсорбционную способность (X), в миллиграммах метиленового синего в пересчете на 1 г, вычисляли по формуле:

$$X = \frac{(C-C_1) \times 1000 \times 100}{a \times (100-W)},$$

где C – содержание метиленового синего в аликвоте раствора A в мг,

$$C = \frac{a_0 \times 20 \times P}{250 \times 100} = \frac{a_0 \times P}{1250},$$

C_1 – остаточное содержание метиленового синего в растворе после взаимодействия с препаратом в мг,

$$C_1 = \frac{A \times a_0 \times 1 \times 100 \times 20 \times P}{A_0 \times 250 \times 200 \times 1 \times 100} = \frac{A \times a_0 \times P}{A_0 \times 2500}$$

(A – оптическая плотность испытуемого раствора; A_0 – оптическая плотность раствора Б; P – содержание метиленового синего в субстанции в пересчете на безводное вещество, в процентах; W – потери массы при высушивании испытуемой субстанции, в %, a_0 – навеска метиленового синего в мг ; a – навеска субстанции в мг).

2.2.25 Поверхностное твердофазное культивирование продуцентов целлюлолитических ферментов

При поверхностном культивировании были использованы среды с одинаковым минеральным составом, а именно солевой раствор среды Чапека (NH_4NO_3 – 0,6 %; $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,05 %; CaCl_2 – 0,002%; KH_2PO_4 – 0,1 %; $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ – 0,8 %) и различным составом основного субстрата, представленном в таблице 2.2.

Все среды перед стерилизацией были увлажнены до влажности 60 – 70 % водопроводной водой.

Засев питательной среды осуществляли смывом с поверхности агаризованной среды. Культивирование осуществляли в кюветах, помещенный в термостат с температурой $(30 \pm 1)^\circ \text{C}$ и $(40 \pm 1)^\circ \text{C}$ в течение 7 сут.

Таблица 2.2 – Процентное содержание основных компонентов в средах с различным углеродным составом

№ среды	Основные компоненты питательных сред, %		
	Отруби пшеничные	Солодовые ростки	Свекловичный жом
1.1	70	-	30
1.2	65	5	30
1.3	60	10	30
1.4	55	15	30
1.5	50	20	30
2.1	80	-	20
2.2	75	5	20
2.3	70	10	20
2.4	65	15	20
2.5	60	20	20
3.1	70	-	30
3.2	65	5	30
3.3	60	10	30
3.4	55	15	30
3.5	50	20	30

ГЛАВА 3 Разработка технологии гидролиза подсолнечной лузги

Химический состав подсолнечной лузги зависит от сорта подсолнечника. В результате постоянно проводимой селекции химический состав лузги изменился. У новых высокомасличных сортов наблюдается тенденция к снижению общего выхода редуцирующих веществ, пентозанов и увеличению содержания уроновых кислот, лигнина и веществ, экстрагируемых водой. Химический состав подсолнечной лузги, использованной в работе, представлен в таблице 3.1. Химический состав золы представлен в таблице 3.2.

Таблица 3.1 – Химический состав подсолнечной лузги ООО «БУНГЕ СНГ»

№	Показатель	Значение, % масс
1	Влажность	5,0 – 8,0
2	Целлюлоза	20,0 – 67,0
3	Лигнин	23,0 – 35,0
4	Гемицеллюлоза	18,0 – 35,0
5	Уроновые кислоты	6,0 – 9,0
6	Липиды	2,0 – 5,5
7	Воск	1,5 – 3,5
8	Протеины	2,0 – 6,0
9	Зола	1,5 – 4,5

Таблица 3.2 – Химический состав золы лузги подсолнечника ООО «БУНГЕ СНГ»

№	Оксид	Значение, % масс золы
1	CaO	8,0 – 13,0
2	MgO	5,0 – 9,0
3	K ₂ O	20,0 – 45,0
4	P ₂ O ₅	4,0 – 8,0
5	SiO ₂	3,0 – 11,0
6	Al ₂ O ₃	2,4 – 7,2

В ходе промышленной биоконверсии подсолнечной лузги можно получить 4 различных продукта: кормовой высококачественный белковый

препарат, пищевой белковый концентрат, кормовой ферментный препарат целлюлолитического действия и фитомеланины.

Для переработки лузги в сырьё, пригодное для выращивания кормовых дрожжей и получения других целевых продуктов, необходима предобработка лузги механическим, химическим и ферментативным способами. Это требуется, в первую очередь, для удаления из лузги ингибирующих рост дрожжей компонентов, таких как лигнин, фитомеланы и другие ароматические соединения. С другой стороны, предобработка лузги необходима для эффективного гидролиза её компонентов до доступных и легко усваиваемых дрожжами сахаров.

3.1 Предобработка подсолнечной лузги

Широко известны четыре типа предобработки целлюлозосодержащего сырья: физическая, механическая, химическая и биологическая предобработка. Главная цель применяемых предобработок – повышение эффективности ферментативного гидролиза.

3.1.1 Механическая предобработка

Механические способы предобработки целлюлозосодержащего сырья заключаются в его измельчении на различных видах мельниц, дезинтеграторах и дробилках, диспергировании на вальцах и т.д. Использование механических способов предобработки приводит нарушению кристаллической структуры целлюлозы, увеличению поверхности, доступной целлюлолитическим ферментам и, как следствие, к значительному росту атакуемости ферментами.

Чем меньше размер частиц, тем больше удельная поверхность, открытая для гидролиза, и тем быстрее происходит образование РВ. Однако, очень малые частицы «упаковываются» слишком тесно, образуя материал с

высокой плотностью, в результате чего скорость процесса гидролиза может быть замедлена.

В нашей работе размол подсолнечной лузги осуществляли на 4 различных мельницах: режущая/ударная мельница Polytron PX-MFC 90 D, роторная ударная мельница Retsch SR 200, несерийная планетарная мельница ПМ-22 (ЗАО «Техника и технология дезинтеграции») и коллоидная мельница Fryma.

Сравнение степени измельчения лузги вели рассевом на ситовом анализаторе «Вибротехник А30» с установленными ситами 30, 50, 80, 100 и 150 мкм, а также на анализаторе HELOS (H3908) & RODOS/L, R5.

Рациональную степень измельчения подсолнечной лузги определяли по количеству образовавшихся редуцирующих веществ при 8-ми часовом ферментативном гидролизе измельченной подсолнечной лузги.

После размола подсолнечной лузги на режущей/ударной мельнице Polytron PX-MFC 90 D получили частицы различного размера, характеризующиеся низкой степенью однородности. Большинство частиц имели игольчатую форму. Размол проводили не более 2 минут, дальнейшее измельчение не имело смысла, так как размер частиц не изменялся.

Измельченная лузга подсолнечника, полученная на планетарной мельнице ПМ-22 и коллоидной мельнице Fryma, визуально не отличалась, характеризовалась высокой степенью однородности.

На анализаторе «Вибротехник А30» получили данные о размере частиц, они представлены в таблице 3.3. В таблице представлены усредненные данные анализа 10 различных размолов на использованных измельчителях.

По данным ситового анализа видно, что самые маленькие по размеру частицы были получены на планетарной мельнице ПМ-22, больше половины (65 %) частиц имели размер менее 30 мкм, все частицы (100 %) имели размер менее 100 мкм. Более крупные частицы были получены на коллоидной мельнице Fryma, 50 % частиц имели размер менее 30 мкм, все частицы (100

%) были менее 150 мкм. На роторной ударной мельнице Retsch SR 200 были получены достаточно крупные частицы, только 80 % частиц имели размер менее 150 мкм, и только половина (50 %) - менее 50 мкм. Самые крупные частицы были получены на мельнице Polytron PX-MFC 90 D, только половина полученных частиц имела размер менее 150 мкм, частиц менее 30 мкм вовсе не было.

Таблица 3.3 – Данные о размере частиц измельченной лузги, прошедшей через ситовой анализатор

Размер частиц, мкм	Режущая/ударная мельница Polytron PX-MFC 90 D	Роторная ударная мельница Retsch SR 200	Планетарная мельница ПМ-22	Коллоидная мельница Fryma
< 30	0 %	30 %	65 %	50%
< 50	10 %	50 %	80 %	65 %
< 80	25 %	60 %	95 %	85 %
< 100	40 %	70 %	100 %	97 %
< 150	50 %	80 %	100 %	100 %

Для более полной оценки эффективности размола был проведен пробный ферментативный гидролиз каждого образца. В качестве субстрата была приготовлена 10 %-ная суспензия измельченной лузги. В качестве суспензирующего агента был использован 4 %-ный раствор гидроксида натрия. Полученная суспензия была выдержана в автоклаве при 120° С в течение 60 мин и после охлаждения нейтрализована до рН 7,0 – 8,0. После центрифугирования полученный осадок промывали водопроводной водой в соотношении 1:1 и повторно центрифугирован. Суспензия промытого осадка влажной лузги была доведена водой до исходного объема. Полученная суспензия подвергнута ферментативному гидролизу, в качестве ферментным препаратом был выбран ЦеллоЛюкс-Ф в количестве 90 ед. ЦдС/г лузги. Ферментативный гидролиз проводили в колбах на качалке с числом оборотов 200 об⁻¹, при рН 5,0, температуре 50° С в течение 16 ч (режим ферментализации установлен по рекомендации производителя

ферментного препарата) [105]. По истечении указанного времени отбирали пробы, центрифугировали и определяли содержание редуцирующих веществ в супернатанте методом Бертрана-Шоорля. Усредненные данные, полученные при проведении 5 ферментативных гидролизом, приведены на рисунке 3.1.

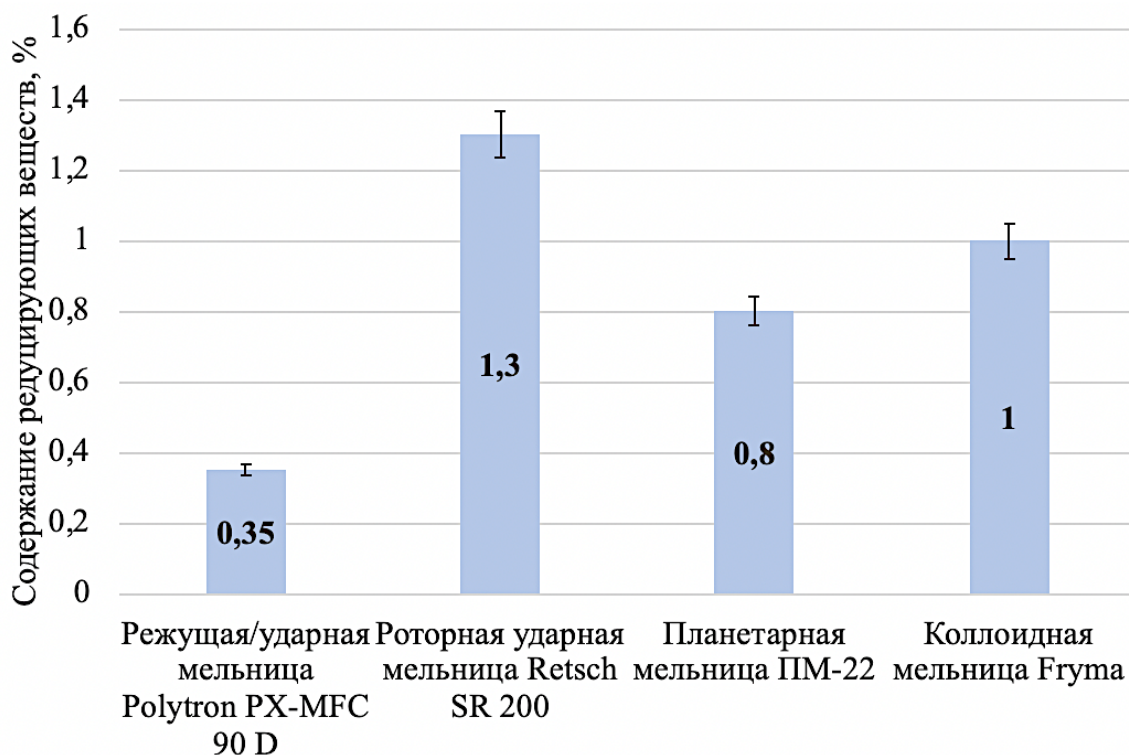


Рисунок 3.1 – Влияние типа устройства для измельчения на содержание редуцирующих веществ после ферментативного гидролиза лузги

Наибольшее количество редуцирующих веществ после ферментативного гидролиза зафиксировано для подсолнечной лузги, измельченной на роторной ударной мельнице Retsch SR 200. Несмотря на то, что на планетарной мельнице и коллоидной мельницах были получены частицы меньшего размера, количество образовавшихся редуцирующих веществ на этих образцах меньше, это связано с тем, что слишком малые частицы имеют свойство слипаться, тем самым становятся менее доступны для ферментов и гидролиз таких частиц даже при интенсивном перемешивании идет медленнее, чем частиц большего размера.

Наиболее перспективные образцы размол подсолнечной лузги (размол на мельнице Retsch SR 200 и Fryma) были проанализированы методом лазерной дифракции на анализаторе частиц HELOS (H3908) & RODOS/L, R5 (условия анализа: давление 2,5 бар; вакуум 60 мбар). Данные анализа представлены на рисунке 3.2 и в таблице 3.4.

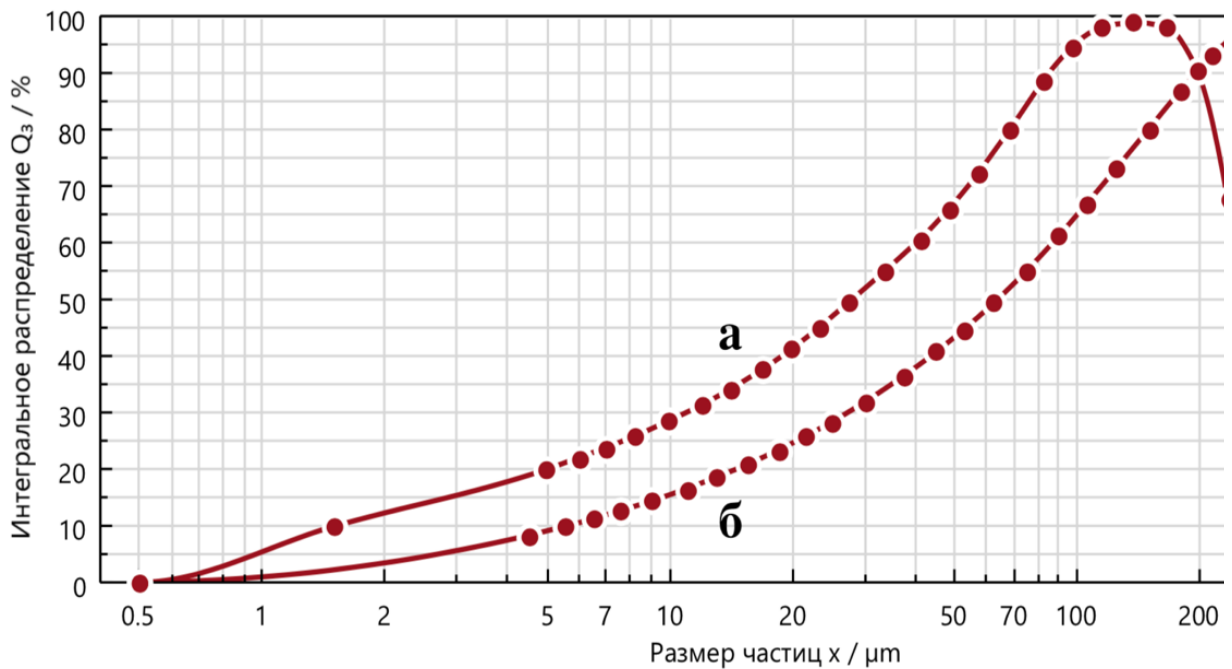


Рисунок 3.2 – Данные о размерах частиц образцов измельченной лузги, полученные на анализаторе частиц HELOS (H3908) & RODOS/L, R5 (а – лузга измельченная на мельнице Fryma, б – лузга измельченная на мельнице Retsch SR 200)

По данным графика можно сделать вывод о том, что размер частиц полученных на роторной ударной мельнице Retsch SR 200 в 2 – 3 раза больше, чем размер частиц, полученных на коллоидной мельнице Fryma.

По результатам исследования ферментативного гидролиза наиболее эффективным стал образец измельченной лузги, полученный на роторной ударной мельнице Retsch SR 200. Несмотря на значительно больший размер частиц, ферментативный гидролиз проходит с большим выходом редуцирующих веществ в аналогичных условиях. Более мелкие частицы

«слипаются», образуя достаточно плотный материал, тем самым уменьшается доступная для фермента площадь поверхности частицы.

Для дальнейшей работы использовали подсолнечную лузгу, подвергнутую механической предобработке на роторной ударной мельнице Retsch SR 200.

3.1.2 Химическая предобработка

Основная цель химической предобработки целлюлозосодержащего сырья в технологии производства белковых препаратов кормового назначения – это интенсификация образования редуцирующих веществ при ферментативном гидролизе. Среди химических методов предобработки целлюлозосодержащего сырья выделяют пять основных, их преимущества и недостатки представлены в таблице 3.4.

Таблица 3.4 – Преимущества и недостатки основных методов химической предобработки целлюлозосодержащего сырья [96]

Метод	Преимущества	Недостатки
Обработка концентрированными минеральными кислотами	Высокая эффективность, полный гидролиз целлюлозосодержащего сырья до усваиваемых сахаров	Загрязнение окружающей среды, деструкция целлюлозы, необходимость нейтрализации и регенерации кислоты, коррозия технологического оборудования
Обработка кадоксеном и другими растворителями	Высокая эффективность	Вредность, высокая стоимость, необходимость регенерации реагента
Обработка разбавленными кислотами	Не нужна регенерация кислот, высокая производительность	Недостаточная эффективность, коррозия оборудования
Щелочная делигнификация	Высокая эффективность	Загрязнение окружающей среды, необходимость нейтрализации щелочи
Паровой взрыв, автогидролиз, термомеханическая обработка	Высокая эффективность, дешевизна, непрерывность процесса	Деструкция гемицеллюлозы, коррозия

Химические методы предобработки основаны на способности тех или иных химических соединений растворять лигнин или целлюлозу, либо приводить к набуханию или разрушению ее структуры. В качестве перспективных методов химической предобработки были выбраны различные виды делигнификации и обработка минеральными кислотами различной концентрации.

3.1.2.1 Делигнификация

Процесс делигнификации исходного сырья исследовали на измельченной подсолнечной лузге. Классическим способом делигнификации целлюлозосодержащего сырья является сульфатная варка. Основная стадия этого термохимического процесса заключается в обработке сырья водным раствором, содержащим гидроксид и сульфид натрия. В процессе целлюлозной варки важнейшим химическим процессом является деструкция макромолекул лигнина, который приводит к его выделению из древесины и переходу в растворимую форму. Под воздействием активных реагентов и температуры связанный древесный лигнин расщепляется и накапливается в варочном растворе. Однако, в процессе такой предобработки образуется значительное количество трудно утилизируемых отходов и побочных продуктов [81, 96, 103, 165].

Альтернативой описанному способу является процесс «биоделигнификации» – это обработка целлюлозосодержащего сырья грибными ферментными препаратами, способными гидролизовать лигнин; такой способ не нашел промышленного применения, ввиду сравнительно низкой скорости протекания процесса и дороговизны ферментного препарата [127, 175].

В данной работе был рассмотрен способ щелочной предобработки – нагревание суспензии лузги в присутствии едкого натра и тиосульфата натрия.

Одним из косвенных показателей делигнификации является изменение числа Каппа. Это число, косвенно характеризующее содержание остаточного лигнина в волокнистом полуфабрикате, определяемое объемом раствора перманганата калия концентрацией 0,02 моль/дм³, израсходованного при титровании на 1 г абсолютно сухой целлюлозы.

Обработку 15 %-ной (такое содержание лужги обусловлено необходимостью интенсивного перемешивания) суспензии лужги вели при различных концентрациях гидроксида натрия и тиосульфата натрия. Процесс обработки проводили при температуре 120° С в течение 30 мин, 1 или 2 часов.

Для более полной оценки эффективности предобработки и выбора оптимального режима был проведен последующий ферментативный гидролиз каждого образца. После выдержки при температуре 120° С суспензия была нейтрализована до рН 7,0 – 8,0 и центрифугирована, полученный осадок промыт водопроводной водой в соотношении 1:1 и повторно центрифугирован. Суспензия промытого осадка влажной лужги была доведена водой до исходного объема. Полученная суспензия подвергнута ферментативному гидролизу ферментным препаратом ЦеллоЛюкс-Ф в дозировке 90 ед. ЦлС/г лужги. Ферментативный гидролиз проводили в колбах на качалке с числом оборотов 200 об⁻¹, при рН 5,0, температуре 50° С в течение 16 ч (условия ферментативного гидролиза рекомендованы производителем ферментного препарата) [105]. По истечении указанного времени отбирали пробы, центрифугировали и определяли содержание редуцирующих веществ в супернатанте методом Бертрана-Шоорля.

Данные об изменении числа Каппа представлены на рисунке 3.3.

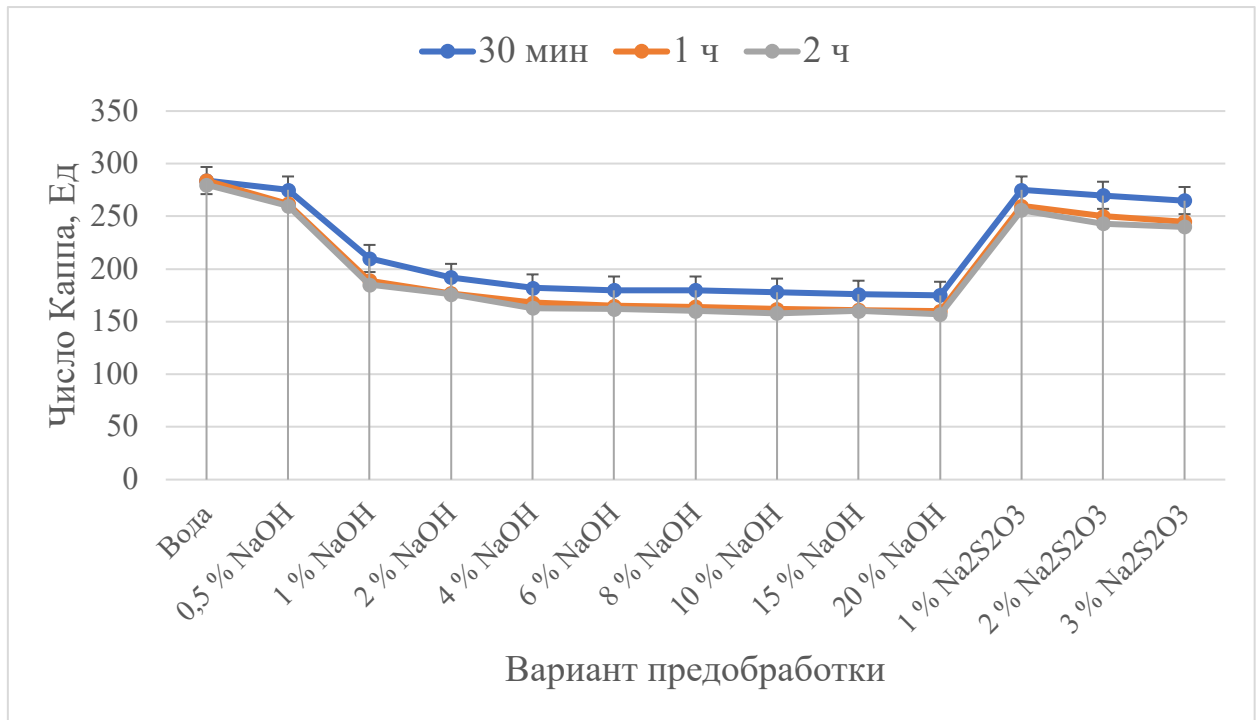


Рисунок 3.3 – Изменение числа Каппа в зависимости от режима предобработки измельченной подсолнечной лузги раствором щелочи

При 30 минутной предобработки степень делигнификации чуть ниже, чем при обработке в течение 1 или 2 ч. Наибольшее значение степени делигнификации наблюдается при предобработке лузги 4 или 6 %-ным раствором едкого натра в течение 1 ч.

В таблице 3.5 представлены данные о количестве нерастворимых целлюлозных фибрилл, сухих и редуцирующих веществ, образовавшихся в ходе ферментативного гидролиза предобработанной подсолнечной лузги.

По данным таблицы видно, что изменение количества нерастворимых целлюлозных фибрилл не происходит при использовании щелочи с концентрацией выше 6 %. Руководствуясь соображениями эффективности и экономичности, был выбран вариант обработки измельченной подсолнечной лузги 4 % раствором гидроксида натрия в течение 1 ч. После ферментативного гидролиза количество РВ составило 3,21 %.

Таблица 3.5 – Количество нерастворимых целлюлозных фибрилл, а также количество СВ и РВ после ферментативной обработки лузги

Вариант предобработки	Время предобработки	Количество нерастворимых целлюлозных фибрилл, %	Количество СВ после ферментативного гидролиза, %	Количество РВ после ферментативного гидролиза, %
Вода (автогидролиз)	30 мин	99,6520	0,4352	0,22
	1 ч	99,5782	0,4481	0,21
	2 ч	99,5523	0,4755	0,27
0,5 % NaOH	30 мин	96,7289	2,2118	1,12
	1 ч	95,3242	2,2298	1,22
	2 ч	95,1020	2,2317	1,24
1 % NaOH	30 мин	93,6812	3,0175	1,61
	1 ч	92,5433	3,1245	1,67
	2 ч	92,1033	3,1477	1,71
2 % NaOH	30 мин	87,3356	5,4599	2,27
	1 ч	84,7221	5,5682	2,47
	2 ч	82,2290	5,7890	2,50
4 % NaOH	30 мин	78,6530	6,7891	2,90
	1 ч	73,6522	7,6422	3,21
	2 ч	73,3240	7,7234	3,25
6 % NaOH	30 мин	74,8092	6,8990	3,05
	1 ч	73,1214	7,7741	3,22
	2 ч	72,8240	8,0124	3,28
8 % NaOH	30 мин	74,7223	6,9120	3,08
	1 ч	72,2298	7,8456	3,21
	2 ч	71,9371	7,9048	3,25
10 % NaOH	30 мин	73,9843	7,6835	3,18
	1 ч	73,3291	7,7349	3,21
	2 ч	71,4588	8,0156	3,27
15 % NaOH	30 мин	73,4599	7,0459	3,10
	1 ч	72,8712	7,6739	3,22
	2 ч	71,4238	8,2861	3,29
20 % NaOH	30 мин	72,8634	8,0191	3,18
	1 ч	72,1239	8,1588	3,26
	2 ч	70,8129	8,2190	3,31
1 % Na ₂ S ₂ O ₃	30 мин	98,7216	0,5699	0,44
	1 ч	98,5278	0,6380	0,45
	2 ч	98,3451	0,6445	0,48
2 % Na ₂ S ₂ O ₃	30 мин	96,9233	0,7477	0,62
	1 ч	96,7712	0,7931	0,66
	2 ч	96,5390	0,8017	0,69
3 % Na ₂ S ₂ O ₃	30 мин	95,1890	0,9355	0,71
	1 ч	94,9093	0,9671	0,76
	2 ч	94,8319	0,9981	0,79

Предобработка измельченной подсолнечной лузги растворами едкого натра различной концентрации способствуют повышению доступности целлюлозы для комплексного ферментного препарата ЦеллоЛюкс-Ф.

3.1.2.2 Обработка серной кислотой

Гидролиз различного целлюлозосодержащего сырья в присутствии разбавленных минеральных кислот обеспечивает образование глюкозы в реакционной смеси.

Обработку серной кислотой измельченной подсолнечной лузги вели при температуре $(130 \pm 1)^\circ \text{C}$ в течение 2, 4 или 6 часов. Обработке подвергали исходную измельченную подсолнечную лузгу и лузгу, прошедшую делигнификацию едким натром. Выдержку 15 %-ной суспензий лузги вели при различных концентрациях серной кислоты. Данные о количестве образовавшихся редуцирующих веществ представлены в таблице 3.6.

Таблица 3.6 – Количество РВ в %, образовавшихся после обработки лузги раствором серной кислоты

Субстрат	Измельченная лузга			Делигнифицированная лузга		
	5	10	15	5	10	15
Концентрация серной кислоты, %						
2 ч	2,57	2,87	4,02	1,98	2,21	2,38
4 ч	2,98	3,12	3,75	2,33	2,44	2,53
6 ч	2,71	3,01	3,44	2,35	2,48	2,58

По данным таблицы видно, что наибольшее накопление РВ наблюдается при гидролизе нативной измельченной лузги, чем при гидролизе делигнифицированной лузги. Делигнифицированная лузга лишена полимеров, способных при кислотном гидролизе образовать РВ.

Недостатком кислотного гидролиза является низкое образование простых углеводов для последующего процесса ферментации, связанное с

тем, что при кислотном гидролизе гидролизуется не только целлюлоза до глюкозы, но происходит разрушение самой глюкозы и разрушение пятиатомных сахаров до фурфурола и оксиметилфурфурола. В связи с этим данный способ предобработки подсолнечной лузги не использован в дальнейшей работе.

3.2 Ферментативный гидролиз подсолнечной лузги

Глубокая деструкция целлюлозы с образованием растворимых сахаров осуществляется под действием полиферментной системы целлюлаз, включающей в себя эндоглюканызы, целлобиогидролазы и β -глюкозидазы. Свойства индивидуальных ферментов, а также их взаимодействие в составе целлюлазного комплекса определяют эффективность при гидролизе целлюлозосодержащих субстратов до технических сахаров, которые используются в дальнейшем микробиологическом синтезе продуктов с высокой добавленной стоимостью.

3.2.1 Выбор целлюлолитических ферментов

Для подбора эффективного коммерческого ферментного препарата было проведено исследование отечественного и зарубежных рынков, сделана выборка наиболее перспективных ферментов. Данная выборка представлена в таблице 3.7.

Таблица 3.7 – Выборка отечественных и зарубежных ферментных препаратов

№	Торговое наименование фермента	Компания-изготовитель	Целлюлолитическая активность по нормативной документации	Целлюлолитическая активность по ГОСТ Р 55293-2012	Ксиланазная активность по нормативной документации	Ксиланазная активность по ГОСТ Р 55302-2012
1	Celluclast 1,5 L	Novozymes	700 EGU	780 Ед/г	-	-
2	Viscozyme	Novozymes	-	-	1760 FXU-S	9250 Ед/г
3	Shearzyme Plus 2x	Novozymes	700 EGU	670 Ед/г	500 FXU-S	4800 Ед/г
4	Viscoferm HT FG	Novozymes	222 FBG	550 Ед/г	-	800 Ед/г
5	Ultraflo XL	Novozymes	500 BGU	620 Ед/г	-	1200 Ед/г
6	Целлолюкс-F	ООО ПО «Сиббиофарм»	2000 Ед/г	2200 Ед/г	10000 Ед/г	8000 Ед/г
7	Фидбест W 2 гр.	ООО ПО «Сиббиофарм»	-	400 Ед/г	20000 Ед/г	17000 Ед/г
8	RovabioMax AP	Adisseo France S.A.S.	2000 AGL/g	1900 Ед/г	22000 VU/g	23500 Ед/г
9	β -glucanase	Heilongjiang Winovazyme Biotech Co.	10000 U/g	1200 Ед/г	-	-
10	Cellulase	Heilongjiang Winovazyme Biotech Co.	6000 U/g	820 Ед/г	-	-
11	Xylanase	Heilongjiang Winovazyme Biotech Co.	-	100 Ед/г	30000 U/g	16000 Ед/г

Для многих ферментных препаратов состав наполнителя не известен, поэтому была проверена способность ферментных препаратов расщеплять собственный наполнитель до простых сахаров (автогидролиз). Для проверки «самоперевариваемости» были приготовлены 1 %-ные суспензии ферментных препаратов. Автогидролиз проводили в колбах Эрленмейера объемом 250 см³. Для каждого ферментного препарата были созданы оптимальные условия по pH и температуре на основе нормативной документации. После 24 ч интенсивного перемешивания и термостатирования в колбах определяли содержание РВ модифицированным методом Бертрана-Шоорля. Полученные данные приведены в таблице 3.8.

Таблица 3.8 – Содержание РВ после автогидролиза

№	Торговое наименование фермента	Начальное содержание РВ, %	РВ после 24 ч, %
1	Celluclast 1,5 L	0	0
2	Viscozyme	0	0
3	Shearzyme Plus 2x	0	0
4	Viscoferm HT FG	0	0
5	Ultraflo XL	0	0
6	Целлолюкс-F	0	0
7	Фидбест W 2 гр.	0	0
8	RovabioMax AP	0	0
9	β -glucanase	0	0,3
10	Cellulase	0	0,5
11	Xylanase	0	0,5

По данным таблицы видно, что автогидролиз наблюдается только у ферментных препаратов Китайского концерна Heilongjiang Winovazyme Biotech Co. Основываясь на приведенных данных, эти ферментные препараты нецелесообразно использовать для гидролиза подсолнечной лузги. Ферментные препараты ООО ПО «Сиббиофарм», Adisseo France S.A.S. и Novozymes содержат в своем составе наполнитель, негидролизуемый целлюлолитическими ферментами.

3.2.2 Гидролиз подсолнечной лузги с использованием коммерческий ФП

Для проведения ферментативного гидролиза сухую подсолнечную лузгу измельчали на роторной ударной мельнице Retsch SR 200, проводили щелочную делигнификацию с помощью 4 %-ного раствора едкого натра. Из предобработанной лузги готовили 15 %-ную суспензию, устанавливали оптимальное значение рН, вносили расчетное количество ферментного препарата и ставили на термостатируемую качалку (частота вращения 220 мин⁻¹) с оптимальной для ФП температурой.

3.2.2.1 Ферментные препараты компании Novozymes

Все ферментные препараты компании Novozymes жидкие, обладают целлюлолитической и ксиланазной активностью.

Celluclast 1,5 L (Целлюкласт 1,5 Л) – жидкий ферментный препарат Ведущая активность – целлюлолитическая, 780 Ед/г. Динамика накопления РВ в зависимости от концентрации ферментного препарата представлена на рисунке 3.4. Гидролиз проводили при температуре 50° С и рН 5,0.

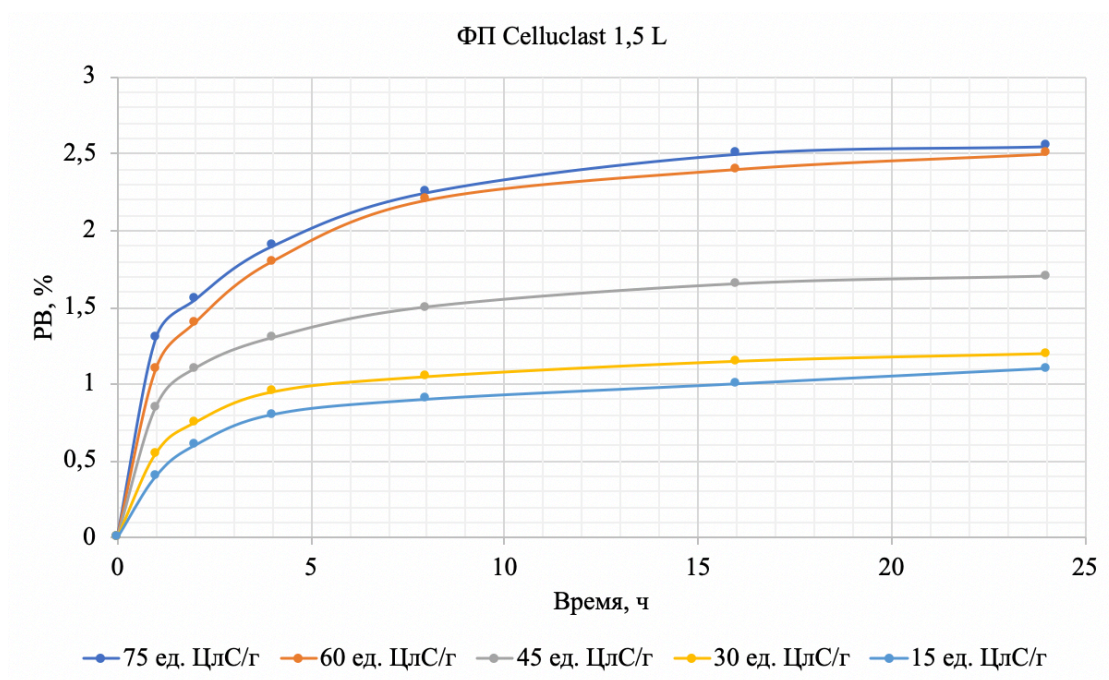


Рисунок 3.4 – Динамика накопления РВ при использовании Celluclast 1,5 L

Из рисунка 3.5 видно, что максимальное накопление РВ наблюдается при концентрации фермента 60 ед. ЦЛС на 1 г сухого субстрата, при этом накапливается 2,5 % РВ. Меньшее количество ФП гидролизует субстрат с образованием меньшего количества РВ.

Ферментным препаратом компании Novozymes с высокой ксиланазной активностью является Viscozyme (Вискозим). Гидролиз проводили при температуре 50° С и рН 5,0. На рисунке 3.5 представлена динамика накопления РВ в зависимости от продолжительности гидролиза и дозировки ферментного препарата.

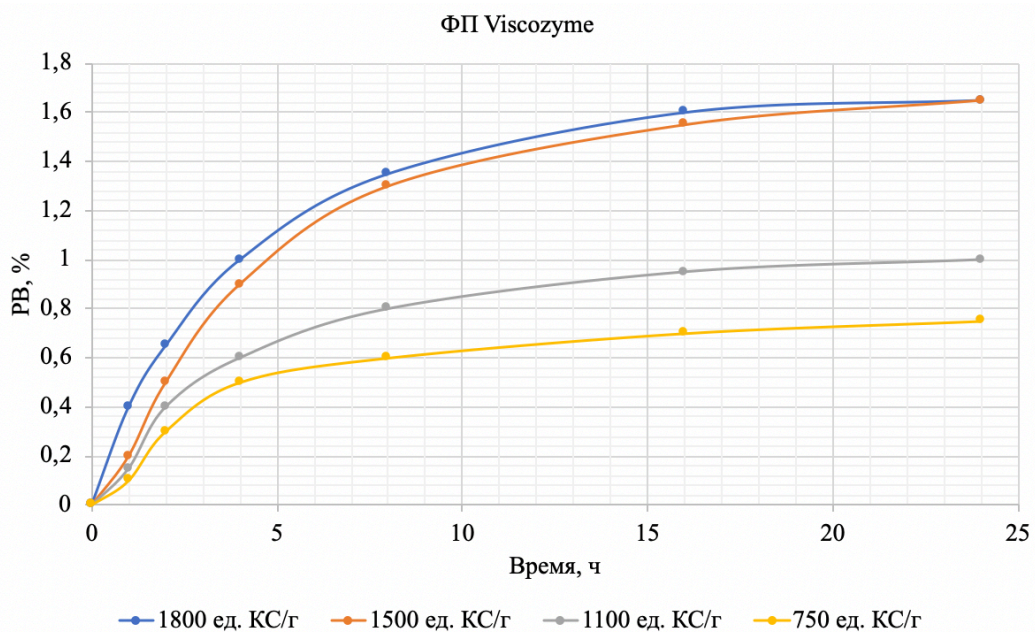


Рисунок 3.5 – Динамика накопления РВ при использовании ФП Viscozyme

Использование ферментного препарата с исключительно ксиланазной активностью ожидаемо позволило получить значительно меньшее количество сбрасываемых сахаров в гидролизате, чем при применении целлюлолитического ферментного препарата.

Комплексным ферментным препаратом компании Novozymes является Shearzyme Plus 2x (Шеарзим Плюс 2x). Дозировку фермента рассчитывали,

опираясь исключительно на целлюлазную активность. Гидролиз проводили при температуре 50° С и рН 5,0. Данные о динамике накопления сбраживаемых сахаров представлены на рисунке 3.6.

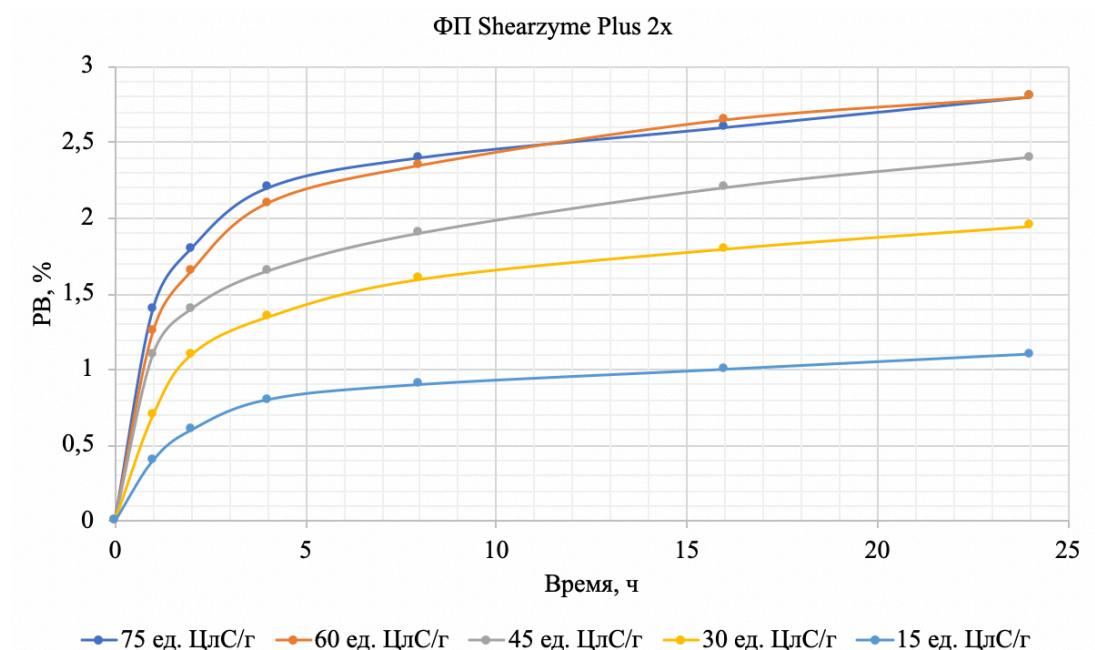


Рисунок 3.6 – Данные о накоплении РВ при использовании Shearzyme Plus 2x

Наибольший выход РВ (2,8 %) наблюдается при дозировке фермента 60 ед. ЦлС/г субстрата, если пересчитать дозировку фермента в ед. КС, то получается – 750 ед. КС/г субстрата.

При использовании комплексного (с целлюлазной и ксиланазной активностями) ферментного препарата показана его высокая эффективность по сравнению с использованием препаратов, обладающих только одной из названных активностей.

Также были рассмотрены два ферментных препарата, обладающие β -глюканазной активностью: Viscoferm HT FG (Вискоферм ХТ ФГ) и Ultraflo XL (Ультрафло ХЛ), обладающие целлюлолитической активностью 550 и 620 ед. ЦлС/г, соответственно. Динамика накопления РВ представлена на рисунке 3.7. Гидролиз проводили при температуре 50° С и рН 5,0.

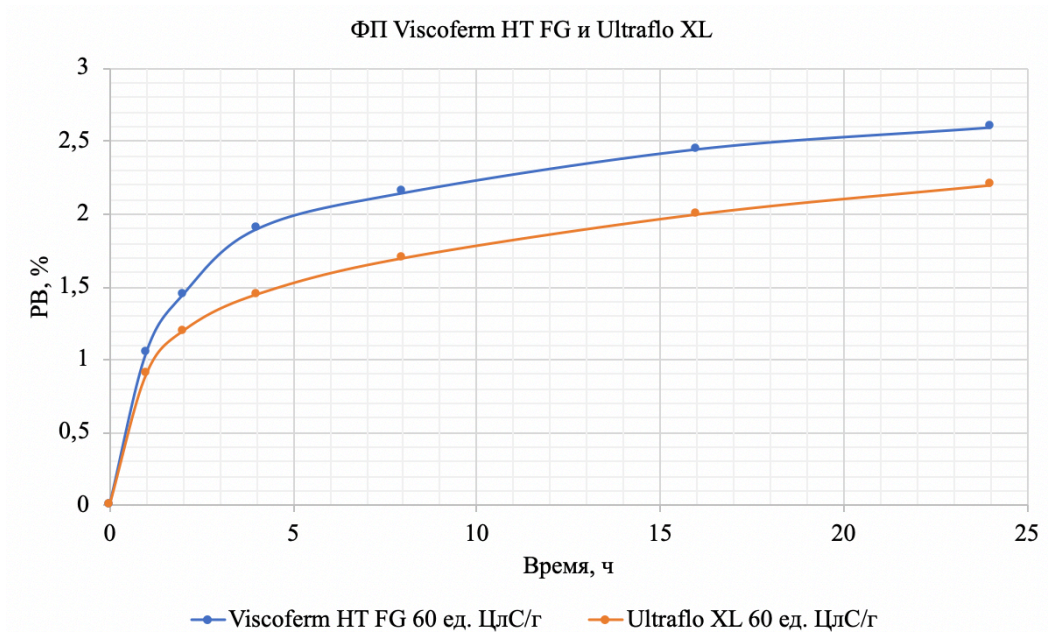


Рисунок 3.7 – Динамика накопления ПВ при использовании Viscoferm HT FG и Ultraflo XL в дозировке 60 ед. ЦлС/г субстрата

По данным рисунка видно, что при равной дозировке Viscozyme HT FG гидролизует большее количество субстрата до сбраживаемых сахаров, однако получаемое количество ПВ (2,6 %) меньше, чем при использовании комплексного ферментного препарата Shearzyme Plus 2х.

Среди рассмотренных ферментных препаратов, предлагаемых компанией Novozymes, наиболее эффективным оказался комплекс целлюлазы и ксиланазы с торговым названием Shearzyme Plus 2х.

3.2.2.2 Ферментные препараты компании Adisseo France S.A.S.

Среди всех ферментных препаратов французского холдинга Adisseo наибольшей целлюлазной активностью обладает Rovabio Max AP. Данные о накоплении восстанавливающих сахаров представлены на рисунке 3.8. Гидролиз проводили при температуре 50° С и pH 5,0.

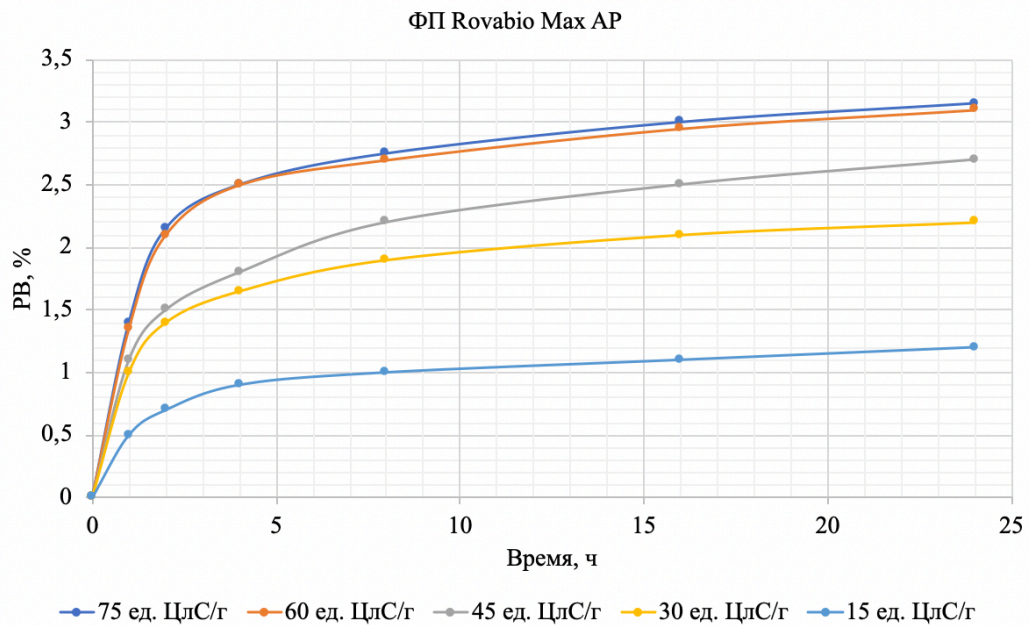


Рисунок 3.8 – Динамика накопления РВ при использовании Rovabio Max AP

В результате использования Rovabio Max AP был получен ферментолитат, содержащий 3,1 % восстанавливающих сахаров. Использование этого ФП позволило получить ферментолитат, содержащий на 0,5 % больше РВ, чем при использовании Shearzyme Plus 2x.

3.2.2.3 Ферментные препараты компании ООО «Сиббиофарм»

Отечественная биотехнологическая компания ООО ПО «Сиббиофарм» предлагает ферментные препараты с различной субстратной специфичностью. Среди ферментов, гидролизующих целлюлозосодержащие сырье, выделяются ЦеллоЛюкс-F (Целловиридин Г20Х) и Фидбест W 2 гр.

ЦеллоЛюкс-F – ферментный препарат, получаемый при глубинной ферментации *Trichoderma viride*. Ферментный препарат сбалансирован по ксиланазной (8800 Ед/г), β-глюканазной (7500 Ед/г) и целлюлазной (2200 Ед/г) активностям. Комплекс ферментов обеспечивает ступенчатое расщепление целлюлозы, ксиланов, β-глюканов растительной клетки до простых сахаров. Фермент активен в широком диапазоне рН (3,5 – 6,0) и

температуры (35 – 65° С). Данные о накоплении РВ при ферментативном гидролизе подсолнечной лузги представлены на рисунке 3.9.

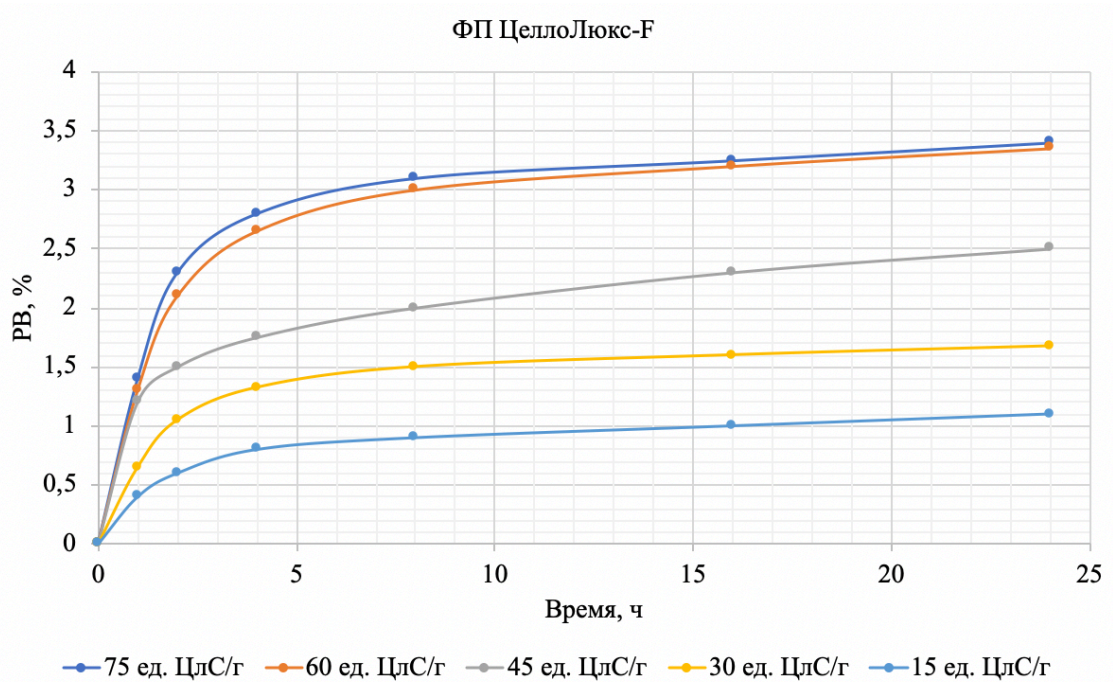


Рисунок 3.9 – Динамика накопления РВ при использовании ЦеллоЛюкс-Ф

По данным рисунка видно, что при дозировке ферментного препарата из расчета 60 ед. ЦлС/г субстрата получен ферментолитат, содержащий 3,4 % РВ, что является самым высоким показателем среди всех ферментолитатов, полученных ранее с использованием другим ферментов.

Другим ферментным препаратом ООО «Сиббиофарм» является Фидбест W 2 гр., обладающий ксиланазной (17000 Ед/г) и β -глюканазной активностями (7000 Ед/г). Ведущей активностью данного ФП является ксиланазная активность, исходя из этого дозировка данного ФП рассчитывалась по ней. Гидролиз проводили при температуре 50° С и рН 5,0. Данные о накоплении РВ представлены на рисунке 3.10.

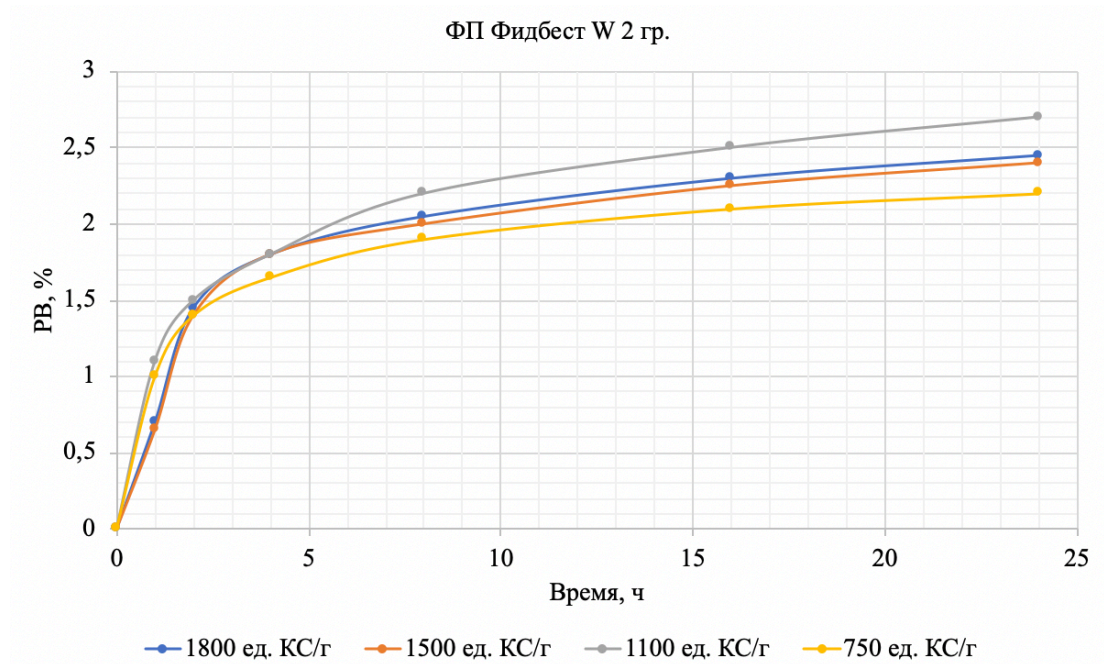


Рисунок 3.10 – Динамика накопления РВ при использовании Фидбест W 2 гр.

По данным рисунка 3.10 видно, что при использовании ферментного препарата ФидБест-W 2 гр был получен ферментолитат, содержащий не более 2,7 % РВ.

3.2.3 Обоснование выбора ферментного препарата для ферментативного гидролиза подсолнечной лузги

Для наиболее полного гидролиза подсолнечной лузги необходимо использовать комплексный ферментный препарат, преобладающей активностью которого должна быть целлюлазная. Сводные характеристики ферментолитатов, полученных при использовании различных ферментных препаратов, представлены в таблице 3.9.

Таблица 3.9 – Сводная таблица, характеризующая содержание РВ в ферментолизатах подсолнечной лузги, полученных при использовании различных ферментных препаратов

№	Торговое наименование фермента	РВ после 24 ч гидролиза, %	Расход ФП, кг/т субстрата	Ориентировочная стоимость 1 кг ФП, руб	Ориентировочная стоимость ФП для гидролиза 1 т субстрата
1	Celluclast 1,5 L	2,50	45	900,00	40 500,00
2	Viscozyme	1,65	45	900,00	40 500,00
3	Shearzyme Plus 2x	2,80	45	900,00	40 500,00
4	Viscoferm HT FG	2,60	55	900,00	49 500,00
5	Ultraflo XL	2,20	55	900,00	49 500,00
6	RovabioMax AP	3,10	31	800,00	24 800,00
7	Фидбест W 2 гр.	2,40	44	700,00	30 800,00
9	ЦеллоЛюкс-Ф	3,40	27	700,00	18 900,00

По данным таблицы видно, что ферментный препарат ЦеллоЛюкс-Ф является наиболее подходящим для проведения ферментативного гидролиза подсолнечной лузги. Получаемый ферментолизат содержит 3,4 % РВ. Ближайшим конкурентом выбранного ферментного препарата является ФП французской компании Adisseo – Rovabio Max AP, ферментолизат содержит на 10 % меньше восстанавливающих сахаров и на 33 % дороже отечественного комплексного препарата. Среди ферментных препаратов датской компании Novozymes наиболее полно гидролиз протекает при использовании комплексного препарата Shearzyme Plus 2x, ферментолизат содержит на 17 % меньше редуцирующих сахаров и на 114 % дороже.

3.3 Оптимизация процесса биокаталитической деструкции полимеров лузги с помощью методов математического моделирования

На втором этапе для определения оптимальных параметров ферментативного гидролиза подсолнечной лузги был разработан план

трёхфакторного эксперимента с использованием композиционного униформ-ротатабельного планирования. В качестве варьируемых факторов были выбраны температура ($40^{\circ}\text{C} \leq X_1 \leq 60^{\circ}\text{C}$), pH суспензии ($4,0 \leq X_2 \leq 6,0$) и продолжительность гидролиза ($12 \text{ ч} \leq X_3 \leq 24 \text{ ч}$). Факторы, фиксируемые на постоянном уровне: содержание подсолнечной лузги (15 %), дозировка ФП ЦеллоЛюкс-F (60 ед. ЦдС/г). Функцией отклика являлось содержание РВ (Y), %, в полученном гидролизате (таблица 3.10).

Таблица 3.10 – План и результаты 3-х факторного эксперимента по оптимизации процесса ферментативного гидролиза подсолнечной лузги

№ опыта	Температура, °C	pH	Время, ч	РВ, %
1	44	4,4	14,4	2,30
2	44	5,6	14,4	2,40
3	56	4,4	14,4	2,40
4	56	5,6	14,4	2,60
5	44	4,4	21,6	2,65
6	44	5,6	21,6	2,67
7	56	4,4	21,6	2,60
8	56	5,6	21,6	3,00
9	40	5,0	18,0	2,30
10	60	5,0	18,0	2,50
11	50	4,0	18,0	2,65
12	50	6,0	18,0	2,88
13	50	5,0	12,0	2,80
14	50	5,0	24,0	3,40
15	50	5,0	18,0	3,30
16	50	5,0	18,0	3,40
17	50	5,0	18,0	3,20
18	50	5,0	18,0	3,40
19	50	5,0	18,0	3,20
20	50	5,0	18,0	3,30

Полученные данные о накоплении РВ были обработаны и получены следующие данные:

Доверительные интервалы коэффициентов регрессии:

$$b_0 = 0,0937511; b_i = 0,0622004; b_{ij} = 0,0812705; b_{ii} = 0,0605517$$

Уравнение регрессии в кодированном виде:

$$Y = 0,067X_1 + 0,081X_2 + 0,163X_3 + 0,06X_1X_2 - 0,0025X_1X_3 + 0,015X_2X_3 - 0,349X_1^2 - 0,22X_2^2 - 0,101X_3^2 + 3,305 \quad (1)$$

Уравнение после исключения незначимых коэффициентов:

$$Y = 0,067X_1 + 0,081X_2 + 0,163X_3 - 0,349X_1^2 - 0,22X_2^2 - 0,101X_3^2 + 3,305 \quad (2)$$

Таблица 3.11 – Результаты обработки данных

№ опыта	X ₁	X ₂	X ₃	Y эксп.	Y расч.	Δ
1	-1,0	-1,0	-1,0	2,3	2,32438	0,0243767
2	-1,0	1,0	-1,0	2,4	2,48646	0,0864583
3	1,0	-1,0	-1,0	2,4	2,45857	0,0585682
4	1,0	1,0	-1,0	2,6	2,62065	0,0206498
5	-1,0	-1,0	1,0	2,65	2,65080	0,0008025
6	-1,0	1,0	1,0	2,67	2,81288	0,1428840
7	1,0	-1,0	1,0	2,6	2,78499	0,1849940
8	1,0	1,0	1,0	3	2,94708	-0,0529243
9	-1,68	0,0	0,0	2,3	2,20615	-0,0938455
10	1,68	0,0	0,0	2,5	2,43184	-0,0681631
11	0,0	-1,68	0,0	2,65	2,54770	-0,1022980
12	0,0	1,68	0,0	2,88	2,82029	-0,0597104
13	0,0	0,0	-1,68	2,8	2,74451	-0,0554946
14	0,0	0,0	1,68	3,4	3,29349	-0,0951204
15	0,0	0,0	0,0	3,3	3,30488	0,00487960
16	0,0	0,0	0,0	3,4	3,30488	-0,0951204
17	0,0	0,0	0,0	3,2	3,30488	0,1048800
18	0,0	0,0	0,0	3,4	3,30488	-0,0951204
19	0,0	0,0	0,0	3,2	3,30488	0,1048800
20	0,0	0,0	0,0	3,3	3,30488	0,0048796

Реализация эксперимента и обработка полученных данных позволили получить уравнение регрессии, описывающее влияние температуры, рН и продолжительности гидролиза на накопление редуцирующих веществ:

$$Y = 0,997X_1 + 6,345X_2 + 0,332X_3 - 0,01X_1^2 - 0,62X_2^2 - 0,008X_3^2 - 41,51 \quad (3)$$

Адекватность математической модели определяли по критерию Фишера (уровень значимости $q = 0,05$; степени свободы: $f_1 = 5$; $f_2 = 7$; $F_{ис\ табл.} = 4,0$; $F_{ис\ расч.} = 2,0$). Полученное уравнение адекватно описывает экспериментальные данные в реализованном диапазоне изменения факторов.

Установлены оптимальные параметры ферментативного гидролиза подсолнечной лузги при применении ЦеллоЛюкс-Ф: температура (X_1) – 53°C; рН (X_2) – 4,83 и продолжительность гидролиза (X_3) – 19,6, определяющие положение точки максимума

3.4 Технология получения ферментолизата подсолнечной лузги

Технологическая блок-схема получения ферментолизата подсолнечной лузги представлена на рисунке 3.11.

Лузга, образующаяся при лущении семян подсолнечника на масличных производствах, просушивается до влажности не более 6 %. Подсушенная лузга измельчается на роторной ударной мельнице Retsch SR 200 до размера частиц не более 100 мкм. В промышленном масштабе могут использоваться планетарные мельницы или коллоидные мельницы.

Измельченная подсолнечная лузга суспендируется при гидромодуле 1:8,5, подвергается щелочной делигнификации в присутствии 4 %-ного раствора NaOH и выдерживается при температуре не менее 120° С в течение 1 ч. Суспензию нейтрализуют до рН 7,0 – 8,0 и центрифугируют. Супернатант отделяют от твердого осадка и направляют на получение водорастворимых фитомеланинов. Твердый осадок ресуспендируют в воде объемом, соответствующим отделенному объему супернатанта. В полученной суспензии устанавливают рН 4,8 и вносят ферментный препарат ЦеллоЛюкс-Ф из расчета 60 ед. ЦлС на 1 г абсолютно сухой лузги. Ферментализ ведут при постоянном перемешивании и термостатировании при 53 °С в течение 20 ч.

Полученный ферментолизат отделяют центрифугированием или фильтрованием. Фильтрат, содержащий не менее 3 % восстанавливающих сахаров, направляют на приготовление питательной среды для культивирования дрожжей-продуцентов кормового белка. Непрогидролизованый осадок лузги является субстратом для получения

кормового ферментного препарата при твердофазном культивировании мицелиального гриба.

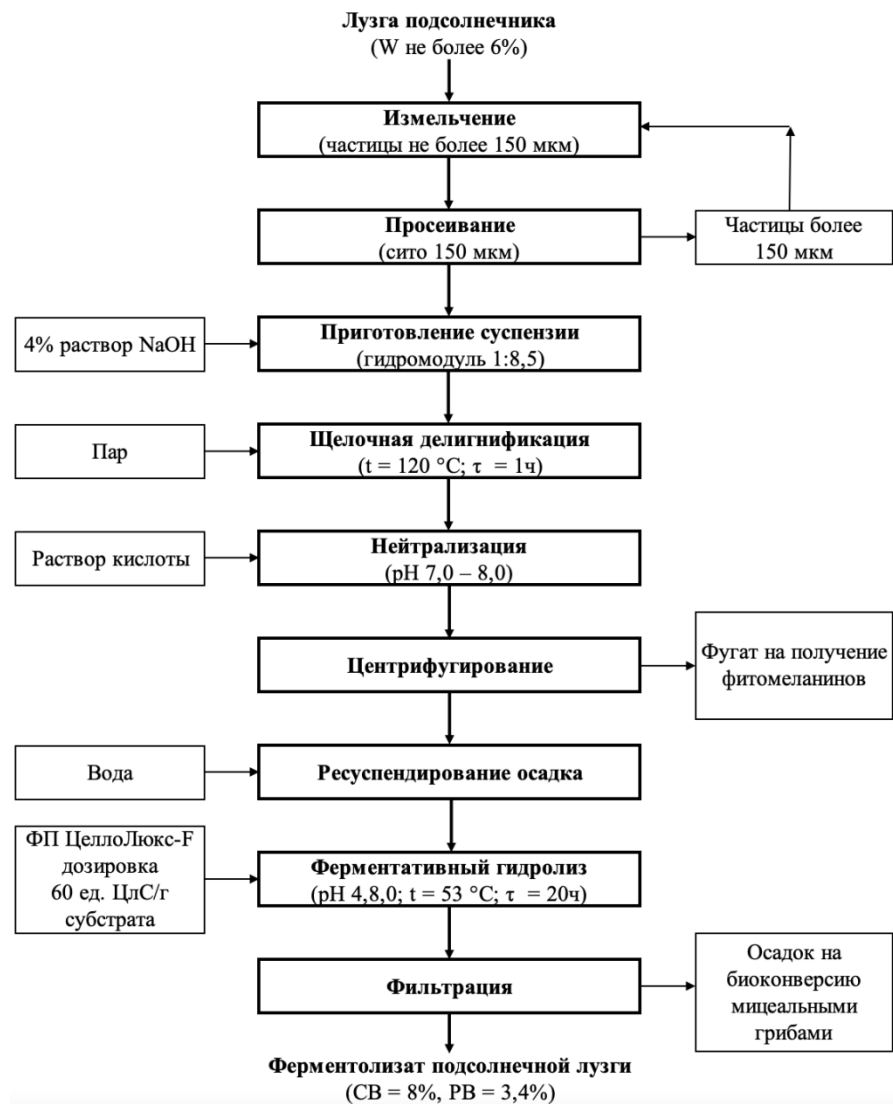


Рисунок 3.11 – Технологическая блок-схема получения ферментолита подсолнечной лузги

3.5 Характеристика ферментолита подсолнечной лузги

По описанной выше схеме можно получать ферментолит, содержащий > 8 % растворенных сухих веществ, из которых > 40 % – это восстанавливающие сахара, преимущественно глюкоза. На рисунке 3.12

представлена хроматограмма образца ферментолізата. Хроматограмма получена при проведении высокоэффективной жидкостной хроматографии на колонке MetaCarb 67C. Отчет получен с помощью ПО МультиХром для Windows.

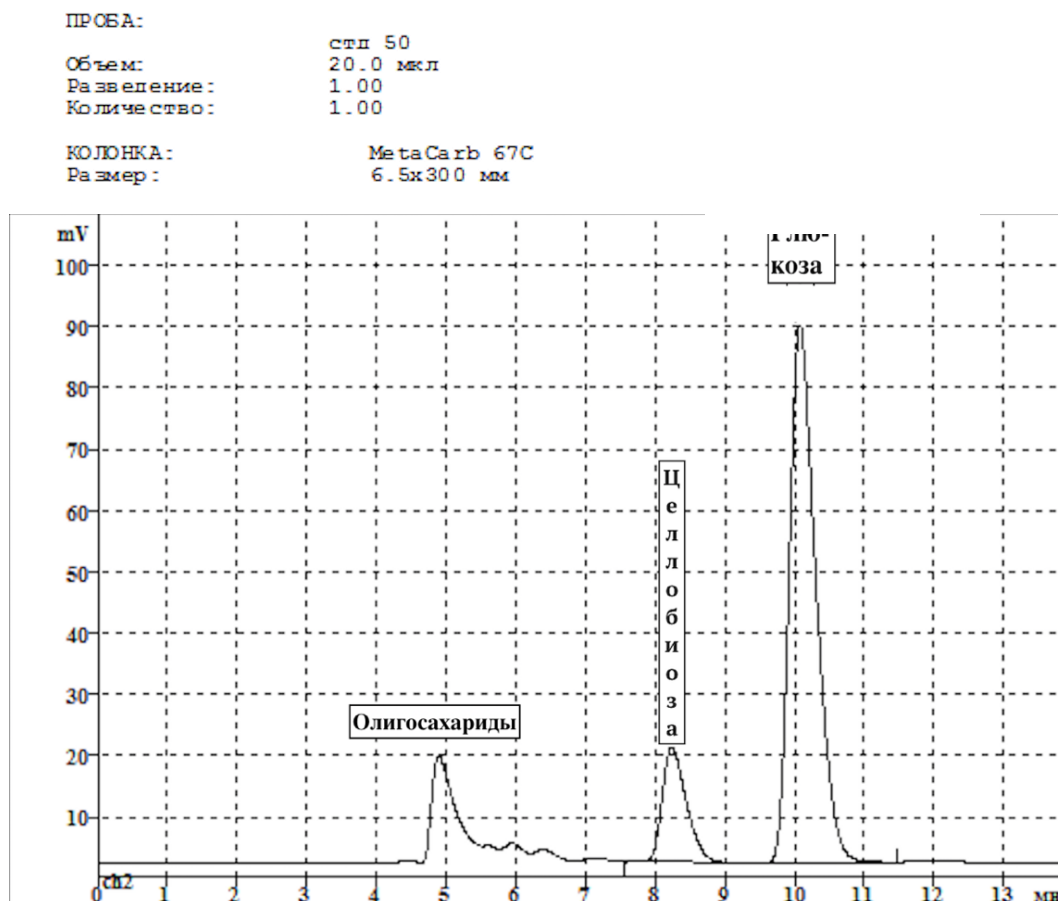


Рисунок 3.12 – Хроматограмма ферментолізата подсолнечной лузги

По данным ВЭЖХ было определено соотношение глюкозы, целлобиозы и высших (3 и более глюкозных остатков) сахаров. Глюкоза – 73,65 %; целлобиоза – 12,49 %; олигосахариды – 13,86 %.

ГЛАВА 4 Разработка технологии промышленного получения дрожжевой биомассы на основе ферментолізата подсолнечной лузги

Тема того, что комбикормовая «отрасль испытывает сильную зависимость от импорта протеина, аминокислот и витаминов и значительно

отстает от других стран по показателям удельного веса зерновых культур в составе комбикормов и нуждается в новых технологиях» – звучала в докладе заместителя директора Департамента животноводства и племенного дела Минсельхоза РФ Надежды Дурыгиной на V Международной конференции «Технологии производства комбикормов. Стабильная сырьевая база и эволюция компонентов», прошедшей в рамках выставки «Зерно-Комбикорма-Ветеринария 2020».

Одной из основных проблем российского рынка комбикормов г-жа Дурыгина назвала несбалансированность по протеиновому и аминокислотному составу. «В России на производство животноводческой продукции затрачивается в 2-3 раза больше кормов по сравнению с другими странами» — констатировала она.

Основу технологии промышленного получения кормового белка составляет глубинная ферментация дрожжевой культуры, являющейся продуцентом высокоусваиваемого белка. Тенденции рыночной экономики «диктуют» требования, предъявляемые к кормовому белку, который может быть высоко оценен на рынке.

4.1 Скрининг дрожжевых культур

На первом этапе разработки технологии промышленного производства кормового белка на ферментализате подсолнечной лузги необходимо было провести скрининг штаммов, способных утилизировать сахара, содержащиеся в ферментализате, накапливать большое количество биомассы, содержащей значительное количество сырого протеина.

Для первичного скрининга были приготовлены агаризованные питательные среды на основе ферментализата подсолнечной лузги. Для обогащения питательной среды в ее состав были введены неорганические соли – источники азотного и фосфорного питания. Состав агаризованной среды для первичного скрининга представлен в таблице 4.1.

Таблица 4.1 – Состав агаризованной питательной среды для первичного скрининга дрожжей-продуцентов кормового белка

№	Компонент питательной среды	Содержание, %
1	NH ₄ H ₂ PO ₄	0,5
2	K ₂ HPO ₄ x 3H ₂ O	0,065
3	Дрожжевой экстракт	0,2
4	Агар	2,0
5	Ферментолизат подсолнечной лузги (3,4% РВ)	До 100 %

pH питательной среды до стерилизации – 5,0

Таблица 4.2 – Визуальная оценка роста дрожжевых культур на агаризованной питательной среде

№	Штамм-продуцент	Визуальная оценка роста
1	<i>Candida tropicalis</i> RCAM1050	+++
2	<i>Candida blancii</i> RCAM3343	+++
3	<i>Candida blancii</i> RCAM3360	+++
4	<i>Candida utilis</i> Y-797	+++
5	<i>Candida parapsilopsis</i> D-18	+++
6	<i>Wickerhamomyces anomala</i> RCAM1039	++
7	<i>Guechomyces pollulans</i> RCAM03356	++
8	<i>Cutaneotrichosporon cutaneum</i> RCAM03569	+++
9	<i>Cylerlindnera sp.</i> RCAM03502	++
10	<i>Hansenula polymorpha</i> D-21	+++
11	<i>Debaryomyces hansenii</i> Y-2519	+++
12	<i>Debaryomyces hansenii</i> Y-3863	+++
13	<i>Debaryomyces hansenii</i> D-15	+++
14	<i>Kluyveromyces lactis</i> Y-4444	++
15	<i>Kluyveromyces marxianus</i> Y-4557	+++
16	<i>Kluyveromyces marxianus</i> Y-4570	+++
17	<i>Pichia membranifaciens</i> D-17	+++
18	<i>Pichia kudriavzevii</i> Y-3918	+++
19	<i>Zygosaccharomyces bailii</i> D-16	–

Стерильную питательную среду разливали по чашкам Петри, охлаждали и засеивали штрихом с помощью микробиологической петли. Культуры выращивали при температуре 30° С. После 48 ч инкубирования чашки оценивали на наличие роста чистых культур дрожжей. Количественно

определить рост на агаризованной среде не представляется возможным, поэтому рост оценивали визуально, каждой культуре выставляли определенное количество «плюсов» («+++» – обильный рост, «++» – рост хороший, «+» – рост удовлетворительный, «–» - рост отсутствует). Данные визуальной оценки выросших культур представлены в таблице 4.2. Внешний вид некоторых культур на агаризованной среде представлен на рисунках 4.1 и 4.2.

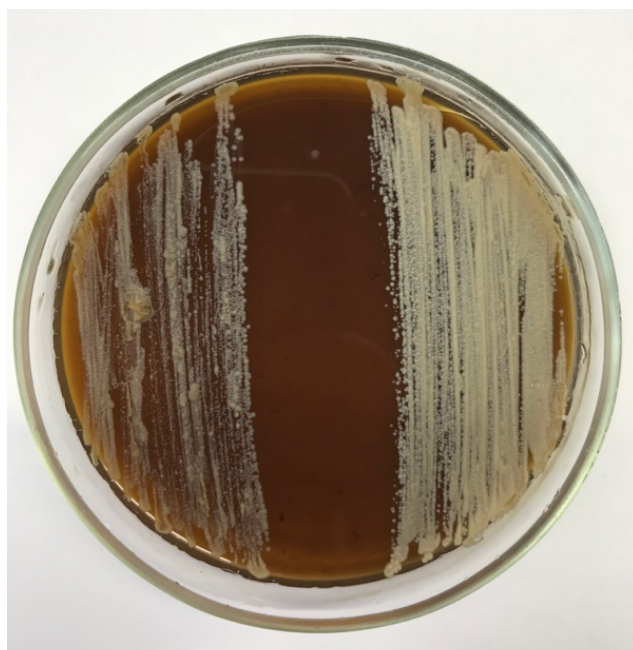


Рисунок 4.1 – Внешний вид выросших дрожжевых культур на агаризованной среде (слева – *Cylerlindnera sp.* RCAM03502 («+++»), справа – *Debaryomyces hansenii* Y-2519 («+++»))

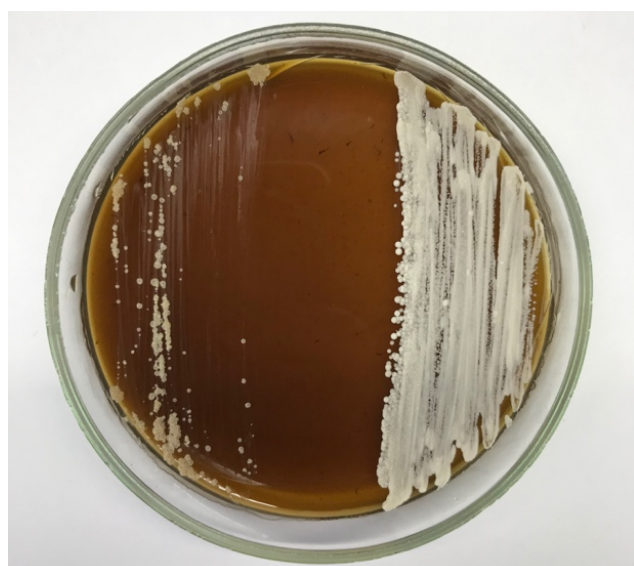


Рисунок 4.2 – Внешний вид выросших дрожжевых культур на агаризованной среде (слева – *Zygosaccharomyces bailii* D-16 («–»), справа – *Kluyveromyces marxianus* Y-4557 («+++»))

Из 19 дрожжевых культур – 18 показали свою способность утилизировать углеродсодержащие питательные вещества из ферментолизата. 14 штаммов характеризовались сильным ростом, среди них - представители рода *Candida*, *Debaryomyces* и *Kluveromyces*.

Следующим этапом отбора стало глубинное культивирование исследуемых штаммов в колбах. Для культивирования была приготовлена модифицированная среда Крючковой, содержащая ферментолизат. Состав питательной среды представлен в таблице 4.3.

Таблица 4.3 – Состав питательной среды для глубинного культивирования дрожжей-продуцентов кормового белка

№	Компонент питательной среды	Содержание, %
1	$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	0,5
2	$\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$	0,065
3	Дрожжевой экстракт	0,2
4	Ферментолизат подсолнечной лузги (3,4% РВ)	До 100 %

рН питательной среды до стерилизации – 5,0; в качестве титранта использовали химически осажденный карбонат кальция – 0,3 %

Питательную среду стерилизовали и разливали по 50 см³ в стерильные колбы Эрленмейера объемом 250 см³. Культивирование вели на качалке (число оборотов – 390 мин⁻¹) при температуре 30 °С или 40 °С в течение 20 ч. После культивирования для каждого штамма определяли количество потребленных сухих веществ (в том числе РВ), количество полученной биомассы и содержание сырого протеина. Полученные данные представлены в таблицах 4.4 и 4.5.

Все исследуемые штаммы дрожжей являются быстрорастущими. Если ферментолизат в питательной среде заменить на глюкозу, то в питательных средах всех вариантах через 20 ч культивирования концентрация РВ будет равна 0%. У всех штаммов количество остаточных РВ отлично от 0 %, следовательно, в среде остались дисахара, относящиеся к редуцирующим, но на ассимиляцию которых дрожжам может потребоваться больше времени.

Таблица 4.4 – Данные о потреблении сухих веществ, количеству полученной биомассы и содержанию сырого протеина при культивировании исследуемых штаммов при температуре 30 °С и 40 °С в течение 20 часов

Исследуемый штамм	Содержание СВ в среде, % (в тч РВ, %)	Температура культивирования	Содержание СВ в культуральной жидкости, % (в тч РВ, %)	Количество полученной биомассы (в пересчете на АСВ), г/дм ³	Содержание сырого протеина, % к АСВ
1	2	3	4	5	6
<i>Candida tropicalis</i> RCAM1050	8,0 (3,2)	30° С	5,0 (0,16)	17,6	42,5
		40° С	5,0 (0,10)	19,2	47,2
<i>Candida blancii</i> RCAM3343	8,0 (3,2)	30° С	4,5 (0,33)	16,1	45,4
		40° С	4,5 (0,30)	16,4	46,9
<i>Candida blancii</i> RCAM3360	8,0 (3,2)	30° С	4,0 (0,33)	19,2	42,3
		40° С	3,8 (0,33)	18,6	42,5
<i>Candida utilis</i> Y-797	8,0 (3,2)	30° С	5,0 (0,36)	15,4	47,7
		40° С	7,0 (2,50)	3,3	–
<i>Candida parapsilopsis</i> D-18	8,0 (3,2)	30° С	4,0 (0,60)	24,4	42,4
		40° С	4,2 (0,60)	23,3	44,7
<i>Wickerhamomyces anomala</i> RCAM1039	8,0 (3,2)	30° С	5,0 (0,16)	17,6	51,2
		40° С	7,0 (3,00)	–	–
<i>Guechomyces pollulans</i> RCAM03356	8,0 (3,2)	30° С	6,0 (1,60)	13,6	46,3
		40° С	7,5 (3,00)	–	–
<i>Cutanitrichosporon cutaneum</i> RCAM03569	8,0 (3,2)	30° С	6,5 (0,92)	10,6	37,4
		40° С	7,5 (2,90)	–	–
<i>Cylerlindnera</i> sp. RCAM03502	8,0 (3,2)	30° С	6,5 (0,80)	7,1	35,5
		40° С	7,5 (2,90)	–	–
<i>Hansenula polymorpha</i> D-21	8,0 (3,2)	30° С	5,0 (1,25)	10,2	52,1
		40° С	5,0 (1,32)	10,6	53,4
<i>Debaryomyces hansenii</i> Y-2519	8,0 (3,2)	30° С	4,5 (0,36)	12,7	48,2
		40° С	7,5 (2,90)	–	–

1	2	3	4	5	6
<i>Debaryomyces hansenii</i> Y-3863	8,0 (3,2)	30° C	5,0 (0,53)	17,1	54,1
		40° C	7,5 (2,90)	–	–
<i>Debaryomyces hansenii</i> D-15		30° C	5,5 (0,96)	8,6	58,2
		40° C	7,5 (2,90)	–	–
<i>Kluyveromyces lactis</i> Y-4444		30° C	5,0 (0,20)	12,7	44,3
		40° C	5,0 (0,33)	10,3	46,8
<i>Kluyveromyces marxianus</i> Y-4557		30° C	5,0 (0,33)	14,3	45,2
		40° C	4,5 (0,33)	18,4	47,3
<i>Kluyveromyces marxianus</i> Y-4570		30° C	5,0 (0,30)	12,5	44,2
		40° C	4,5 (0,30)	13,1	46,7
<i>Pichia membranifaciens</i> D-17		30° C	5,5 (0,33)	14,1	42,1
		40° C	5,0 (0,33)	15,9	43,1
<i>Pichia kudriavzevii</i> Y-3918	30° C	4,5 (0,30)	16,3	46,7	
	40° C	4,5 (0,30)	16,9	46,9	

Таблица 4.5 – Данные о потреблении сухих веществ, количеству полученной биомассы и содержанию сырого протеина при культивировании исследуемых штаммов при температуре 30 °С и 40 °С в течение 40 ч

Исследуемый штамм	Содержание СВ в среде, % (в тч РВ, %)	Температура культивирования	Содержание СВ в культуральной жидкости, % (в тч РВ, %)	Количество полученной биомассы (в пересчете на АСВ), г/дм ³	Содержание сырого протеина, % к АСВ
1	2	3	4	5	6
<i>Candida tropicalis</i> RCAM1050	8,0 (3,2)	30° C	4,5 (0)	28,80	40,2
		40° C	4,4 (0)	26,20	44,3
<i>Candida blancii</i> RCAM3343		30° C	4,0 (0)	30,60	44,2
		40° C	4,5 (0)	27,40	45,3
<i>Candida blancii</i> RCAM3360		30° C	3,2 (0)	21,19	41,3
		40° C	3,2 (0)	26,37	41,2

1	2	3	4	5	6
<i>Candida utilis</i> Y-797	8,0 (3,2)	30° C	4,8 (0,16)	21,80	42,6
		40° C	7,0 (2,3)	3,39	–
<i>Candida parapsilopsis</i> D-18		30° C	3,8 (0,33)	23,90	43,7
		40° C	4,0 (0,33)	27,60	43,6
<i>Wicerhamomyces anomala</i> RCAM1039		30° C	4,5 (0)	24,00	47,9
		40° C	7,0 (3)	–	–
<i>Guechomyces pollulans</i> RCAM03356		30° C	5,5 (0,8)	16,10	44,6
		40° C	7,5 (3,0)	–	–
<i>Cutanitrichosporon cutaneum</i> RCAM03569		30° C	5,0 (0,2)	20,10	39,2
		40° C	7,5 (2,9)	–	–
<i>Cylerlindnera sp.</i> RCAM03502		30° C	6,5 (0,8)	11,10	37,7
		40° C	7,5 (2,9)	–	–
<i>Hansenula polymorpha</i> D-21		30° C	4,5 (0,96)	16,40	56,5
		40° C	4,5 (0,72)	17,60	57,8
<i>Debaryomyces hansenii</i> Y-2519		30° C	3,5 (0,16)	21,70	46,7
		40° C	7,5 (2,9)	–	–
<i>Debaryomyces hansenii</i> Y-3863		30° C	3,5 (0,2)	24,10	53,9
		40° C	7,5 (2,9)	–	–
<i>Debaryomyces hansenii</i> D-15		30° C	5,0 (0,72)	11,50	59,6
		40° C	7,5 (2,9)	–	–
<i>Kluyveromyces lactis</i> Y-4444	30° C	5,0 (0,2)	12,50	46,7	
	40° C	5,0 (0,2)	14,30	46,9	
<i>Kluyveromyces marxianus</i> Y-4557	30° C	5,5 (0,16)	19,20	45,2	
	40° C	4,3 (0,16)	24,20	47,2	
<i>Kluyveromyces marxianus</i> Y-4570	30° C	5,0 (0,3)	18,80	47,8	
	40° C	4,5 (0,3)	19,10	48,7	
<i>Pichia membranifaciens</i> D-17	30° C	4,5 (0)	17,70	52,2	
	40° C	4,5 (0)	19,30	55,8	
<i>Pichia kudriavzevii</i> Y-3918	30° C	4,5 (0,3)	16,90	51,6	
	40° C	4,5 (0,3)	17,50	50,2	

С целью подтвердить эту гипотезу, время культивирования для исследуемых штаммов увеличили в 2 раза до 40 ч. Полученные данные представлены в таблице 4.5.

Увеличение времени культивирования в два раза привело к тому, что большинство штаммов потребило большее количество редуцирующих веществ, что привело к увеличению количества сухой биомассы и в 30 % культур наблюдалось повышение содержания сырого протеина в биомассе.

Для отбора наиболее перспективных штаммов были выбраны четыре основных параметра для сравнения: 1) отношение к температуре; 2) максимальная ассимиляция, содержащихся в среде восстанавливающих сахаров; 3) выход сухой биомассы с 1 дм³ среды; 4) количество сырого протеина.

Все исследуемые дрожжевые культуры относятся к мезофилам, однако были выявлены штаммы, не способные развиваться при температуре 40° С. В процессе культивирования дрожжей образуется большое количество тепла. Избыточное тепло необходимо отводить. В масштабах колб и небольших ферментеров (до 10 м³) этим теплом можно пренебречь и выбрать штамм, способный расти при любой температуре, однако в больших аппаратах поддерживать температуру на уровне не выше 30° С очень затратно, поэтому для крупнотонажного производства целесообразно выбирать термотолерантные мезофилы (способные расти при 40° С) [82]. В этом случае затраты на охлаждение дрожжерастительного аппарата будут значительно ниже. Среди культур с допустимой температурой роста в 40° С оказались все представители рода *Candida*, кроме *Candida utilis*. Дрожжи родов *Kluveromyces* и *Pichia* и единственный представитель рода *Hansenula* так же оказались термотолерантными мезофилами.

Напротив, дрожжи рода *Debaryomyces* и штаммы из коллекции Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной микробиологии (ИСАМ) оказались способны расти только при температуре 30° С.

Следующим критерием отбора для потенциальных продуцентов была максимальная ассимиляция восстанавливающих сахаров среды. Все штаммы, кроме *Guechomyces pollulans* RCAM03356 (0,8% PB), *Cylerlindnera sp.*, *Hansenula polymorpha* D-21 (0,72% PB), *Debaryomyces hansenii* D-15 (0,7% PB), утилизировали редуцирующие вещества практически полностью. Если в культуральной жидкости присутствуют остаточные сахара, то необходимо производить дополнительную очистку фильтрата перед сбросом в канализацию, либо проводить двухстадийное культивирование с использованием двух штаммов. На первой стадии культивируется выбранный продуцент, неполностью утилизирующий сахара, на второй стадии происходит культивирование другого продуцента на фильтрате культуральной жидкости. Двухстадийная технология требует дополнительных капитальных затрат на оборудование и коммуникации, данный процесс нецелесообразно внедрять на дрожжевом производстве из экономических соображений. Исходя из этого, указанные выше штаммы не могли быть рассмотрены в качестве продуцентов кормового белка при разработке промышленной технологии.

Важнейшими показателями при отборе промышленных культур является количество образующейся сухой биомассы в 1 дм³ питательной среды и высокое содержание в ней сырого протеина. Эти параметры являются ценообразующими для будущей технологии. От содержания сырого протеина в биомассе зависит рыночная цена данного продукта. Для примера, цена 1 кг кормовых дрожжей с содержанием сырого протеина 40 – 50 % составляет 17-19 руб. В то же время, при содержании сырого протеина 60 – 65 % цена 1 кг доходит до 55 – 60 руб. Очевидно, что количество образующейся биомассы и содержание в ней сырого протеина в большей степени зависит не от самой культуры, а от условий ее культивирования. Важно сбалансированное содержание в питательной среде азота, фосфора, калия, магния и других макро- и микроэлементов. Работа по оптимизации и подбору оптимальных условий культивирования той или иной культуры

очень долгая и кропотливая работа. На этапе первичного отбора необходимо определить потенциал штамма, для этого все культуры помещены в единые условия культивирования.

Среди факультативных мезофилов выделяются дрожжи рода *Debaryomyces* и *Wickerhamomyces anomala*. Количество сухой биомассы для данных культур превышает 20 г/дм³ содержание сырого протеина выше 45 % и достигает 53 % для штамма Y-3863.

Род *Debaryomyces* относится к классу сахаромецетов. *Debaryomyces hansenii* способны сбраживать большинство сахаров, органических кислот и солей. Некоторые штаммы этого вида используются при производстве рассольных сыров и других молочных продуктов. Использование дрожжей данного вида в пищевой промышленности говорит об их безопасности для применения в кормопроизводстве. Данный микроорганизм способен синтезировать вещества, токсичные для других микроорганизмов, эти токсины могут быть использованы в качестве терапевтических агентов в медицине против патогенных микроорганизмов.

Среди термотолерантных мезофилов выделяются представители трех родов: *Candida*, *Kluyveromyces* и *Pichia*. Дрожжи *Candida* исторически являются самыми распространенными в гидролизных производствах. При культивировании их на ферментализате подсолнечной лузги количество дрожжевой биомассы варьировалось от 26 г/дм³ до 32 г/дм³. По количеству образующейся биомассы дрожжи этого рода являются неоспоримыми лидерами, однако содержание сырого протеина в биомассе невелико и не превышает 45 %. Большое количество сырого протеина - до 54 % - накапливают дрожжи рода *Pichia*, количество биомассы невелико и составляет 16 – 18 г/дм³. Золотой серединой между этими родами являются представители рода *Kluyveromyces*. Так называемые «молочные дрожжи» способны накапливать до 24 г/дм³ сухой биомассы, содержащей до 48 % сырого протеина.

В результате проведения скрининга потенциальных продуцентов белка для дальнейшей работы по разработке технологии получения высококачественной биомассы были выбраны следующие штаммы: *Kluyveromyces marxianus* Y-4557, *Debaryomyces hansenii* Y-3863, *Candida blancii* RCAM3343, *Candida parapsilosis* D-18. Первые два штамма могут использоваться для получения белковых концентратов, которые возможно использовать для получения биологически активной добавки к пище человека.

K. marxianus и *D. hansenii* классифицируются, как GRAS микроорганизмы, то есть непатогенные, нетоксичные, не образующие антибиотиков и используемые в качестве базовых объектов биотехнологии. Дрожжи рода *Candida* возможно использовать только в качестве продуцентов кормового белка.

Среди выбранных штаммов наибольший промышленный интерес представляют *Kluyveromyces marxianus* Y-4557 и *Candida parapsilosis* D-18, эти штаммы термофильны и способны накапливать большое количество биомассы с высоким содержанием «сырого» протеина.

4.2 Оптимизация технологии культивирования отобранных штаммов

При промышленном получении дрожжевой биомассы рационально применять многоцикличный (отъемно-доливной) способ культивирования с подпиткой субстрата.

Полноценная среда для культивирования дрожжей должна содержать источник углерода (ферментализат подсолнечной лузги), источник азота, фосфора, калия и магния (минеральные соли).

4.2.1 Определение рациональной концентрации азота в питательной среде

Для определения рациональной концентрации азота в питательной среде, выбранные штаммы дрожжей культивировали в периодическом режиме с подпиткой субстратом на средах с различным содержанием азотсодержащей соли. В качестве минеральных солей – источников азота использовали классические для промышленной биотехнологии соли: аммоний сульфат $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, дигидрофосфат аммония $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$. Концентрации солей варьировали от 0,1 до 0,5 %. В среду также добавляли сульфат магния – 0,1 % и фосфат калия – 0,05 %.

Данные о культивировании дрожжей на средах с различным содержанием азота представлены в таблице 4.6.

Таблица 4.6 – Данные о накоплении сухой биомассы и «сырого» протеина на средах с различным содержанием азота

Концентрация минеральной соли в среде, %		<i>Kluyveromyces marxianus</i> Y-4557		<i>Candida parapsilosis</i> D-18	
		Сухая биомасса, г/дм ³	«Сырой» протеин, %	Сухая биомасса, г/дм ³	«Сырой» протеин, %
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,1	19,1	35,6	20,2	32,6
	0,2	25,6	43,8	23,1	44,7
	0,3	26,2	51,1	26,9	50,1
	0,4	27,1	54,6	30,7	54,4
	0,5	29,4	57,6	35,1	58,9
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	0,1	18,9	33,1	21,1	36,5
	0,2	24,7	42,7	22,9	43,1
	0,3	29,4	49,4	25,5	46,6
	0,4	32,8	58,3	29,9	52,2
	0,5	31,1	61,2	33,6	55,1

По данным таблицы можно сделать вывод о том, что для культивирования дрожжей *Kluyveromyces marxianus* целесообразно использовать дигидрофосфат аммония в концентрации 0,5 % в то время, как для культивирования дрожжей *Candida parapsilosis* лучше подходит сульфат аммония в той же концентрации.

4.2.2 Определение рационального значения pH культивирования

В процессе культивирования дрожжей происходит постепенное понижение («закисление») pH среды за счет образования метаболитов, снижающих pH, как только значение pH доходит до критического значения, равного 3,0 – 4,0, процесс роста дрожжей замедляется и останавливается, поэтому на дрожжевых производствах предусматривают pH-статирование при определенном значении. В качестве титранта классически используют аммиачную воду, так как она способна нейтрализовать образующиеся кислоты и выступает дополнительным источником азота.

С целью определения рационального значения для pH-статирования проводили периодическое культивирование с подпиткой субстратом в течение 24 ч. Полученные данные представлены на рисунке 4.3.

По данным графика видно, что оптимальное значение pH-статирования для штамма *Kluyveromyces marxianus* Y-4557 составляет 5,0, а для *Candida parapsilosis* D-18 – 5,5. При поддержании этих значений pH наблюдается максимальное накопление биомассы – до 32 г/дм³ и до 36 г/дм³, соответственно.

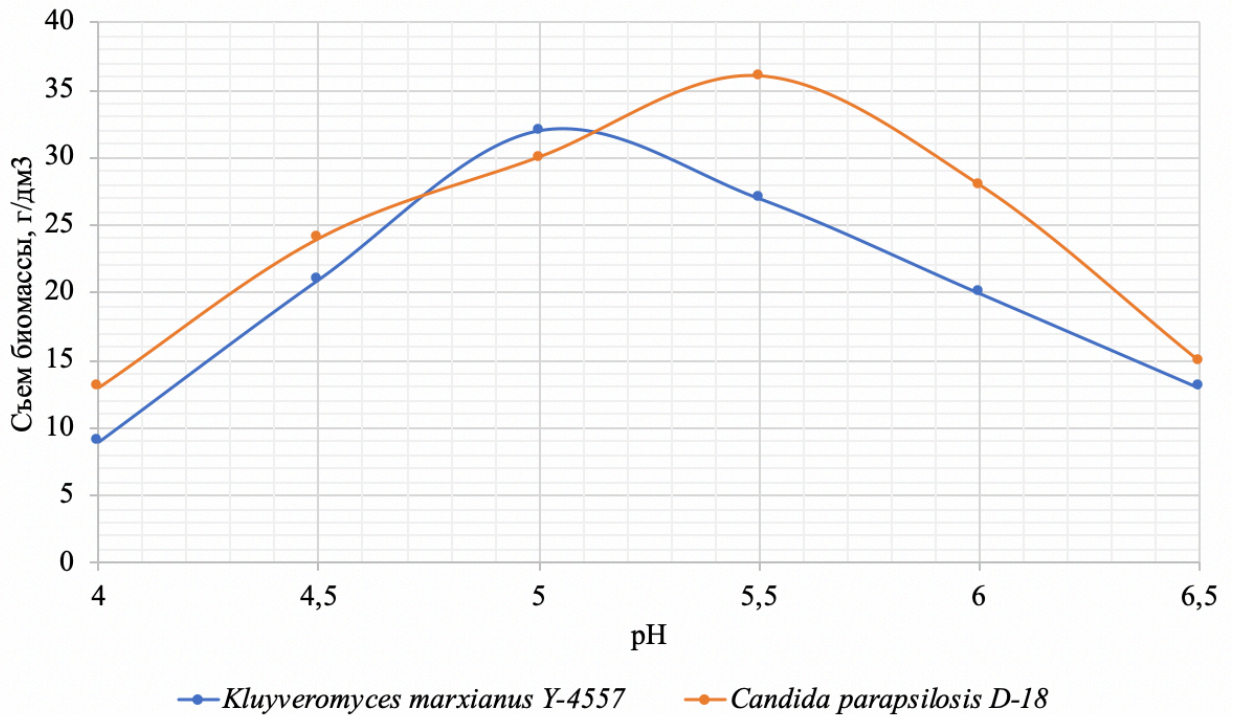


Рисунок 4.3 – Съем сухой биомассы при культивировании дрожжей при различных значениях pH

4.3 Характеристика дрожжевой биомассы

По разработанной технологии было проведено культивирование штаммов *Kluyveromyces marxianus* Y-4557 и *Candida parapsilosis* D-18 на технологической линии ОАО Институт «Прикладной биохимии и машиностроения». Процесс культивирования осуществляли в ферментере объемом 100 дм³ (тип «БИОР-0,1»), аппарат снабжен: трехъярусной мешалкой с магнитным приводом; кольцевым барботером; отражательными перегородками в количестве 4 штук; ротаметром 4,0 м³/ч; электродами pH и pO₂. Культивирование велось в отъемно-доливном (многоциклическом) режиме, общий объем культуральной жидкости – 200 дм³.

Биомассу отделяли сепарированием с промывкой («Westfalia» (Германия), тип SA1-04575), суспензию дрожжей плазмолизировали (в автоклаве ВК-75-01 (Россия)) и высушивали в распылительной сушилке (РС-200 (Россия)). Количество полученной сухой биомассы с учетом потерь на

всех стадиях технологического процесса: *Kluyveromyces marxianus* Y-4557 – 4200 г, *Candida parapsilosis* D-18 – 4520 г.

Основные органолептические и физико-химические показатели полученной биомассы дрожжей и нормативные показатели по ГОСТ 20083-74 Дрожжи кормовые представлены в таблице 4.7.

Таблица 4.7 – Органолептические и физико-химические показатели сухой биомассы *Kluyveromyces marxianus* Y-4557 и *Candida parapsilosis* D-18

Наименование показателей	Норма по ГОСТ 20083-74 для высшей группы	Сухая биомасса <i>Kluyveromyces marxianus</i> Y-4557	Сухая биомасса <i>Candida parapsilosis</i> D-18
Внешний вид	Порошок, чешуйки или гранулы	Порошок	Порошок
Цвет	От светло-желтого до коричневого	Светло-коричневый	Светло-коричневый
Запах	Свойственный дрожжам, без постороннего	Дрожжевой	Дрожжевой
Массовая доля влаги	Не более 10 %	4,4 %	4,1 %
Массовая доля сырого протеина (на АСВ)	Не менее 54 %	61,4 %	62,3 %
Массовая доля белка по Барнштейну (на АСВ)	Не менее 44 %	55,2 %	54,8 %
Массовая доля золы (на АСВ)	Не более 10 %	3,5 %	4,0 %
Живые клетки продуцента	Не допускаются в 1 г	В 1 г не обнаружены	В 1 г не обнаружены
Общая бактериальная обсемененность	Не более $1,5 \cdot 10^5$ КОЕ/г	$1 \cdot 10^2$ КОЕ/г	$2,5 \cdot 10^2$ КОЕ/г

По данным таблицы видно, что полученная биомасса соответствует требованиям ГОСТ 20083-74, по органолептическим и физико-химическим показателям дрожжи относятся к высшей группе. Стоит отметить низкое

содержание золы в полученной биомассе, что говорит о будущей хорошей перевариваемости дрожжей сельскохозяйственными животными.

Полученные образцы биомассы были проверены в ИЛ Провилаб ООО «Провими» на перевариваемость, полученные данные представлены в таблице 4.8.

Таблица 4.8 – Перевариваемость образцов дрожжевой биомассы

Образец	Перевариваемость протеина с пепсином и панкреатином, % (Method PROVIMI R&I Unit, Institut Meurice)	
	3 ч	24 ч
Сухая биомасса <i>Kluyveromyces marxianus</i> Y-4557	Более 95,0 %	Более 95,0 %
Сухая биомасса <i>Candida parapsilosis</i> D-18	Более 95,0 %	Более 95,0 %
Кормовая мука из птицы National Grain & Feed Association	80,5 %	91,0 %
Концентрат соевый белковый кормовой торговой марки «Балтсоя» ЗАО «Агропродукт» ГК "Содружество" ТУ-9146-008-15323453-2013, Марка 70-К	83,0 %	90,5 %
Рыбная мука по ГОСТ 2116-2000	86,0 %	93,0 %

По данным таблицы можно судить о высокой и быстрой перевариваемости белка дрожжевой биомассы в сравнении с другими высокобелковыми кормовыми продуктами: наблюдается переваривание более 95 % в первые 3 ч гидролиза, за это же время кормовая мука из птицы National Grain & Feed Association переваривается на 80,5 %, концентрат соевый белковый кормовой торговой марки «Балтсоя» ЗАО «Агропродукт» – на 83 %, а рыбная мука, соответствующая требованиям ГОСТ 2116-2000, – на 86 %.

ГЛАВА 5 Получение белковых ингредиентов для пищевой промышленности на основе дрожжевой биомассы

Для получения белковых концентратов, пригодных для пищевой промышленности, можно использовать биомассу дрожжей *Kluyveromyces marxianus* Y-4557, полученную при культивировании на ферментолизате подсолнечной лузги.

Биохимический состав биомассы *Kluyveromyces marxianus* Y-4557 представлен в таблице 5.1.

Таблица 5.1 – Биохимический состав биомассы дрожжей *Kluyveromyces marxianus* Y-4557

Наименование показателя	Значение, % к АСВ
АСВ	19,2±0,96
«Сырой» протеин по Къельдалю	61,4±0,64
Истинный белок по Барнштейну	55,2±0,43
Липиды по Фолчу	11,6±0,22
Нуклеиновые кислоты по Спирину	8,7±0,17

Для получения дрожжевого концентрата необходимо удалить липиды и нуклеиновые кислоты. По рекомендации ФИЦ «Питания и биотехнологии» в дрожжевых концентратах содержание белка должно быть не менее 60 %, липидов не более 2 % и нуклеиновых кислот не более 1 %.

5.1 Обезжиривание дрожжевой биомассы

В дрожжевых концентратах должно быть не более 2 % липидов. Удаление липидов из дрожжевой биомассы позволит продлить срок ее хранения, а также увеличить процентное содержание белка по сухим веществам.

Обезжиривание биомассы можно вести по методу Фолча, при этом биомассу последовательно обрабатывают смесью хлороформ-метанол (2:1), однако такой метод не может быть применим при получении концентрата для пищевой промышленности. Необходимо использовать растворители, разрешенные для применения в производстве пищевых ингредиентов, к таким растворителям относится этиловый спирт.

В ходе оптимизации процесса обезжиривания варьировали концентрацию водного раствора этилового спирта (40 %; 60 %; 70 %), температуру процесса экстракции (50° С; 60° С; 70° С) и гидромодуль (1:1,5; 1:2; 1:2,5). После обработки биомассы этиловым спиртом определяли остаточное количество липидов и рассчитывали процентное содержание экстрагированных липидов по отношению к исходному количеству. Полученные данные представлены в таблице 5.2.

Таблица 5.2 – Количество экстрагированных липидов по отношению к общему содержанию липидов в обезжиренной биомассе после обработки этиловым спиртом при различных параметрах

Наименование показателя		Количество экстрагированных липидов по отношению к общему содержанию липидов, %		
		Гидромодуль		
Температура, °С	Концентрация этанола	1:1,5	1:2	1:2,5
50	40	72,41±3,62	74,18±3,70	75,02±3,75
	60	74,24±3,71	75,24±3,76	77,70±3,88
	70	75,12±3,75	76,30±3,81	78,52±3,92
60	40	75,46±3,77	76,74±3,83	82,90±4,14
	60	76,18±3,80	78,10±3,90	85,57±4,27
	70	77,12±3,85	81,32±4,06	86,46±4,32
70	40	78,54±3,92	82,15±4,10	87,17±4,35
	60	79,60±3,90	83,47±4,17	87,89±4,39
	70	81,04±4,05	84,30±4,21	89,55±4,47

По данным таблицы видно, при повышении концентрации этанола пропорционально росло количество экстрагированных липидов. Наилучшая экстракция происходит при использовании 70 %-ного этилового спирта. При такой обработке остаточное количество липидов не превышало 1,5 % к АСВ. Однако использовать спирт с такой концентрацией нецелесообразно. При использовании 60 % этанола количество экстрагированных липидов меньше примерно на 2 %, а остаточное количество не превышает 2 % к АСВ. Использование 40 %-ного спирта имело значительно меньшую эффективность при экстрагировании, остаточное количество липидов варьировалось от 2 до 3 %. Спиртовой раствор с такой концентрацией не позволил получить продукт с желаемыми характеристиками.

Следующим этапом оптимизации процесса обезжиривания дрожжевой биомассы было уточнение рациональной температуры экстракции. Из данных таблицы 5.2 видна линейная зависимость между температурой экстракции и количеством удаленных липидов. Максимальное удаление липидов наблюдается при прогревании растворителя до 70° С. При использовании растворителя с температурой 60° С наблюдалось небольшое снижение количества экстрагированных липидов, при этом остаточное количество менее 2 % к АСВ, что свидетельствует о соблюдении требований, предъявляемых к белковым концентратам. С экономической точки зрения данный температурный режим является более выгодным. При нагревании растворителя до температуры 50° С количество экстрагированных липидов падало, а количество остаточных превышало 2 % к АСВ, поэтому данный температурный режим не подходит для разрабатываемой технологии.

После подбора концентрации этилового спирта и температурного режима процесса экстракции необходимо было определить оптимальное соотношение сырой биомассы дрожжей и этанола (гидромодуль).

При использовании 60 %-ного раствора этилового спирта, нагретого до 60° С наилучшие результаты обеспечило соотношение биомасса : этанол = 1 : 2,5. При других значениях гидромодуля не удалось экстрагировать

достаточное количество липидов из дрожжевой биомассы. В процессе экстракции образовывалось большое количество спиртового раствора биожира, который необходимо отправлять на перегонку и дистилляцию. Биожир направляется на склад, а регенерированный спирт может повторно использоваться для экстракции липидов из биомассы дрожжей.

Учитывая полученные данные, рациональными технологическими параметрами для экстракции липидов из биомассы дрожжей являются: 60 %-ный раствор этилового спирта; температура 60° С; соотношение биомасса (W = 18 – 22 %) : этанол = 1 : 2,5. При таких параметрах остаточное содержание липидов составило 1,9 % к АСВ.

5.2 Денуклеинизация дрожжевой биомассы

Процесс денуклеинизации целесообразно осуществлять за счет активации собственных эндонуклеаз дрожжевых клеток, при этом нужно было определить оптимальное соотношение сырой биомассы и воды (гидромодуль), температуру при которой происходит активация ферментов и длительность выдержки суспензии. Полученные данные представлены в таблице 5.3.

Было определено, что рациональный гидромодуль – 1:7. При таком соотношении удаляется наибольшее количество нуклеиновых кислот (таблица 5.3). В данном случае принят наибольший гидромодуль, т.к. вода имеет низкую стоимость, а количество удаленных нуклеиновых кислот с увеличением гидромодуля возрастает. С гидромодулем 1:7 при различных значениях температуры и длительности денуклеинизации остаточное количество нуклеиновых кислот составляет от 3,57 % до 1,78 %.

После подбора гидромодуля необходимо было установить рациональную температуру и время выдержки суспензии. По данным таблицы 5.3 видно, что в течение 1 ч при 40° С удаляется 64 % нуклеиновых кислот, при 50° С - 77 %, а при 60° С – 69 %. На основе полученных данных

можно сделать вывод, что при увеличении температуры до определенного значения будет увеличиваться активность собственных ферментов. При 50° С ферменты имеют самую высокую активность, то есть, данная температура является оптимальной для действия эндонуклеаз. При 40° С удаляется меньшее количество нуклеиновых кислот, чем при 50° С, а при 60° С активность ферментов подавляется из-за высокой температуры.

Таблица 5.3 – Количество удаленных нуклеиновых кислот по отношению к исходному содержанию в биомассе при изменении технологических параметров

Наименование показателя		Количество удаленных нуклеиновых кислот по отношению к общему содержанию НК, %		
		Гидро модуль		
Температура, °С	Длительность экстракции, ч	1:3	1:5	1:7
40	0,5	56,32±2,81	58,75±2,93	59,60±2,98
	1,0	58,60±2,93	60,12±3,00	64,02±3,20
	1,5	62,75±3,13	65,43±3,27	66,05±3,30
50	0,5	67,89±3,39	68,98±3,44	70,25±3,51
	1,0	69,34±3,46	71,30±3,56	77,74±3,88
	1,5	70,02±3,50	72,46±3,62	79,88±3,99
60	0,5	66,16±3,30	67,18±3,35	68,07±3,40
	1,0	67,25±3,36	68,93±3,44	69,74±3,48
	1,5	68,73±3,43	69,80±3,49	70,10±3,50

Таким образом, для осуществления денуклеинизации необходимо суспендировать обезжиренную биомассу при гидро модуле 1:7, используя в качестве дисперсной среды воду, нагреть суспензию до температуры 50° С и выдержать при этой температуре в течение 1 ч.

5.3 Технология получения белкового концентрата из биомассы *Kluyveromyces marxianus* Y-4557

Технологическая блок-схема получения белкового концентрата из биомассы *Kluyveromyces marxianus* Y-4557 представлена на рисунке 5.1

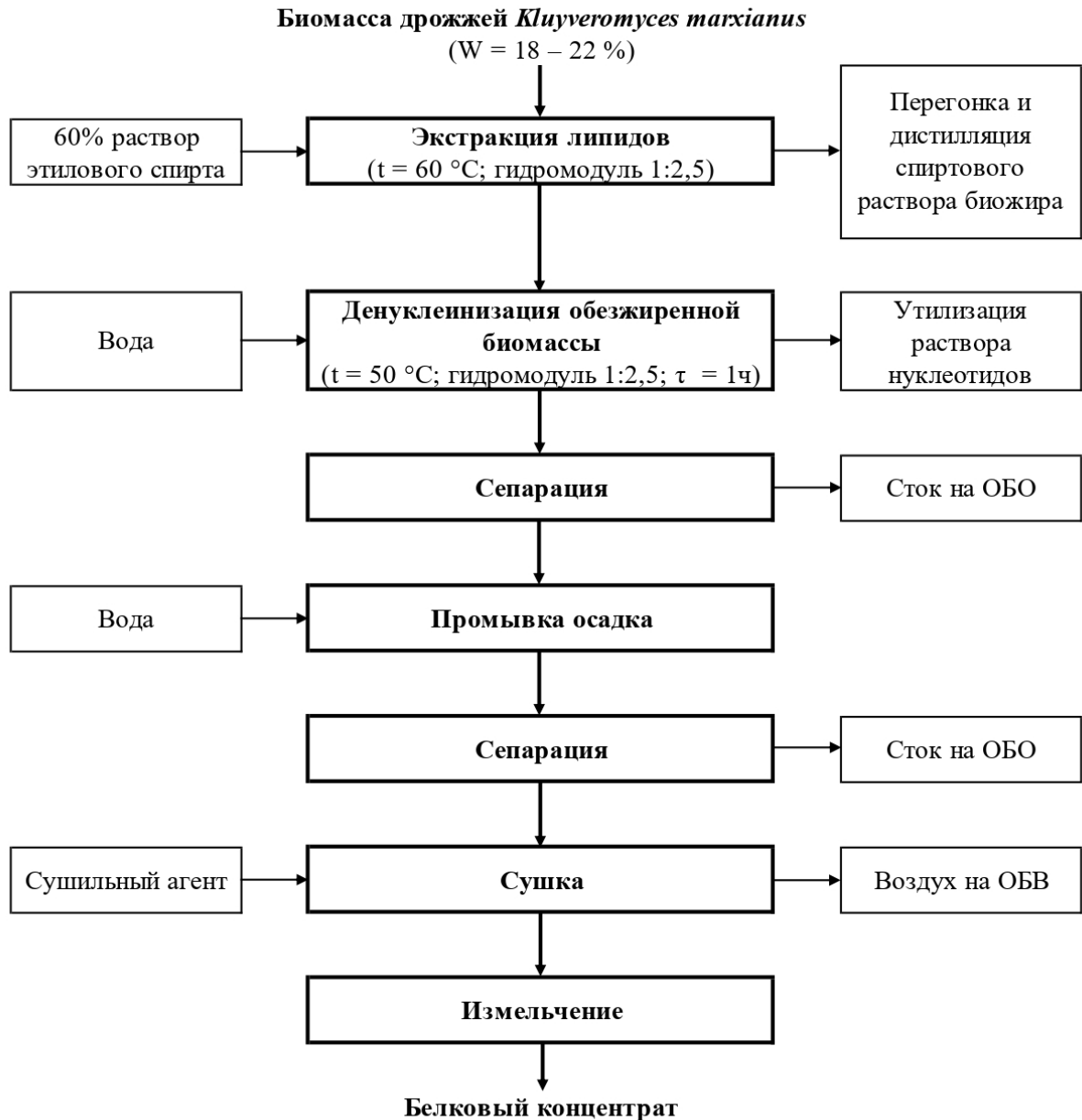


Рисунок 5.1 – Технологическая блок-схема производства белкового концентрата из биомассы *Kluyveromyces marxianus* Y-4557

Технология получения белкового концентрата из биомассы *Kluyveromyces marxianus* Y-4557 состоит из 7 основных стадий. На первой стадии необходимо удалить липиды из дрожжевой биомассы, для этого проводят спиртовую (60 %-ным раствором этанола) экстракцию липидов из биомассы при соотношении биомасса : этанол = 1:2,5, температуре 40° С в течение 1 ч. Вторичным сырьевым ресурсом на этой стадии является спиртовой раствор биожира, который подвергается перегонке и дистилляции, спирт-ректификат возвращается в технологический процесс, биожир отправляется на склад.

Обезжиренную биомассу подвергают денуклеинизации, протекающей за счет активации собственных эндонуклеаз дрожжевой клетки. Биомасса суспендируется при гидромодуле 1:2,5. В качестве дисперсной среды используется вода. Суспензию выдерживают при температуре 50° С в течение 1 ч.

Обезжиренную и денуклеинизированную биомассу сепарируют, промывают водой и сепарируют повторно, далее готовят суспензию, содержащую 15 – 18 % СВ, которую сушат на распылительной сушилке (температура теплоносителя на входе в сушильную камеру – 180 °С, на выходе – 90 °С). Полученный порошок измельчают, просеивают и упаковывают.

5.4 Биохимический состав белкового концентрата

По описанной выше технологии получают белковый концентрат из дрожжевой биомассы *Kluyveromyces marxianus*, содержащий до 65 % истинного белка (таблица 5.4). В сравнении с исходной биомассой его количество увеличилось на 10 %.

Увеличение содержания белка объясняется тем, что в процессе экстракции липидов и нуклеиновых кислот их доля по сухим веществам уменьшается, при этом увеличивается доля белка по отношению к АСВ.

Таблица 5.4 – Сравнение биохимического состава белкового концентрата и дрожжевой биомассы

Наименование показателя	Значение показателя, % к АСВ	
	Биомасса	Белковый концентрат
Сырой протеин по Кьельдалю	59,29±2,96	71,65±3,43
Истинный белок по Барнштейну	54,60±2,73	65,94±3,14
Липиды по Фолчу	13,45±0,67	1,94±0,09
Нуклеиновые кислоты по Спирину	8,85±0,44	1,97±0,10

Сравнение аминокислотного состава дрожжевой биомассы и белкового концентрата с «эталонным» белком (таблица 5.5) позволяет сделать вывод, что содержание аминокислот в обоих образцах практически полностью удовлетворяет требования ФАО/ВОЗ. Аминокислотный состав дрожжевой биомассы и белкового концентрата сопоставим с «идеальным» белком. Определение аминокислот вели согласно ГОСТ 32195-2013 [20].

Белок дрожжевой биомассы *Kluuveromyces marxianus* имеет недостаток по лизину, треонину и серосодержащим аминокислотам (таблица 5.5). Относительное увеличение содержания аминокислот обусловлено уменьшением содержания липидов и нуклеиновых кислот, а также удалением влаги на этапе высушивания. По сравнению с исходной биомассой содержание лизина увеличилось на 1,75 %, треонина на 0,5 %, серина на 0,62 %, аргинина на 1,02 %, пролина на 2,66 %, аспарагиновой кислоты на 1,93 % и глутаминовой кислоты на 1,76 %. Количество глицина уменьшилось на 2,14 %, лейцина на 1,22 % и гистидина на 0,16 %. Это связано с тем, что данные аминокислоты разрушаются при нагревании.

Таблица 5.5 – Сравнение аминокислотного состава белкового концентрата и дрожжевой биомассы с эталоном

Наименование аминокислоты	Дрожжевая биомасса	Белковый концентрат	«Идеальный» белок ФАО/ВОЗ
	Содержание, г в 100 г белка		
Фенилаланин + Тирозин	5,77±0,28	5,20±0,26	6,0
Лейцин	6,70±0,33	5,48±0,27	5,9
Лизин	3,75±0,18	5,50±0,27	5,5
Валин	4,36±0,21	4,86±0,24	4,9
Изолейцин	4,28±0,22	4,35±0,21	4,0
Треонин	1,87±0,09	2,31±0,11	3,3
Триптофан	1,23±0,06	1,34±0,06	1,0
Глутаминовая кислота	2,55±0,12	4,31±0,21	–
Аргинин	3,46±0,17	4,48±0,22	–
Глицин	4,59±0,23	2,45±0,12	–
Аспарагиновая кислота	3,54±0,17	5,47±0,27	–
Метионин + Цистеин	2,03±0,10	2,20±0,11	3,5
Пролин	2,61±0,13	5,27±0,26	–
Гистидин	1,82±0,09	1,66±0,08	1,5
Аланин	4,32±0,21	5,53±0,27	–
Серин	0,41±0,02	1,03±0,05	–

ГЛАВА 6 Разработка малоотходной технологии

6.1 Разработка технологии получения субстанции фитомеланинов

В процессе щелочной делигнификации измельченной подсолнечной лузги образуется большое количество стока, который необходимо утилизировать. Данный сток содержит в себе растворенный лигнин и фитомеланины.

В щелочной среде фитомеланины обладают наибольшей растворимостью, то есть с увеличением рН среды увеличивается диссоциация ионогенных групп меланинов. При этом гидрофильные ионогенные группы частиц меланина ориентируются наружу, а гидрофобные участки внутрь частиц. Наличие электрического заряда приводит к значительной гидратации и разобщению частиц меланинов и повышению их растворимости.

В рационе человека фитомеланины встречаются во многих продуктах питания: черный хлеб, какао, черные грибы, гречневая крупа и др., и постоянно поступают в организм в их естественном нерастворимом виде. Для производственного получения фитомеланинов перспективным сырьем являются различные растительные отходы пищевых и кормовых производств.

Известен ряд способов получения меланинов из различного растительного сырья, в том числе из лузги подсолнечника [44, 77, 86, 115, 131, 144]. Во всех представленных способах выделение меланинов из экстрактов основано на их способности выпадать в осадок при низких (1,0 – 2,0) значения рН, в качестве подкислителя используют раствор соляной кислоты. Подобная обработка позволяет отделить фитомеланины от низкомолекулярных и растворимых в кислоте высокомолекулярных соединений. В результате подобной обработки получается продукт с

пониженным содержанием балластных веществ, что безусловно сказывается на улучшении качества получаемых фитомеланинов.

Нативную лузгу подсолнечника измельчали на роторной ударной мельнице Retsch SR 200 до размера частиц 20 – 100 мкм. Измельченную лузгу суспендировали при гидромодуле 1:8,5 в качестве дисперсной среды использовали раствор едкого натра с концентрацией основного вещества от 0,5 до 10 %. Экстракцию проводили дважды, после чего объединенные экстракты подкисляли соляной и ортофосфорной кислотами до рН (1,0±0,1). Полученный осадок высушивали и определяли его выход относительно массы измельченной лузги, адсорбционную и общую антиоксидантную активность. Полученные данные представлены в таблице 6.1.

Таблица 6.1 – Сравнение выхода фитомеланинов при использовании соляной и ортофосфорной кислот в качестве осадителя

Концентрация NaOH, %	Выход осадка по отношению к массе лузги при осаждении соляной кислотой, %	Выход осадка по отношению к массе лузги при осаждении ортофосфорной кислотой, %
0,5	0,44	0,66
1,0	2,12	3,19
2,0	9,02	13,22
4,0	28,51	39,71
6,0	32,81	41,16
8,0	36,17	42,11
10,0	42,88	45,94

По данным таблицы видно, что при использовании ортофосфорной кислоты в качестве подкислителя, увеличивается выход осадка, содержащего фитомеланины. Наибольшая разница наблюдается при использовании 4 и 6 %-ного растворов едкого натра. Для всех полученных образцов был подтвержден меланоидный характер с помощью качественных реакций, а также определена адсорбционная способность и общая антиоксидантная активность (таблица 6.2).

Таблица 6.2 – Адсорбционная способность и общая антиоксидантная активность полученных образцов фитомеланинов

Концентрация NaOH, %	Адсорбционная способность, мг метиленовой сини/г субстанции		Общая антиоксидантная активность, %	
	Осадитель соляная кислота	Осадитель ортофосфорная кислота	Осадитель соляная кислота	Осадитель ортофосфорная кислота
0,5	71,35	78,92	–	–
1,0	75,61	84,18	–	–
2,0	77,25	88,17	29,1	32,5
4,0	82,71	91,63	28,2	31,6
6,0	75,65	80,81	26,4	30,1
8,0	53,23	58,77	18,5	20,8
10,0	48,38	52,17	10,9	13,7

При использовании в качестве осадителя ортофосфорной кислоты наблюдается повышение адсорбционной способности и общей антиоксидантной активности в получаемой субстанции. Данное повышение заметно при сравнении с аналогичными работами [44, 86].

Наибольшая активность меланинов наблюдается при использовании в качестве экстрагента раствора едкого натра с концентрацией основного вещества 1, 2 или 4 %, использование более концентрированных растворов экстрагента способствует экстракции большего количества балластных веществ, отличных по своей природе от фитомеланинов, в связи с этим наблюдается понижение адсорбционной способности и общей антиоксидантной активности в получаемой субстанции.

Таким образом, по предложенной технологии можно получить субстанцию с высоким содержанием фитомеланинов, обладающую высокой сорбционной антиоксидантной активностью.

6.2 Разработка технологии получения кормового ферментного препарата

После проведения ферментативного гидролиза измельченной подсолнечной лузги суспензию подвергают разделению методом

центрифугирования, фугат, содержащий растворенные редуцирующие вещества направляется на получения дрожжевой биомассы, а нерастворимый осадок лузги является отходом данной стадии производства.

Непрогидролизированный осадок лузги может быть использован в качестве субстрата при получении кормового ферментного препарата целлюлолитического действия поверхностным способом. Для оценки возможности использования влажного осадка в технологии получения кормовой целлюлазы был проведен скрининг мицелиальных грибов с целью отбора потенциального продуцента.

В качестве потенциальных продуцентов рассматривали 3 штамма рода *Aspergillus*: *A. oryzae* 4802, *A. foetidus* 4803 и *A. awamori* 4804 из коллекции ВНИИПБТ, 1 штамм *Trichoderma viride* 4801 из коллекции культур микроскопических грибов ФГБОУ ВО «МГУПП» и 5 штаммов: *Myceliophthora thermophila* F-244, *Myceliophthora thermophila* F-859, *Chaetomium globosum* F-323, *Trichoderma reesei* F-427 и *Irpex lacteus* F-452 из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов ФГБУ НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИГенетика.

Для проведения скрининга на агаризованных питательных средах использовали 2 контрольные питательные среды (среда Сабуро и среда Чапека с сахарозой), а также 2 опытные питательные среды (среда Чапека с измельченной лузгой и минимальная ПС, состоящая из измельченной лузги и агара). Культивирование проводилось поверхностным способом в чашках Петри, засеянные чашки инкубировали 7 суток в термостате при $30 \pm 1^\circ \text{C}$.

После инкубирования визуально оценивали рост мицелиальных грибов на поверхности агаризованных питательных сред, полученные данные представлены в таблице 6.3.

Обозначение «+++» соответствует обильному росту культуры, «++» – хороший рост, «+» – рост незначительный. Примеры роста показаны на рисунках 6.1 – 6.3.

Таблица 6.3 – Визуальная оценка роста мицелиальных грибов на питательных средах с лузгой подсолнечника

Штаммы мицелиальных грибов	Среда Сабуро	Среда Чапека с сахарозой	Среда Чапека с лузгой	Лузга с агаром
<i>Aspergillus oryzae</i>	+	++	+	+
<i>Aspergillus awamori</i>	++	+	+	+
<i>Aspergillus foetidus</i>	++	++	++	+
<i>Trichoderma viride</i> 4801	++	+	+	+
<i>Myceliophthora thermophila</i> F-244	+++	+++	++	++
<i>Myceliophthora thermophila</i> F-859	++	+	+	+
<i>Chaetomium globosum</i> F-323	++	+	+	+
<i>Trichoderma reesei</i> F-427	+++	+++	++	++
<i>Irpex lacteus</i> F-452	+++	++	++	+

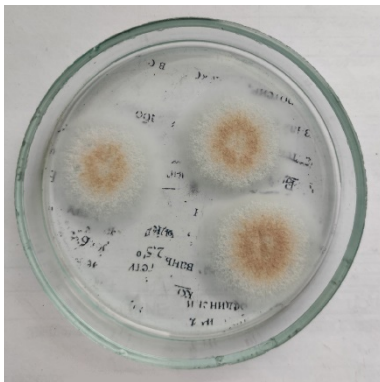


Рисунок 6.1 – Рост незначительный



Рисунок 6.2 – Хороший рост



Рисунок 6.3 – Обильный рост

По данным таблицы видно, что лучший рост на средах, содержащих измельчённую лузгу, показали штаммы: *Myceliophthora thermophila* F-244 и *Trichoderma reesei* F-427. Хороший рост на среде Чапека с добавленной лузгой, помимо тех же культур, показали *Aspergillus foetidus* и *Irpex lacteus* F-452. Таким образом, все 9 штаммов мицелиальных грибов способны синтезировать целлюлолитические ферменты в достаточном количестве,

чтобы эффективно осуществлять биоконверсию негидролизованной подсолнечной лузги.

Отобранные штаммы мицелиальных грибов культивировали поверхностным способом на питательных средах, содержащих в качестве источника углерода 30 % негидролизованной подсолнечной лузги, от 50 до 70 % пшеничных отрубей, в качестве фактора роста – солодовые ростки от 0 до 20 % и соли среды Чапека в качестве источника макро- и микроэлементов.

Культивирование осуществляли в течение 5 – 7 суток при температуре $(30 \pm 1)^\circ \text{C}$. По окончании культивирования в каждом варианте определяли целлюлолитическую активность, полученные данные представлены на рисунке 6.4.

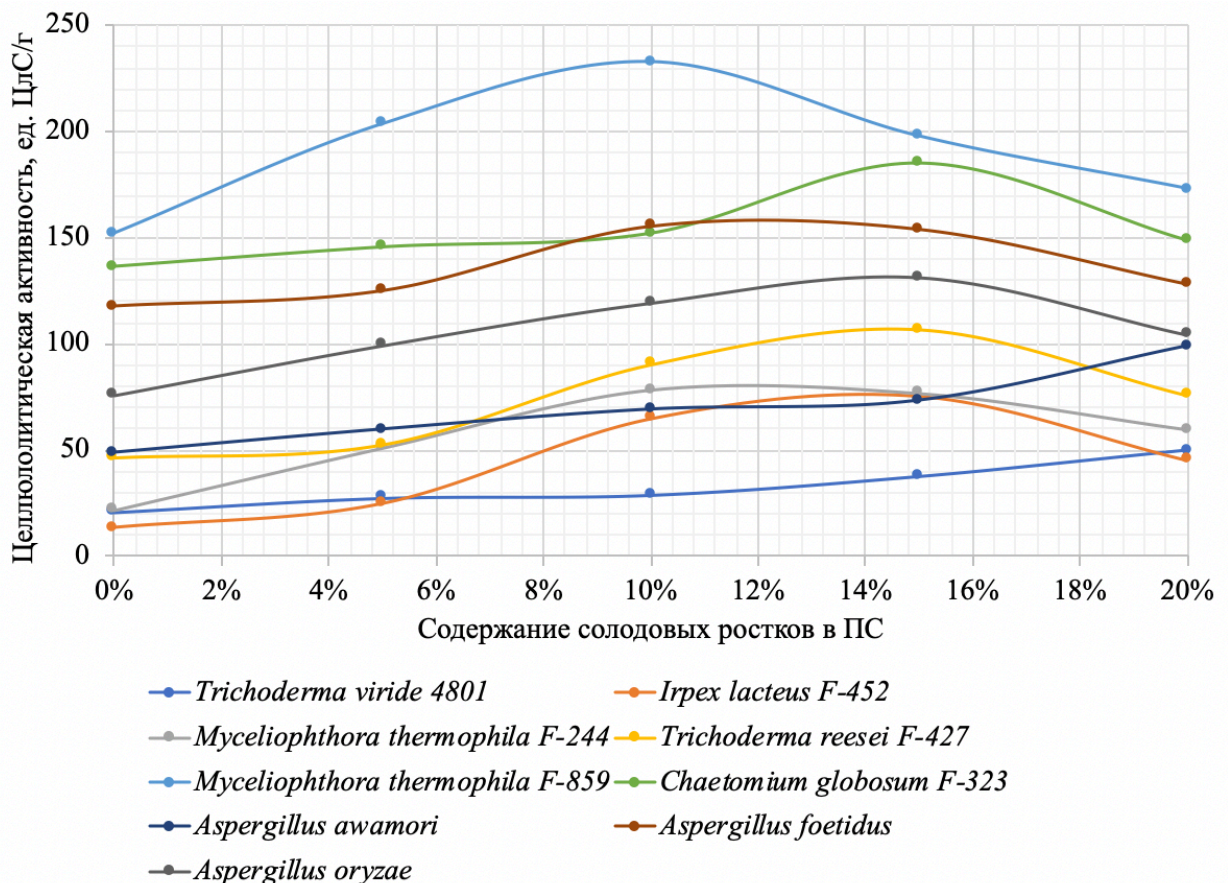


Рисунок 6.4 – Данные о целлюлолитической активности выросших культур

Сравнивая показатели целлюлолитических активностей, полученных на средах с внесением различных концентраций солодовых ростков, с показателями активностей, измеренных на контрольной среде, содержащей

только лузгу и пшеничные отруби, можно отметить повышение активности целлюлолитических ферментов в отношении всех культур при внесении в среду даже малого (5 %) количества ростков. Так, активность *Myceliophthora thermophila* F-859 на среде без солодовых ростков составила 151,92 ед. ЦлС/г АСВ, а при концентрации солодовых ростков 5 % поднялась до 203,59 ед. ЦлС/г АСВ. Причина роста активности может заключаться в химическом составе солодовых ростков. Свободный аминный азот в их составе хорошо усваивается микроорганизмами.

Однако у некоторых штаммов наблюдалось снижение активности при содержании ростков 15–20 %. Это объясняется тем, что при повышении содержания солодовых ростков одновременно снижается и концентрация основного компонента среды, являющегося источником целлюлозы и субстратом-мишенью целлюлолитических ферментов – пшеничных отрубей до 55–60 %.

Классический продуцент целлюлаз вида *Trichoderma viride* показал наименьшие уровни целлюлолитической активности по сравнению с остальными исследуемыми штаммами. Максимальный показатель составил 49,98 ед. ЦлС/г АСВ при 20 % солодовых ростков. Наилучший результат всего эксперимента получен в результате культивирования штамма *Myceliophthora thermophila* F-859 и составил 232,9 ед/г АСВ при содержании солодовых ростков 10 %. Для всех остальных штаммов оптимальными соотношениями компонентов для получения высокой активности ферментов были те, где солодовых ростков было 15 %.

Полученный сухой неочищенный ферментный препарат можно использовать в качестве кормовой добавки для сельскохозяйственных животных.

6.3 Технология биоконверсии подсолнечной лузги

В результате биоконверсии подсолнечной лузги возможно получение четырех различных продуктов: дрожжевой биомассы кормового назначения,

белкового концентрата для пищевой промышленности, водорастворимой субстанции фитомеланинов и кормового целлюлолитического ферментного препарата. Схема комплексной переработки подсолнечной лузги представлена на рисунке 6.5.

Лузга, образующаяся при лущении семян подсолнечника на масличных производствах, просушивается до влажности не более 6 %. Подсушенная лузга измельчается на роторной ударной мельнице Retsch SR 200 до размера частиц не более 100 мкм. В промышленном масштабе могут использоваться планетарные мельницы или коллоидные мельницы.

Измельченная подсолнечная лузга суспендируется при гидромодуле 1:8,5 и подвергается щелочной делигнификации под действием 4 %-ного раствора NaOH и выдерживается при температуре не менее 120° С в течение 1 ч. Суспензию нейтрализуют до pH 7,0 – 8,0 и центрифугируют. Супернатант отделяют от твердого осадка и направляют на получение водорастворимых фитомеланинов. Твердый осадок ресуспендируют в воде объемом, соответствующим отделенному объему супернатанта. В полученной суспензии устанавливают pH 4,8 и добавляют ферментный препарат ЦеллоЛюкс-Ф из расчета 60 ед. ЦлС на 1 г абсолютно сухой лузги. Ферментализацию ведут при постоянном перемешивании и термостатировании при 53° С в течение 20 ч. Полученную суспензию центрифугируют, фугат, содержащий до 3,5 % РВ, направляют на стадию приготовления питательной среды, нерастворимый осадок используют для получения кормового ферментного препарата.

Питательную среду для культивирования дрожжей готовят на основе ферментализата подсолнечной лузги с добавлением питательных солей (сульфат аммония, фосфат аммония, сульфат магния, фосфат калия). Питательную среду стерилизуют при температуре не менее 120° С в течение 1 ч. Культивирование дрожжей осуществляют в многоциклическом режиме с подпиткой субстратом. В качестве титранта используется 25 %-ная аммиачная вода, температура культивирования 40° С

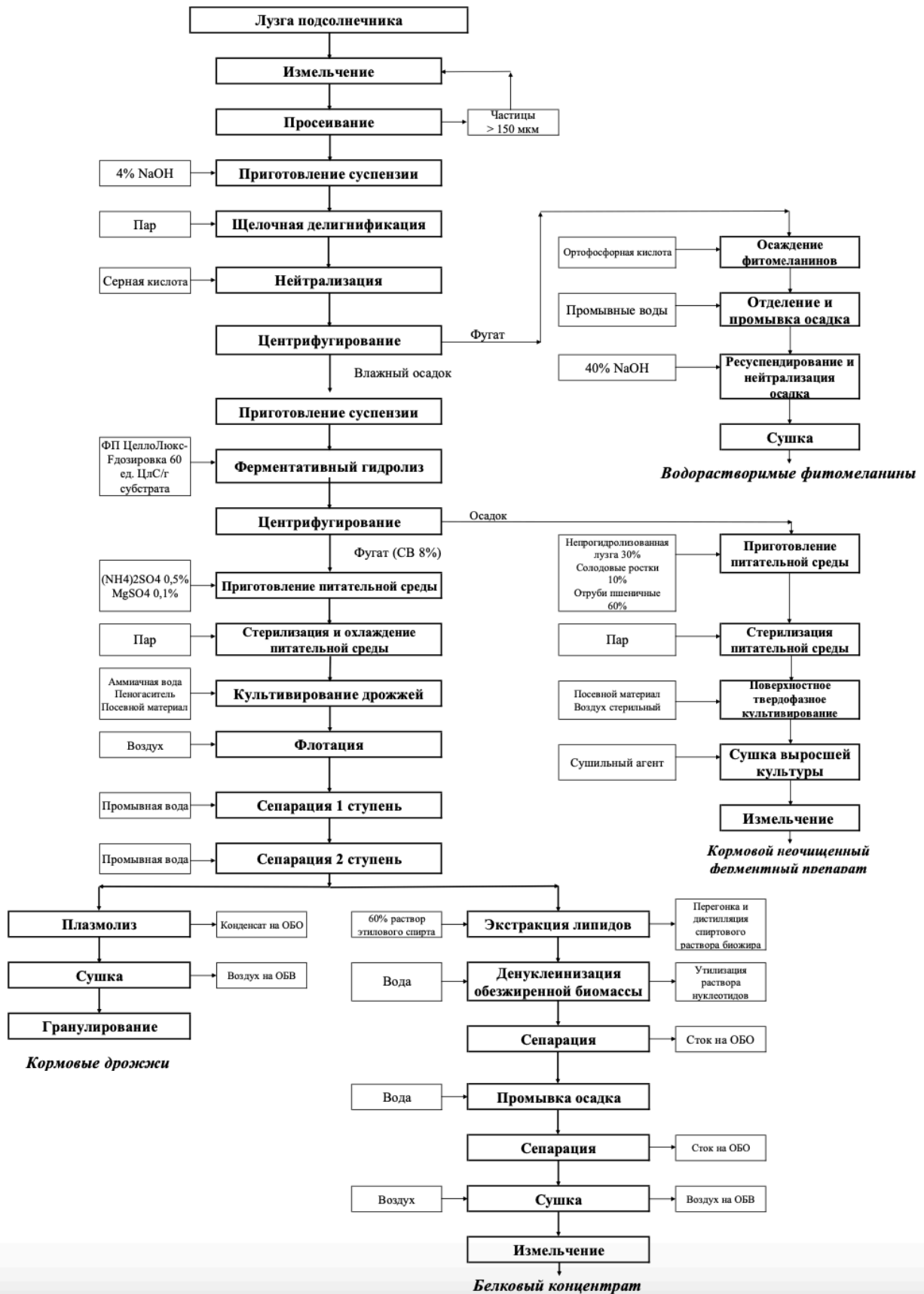


Рисунок 6.5 – Схема комплексной биоконверсии подсолнечной лузги

Культуральную жидкость подвергают флотации и 2-м степеням сепарации. Отделенную биомассу дрожжей *Candida parapsilosis* D-18 плазмолизуют, высушивают на распылительной сушилке, гранулируют и упаковывают. Сырую биомассу *Kluyveromyces marxianus* Y-4557 подвергают обезжириванию с использованием 60 %-ного раствора этанола при гидромодуле 1:2,5, температуре 60° С в течение 1 ч, далее биомассу подвергают денуклеинизации за счет активации собственных эндо нуклеаз клетки. Параметры денуклеинизации: гидромодуль 1:2,5, температура 50° С, длительность 1 ч. Обезжиренную и денуклеинизированную биомассу сепарируют, промывают и сушат, получая таким образом белковый концентрат пищевого назначения.

В качестве побочных продуктов разработанной технологии получают водорастворимую субстанцию фитомеланинов. Для этого образовавшуюся щелочь на стадии делигнификации подкисляют ортофосфорной кислотой до рН 1,0, при этом фитомеланины выпадают в осадок, который отделяют от балластных веществ центрифугированием, влажный осадок ресуспендируют и нейтрализуют при помощи гидроксида натрия. Полученный нейтрализат подвергают распылительной сушке. Вторым побочным продуктом является кормовой ферментный препарат целлюлолитического действия, который получают путем поверхностного культивирования мицелиального гриба *Myceliophthora thermophila* F-859 на негидролизованной осадке подсолнечной лузги, обогащенной макро- и микроэлементами и солодовыми ростками.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Разработан способ подготовки подсолнечной лузги к ферментативному гидролизу, заключающийся в последовательном измельчении подсолнечной лузги до размера частиц менее 150 мкм, проведении щелочной делигнификации (гидромодуль 1:8,5, дисперсная среда – 4 % NaOH, температура 120 °С, длительность обработки – 1 ч) и нейтрализации серной кислотой.

2. С использованием методов математического моделирования подобраны рациональные параметры ферментативного гидролиза подготовленной подсолнечной лузги, позволяющие получить ферментолитат, содержащий более 8 % растворенных сухих веществ, из которых более 40 % – это восстанавливающие сахара, соотношение глюкозы, целлобиозы и олигосахаридов (3 и более глюкозных остатков) сахаров: глюкоза – 73,65 %; целлобиоза – 12,49 %; олигосахариды – 13,86 %. Ферментативный гидролиз целесообразно проводить в суспензии подсолнечной лузги с гидромодулем 1:8,5, в качестве дисперсной среды используется вода. Параметры ферментативного гидролиза: рН 4,8, ФП «ЦеллоЛюкс-Ф» из расчета 60 ед. ЦЛС на 1 г абсолютно сухой лузги, температура 53° С, длительность – 20 ч при постоянном перемешивании 200 мин⁻¹.

3. Разработан способ получения белкового препарата кормового назначения на основе штаммов *Kluyveromyces marxianus* Y-4557 и *Candida parapsilosis* D-18 с содержанием сырого протеина не менее 60 % и перевариваемостью пепсином и панкреатином более 95 % за 3 ч. Культивирование штаммов осуществляется в ферментере в многоциклическом режиме с подпиткой субстратом. Основу питательной среды составляет ферментолитат подсолнечной лузги с содержанием СВ 8,0–8,5 %, дополнительно в среду вносят (NH₄)₂SO₄ – 0,5 % (или NH₄H₂PO₄ – 0,5 %); MgSO₄ – 0,1 %; K₂HPO₄ – 0,065 %. Культуральную среду подвергают флотации и 2-м ступеням сепарирования, полученную биомассу

плазмолизуют, сушат на распылительной сушильной установке и гранулируют.

4. Разработана технология дрожжевого концентрата пищевого назначения на основе штамма *Kluyveromyces marxianus* Y-4557, содержащий более 65 % истинного белка и не более 2 % нуклеиновых кислот и липидов. Способ заключается в последовательном обезжиривании (60 % этанол, гидромодуль 1:2,5, температура 60° С, 1 ч), денуклеинизации (гидромодуль 1:2,5, дисперсная среда – вода, температура 50 °С, 1 ч), сепарации, промывке и сушке биомассы.

5. Разработаны ресурсосберегающие технологии получения двух побочных продуктов – водорастворимой субстанции фитомеланинов и кормового целлюлолитического ферментного препарата. Субстанцию фитомеланинов получают путем осаждения ортофосфорной кислотой из раствора целевых компонентов в гидроксид натрия, образующегося на стадии щелочной делигнификации измельченной подсолнечной лузги. При рН 1,0–1,2 фитомеланины выпадают в осадок, суспензию подвергают центрифугированию с последующей нейтрализацией и сушкой осадка. Полученная субстанция обладает адсорбционной способностью (91,63 мг метиленовой сини/г субстанции) и антиоксидантной активностью (31,6 %). Кормовой целлюлолитический ферментный препарат получают при поверхностном культивировании мицелиального гриба *Myceliophthora thermophila* F-859 на непрогидролизованном осадке подсолнечной лузги, обогащенном макро- и микроэлементами и солодовыми ростками.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АСВ – абсолютно сухой вес

ВАК РФ – Высшая аттестационная комиссия Российской Федерации

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

ГОСТ – межгосударственный стандарт

КЖ – культуральная жидкость

КС – ксиланазная активность

КС – культуральная среда

ОАО – общая антиоксидантная активность

ОП – оптическая плотность

ПС – питательная среда

РВ – редуцирующие (восстанавливающие) вещества

СП – «сырой» протеин

ТИ – технологическая инструкция

ТР ТС – технический регламент таможенного союза

ТУ – технические условия

ФП – ферментный препарат

ЦлС – целлюлолитическая активность

FAO (ФАО) – Food and agriculture organization of the United nations

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Агафонова, С. В. Оценка биологической ценности белков люпина и перспектив его использования в пищевой промышленности / С. В. Агафонова, А. И. Рыков, О. Я. Мезенова // Вестник международной академии холода. – 2019. – № 2. – С. 79-85.
2. Антимонов, С. В. Технология экструдирования гречишной (подсолнечной) лузги в смеси с отрубями / С. В. Антимонов, Р. Ф. Сагитов, С. Ю. Соловых // Известия высших учебных заведений. Пищевая технология. – 2008. – № 3. – С. 61-63.
3. Артемьева, О. А. Возможности использования продуктов вторичной переработки для получения кормового белка / О. А. Артемьева, О. В. Павлюченкова, Е. Н. Котковская [и др.] // Молочное и мясное скотоводство. – 2015. – № 6. – С. 33-35.
4. Бабьева, И. П. Биология дрожжей : учеб. пособие / И. П. Бабьева, И. Ю. Чернов ; Факультет почвоведения Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова. – М. : Товарищество науч. изд. КМК, 2004. – 221 с.
5. Банницына, Т. Е. Дрожжи в современной биотехнологии / Т. Е. Банницына, А. В. Канарский, А. В. Щербаков [и др.] // Вестник Международной академии холода. – 2016. – № 1. – С. 24-29.
6. Бахшалиев, А. Е. Биохимический состав продуктов, полученных путем микробиологической конверсии лигноцеллюлозных субстратов мицелиальными грибами / А. Е. Бахшалиев, В. Г. Мусаева, А. Э. Гусейнова [и др.] // Современная наука: актуальные проблемы теории и практики. Серия: Естественные и технические науки. – 2020. – № 4. – С. 7-11.
7. Бахшалиева, К. Ф. Биоконверсия как эффективный метод для рационального использования растительных отходов аграрного сектора / К. Ф. Бахшалиева, В. Г. Мусаева, А. Э. Бахшалиев [и др.] // Сборник 5 Международной конференции «Наука в эпоху дисбаланса». – Центр научных публикаций «Велес», 2019. – № 11. – С. 13-19.
8. Белова, Е. И. Перспективы вторичных продуктов переработки рапса в разработке комплексных пищевых белково-углеводных обогатителей / Е. И. Белова, И. А. Глотова, С. С. Забурунов // Современные наукоемкие технологии. – 2010. – № 3. – С. 58-59.
9. Беловежец, Л. А. Перспективные способы переработки вторичного лигноцеллюлозного сырья / Л. А. Беловежец, И. В. Волчатова, С. А. Медведева // Химия растительного сырья. – 2010. – № 2. – С. 5 – 16.
10. Богатова, О. В. Современные биотехнологии в сельском хозяйстве : монография. / О. В. Богатова, Г. В. Карпова, М. Б. Ребезов [и др.]. - Оренбург: ОГУ, 2012. – 171 с.

11. Бюллетени о состоянии сельского хозяйства (электронные версии). Росстат. Федеральная служба государственной статистики : Официальный сайт. – 2021. – URL : <https://www.gks.ru/compendium/document/> (Дата обращения 12.06.2021)
12. Валиева, Е. Р. Использование сельскохозяйственных отходов в качестве субстрата для кормовых дрожжей / Е. Р. Валиева, Л. А. Литвина // Проблемы биологии и биотехнологии. – Новосибирск : Издательский центр «Золотой колос», 2017. – С. 134-138.
13. Васильева, С. В. Изменение основных показателей обмена веществ у перепелов под влиянием микронизированных кормовых добавок / С. В. Васильева, В. А. Трушкин, Н. В. Пилаева [и др.] // Иппология и ветеринария. – 2015. – № 3 (17) – С. 35-38.
14. Воскобулова, Н. И. Аминокислотный состав и биологическая ценность белка гороха в зависимости от приёмов возделывания / Н. И. Воскобулова, А. С. Верещагина, Р. Н. Ураскулов, М. Я. Курилкина // Животноводство и кормопроизводство. – 2019. – Т. 102. – № 3. – С. 117-125.
15. Гаврилов, М. Д. Соя – как источник растительного белка / М. Д. Гаврилов // Новая наука. Проблемы и перспективы. - 2016. – № 6-2. – С. 147.
16. Герман, Л. С. Комплексная технология переработки некондиционного зерна как исходная стадия биотехнологических производств : дис. канд. техн. наук : 03.01.06 / Герман Людмила Сергеевна – М., 2012. – 236 с.
17. Гордеева, И. В. Качественная оценка содержания тяжелых металлов в плодовых телах искусственно культивируемых шампиньонов / И. В. Гордеева // Потребительский рынок Евразии : современное состояние, теория и практика в условиях евразийского экономического союза и ВТО. Сборник статей III Международной научно-практической конференции. - Екатеринбург : Уральский государственный экономический университет, 2015. – С. 24-27.
18. ГОСТ 10070-74. Целлюлоза и полуцеллюлоза. Метод определения числа Каппа = Pulp and semi-pulp. Method for determining Kappa number : Межгосударственный стандарт : издание официальное : утвержден и введен в действие Постановлением Государственного комитета стандартов Совета Министров СССР от 09.01.74 : взамен ГОСТ 10070-62 : дата введения 1975-01-01 / Разработан и внесен Министерством целлюлозно-бумажной промышленности. – М. : Государственный комитет СССР по стандартам, 1975. – 16 с.
19. ГОСТ 20083-74. Дрожжи кормовые. Технические условия = Feeding stuff yeast. Specifications : Межгосударственный стандарт : издание официальное : утвержден и введен в действие Постановлением Государственного комитета стандартов Совета Министров СССР от 20.08.74 N 2020 : введен впервые : дата введения 1976-07-01 /

Разработан и внесен Главным управлением микробиологической промышленности при Совете Министров СССР. – М. : Государственный комитет СССР по стандартам, 1976. – 11 с.

20. ГОСТ 32195-2013. Корма, комбикорма. Метод определения содержания аминокислот = Feeds, compound feeds. Method for determination of amino acids : Межгосударственный стандарт : издание официальное : утвержден и введен в действие Федеральным агентством по техническому регулированию и метрологии (ТК 004): введен впервые : дата введения 2015-07-01 / Разработан и внесен Открытым акционерным обществом "Всероссийский научно-исследовательский институт комбикормовой промышленности" (ОАО "ВНИИКП"). – М. : Межгосударственный Совет по стандартизации, метрологии и сертификации, 2013. – 15 с.

21. ГОСТ Р 55293-2012. Ферментные препараты для пищевой промышленности. Метод определения целлюлазной активности : национальный стандарт Российской Федерации : издание официальное : утвержден и введен в действие Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 29 ноября 2012 г. N 1493-ст : введен впервые : дата введения 2014-01-01 / Разработан и внесен Государственным научным учреждением Всероссийским научно-исследовательским институтом пищевой биотехнологии Российской академии сельскохозяйственных наук (ГНУ «ВНИИПБТ» Россельхозакадемии). – М. : Стандартинформ , 2014. – 14 с.

22. ГОСТ Р 55302-2012. Ферментные препараты для пищевой промышленности. Метод определения ксиланазной активности = Enzyme preparations for the food industry. Method for determination of xylanase activity : национальный стандарт Российской Федерации : издание официальное : утвержден и введен в действие приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 29 ноября 2012 г. N 1509-ст : введен впервые : дата введения 2014-01-01/ осударственным научным учреждением "Всероссийский научно-исследовательский институт пищевой биотехнологии" Российской академии сельскохозяйственных наук (ГНУ "ВНИИПБТ" Россельхозакадемии). – М. : Стандартинформ , 2013. – 19 с.

23. Грачева, И. М. Технология белковых препаратов, аминокислот и биоэнергия : учебник для вузов по специальности "Биотехнология" / И. М. Грачева, Л. А. Иванова, В. М. Кантере. – 2-е изд., перераб. и доп. – М. : Колос, 1992. – 382 с. : ил.

24. Губанова, Ю. В. Исследование технологии производства кормовых дрожжей / Ю. В. Губанова, В. П. Попов, Г. Б. Зинюхин // Сборник конференции «Университетский комплекс как региональный центр образования, науки и культуры». Оренбург : ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный университет». – 2018. – С. 1967-1969.

25. Дворянинова, О. П. Разработка высокоценных пищевых продуктов на основе объектов аквакультуры для обеспечения сбалансированного питания населения / О. П. Дворянинова, А. В. Соколов // *Современные проблемы науки и образования*. – 2015. – № 1-1. – С. 254.
26. Дедков, В. Н. Разработка биотехнологии кормового белка из растительного сырья : дис. канд. техн. наук : 03.01.06 / Дедков Виталий Николаевич. – Орел, 2014. – 146 с.
27. Дейнеко, И. П. Утилизация лигнинов: достижения, проблемы и перспективы / И. П. Дейнеко // *Химия растительного сырья*. – 2012. – № 1. – С. 5-20.
28. Дорохов, А. С. Обзор мирового рынка сои / А. С. Дорохов, О. В. Евдокимова, К. К. Большева // *Сборник докладов «Инновации в сельском хозяйстве»*. – М. : Федеральный научный агроинженерный центр ВИМ, 2018. – № 4. – С. 237-246.
29. Евтушенко, С. Л. Влияние качественных показателей сырья и технологического процесса на содержание протеина в семенах подсолнечника и продуктах его переработки / С. Л. Евтушенко // *Вестник национального технического университета «ХПИ»*. Сборник научных трудов. – 2008. – №3. – С. 89-97.
30. Егорова, О. В. Эффективность кормопроизводства как важный фактор развития животноводства / О. В. Егорова // *Сборник докладов Всероссийской научной конференции «Управление регионом: тенденции, закономерности, проблемы»*. – Горно-Алтайск, 2018. – Т. 1 – С. 356-361.
31. Ерашова, Л. Д. Использование нетрадиционных источников белка растительного происхождения / Л. Д. Ерашова, Г. Н. Павлова, Р. С. Ермоленко [и др.] // *Пищевая промышленность*. – 2009. – № 10. – С. 14-15.
32. Ефрюшин, Д. Д. Лигнин: основные свойства и методы утилизации / Д. Д. Ефрюшин, О. В. Жогов // *Стратегии развития современной науки*. – 2020. Т. 4. – С. 101-104.
33. И солнце разливает масло: Обзор российского рынка растительного масла. Исследования компании ID-Marketing. – 2019. – URL: <http://www.foodmarket.spb.ru/search.php?article=1904> (Дата обращения 01.08.2020)
34. Иванкин, А. Н. Потенциальные ресурсы получения пищевого белка / А. Н. Иванкин, А. В. Куликовский, А. С. Князева, А. М. Сорокин // *Современная биотехнология: актуальные вопросы, инновации и достижения. Сборник тезисов Всероссийской онлайн-конференции – Кемерово, 2020*. – С. 75-77.
35. Иванова, А. А. Фармакологические свойства фитомеланина / А. А. Иванова, И. Е. Андрианова, В. Н. Мальцев [и др.] // *Медицина экстремальных ситуаций*. – 2014. – № 4 (50). – С. 66-72

36. Иванова, И. С. Разработка технологии биологически активной добавки к пище в виде белково-углеводного концентрата из биомассы хлебопекарных дрожжей : дис. канд. техн. наук : 05.18.10 / Иванова Ирина Сергеевна. – М., 2003. – 248 с.
37. Иванова, Л. А. Биологически активная добавка из биомассы дрожжей / Л. А. Иванова, Л. И. Войно, И. С. Иванова // Современные наукоемкие технологии. – 2004. – № 2. – С. 64-64.
38. Иванова, Л. А. Разработка технологии получения фитомеланинов из отходов масличного производства / Л. А. Иванова, И. А. Фоменко, Д. А. Сергеева [и др.] // Health, Food & Biotechnology. – 2019. - №2. - С. 136-143.
39. Итоги-2020. Масличные. Институт конъюнктуры аграрного рынка (ИКАР). – 2021. – URL: <http://ikar.ru/lenta/720.html> (Дата обращения 16.05.2021)
40. Казимилова, Е. А. Исследование по получению и применению белкового гидролизата из остаточных пивных дрожжей в технологии злаковых батончиков / Е. А. Казимилова, О. Я. Мезенова, В. И. Шендерюк // Известия КГТУ. – 2020. – № 57. – С. 107-117.
41. Каминский, В. Д. Гречневая лузга как кормовая добавка / В. Д. Каминский, А. И. Карунский, М. Б. Бабич // Хранение и переработка зерна. – 2000. – № 5. - С. 44-56
42. Капков, В. И. Исследование устойчивости массовых видов морских водорослей к тяжелым металлам / В. И. Капков, О. А. Беленикина // Вестник Московского университета. Серия 16. Биология. – 2007. – № 1. – С. 35-38.
43. Каримов, О. Х. Развитие химии и технологии биополимера лигнина / О. Х. Каримов, Г. А. Тептерева, И. А. Четвертнева, Э. М. Мовсумзаде // Промышленное производство и использование эластомеров. – 2020. – № 1. – С. 25-39.
44. Картушина, Ю. Н. Получение меланина на основе отходов маслоэкстракционного производства / Ю. Н. Картушина, М. А. Кириченко, Г. А. Севрюкова // Вестник Казанского технологического университета. – 2016. – Т. 19. – № 16. – С. 124-126.
45. Кисаримов, А. А. Применение дрожжей в пищевой промышленности / А. А. Кисаримов. // НИРС-первая ступень в науку. Сборник научных трудов по материалам XL Международной научно-практической конференции. – Ярославль, 2017. – С. 130-133.
46. Клебанов, Г.И. Оценка антиокислительной активности плазмы крови с применением желточных липопротеидов / Г.И. Клебанов и [др.] // Лабораторное дело. – 1988. – № 5. – С. 59-62.
47. Кленова, И. А. Экологические подходы к оценке безвредности нетрадиционных белковых продуктов / И. А. Кленова, Д. А. Рудиков // Заметки ученого. – 2016. – № 7. – С. 132-137.

48. Клещевников, Л. И. Методы получения фурфурола и его применение / Л. И. Клещевников, И. В. Логинова, М. В. Харина, В. М. Емельянов // Вестник технологического университета. – 2015. – Т. 18. – № 19. – С. 95-101.

49. Ключкова, О. С. Растениеводство. Масличные и эфирномасличные культуры : пособие для студентов учреждений высшего образования, обучающихся по специальностям 1-74 02 01 "Агрономия" и 1-74 02 02 "Селекция и семеноводство" / О. С. Ключкова ; Министерство сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь, Главное управление образования, науки и кадров, Учреждение образования "Белорусская государственная сельскохозяйственная академия". - Горки : БГСХА, 2015 - 90 с.

50. Кокиева, Г. Е. Кормовые дрожжи как биологически активная добавка в кормлении сельскохозяйственных животных / Г. Е. Кокиева // Материалы региональной научно – практической конференции «Пищевые технологии, качество и безопасность продуктов». – Иркутск: Изд-во ИТУ, 2006. – С. 44-45.

51. Компанцев, Д. В. Белковые изоляты из растительного сырья: обзор современного состояния и анализ перспектив развития технологии получения белковых изолятов из растительного сырья / Д. В. Компанцев, А. В. Попов, И. М. Привалов, Э. Ф. Степанова // Современные проблемы науки и образования. – 2016. – № 1. – С. 58-68.

52. Конганбаев, Е. К. Биоконверсия целлюлозосодержащего сырья как фактор расширения возможностей кормовой базы животноводства / Е. К. Конганбаев, Ф. Х. Смольникова, Х. М. Нугманова, Г. М. Бисагымова // Сборник научных трудов 4-ой Международной научно-практической конференции «Современные инновации в науке и технике». – Курск, 2014. – Т. 2 – С. 259-262.

53. Кононенко, С. И. Горох и нут разных сортов в кормопроизводстве / С. И. Кононенко, Ю. И. Левахин, А. Г. Мещеряков, А. М. Испанова // Зоотехническая наука Беларуси. – 2015. – Т. 50. – № 2. – С. 3-11.

54. Коротков, В. Г. Получение кормовых экструдатов на основе подсолнечной лузги / В. Г. Коротков, С. Ю. Соловых, С. В. Кишкилев, С. В. Антимонов // Технические науки - от теории к практике. – 2013. – №18. – С. 124-131.

55. Косолапов, В. М. Кормопроизводство – определяющий фактор сельского хозяйства России / В. М. Косолапов, И. А. Трофимов, Л. С. Трофимова, Е. П. Яковлева // Вестник аграрной науки. – 2012. – № 1 (12). – С. 29-32.

56. Крючков, М. М. Горчица белая и рапс, как важные элементы в биологизации земледелия / М. М. Крючков, И. В. Смертенков // Здоровая окружающая среда – основа безопасности регионов: сборник трудов первого международного экологического форума

в Рязани: посвящается году экологии в Российской Федерации. – Рязань, 2017. – С. 228–231.

57. Кудряшева, А. А. Особенности биосинтеза белка одноклеточными организмами и способы его регуляции / А. А. Кудряшева, А. А. Тихомиров // Пищевая промышленность. – 2016. – № 7 – С. 40-43.

58. Кузнецова, О. Ю. Разработка кондитерских мармеладных изделий функционального назначения / О. Ю. Кузнецова // Вестник Казанского технологического университета. – 2013. – Т. 16. – № 20. – С. 206-210.

59. Кулабухова, Д. Ю. Продовольственная безопасность: проблема обеспечения человечества белком / Д. Ю. Кулабухова // Аллея науки. – 2017. – Т. 4. – № 16. – С. 321-324.

60. Кулемин, Л. М. Рекицен - РД (состав, некоторые механизмы действия и клинические аспекты использования) / Л. М. Кулемин, В. Ф. Кузнецов, Т. С. Уланова // материалы III конференции иммунологов Урала (Челябинск, 16-17 октября 2003 г.). – Челябинск, 2003 г. - С. 84- 93.

61. Левчук, А. А. Модификация свойств лигноцеллюлозных отходов растениеводства / А. А. Левчук, И. Д. Рашид // Научные труды Кубанского государственного технологического университета. – 2015. – № 5. – С. 175-198.

62. Литвицкий, П. Ф. Нарушение обмена белков, аминокислот и нуклеиновых кислот / П. Ф. Литвицкий, Л. Д. Мальцева // Вопросы современной педиатрии. – 2015. – Т. 14. – № 1. – С. 95-107

63. Луканин, А. В. Инженерная экология. Защита литосферы от твердых промышленных и бытовых отходов : учебное пособие для студентов высших учебных заведений, обучающихся по направлениям подготовки 20.03.01 "Техносферная безопасность", 05.03.06 "Экология и природопользование" (квалификация (степень) "бакалавр") / А. В. Луканин. - Москва : ИНФРА-М, 2018. - 555 с. : ил., табл.

64. Лукомец, А. В. Место семеноводства масличных культур в системе продовольственного обеспечения России / А. В. Лукомец // Экономика сельского хозяйства России. – 2020. – № 10. – С. 54-61.

65. Матвеева, Н. О. Разработка элементов системы менеджмента безопасности при производстве углеводно-белкового продукта / Н. О. Матвеева, В. Н. Родионов, А. Л. Новокшанова // Молочнохозяйственный вестник. – 2020. – № 2 – С. 191-200.

66. Матеев, Е. З. Тенденции и инновации при производстве и переработке масличных культур / Е. З. Матеев, Н. В. Королькова, В. Е. Константинов и др. // Вестник Воронежского государственного аграрного университета. – 2017. – № 3 (54). – С. 123-131.

67. Меледина, Т. В. Дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*. Морфология, химический состав, метаболизм / Т. В. Меледина, С. Г. Давыденко - СПб.: ИТМО, 2015. - 88 с.
68. Мендельсон, И. Значение соевых белковых продуктов в питании человека / И. Мендельсон // Пищевая промышленность. – 2004. – № 7. – С. 90-91.
69. Методические указания по лабораторному контролю качества продукции общественного питания. Порядок отбора проб и физико-химические методы испытаний. / Комитет РФ по торговле; Всероссийский институт питания. - М., 1991. - С. 86
70. Минаков, И. А. Состояние и эффективность производства масличных культур в России / И. А. Минаков // Наука и Образование. – 2020. – Т. 3. – № 2. – С. 428-428.
71. Мудрецова-Висс, К. А. Основы микробиологии: учебник для студентов высших учебных заведений, обучающихся по специальности "Товароведение и экспертиза товаров" / К. А. Мудрецова-Висс, В. П. Дедюхина, Е. В. Масленникова. - 5-е изд., испр. и доп. – М. : ФОРУМ : ИНФРА-М, 2015. – 383 с. : ил., табл.
72. Некрылов, Н. М. Биомасса остаточных пивных дрожжей как источник пищевых и биологически активных веществ / Н. М. Некрылов, И. А. Глотова, Т. А. Парфенова // Современные наукоемкие технологии. – 2013. – № 8. – С. 319-329.
73. Никифоров-Никишин, Д. Л. Водоросли как экологический и возобновляемый биологический источник питания / Д. Л. Никифоров-Никишин, В. В. Тараканова, Н. А. Головачева // Дельта науки. – 2019. – № 1. – С. 16-18.
74. Ноев, Д. М. Производство дополнительной продукции для животноводства / Д. М. Ноев, Д. А. Соколов // Наука и образование: новое время. – 2019. – № 2. – С. 119-122.
75. Орешкин, М. В. Проблема дефицита белка: подходы к решению / М. В. Орешкин // Вестник Луганского национального университета имени Тараса Шевченко. – 2017. – № 1. – С. 19-22.
76. ОФС.1.2.3.0021.15 Определение адсорбционной активности энтеросорбентов
77. Патент № 2215761, С09В 61/00, 2003. Способ получения пигмента-красителя из растительного сырья. Огарков Б. Н., Самусенок Л. В. Опубликовано 10.11.2003.
78. Патент № 2268613 Российская Федерация, МПК: А23К 1/14. Способ получения белковой добавки из шрота : № 2268613 : опубликовано 27.01.2006 / А. Г. Кощаев, Г. А. Плутахин, А. И. Петенко.
79. Патент № 2340203 Российская Федерация, МПК: А23J 3/14, А23J 1/14. Способ получения пищевого белкового изолята из подсолнечного шрота : № 2340203 : Опубликовано 10.12.2008. / В. Г. Лобанов, П. И. Кудинов, Л. К. Бочкова. Опубликовано 10.12.2008.

80. Патент № 2499417 Российская Федерация, МПК: А23К 10/32, А23К 10/12, А23К 20/18. Способ получения кормового средства из растительного сырья с высоким содержанием одревесневшей клетчатки : № 2017114939 : опубликовано 12.09.2018 / Н. Е. Петухова, Р. В. Петухов, С. А. Кокшаров.

81. Патент № 2518305 Российская Федерация, МПК С12Р 19/00, С12Р 7/10, С12N 9/14, С12N 9/42, С13К 1/02. Способ обработки лигноцеллюлозного материала : № 201010003009 : опубликовано 10.06.2010 / Ю. Ксююфен, Ли Жихон, Ю. Минхуа.

82. Патент № 507632, МПК: С12С 11/08. Способ получения биомассы кормовых дрожжей : № 2009423 : заявл. 28.03.1974 : опубликовано 25.03.1976 / О. С. Решетник, Н. П. Стребков, Д. Г. Победимский.

83. Петенко, А. И. Биотехнология кормов и кормовых добавок / А. И. Петенко, А. Г. Коцаев, И. С. Жолобова, Н. В. Сазонова. - Краснодар: ФГОУ ВПО «Кубанский ГАУ», 2011. - 454 с.

84. Подсолнечник Казахстана. Аналитический обзор ATFBank Research. – 2010. URL : <https://www.atfbank.kz/docs/economics/maslo.pdf>. (дата обращения: 05.09.2021).

85. Попов, В. Г. Новые пути решения продовольственной проблемы на территории Тюменской области / В. Г. Попов, М. В. Николенко, В. В. Тригуб // Ползуновский вестник. – 2019. – № 2. – С. 80-83

86. Прутенская, Е. А. Технологии получения меланинов / Е. А. Прутенская, А. С. Васильев, Е. Ю. Лебедева, А. И. Сидоров // Вестник ТвГТУ. – 2017. – Т. 200. – № 31. – С. 129-133.

87. Ралкова, В. С. Возможность использования изолятов дрожжей, выделенных из биологических объектов, для утилизации углеводов, увеличения биомассы-источника кормового белка / В. С. Ралкова, О. А. Артемьева, Е. Н. Колодина, Д. А. Никанова // Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук. – 2016. – № 11. – С. 66-70.

88. Расулова, В. А. Анализ современного состояния производства сои в России / В. А. Расулова, А. Ф. Мельник // Вестник сельского развития и социальной политики. – 2020. – № 3. – С. 6-8.

89. Римарева, Л. В. Кормовые дрожжи из зерновой барды в рационе птицы / Л. В. Римарева, Т. И. Лозанская, Н. М. Худякова // Птица и птицепродукты. – 2008. – № 6. – С. 33-34.

90. Рыженков, А. В. Химическая технология лигнина и перспективные материалы на его основе / А. В. Рыженков // Вестник евразийской науки. – 2015. – Т. 7. – № 6. – С. 127 - 137.

91. Свищева, М. И. Состояние и прогнозы производства сои в России / М. И. Свищева // Управление рисками в АПК. – 2020. – № 3(37). – С. 70-76.
92. Семёнов, В. В. Питательность и аминокислотный состав сортов зерна сорго, используемых в кормлении животных / В. В. Семёнов, С. И. Кононенко, И. С. Кононенко // Сборник научных трудов Ставропольского научно-исследовательского института животноводства и кормопроизводства. – Ставрополь, 2011. – Т. 1. - № 4-1. – С. 86-88.
93. Серба, Е. М. Перспективные расы хлебопекарных дрожжей для получения пищевых ингредиентов, обогащенных селеном и хромом / Е. М. Серба, Е. Н. Соколова, Л. В. Римарева [и др.] // Вопросы питания. – 2020. – Т. 89. – № 6. - С. 48-58
94. Силаева, Л. П. Пространственная организация производства семян масличных культур / Л. П. Силаева // Зернобобовые и крупяные культуры. – 2021. – № 2 (38). – С. 79-88.
95. Симахина, Г. А. Перспективы использования съедобных грибов в качестве полноценных белков / Г. А. Симахина // Продукты & ингредиенты. – 2008. – № 6. – С. 106-109.
96. Сеницын, А. П. Биоконверсия возобновляемого растительного сырья в полезные продукты - оптимизация состава целлюлазного ферментного комплекса / А. П. Сеницын, И. А. Шашков, А. В. Гусаков, О. А. Сеницына // Актуальные вопросы биологической физики и химии. – 2018. – Т. 3. – № 1. – С. 219-224.
97. Степанова, Н. В. Оценка сырьевого потенциала сои / Н. В. Степанова, Д. П. Чирик. // Вестник Белорусской государственной сельскохозяйственной академии. – 2021. – № 1. – С. 126-129.
98. Султанова, М. Ж. Виды утилизации отходов масличных культур / М. Ж. Султанова, Х. А. Абдрахманов, М. Е. Кизатова, А. Ю. Боровский // Colloquium-journal. –2019. – № 19. – С. 21-23.
99. Сухорукова Е. С. В России начала снижаться цена на подсолнечное масло. РБК. – 2021. – URL: <https://www.rbc.ru/business/12/07/2021/60e84b9c9a7947756ff62c0f> (Дата обращения 11.08.2021)
100. Сушинская, Н.В. Получение и физико-химические свойства меланинов из базидиомицетов // Труды Белорусского государственного технологического университета. Серия IV: Химия и технология органических веществ. - Вып. XII. - Минск, 2004. - С. 193-196.
101. Телишевская, Л. Я. Ферментные препараты в кормопроизводстве / Л. Я. Телишевская, А. А. Комаров, Ю. В. Болденко // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. – 2005. - Т. 1. – № 2. – С. 63-67.

102. Тухина, Н. Ю. Тенденции развития мирового рынка масличных культур в современных экономических условиях / Н. Ю. Тухина // Вестник МГЭИ. - 2019. - № 1. - С. 65-70.

103. Феофилова, Е. П. Лигнин: химическое строение, биодegradация, практическое использование (обзор) / Е. П. Феофилова, И. С. Мысякина // Прикладная биохимия и микробиология. – 2016. – Т. 52. – № 6. – С. 559-569.

104. Ферментный препарат ФидБест W. – Интернет-портал Сиббиофарм (ООО ПО «Сиббиофарм»). – 2016. – URL: <http://www.sibbio.ru/catalog/ptitsevodstvo/fermentnyuy-preparat-fidbest-w/> (Дата обращения 16.11.2019)

105. Ферментный препарат ЦеллоЛюкс-Ф. – Интернет-портал Сиббиофарм (ООО ПО «Сиббиофарм»). – 2016. – URL: <http://www.sibbio.ru/catalog/ptitsevodstvo/tsellolyuksa-f/> (Дата обращения 16.11.2019)

106. Харьков, В. В. Термохимическая переработка лузги подсолнечника / В. В. Харьков, Д. В. Тунцев, М. Г. Кузнецов // Вестник Казанского государственного аграрного университета. – 2018. – Т. 13. – № 4. – С. 130-134.

107. Хрулёв, А. А. Тенденции развития и экономические аспекты производства горохового протеина / А. А. Хрулёв, Н. А. Бесчетникова, И. А. Федотов // Пищевая промышленность. – 2016. – № 4. – С. 24-29.

108. Хусид, С. Б. Подсолнечная лузга как источник получения функциональных кормовых добавок / С. Б. Хусид, А. Н. Гнеуш, Е. Е. Нестеренко. - Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. – 2015. – № 107. – С. 142-155. – URL: <http://ej.kubagro.ru> (Дата обращения 20.03.2021)

109. Цветков, М. В. Лигнин: направления использования и способы утилизации (обзор) / М. В. Цветков, Е. А. Салганский // Журнал прикладной химии. – 2018. – Т. 91. – № 7. – С. 988-997.

110. Шамцян, М. М. Биотехнологическая переработка отходов сельского хозяйства и пищевой промышленности / М. М. Шамцян, Б. А. Колесников, А. А. Клепиков, О. В. Касьян // Российский химический журнал. – 2011. – Т. 55. – № 1. – С. 17-25.

111. Шаяхметова, А. Х. Лузга подсолнечника и отходы деревообработки как альтернативное биотопливо / А. Х. Шаяхметова, А. Л. Тимербаева, А. В. Сафина // Деревообрабатывающая промышленность. – 2015. – № 2. – С. 41-45.

112. Щеколдина, Т. В. Технологии получения белоксодержащего сырья из продуктов переработки семян подсолнечника / Т. В. Щеколдина // Политематический сетевой

электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. – 2015. – № 109. – С. 360-378.

113. Ястребова, А. В. Люпин узколистый в кормопроизводстве / А. В. Ястребова // Аграрное образование и наука - в развитии животноводства. Материалы Международной научно-практической конференции – Ижевск : ФГБОУ ВО Ижевская ГСХА, 2020. – Т. 1. – С. 243-247.

114. Ambrico, M. Photoresponsive Red-Hair-Inspired Polydopamine-Based Copolymer for Hybrid Photocapacitive Sensors / M. Ambrico, N. F. D. Vecchia, P. F. Ambrico, A. Cardone, S. R. Cicco [et al.] // *Advanced Functional Materials*. – 2014. – Vol. 24. – № 45. – P. 7161-7172.

115. Adeleke, B. Oilseed crop sunflower (*Helianthus annuus*) as a source of food: Nutritional and health benefits / B. Adeleke, O. Babalola. // *Food Science & Nutrition*. – 2020. – Vol. 8. – № 9. – P. 4666-4684.

116. Aguilar, B. Characterization of cell wall extracts from *Saccharomyces cerevisiae* with immunological activity / B. Aguilar, J. Solís, J. M. Viveros, Z. López, Z., P. Knauth // *Food Biotechnology*. – 2012. – Vol. 26. – № 4. – P. 326-338.

117. Ali, N. Emerging technologies for the pretreatment of lignocellulosic materials for bio-based products / N. Ali, Q. Zhang, Z. Y. Liu, F. L. Li, M. Lu [et al.] // *Applied microbiology and biotechnology*. – 2020. – Vol. 104. – № 2. – P. 455-473.

118. Antonio, D. A review of biological delignification and detoxification methods for lignocellulosic bioethanol production / D. Antonio, I. David, A. Pablo, T. P. Elia, B. Mercedes [et al.] // *Critical reviews in biotechnology*. – 2015. – Vol. 35. – № 3. – P. 342-354.

119. Antunes, J. Search for killer phenotypes with potential for biological control / J. Antunes, C. Aguiar // *Annals of Microbiology*. – 2012. – Vol. 62. – № 1. – P. 427-433.

120. Ahanasul, K. *Kluyveromyces marxianus*: an emerging yeast cell factory for applications in food and biotechnology / K. Ahanasul, G. Natela // *International Journal of Food Microbiology*. – 2020. – V. 333. – P. 108818

121. Balandaykin, M. E. Review on chaga medicinal mushroom, *Inonotus obliquus* (higher basidiomycetes): Realm of medicinal applications and approaches on estimating its resource potential / M. E. Balandaykin, I. V. Zmitrovich // *International journal of medicinal mushrooms*. – 2015. – Vol. 17. – № 2. – P. 95-104.

122. Binetti, A. Yeasts from autochthonal cheese starters: Technological and functional properties / A. Binetti // *Journal of Applied Microbiology*. – 2013. – Vol. 115. – № 2. – P. 434-444.

123. Carré, P. Rapeseed market, worldwide and in Europe / P. Carré, A. Pouzet // *Ocl*. – 2014. – Vol. 21. – № 1. – D102.

124. Cellulase, liquid – Novozymes.com. – 2020. – URL: https://biosolutions.novozymes.com/en/food/product-finder?search=&field_industry_tid=48&field_categories_tid=&field_sub_categories_tid=&field_is_best=&page=0 (Дата обращения 02.02.2021)
125. Chandel, A. K. Dilute acid hydrolysis of agro-residues for the depolymerization of hemicellulose: state-of-the-art / A. K. Chandel // *D-Xylitol*. – 2012. - № 3 – P. 39-61.
126. Chandraju, S. Estimation of Reducing Sugar by Acid Hydrolysis of Sunflower (*Helianthus annuus*) Husk by Standard Methods / S. Chandraju // *Agricultural Sciences*. – 2016. – Vol. 7. – № 5. – P. 322-325.
127. Chen, S. Biological pretreatment of lignocellulosics: potential, progress and challenges / S. Chen, X. Zhang, D. Singh, H. Yu, X. Yang // *Biofuels*. – 2010. – Vol. 1. – № 1. – P. 177-199.
128. Cho, C. H. The production of D-xylose by enzymatic hydrolysis of agricultural wastes / C. H. Cho, M. Hatsu M, K. Takamizawa // *Water Science and Technology*. – 2002. – Vol. 45. – № 12. – P. 97-102.
129. Coton, E. Yeast ecology in French cider and black olive natural fermentations / E. Coton, M. Coton, D. Levert, S. Casaregola, D. Sohier // *International journal of food microbiology*. – 2006. – Vol. 108. – № 1. – P. 130-135.
130. Eklund, E. Acid hydrolysis of sunflower seed husks for production of single cell protein / E. Eklund, A. Hatakka, A. Mustranta, P. Nybergh // *European journal of applied microbiology and biotechnology*. – 1976. – Vol. 2. – № 3. – P. 143-152.
131. Forgaty, R. V. Fungal melanins and their interactions with metal / R. V. Forgaty, J. M. Tobin // *Enz Microb Technol*. – 1996. – Vol. 19. – P. 311-317.
132. Girio, F. M. Hemicelluloses for fuel ethanol: a review / F. M. Girio, C. Fonseca, F. Carvalheiro, L. C. Duarte, S. Marques [et al.] // *Bioresource technology*. – 2010. – Vol. 101. – № 13. – P. 4775-4800.
133. Glagoleva, A. Y. Melanin pigment in plants: Current knowledge and future perspectives / A. Y. Glagoleva, O. Y. Shoeva, E. K. Khlestkina // *Frontiers in Plant Science*. – 2020. – Vol. 11. – P. 770-776.
134. Grossi, G. F. Effects of melanin on high-and low-linear energy transfer (LET) radiation response of human epithelial cells / G. F. Grossi, M. Durante, G. Gialanella, M. Pugliese, I. Mosse // *Radiation and environmental biophysics*. – 1998. – Vol. 37. – № 1. – P. 63-67.
135. Ha, C. H. Preparation and analysis of yeast cell wall mannoproteins, immune enhancing materials, from cell wall mutant *Saccharomyces cerevisiae* / C. H. Ha, C. W. Yun, H. D. Paik, S. W. Kim, C. W. Kang // *Journal of microbiology and biotechnology*. – 2006. – Vol. 16. – № 2. – P. 247-255.

136. Hartman, G. L. Crops that feed the World 2. Soybean—worldwide production, use, and constraints caused by pathogens and pests / G. L. Hartman, E. D. West, T. K. Herman // Food Security. – 2011. – Vol. 3. – № 1. – P. 5-17.

137. Henchion, M. Future protein supply and demand: strategies and factors influencing a sustainable equilibrium / M. Henchion, M. Hayes, A. M. Mullen, M. Fenelon, B. Tiwari // Foods. – 2017. – Vol. 6. – № 7. – P. 53-60.

138. Hsu, S. A. Yeasts in fermented food and kefir: in vitro characterization of probiotic traits / S. A. Hsu, J. Y. Choy // Journal of animal and plant sciences. – 2021. – Vol. 31. – № 2. – P. 567-582.

139. Hung, Y. C. Antioxidant activity of melanins derived from tea: comparison between different oxidative states / Y. C. Hung, V. M. Sava, S. Y. Mekan, T. H. J. Chen, M. Y. Hong [et al.] // Food Chemistry. – 2002. – Vol. 78. – № 2. – P. 233-240.

140. Hussain, M. Drought stress in sunflower: Physiological effects and its management through breeding and agronomic alternatives / M. Hussain // Agricultural water management. - 2018. – № 201. – P. 152-166.

141. Johansen, P. G. Occurrence and importance of yeasts in indigenous fermented food and beverages produced in Sub-Saharan Africa / P. G. Johansen, J. Owusu-Kwarteng, C. Parkouda, S. W. Padonou, L. Jespersen // Frontiers in microbiology. – 2019. – Vol. 10. – P. 1789.

142. Kamireddy, S. R. Pretreatment and enzymatic hydrolysis of sunflower hulls for fermentable sugar production / S. R. Kamireddy // International Journal of Agricultural and Biological Engineering. – 2012. – Vol. 5. – № 1. – P. 62-70.

143. Kanda, T. Xylanase activity of an endo-cellulase of carboxymethyl-cellulase type from *Irpex lacteus* / T. Kanda, K. Wakabayashi, K. Nisizawa // The Journal of Biochemistry. – 1976. – Vol. 79. – № 5. – P. 989-995.

144. Keles, Y. Extraction, purification, antioxidant properties and stability conditions of phytomelanin pigment on the sunflower seeds / Y. Keles, Ö. Özdemir // International Journal of Secondary Metabolite. – 2018. – Vol. 5. – № 2. – P. 140-148.

145. Khan, A. Health complication caused by protein deficiency / A. Khan, S. Khan // Journal of Food Science and Nutrition. – 2017. – Vol. 1. – P. 645-647.

146. Kikas, T. Basis of energy crop selection for biofuel production: cellulose vs. lignin / T. Kikas, M. Tutt, M. Raud, M. Alaru, R. Lauk [et al.] // International Journal of Green Energy. – 2016. – Vol. 13. – № 1. – P. 49-54.

147. Kogan, G. Role of yeast cell wall polysaccharides in pig nutrition and health protection / G. Kogan, A. Kocher // Livestock Science. – 2007. – Vol. 109. – № 1-3. – P. 161-165.

148. Kumar, R. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives / R. Kumar, S. Singh, O. V. Singh // *Journal of industrial microbiology and biotechnology*. – 2008. – Vol. 35. – № 5. – P. 377-391.
149. Kunwar, A. Melanin a promising radioprotector: mechanisms of actions in a mice model / A. Kunwar, B. Adhikary, S. Jayakumar, A. Barik, S. Chattopadhyay [et al.] // *Toxicology and applied pharmacology*. – 2012. – Vol. 264. – № 2. – P. 202-211.
150. Kurtzman, C. P. *The Yeasts: A Taxonomic Study* / C. P. Kurtzman, J. W. Fell // Fifth Edition. - Elsevier Science. – 2011. – P. 543
151. Lehnhardt, A. Pathogenesis, diagnosis and management of hyperkalemia / A. Lehnhardt, M. J. Kemper // *Pediatric Nephrology*. – 2011. – Vol. 26. – № 3. – P. 377-384.
152. Li, S. Sunflower response to potassium fertilization and nutrient requirement estimation / S. Li, D. U. A. N. Yu, T. W. Guo, P. L. Zhang, H. E. Ping [et al.] // *Journal of integrative agriculture*. – 2018. – T. 17. – № 12. – P. 2802-2812.
153. Liem, D. G. Reducing sodium in foods: the effect on flavor / D. G. Liem, F. Miremedi, R. S. J. Keast // *Nutrients*. – 2011. – Vol. 3. – № 6. – P. 694-711.
154. Liu, Q. *Lignins: Biosynthesis and Biological Functions in Plants* / Q. Liu, L. Luo, L. Zheng // *Int J Mol Sci*. – № 2 (19) – P. 335-351.
155. Liu, X. The impact of renewable energy and agriculture on carbon dioxide emissions: Investigating the environmental Kuznets curve in four selected ASEAN countries / X. Liu, S. Zhang, J. Bae // *Journal of Cleaner Production*. – 2017. – Vol. 164. – P. 1239-1247.
156. Liu, Y. Irradiation pretreatment facilitates the achievement of high total sugars concentration from lignocellulose biomass / Y. Liu, L. Guo, L. Wang, W. Zhan, H. Zhou // *Bioresource technology*. – 2017. – Vol. 232. – P. 270-277.
157. Lobato-Peralta, D. R. A review on trends in lignin extraction and valorization of lignocellulosic biomass for energy applications / D. R. Lobato-Peralta, E. Duque-Brito, H. I. V. Vidales, A. Longoria // *Journal of Cleaner Production*. – 2021. № 1. – P. 126123.
158. Lysenko, Y. TOP 10 Soybean Producing Countries in 2019 / Y. Lysenko. – Текст: электронный // Latifundist.com major agribusiness website. – URL: <https://latifundist.com/en/rating/top-10-proizvoditelej-soi-v-mire-v-2019-godu> (Дата обращения: 20.01.2021)
159. Malaeke, H. Deep eutectic solvent as an efficient molecular liquid for lignin solubilization and wood delignification / H. Malaeke, M. R. Housaindokht, H. Monhemi, M. Izadyar // *Journal of molecular liquids*. – 2018. – Vol. 263. – P. 193-199.

160. Martínez, L. M. Production of melanins with recombinant microorganisms / L. M. Martínez, A. Martínez, G. Gosset // *Frontiers in bioengineering and biotechnology*. – 2019. – Vol. 7. – P. 285.
161. Matassa, S. Microbial protein: future sustainable food supply route with low environmental footprint / S. Matassa, N. Boon, I. Pikaar, W. Verstraete // *Microbial biotechnology*. – 2016. – Vol. 9. – № 5. – P. 568-575.
162. Moreira, N. Volatile compounds contribution of *Hanseniaspora guilliermondii* and *Hanseniaspora uvarum* during red wine vinifications / N. Morena // *Food Control*. – 2011. – Vol. 22. – № 5. – C. 662-667.
163. Nataraj, D. Extraction and Characterization of Proteins from Castor Oil Meal for Medical Applications / D. Nataraj, D.D. Saripalla, A. Kamath, P. Aramwit, N. Reddy // *Polymer Science, Series A*. – 2021. – Vol. 63. – № 4. – P. 400-411.
164. Oliveira, O. C. The role of fibres and the hypodermis in *Compositae* melanin secretion / O. C. Oliveira, J. De-Paula, D. M. T. Marzinek // *Micron*. – 2013. – Vol. 44. – P. 312-316.
165. Pérez, J. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview / J. Pérez, J. Munoz-Dorado, T. D. L. R. De la Rubia, J. Martínez // *International microbiology*. – 2002. – Vol. 5. – № 2. – P. 53-63.
166. Pickardt, C. Pilot plant preparation of light-coloured protein isolates from de-oiled sunflower (*Helianthus annuus* L.) press cake by mild-acidic protein extraction and polyphenol adsorption / C. Pickardt, P. Eisner, D. R. Kammerer, R. Carle // *Food Hydrocolloids*. – 2015. – Vol. 44. – P. 208-219.
167. Pilorgé, E. Sunflower in the global vegetable oil system: situation, specificities and perspectives / E. Pilorgé // *OCL*. – 2020. – Vol. 27. – P. 34-42.
168. Podpora, B. Spent brewer's yeast extracts as a new component of functional food / B. Podpora, F. Świdorski, A. Sadowska, R. Rakowska, G. & Wasiak-Zys // *Czech Journal of Food Sciences*. – 2016. – Vol. 34. – № 6. – P. 554-563.
169. Pugh, N. D. Melanin: dietary mucosal immune modulator from *Echinacea* and other botanical supplements / N. D. Pugh, P. Balachandran, H. Lata, F. E. Dayan, V. Joshi [et al.] // *International immunopharmacology*. – 2005. – Vol. 5. – № 4. – P. 637-647.
170. Ribera, J. Scalable biosynthesis of melanin by the basidiomycete *Armillaria cepistipes* / J. Ribera, G. Panzarasa, A. Stobbe, A. Osypova, P. Rupper [et al.] // *Journal of agricultural and food chemistry*. – 2018. – Vol. 67. – № 1. – P. 132-139.
171. Ritala, A. Single cell protein-state-of-the-art, industrial landscape and patents 2001-2016 / A. Ritala, S. Häkkinen, M. Toivari, M. Wiebe // *Frontiers in Microbiology*. – 2017. – T. 8. – № 8 – P. 22-48

172. Rosgaard, L. Evaluation of minimal *Trichoderma reesei* cellulase mixtures on differently pretreated barley straw substrates / L. Rosgaard, S. Pedersen, J. Langston, D. Akerhielm, J. R. Cherry [et al.] // *Biotechnology progress*. – 2007. – Vol. 23. – № 6. – P. 1270-1276.
173. Rovabio excel, the versatile enzyme – [adisseo.com](https://www.adisseo.com/en/products/rovabio/rovabio-excel-the-versatile-enzyme/). – 2020. – URL: <https://www.adisseo.com/en/products/rovabio/rovabio-excel-the-versatile-enzyme/> (Дата обращения 09.02.2020)
174. Ruiz, E. Evaluation of steam explosion pre-treatment for enzymatic hydrolysis of sunflower stalks / E. Ruiz, C. Cara, P. Manzanares, M. Ballesteros, E. Castro // *Enzyme and microbial technology*. – 2008. – Vol. 42. – № 2. – P. 160-166.
175. Sánchez, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi / C. Sánchez // *Biotechnology advances*. – 2009. – Vol. 27. – № 2. – P. 185-194.
176. Shurson, G. C. Yeast and yeast derivatives in feed additives and ingredients: Sources, characteristics, animal responses, and quantification methods / G. C. Shurson // *Animal feed science and technology*. – 2018. – Vol. 235. – P. 60-76.
177. Sun, S. Production of natural melanin by *Auricularia auricula* and study on its molecular structure / S. Sun, X. Zhang, S. Sun, L. Zhang, S. Shan // *Food Chemistry*. – 2016. – Vol. 190. – P. 801-807.
178. Sun, Y. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review / Y. Sun, J. Cheng // *Bioresource technology*. – 2002. – V. 83. – № 1. – P. 1-11.
179. Sunil, P. Salt substitutes: Are they safe? / P. Sunil, A. Goel, Y. S. Rizvi // *Indian journal of nephrology*. – 2013. – Vol. 23. – № 3. – P. 238
180. Taketani, Y. Yeast thioredoxin-enriched extracts for mitigating the allergenicity of foods / Y. Taketani, K. Kinugasa, S. Furukawa, H. Nakamura, R. Otsuki [et al.] // *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. – 2011. – Vol. 75. – № 10. – P. 1872-1879.
181. Taylor, C. “The safety of sodium reduction in the food supply: A cross-discipline balancing act”-Workshop proceedings / C. Taylor, M. Doyle, D. Webb // *Critical reviews in food science and nutrition*. – 2018. – Vol. 58. – № 10. – P. 1650-1659.
182. Tilman, D. Global diets link environmental sustainability and human health / D. Tilman, M. Clark // *Nature*. – 2014. – Vol. 515. – № 7528. – P. 518-522.
183. Tomé, D. Yeast Extracts: Nutritional and Flavoring Food Ingredients / D. Tomé // *ACS Food Science & Technology*. – 2021. – Vol. 1. – № 4. – P. 487-494.
184. Tran-Ly, A. N. Microbial production of melanin and its various applications / A. N. Tran-Ly, C. Reyes, F. W. Schwarze, J. Ribera // *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. – 2020. – Vol. 36. – № 11. – P. 1-9.

185. Trayer, K.P. Edema: diagnosis and management / K. P. Trayer, J. Studdiford, S. Pickle, A. S. Tully // *American family physician*. – 2013. – Vol. 88. – № 2. – P. 102-110.
186. Upadhyaya, S. Microbial protein: a valuable component for future food security / S. Upadhyaya, S. Tiwari, N. Arora [et al.] // *Microbes and environmental management*. – 2016. – Vol. 8. – P. 259-278.
187. Willer, H. Current status of organic oilseeds worldwide – Statistical update / H. Willer, J. Travnicek, B. Schlatter // *OCL*. – 2020. – Vol. 27. – № 62. – P. 5-6.
188. Zheng, Y. Fractionation and identification of salty peptides from yeast extract / Y. Zheng, L. Tang, M. Yu, T. Li, H. Song [et al.] // *Journal of Food Science and Technology*. – 2021. – Vol. 58. – № 3. – P. 1199-1208.

**ПРИЛОЖЕНИЕ 1 Проект ТУ производства «Сухие кормовые дрожжи
«КД-Км-60» (ТУ 10.91.10-007-02068634-2021)**

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ПИЩЕВЫХ
ПРОИЗВОДСТВ»
(ФГБОУ ВО «МГУПП»)

ОКП 929002

Группа С05

УТВЕРЖДАЮ
Проректор по научной работе
ФГБОУ ВО «МГУПП»


М.П. Щетинин
«30»  2021 г.

**СУХИЕ КОРМОВЫЕ ДРОЖЖИ
«КД-Км-60»**

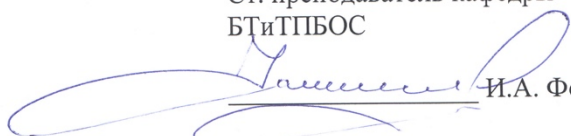
Технические условия

ТУ 10.91.10-007-02068634-2021
(Вводится впервые)

Дата введения в действие 30.09.2021
Без ограничения срока действия

РАЗРАБОТАНО
ФГБОУ ВО «МГУПП»

Ст. преподаватель кафедры
БТиТПБОС


И.А. Фоменко

Профессор кафедры БТиТПБОС


Л.А. Иванова

г. Москва
2021

**ПРИЛОЖЕНИЕ 2 Проект ТИ производства «Сухие кормовые дрожжи
«КД-Км-60» (к ТУ 10.91.10-007-02068634-2021)**

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ПИЩЕВЫХ
ПРОИЗВОДСТВ»
(ФГБОУ ВО «МГУПП»)

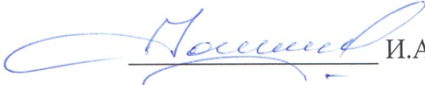
УТВЕРЖДАЮ:
Проректор по научной работе
ФГБОУ ВО «МГУПП»
_____ М.П. Щетинин
«30» _____ 2021 г.

**ТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ ИНСТРУКЦИЯ
по производству**

**СУХИХ КОРМОВЫХ ДРОЖЖЕЙ
«КД-Км-60»**

РАЗРАБОТАНО
ФГБОУ ВО «МГУПП»

Ст. преподаватель кафедры
БТиТПБОС


_____ И.А. Фоменко
Профессор кафедры БТиТПБОС


_____ Л.А. Иванова

г. Москва
2021

**ПРИЛОЖЕНИЕ 3 Акт производственных испытаний технологии на базе
ОАО «Биохиммаш»**

«УТВЕРЖДАЮ»



Генеральный директор ОАО «Биохиммаш»

М.С. Карташов

2021 г.

А К Т

производственных испытаний технологии получения сухих кормовых
дрожжей на основе биоконверсии подсолнечной лузги

Технология разработана на кафедре «Биотехнология и технология продуктов биоорганического синтеза» ФГБОУ ВО «Московский государственный университет пищевых производств».

Испытания проводили в отделе технологий и препаратов на основе бактериальных и грибных культур Института «Прикладной биохимии и машиностроения» (ОАО «Биохиммаш»), г. Москва.

Испытательная комиссия в составе представителей:

От ОАО «Биохиммаш»

Начальник отдела № 2, к.б.н.

Ведущий научный сотрудник, к.т.н.

Т.К. Крашенинникова

Е.В. Синчурина

От ФГБОУ ВО «МГУПП»

Профессор кафедры БТиТПБОС, д.т.н.

Соискатель

Л.А. Иванова

И.А. Фоменко

Настоящий акт составлен о том, что в период с 02.08.2021 по 20.08.2021 г. были проведены испытания технологии получения сухих кормовых дрожжей на основе биоконверсии подсолнечной лузги.

В качестве исходного сырья для биоконверсии использовалась лузга подсолнечника, полученная на маслоэкстракционном заводе ООО «Бунге СНГ» (Воронежская обл.).

Подсолнечную лузгу измельчали до размера частиц 50 – 150 мкм на роторной ударной мельнице Retsch SR 200 (Германия), измельченную лузгу

Приложение 3 Акт производственных испытаний технологии на базе

ОАО «Биохиммаш»

суспендировали при гидромодуле 1:8,5. В качестве дисперсной среды использовали 4 % раствор гидроксида натрия. Суспензию объемом 400 дм³ выдерживали при избыточном давлении 1,1 ати (121 °С) в опытно-промышленном биореакторе БИОР-0,63 (Россия) в течение 60 мин. Суспензию охлаждали и подвергали фильтрации на нутч-филт্রে НФ-100 (Россия). В процессе фильтрации осуществляли промывку осадка холодной водой в соотношении 1:2.

Влажный осадок ресуспендировали в водопроводной воде, полученную суспензию перекачивали в биореактор БИОР-0,63 (Россия), вносили ферментный препарат ЦеллоЛюкс – F (ООО ПО «Сиббиофарм»), дозировка фермента – 80 Ед.ЦлС/г АСВ. Процесс ферментативного гидролиза вели при температуре $+(50 \pm 1)$ °С, рН = $(5,0 \pm 0,1)$ в течение 24 ч при постоянном перемешивании 200 об/мин. Полученный ферментолитат отделяли от непрогидролизованного осадка на нутч-филт্রে НФ-100 (Россия). Фильтрат содержал 8,1 % сухих веществ (СВ) из которых 38 % – редуцирующие вещества (РВ).

В качестве продуцентов белка использовали чистые культуры дрожжей *Candida parapsilopsis* D-18 и *Kluyveromyces marxianus* Y-4557. Культивирование осуществляли в опытно-промышленном биореакторе турбинного типа БИОР-0,1 (Россия), аппарат снабжен:

- трехъярусной мешалкой с магнитным приводом, скорость вращения мешалки до 500 об/мин;
- кольцевым барботером;
- отражательными перегородками в количестве 4 штук;
- ротаметром с максимальным расходом воздуха 4,0 м³/ч (100 % шкалы);
- «рубашкой» для охлаждения/подогревания содержимого аппарата;
- пробоотборником;
- трубой переадавливания;
- двумя врезками для подачи различных жидкостей в аппарат;
- датчиками рН и рО₂.

Состав питательных сред для культивирования и значения технологических параметров процесса культивирования представлены в таблице.

Питательную среду стерилизовали острым и глухим паром в ферментере; подпиточные и доливные среды стерилизовали в автоклаве ВК-75 (Россия) и переадавливали в ферментер с соблюдением правил асептики в соответствии с технологической инструкцией.

Приложение 3 Акт производственных испытаний технологии на базе

ОАО «Биохиммаш»

Таблица – Состав питательной среды и технологические параметры культивирования дрожжей

Условия культивирования	Культура <i>Candida parapsilopsis</i> D-18	Культура <i>Kluyveromyces marxianus</i> Y-4557
Состав питательной среды	NH ₄ H ₂ PO ₄ – 0,5 % MgSO ₄ – 0,1 % K ₂ HPO ₄ – 0,065 % Ферментолитат ПЛ до 100 %	(NH ₄) ₂ SO ₄ – 0,5 % MgSO ₄ – 0,1 % K ₂ HPO ₄ – 0,065 % Ферментолитат ПЛ до 100 %
Тип культивирования	Многоциклический с подпиткой ферментолитатом	Многоциклический с подпиткой ферментолитатом
pH-стабилизация	5,5 ± 0,1 Титрант 25 % раствор аммиака	5,0 ± 0,1 Титрант 25 % раствор аммиака
Термостатирование	40 ± 0,5 °C	40 ± 0,5 °C
Количество растворенного кислорода	Не менее 15 %	Не менее 15 %
Обороты мешалки	200 – 600 об/мин (по показаниям dO ₂)	200 – 600 об/мин (по показаниям dO ₂)
Количество РВ	Не менее 0,2 %	Не менее 0,2 %
Расход аэрирующего воздуха	1 об/об в мин	1 об/об в мин

В качестве посевного материала использовали чистую культуру, выращенную в колбах объемом 750 см³ на среде Сабуро (глюкоза - 4 %; пептон - 1 %; дрожжевой экстракт – 0,5 %; pH=5,6±0,2). Посевной материал выращивали на качалке при 390 об/мин и температуре +(40 ± 0,5)⁰C в течение 24 ч. Посевной материал считается кондиционным, если при микроскопировании в поле зрения фиксируется не менее 50 % почкующихся клеток, а оптическая плотность культуральной жидкости (КЖ) не ниже $D_{540}^1 = 12,5$ о.е.

Начальный объем среды в ферментере составил 40 дм³ в качестве подпитки использовали стерильный раствор ферментолитата подсолнечной лузги, по достижении в аппарате 70 дм³ осуществляли слив 50 дм³ КЖ (с оптической плотностью не менее $D_{540}^1 = 35,0$ о.е. для *Kluyveromyces marxianus* Y-4557 и $D_{540}^1 = 40,0$ о.е. для *Candida parapsilopsis* D-18) и долив 20 дм³

Приложение 3 Акт производственных испытаний технологии на базе

ОАО «Биохиммаш»

полной ПС. Количество РВ в КЖ определяли методом Бертрана-Шоорля, каждые 4 ч. Подачу подпитки осуществляли при достижении в ферментере рН превышающего заданное значение на 0,2.

Процесс вели отъемно-доливным способом, для культуры *Candida parapsilopsis* D-18 провели 5 циклов, а для культуры *Kluyveromyces marxianus* Y-4557 – 3 цикла; время культивирования для культур составило соответственно 72 и 60 часов.

Культуральную жидкость разделяли на сепараторе фирмы «Westfalia» (Германия), тип SA1-04575. Скорость вращения ротора сепаратора – 9700 об/мин. Скорость подачи культуральной жидкости в сепаратор 200 – 300 см³/мин. Скорость подачи культуральной жидкости экспериментально подбирали, ориентируясь на прозрачность и обесцвечивание жидкой фазы, сбрасываемой из сепаратора на утилизацию. Оптическая плотность жидкой фазы не должна превышать $D_{540}^l = 0,1$ о.е.

Разгрузку сепаратора проводили с использованием очищенной воды (выгрузка водой), при заполнении ротора сепаратора. При этом типе выгрузки происходит разбавление биомассы стерильной водой.

После сепарации готовили дрожжевую суспензию, содержащую 15–18 % СВ, для инактивации дрожжей. Клетки инактивировали автоклавированием при 0,4 ати в течение 15 мин.

Дрожжевую суспензию высушивали на распылительной сушильной установке при температуре воздуха на входе в камеру – 120⁰ С, на выходе – 75⁰ С.

В ходе отработки технологии было получено 4,4 кг сухой биомассы *Candida parapsilopsis* и 3,9 кг сухой биомассы *Kluyveromyces marxianus*. Остаточная влажность не превышала 3 %. Полученные образцы биомассы проверяли на соответствие с ГОСТ 20083-74 «Дрожжи кормовые. Технические условия».

Заключение

1. Технология получения кормовых дрожжей на основе штаммов *Candida parapsilopsis* D-18 и *Kluyveromyces marxianus* Y-4557 воспроизводима в опытно-промышленных условиях.

2. Апробированная технология получения кормовых дрожжей позволит расширить ассортимент высокобелковых ингредиентов для пищевой промышленности.

3. Полученные в ходе наработки образцы биомассы соответствуют требованиям ГОСТ 20083-74 «Дрожжи кормовые. Технические условия», а полученная биомасса относится к высшей группе.

Приложение 3 Акт производственных испытаний технологии на базе

ОАО «Биохиммаш»

4. Технологию получения кормовых дрожжей на основе штаммов *Candida parapsilopsis* D-18 и *Kluyveromyces marxianus* Y-4557 рационально рекомендовать к внедрению на производстве.



/ Т.К. Крашенинникова



/ Е.В. Синчурина



/ Л.А. Иванова



/ И.А. Фоменко

**ПРИЛОЖЕНИЕ 4 Акт производственных испытаний технологии на базе
ООО «ПромБит»**

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор ООО «ПромБит»

А.С. Хулищников
«03» сентября 2021 г.



А К Т

производственных испытаний технологии получения белкового концентрата
пищевого назначения из дрожжевой биомассы

Технология разработана на кафедре «Биотехнология и технология продуктов биоорганического синтеза» ФГБОУ ВО «Московский государственный университет пищевых производств»

Испытания проводили на опытно-промышленной технологической линии ООО «ПромБит» (Россия, Тульская обл. г. Ефремов)

Испытательная комиссия в составе представителей:

От ООО «ПромБит»

Руководитель научной группы, к.т.н.
Ведущий инженер-микробиолог, к.т.н.

А.В. Сергеева
Е.М. Мордвинова

От ФГБОУ ВО «МГУПП»

Профессор кафедры БТиТПБОС, д.т.н.
Соискатель

Л.А. Иванова
И.А. Фоменко

Настоящий акт составлен о том, что в период с 23.08.2021 по 03.09.2021 г. были проведены испытания технологии получения белкового концентрата пищевого назначения из дрожжевой биомассы.

Исходным сырьем в предложенной технологии является дрожжевая биомасса *Kluyveromyces marxianus*, полученная на ферментализате лузги подсолнечника. Биохимический состав биомассы (% к АСВ): АСВ – 19,2%; «сырой» протеин по Кьельдалю – 61,4%; Истинный белок по Барнштейну – 55,2%; Липиды по Фолчу – 11,6%; Нуклеиновые кислоты по Спирину – 8,7%.

ФГБУН ФИЦ «Питания и Биотехнологии» предъявляет требования к содержанию липидов и нуклеиновых кислот в концентратах, их количество не должно превышать 2%.

Приложение 4 Акт производственных испытаний технологии на базе
ООО «ПромБит»

Липиды относят к нежелательным компонентам в белковых концентратах, так как они вступают в биохимические реакции и, окисляясь, способствуют развитию неприятного вкуса и аромата. Удаление липидов из дрожжевой биомассы позволит продлить срок ее хранения, а также увеличить процентное содержание белка по сухим веществам.

Для обезжиривания биомассы предложены следующие технологические параметры: экстрагент – 60% этанол; гидромодуль 1:2,5; температура 60 °С. длительность обработки – 1 ч.

Остаточное количество липидов при такой обработке составляет 1,9%.

Следующим этапом технологии является денуклеинизация биомассы, так как избыток нуклеиновых кислот поступает в кровь, а затем откладывается в органах в виде уратов, вызывая различные заболевания, в частности мочекаменную болезнь.

Для проведения денуклеинизации рационально активировать собственные эндонуклеазы дрожжей с помощью «теплого» шока. Технологические параметры процесса: гидромодуль 1:2,5; дисперсная среда – вода; температура 50 °С. длительность обработки – 1 ч.

Остаточное количество нуклеиновых кислот при такой обработке составляет 1,8%.

Обезжиренную и денуклеинизированную биомассу промывают водой и сушат на распылительной сушилке. Суспензия, поступающая на сушку – 15% по СВ, температура воздуха на входе в камеру – 120 °С. температура на выходе – 70 °С.

Выводы:

1. Технология получения белкового концентрата из дрожжевой биомассы *Kluyveromyces marxianus*, разработанная в ФГБОУ ВО «МГУПП», воспроизводима в опытно-промышленных условиях.

2. Апробированная технология получения белкового концентрата позволит расширить ассортимент высокобелковых ингредиентов для пищевой промышленности.

3. Технологию получения белкового концентрата на основе дрожжей *Kluyveromyces marxianus* рационально рекомендовать к внедрению на производстве.

3 сентября 2021 г.

 / А.В. Сергеева

 / Л.А. Иванова

 / Е.М. Мордвинова

 / И.А. Фоменко

ПРИЛОЖЕНИЕ 5 Протоколы испытаний промышленных образцов



ОТКРЫТОЕ АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО
ИНСТИТУТ «ПРИКЛАДНОЙ БИОХИМИИ И МАШИНОСТРОЕНИЯ»
(ОАО «БИОХИММАШ»)
г. Москва, ул. Клары Цеткин, д.4 тел. 8(499)159-31-70, e-mail: s@biochimash.ru



«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор
ОАО «Биохиммаш»
Карташов М.С.
«18» сентября 2021 г.

ПРОТОКОЛ ИСПЫТАНИЙ № 35-01

Наименование образцов: сухая биомасса *Candida parapsilosis* (образец № 1); сухая биомасса *Kluyveromyces marxianus* (образец № 2)

Заказчик: Фоменко Иван Андреевич (ФГБОУ ВО «МГУПП»)

Дата поступления образцов: 5 сентября 2021 г.

Результаты испытаний:

Наименование, ед. изм.	НД	Образец № 1	Образец № 2
Массовая доля влаги, %	ГОСТ 31640	3,0	3,5
Массовая доля сырого протеина, %	ГОСТ Р ИСО 16634	61,90 ± 2,05	63,70 ± 2,20
Массовая доля клетчатки, %	ГОСТ 31675	Менее 1,0	Менее 1,0
Массовая доля сырой золы, %	ГОСТ Р 51418	6,1 ± 0,3	5,4 ± 0,25
Массовая доля сырой золы, не растворимой в HCl, %		Менее 0,1	Менее 0,1
Массовая доля аспарагина, %	ГОСТ 32195	6,22 ± 0,62	3,54 ± 0,36
Массовая доля треонина, %		3,37 ± 0,34	1,87 ± 0,19
Массовая доля серина, %		3,20 ± 0,32	0,41 ± 0,05
Массовая доля глутамина, %		8,85 ± 0,89	2,55 ± 0,26
Массовая доля пролина, %		2,24 ± 0,22	2,61 ± 0,26
Массовая доля глицина, %		2,48 ± 0,25	4,59 ± 0,23
Массовая доля аланина, %		4,21 ± 0,42	4,32 ± 0,44
Массовая доля валина, %		2,81 ± 0,28	4,36 ± 0,44
Массовая доля изолейцина, %		2,60 ± 0,26	4,28 ± 0,43
Массовая доля лейцина, %		4,27 ± 0,43	6,70 ± 0,67
Массовая доля тирозина, %		2,02 ± 0,20	2,65 ± 0,27
Массовая доля фенилаланина, %		2,93 ± 0,29	3,11 ± 0,31
Массовая доля гистидина, %		1,29 ± 0,13	1,82 ± 0,18
Массовая доля лизина, %		4,99 ± 0,50	3,75 ± 0,38
Массовая доля аргинина, %		3,06 ± 0,31	3,46 ± 0,35
Массовая доля цистина, %		0,44 ± 0,04	0,82 ± 0,08
Массовая доля метионина, %	0,71 ± 0,07	1,22 ± 0,12	


Протокол касается только образцов, подвергнутых испытаниям.

Протокол не может быть воспроизведен полностью или частично без письменного разрешения ОАО «Биохиммаш»

Заведующий лабораторией, к.б.н.

 Грязнов А.И.

Старший лаборант

 Цымбаленко Л.И.

Приложение 5 Протоколы испытаний промышленных образцов



ОТКРЫТОЕ АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО
ИНСТИТУТ «ПРИКЛАДНОЙ БИОХИМИИ И МАШИНОСТРОЕНИЯ»
(ОАО «БИОХИММАШ»)
г. Москва, ул. Клары Цеткин, д.4 тел. 8(499)159-31-70, e-mail: s@biochimash.ru



«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор
ОАО «Биохиммаш»
Карташов М.С.
«18» сентября 2021 г.

ПРОТОКОЛ ИСПЫТАНИЙ № 35-02

Наименование образцов: сухой белковый концентрат из биомассы дрожжей
Kluyveromyces marxianus (образец № 1)

Заказчик: Фоменко Иван Андреевич (ФГБОУ ВО «МГУПП»)

Дата поступления образцов: 5 сентября 2021 г.

Результаты испытаний:

Наименование, ед. изм.	НД	Образец № 1
Массовая доля влаги, %	ГОСТ 31640	5,5
Массовая доля сырого протеина, %	ГОСТ Р ИСО 16634	71,65 ± 2,75
Массовая доля клетчатки, %	ГОСТ 31675	Менее 1,0
Массовая доля сырой золы, %	ГОСТ Р 51418	6,9 ± 0,3
Массовая доля сырой золы, не растворимой в HCl, %		Менее 0,1
Массовая доля аспарагина, %	ГОСТ 32195	3,54 ± 0,35
Массовая доля треонина, %		2,31 ± 0,23
Массовая доля серина, %		1,03 ± 0,10
Массовая доля глутамина, %		4,31 ± 0,43
Массовая доля пролина, %		5,27 ± 0,53
Массовая доля глицина, %		2,45 ± 0,25
Массовая доля аланина, %		5,53 ± 0,55
Массовая доля валина, %		4,88 ± 0,49
Массовая доля изолейцина, %		4,35 ± 0,44
Массовая доля лейцина, %		5,48 ± 0,55
Массовая доля тирозина, %		2,18 ± 0,22
Массовая доля фенилаланина, %		2,91 ± 0,29
Массовая доля гистидина, %		1,66 ± 0,17
Массовая доля лизина, %		5,50 ± 0,55
Массовая доля аргинина, %		4,48 ± 0,45
Массовая доля цистина, %		1,09 ± 0,11
Массовая доля метионина, %		1,20 ± 0,12

Протокол касается только образцов, подвергнутых испытаниям.

Протокол не может быть воспроизведен полностью или частично без письменного разрешения ОАО «Биохиммаш»

Заведующий лабораторией, к.б.н.

Старший лаборант

 Грязнов А.И.

 Цымбаленко Л.И.

Продолжение приложения 5

Приложение 5 Протоколы испытаний промышленных образцов



ОТКРЫТОЕ АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО
ИНСТИТУТ «ПРИКЛАДНОЙ БИОХИМИИ И МАШИНОСТРОЕНИЯ»
(ОАО «БИОХИММАШ»)
г. Москва, ул. Клары Цеткин, д.4 тел. 8(499)159-31-70, e-mail: s@biochimash.ru



«УТВЕРЖДАЮ»
Генеральный директор
ОАО «Биохиммаш»
Карташов М.С.
«18» сентября 2021 г.

ПРОТОКОЛ ИСПЫТАНИЙ № 35-03

Наименование образцов: сухой белковый концентрат из биомассы дрожжей *Kluyveromyces marxianus* (образец № 1)
Заказчик: Фоменко Иван Андреевич (ФГБОУ ВО «МГУПП»)
Дата поступления образцов: 5 сентября 2021 г.



Результаты испытаний:

Наименование, ед. изм.	НД	Образец № 1
Внешний вид	ГОСТ Р 54731	Однородный сухой мелкодисперсный порошок
Цвет		Светло-бежевый
Запах		Свойственный дрожжам, без постороннего запаха
Вкус		Свойственный дрожжам, без постороннего вкуса
Микробиологические показатели	ТР ТС 021/2011	Соответствует требованиям ТР ТС 021/2011

*Протокол касается только образцов, подвергнутых испытаниям.
Протокол не может быть воспроизведен полностью или частично без письменного разрешения ОАО «Биохиммаш»*

Заведующий лабораторией, к.б.н.

Старший лаборант

 Грязнов А.И.
 Цымбаленко Л.З.