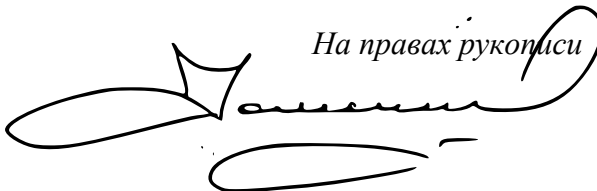


На правах рукописи



ФОМЕНКО ИВАН АНДРЕЕВИЧ

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

Специальность: 05.18.07 – Биотехнология пищевых продуктов и биологически активных веществ

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата технических наук

Москва – 2022

Работа выполнена на кафедре «Биотехнология и технология продуктов биоорганического синтеза» Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет пищевых производств».

Научный руководитель: **Иванова Людмила Афанасьевна**
доктор технических наук, профессор,
проф. кафедры «Биотехнология и технология
продуктов биоорганического синтеза» ФГБОУ ВО
«МГУПП»

Официальные оппоненты: **Шарова Наталья Юрьевна**
доктор технических наук, профессор, заместитель
директора по научной работе Всероссийского
научно-исследовательского института пищевых
добавок – филиала ФГБНУ «ФНЦ пищевых систем
им. В.М. Горбатова» РАН

Канарская Зоя Альбертовна
кандидат технических наук, доцент, доц. кафедры
«Пищевая биотехнология» ФГБОУ ВО «Казанский
национальный исследовательский технологический
университет»

Ведущая организация: **Всероссийский научно-исследовательский
институт пищевой биотехнологии (ВНИИПБТ) –
филиал ФГБУН «ФИЦ питания, биотехнологии и
безопасности пищи»**

Защита диссертации состоится: « ____ » _____ 2022 г. в _____ ч на заседании
Совета по защите диссертаций на соискание степени кандидата наук Д 212.148.11 на базе
ФГБОУ ВО «Московский государственный университет пищевых производств» по адресу:
125080, г. Москва, Волоколамское ш., д. 11, корп. А

Отзывы (в двух экземплярах) на автореферат, заверенные гербовой печатью учреждения,
просим направлять в адрес диссертационного совета.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО «Московский
государственный университет пищевых производств» по адресу: 125080, г. Москва,
Волоколамское ш., д. 11, корп. А. Диссертация размещена в сети интернет на официальном
сайте ФГБОУ ВО «МГУПП» <http://www.mgupp.ru/>

Автореферат размещен на официальных сайтах ВАК Минобрнауки РФ
(<http://vak.ed.gov.ru/>) и ФГБОУ ВО «Московский государственный университет пищевых
производств» (<http://www.mgupp.ru/>).

Автореферат разослан « ____ » _____ 2022 г.

Ученый секретарь диссертационного совета Д 212.148.11,

кандидат технических наук, доцент

Кусова Ирина Урузмаговна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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, лузжистость 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 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 ферментолизат, содержащий 3,4 % РВ, из которых глюкоза – 73,65 %; целлобиоза – 12,49 %; олигосахариды – 13,86 %.

Выявлено, что последовательное обезжиривание и денуклеинизация 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 (ферментолизат) 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 *Muceliophthora 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 (Приложение 6). 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 перекрывания 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 «Продовольственная безопасность: научное, кадровое и информационное обеспечение» (VI Международная научно-практическая конференция, Воронеж, 2019 г.), 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.)

Структура и объем работы диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, шести глав, заключения и списка использованной литературы. Работа изложена на 158 страницах, содержит 32 таблицы и 28 рисунков. Список использованной литературы включает 188 источников (из них 75 – иностранных).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во ВВЕДЕНИИ обоснована актуальность темы, сформулированы цель и задачи исследования, определены основные направления реализации поставленных задач, показана научная новизна, теоретическая и практическая значимость результатов.

ГЛАВА 1 Обзор литературы

Описана роль полноценного белка в питании человека, рассмотрены основные причины дефицита белка. Показаны основные источники восполнения белкового дефицита, обоснована перспективность получения белковых продуктов микробного происхождения для обогащения кормов сельскохозяйственных животных и рациона человека. Показано, что в качестве субстрата для получения микробного белка целесообразно использовать лузгу подсолнечника, являющуюся крупнотоннажным отходом масличного производства.

ГЛАВА 2 Материалы и методы

Представлено описание объектов и методов исследования, схема исследования представлена на рисунке 1.

Объектами исследования стала подсолнечная лузга, полученная в процессе производства растительного масла на предприятии ООО «Бунге СНГ» (г. Воронеж, Россия), в работе исследовалась возможность культивирования различных штаммов дрожжей, полученных из коллекции Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной микробиологии (ФГБНУ ВНИИСХМ), коллекции БРЦ ВКПМ НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика и коллекции 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, *Cutanitrichosporon 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*: *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 БРЦ ВКПМ НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика.

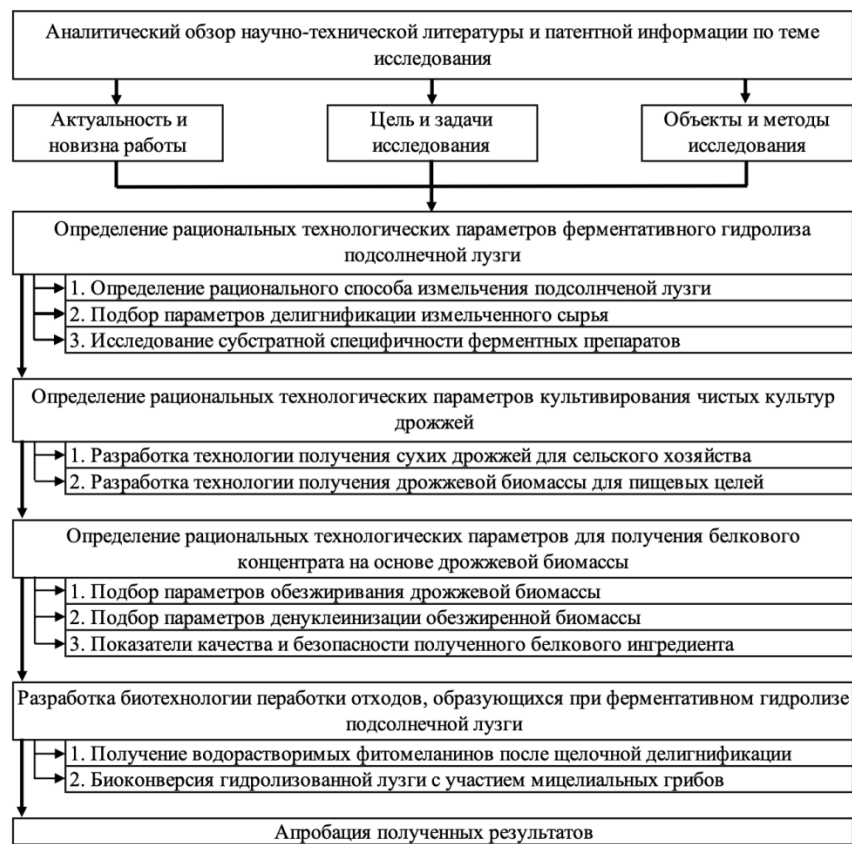


Рисунок 1 – Схема проведения исследования

Для ферментативного гидролиза предобработанной подсолнечной лузги использовались коммерческие ферментные препараты, представленные в таблице 1.

Таблица 1 – Выборка отечественных и зарубежных ферментных препаратов

№	Торговое наименование фермента	Изготовитель	Внешний вид	Субстратная специфичность	Активность по ГОСТ 55293, ГОСТ 55302
1	Celluclast 1,5 L	Novozymes	Жидкость	Целлюлаза	780 ед. ЦлС/г
2	Viscozyme	Novozymes	Жидкость	Ксиланаза	9250 ед. КС/г
3	Shearzyme Plus 2x	Novozymes	Жидкость	Целлюлаза Ксиланаза	670 ед. ЦлС/г 4800 ед. КС/г
4	Viscoferm HT FG	Novozymes	Жидкость	Целлюлаза	800 ед. ЦлС/г
5	Ultraflo XL	Novozymes	Жидкость	Целлюлаза	1200 ед. ЦлС/г
6	Целлюлюкс-Ф	ООО ПО «Сиббиофарм»	Порошок	Целлюлаза Ксиланаза	2200 ед. ЦлС/г 8000 ед. КС/г
7	Фидбест W 2 гр.	ООО ПО «Сиббиофарм»	Порошок	Ксиланаза	17000 ед. КС/г
8	RovabioMax AP	Adisseo France S.A.S.	Порошок	Целлюлаза Ксиланаза	1900 ед. ЦлС/г 23500 ед. КС/г

ГЛАВА 3 Разработка технологии гидролиза подсолнечной лузги

В силу особенностей химического состава подсолнечной лузги необходима ее предварительная обработка механическим, химическим и ферментативным способами.

В лабораторных условиях 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 Figma. Сравнение степени измельчения лузги вели на ситовом анализаторе «Вибротехник А30» (таблица 2).

Таблица 2 – Данные о размере частиц измельченной лузги («Вибротехник А30»)

Размер частиц, мкм	Режущая/ударная мельница Polytron PX-MFC 90 D, %	Роторная ударная мельница Retsch SR 200, %	Планетарная мельница ПМ-22, %	Коллоидная мельница Figma, %
< 30	0	30±3	65±7	50±5
< 50	10±1	50±5	80±8	65±7
< 80	25±3	60±6	95±5	85±9
< 100	40±4	70±7	100±3	97±3
< 150	50±5	80±8	100±3	100±3

По данным ситового анализа видно, что самые маленькие по размеру частицы были получены на планетарной мельнице ПМ-22, больше половины (65±7 %) частиц имели размер менее 30 мкм, все частицы (100 %) имели размер менее 100 мкм. Более крупные частицы были получены на коллоидной мельнице Figma, 50 % частиц имели размер менее 30 мкм, все частицы (100 %) менее 150 мкм. На роторной ударной мельнице Retsch SR 200 были получены достаточно крупные частицы, только 80±8 % частиц имели размер менее 150 мкм, и лишь половина (50±5 %) – менее 50 мкм. Самые крупные частицы были получены на режущей/ударной мельнице Polytron PX-MFC 90 D, половина полученных частиц имела размер менее 150 мкм, частиц менее 30 мкм не было.

Для оценки эффективности размола был проведен пробный ферментативный гидролиз каждого образца. В качестве ФП использовали «Целлюлюкс-Ф» в дозировке 90 ед. ЦлС/г лузги. Ферментативный гидролиз проводили на качалке со скоростью вращения 200 мин⁻¹ при pH 5,0,

температуре 50° С в течение 16 ч (режим ферментализации выбран по рекомендации производителя ФП). Результаты оценивали по накоплению РВ (рисунок 2).

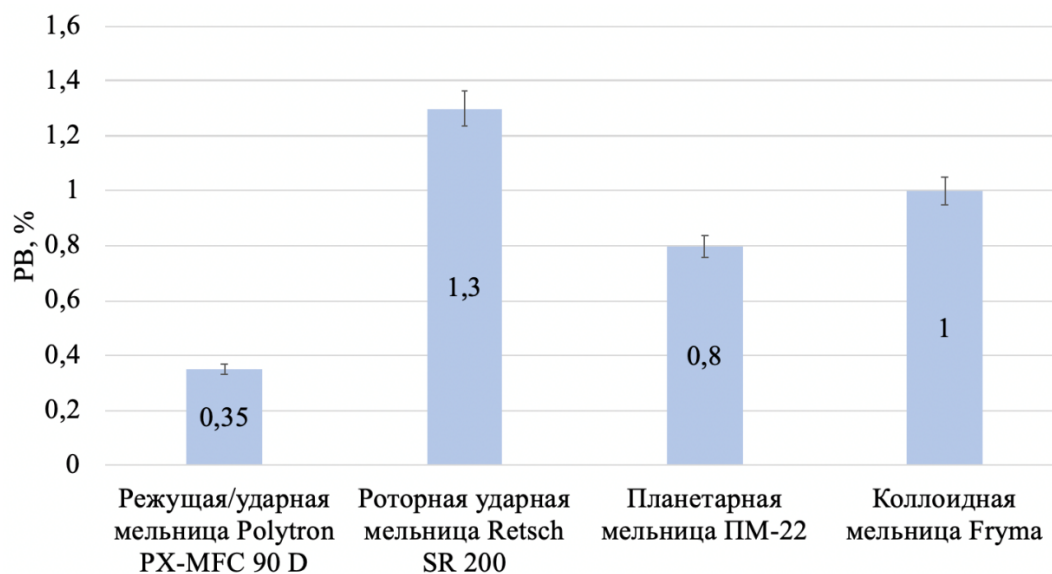


Рисунок 2 – Содержание РВ после ферментативного гидролиза измельченной лузги

Наибольшее количество РВ наблюдалось для образца, полученного на роторной ударной мельнице Retsch SR 200. Несмотря на то, что на планетарной и коллоидной мельницах были получены частицы меньшего размера, количество образовавшихся редуцирующих веществ в этих образцах было меньше.

Основная цель химической предобработки целлюлозосодержащего сырья в технологии производства белковых препаратов – это удаление полимеров, способных ингибировать ферменты. В подсолнечной лузге содержится лигнин, являющийся ингибитором целлюлолитических ФП. С целью удаления лигнина из подсолнечной лузги в работе был рассмотрен способ щелочной предобработки – нагревание суспензии лузги в присутствии гидроксида натрия или тиосульфата натрия. Одним из показателей делигнификации является изменение числа Каппа, косвенно характеризующее содержание остаточного лигнина в волокнистом полуфабрикате. Обработку 15 %-ной (такое содержание лузги в суспензии обусловлено необходимостью интенсивного перемешивания) суспензии лузги вели при различных концентрациях гидроксида натрия и тиосульфата натрия. Процесс обработки проводили при температуре 30° С или 120° С в течение 30 мин, 1 или 2 ч.

С точки зрения эффективности и экономической выгоды был выбран следующий вариант делигнификации подсолнечной лузги: в качестве дисперсной среды используется 4 %-ный раствор гидроксида натрия, время обработки при 120° С – 1 ч, при этом количество нерастворимых целлюлозных фибрилл составляет (73,65±0,7) %; количество сухих веществ после ферментативного гидролиза – (7,65±0,35) %; количество редуцирующих веществ после ферментативного гидролиза – (3,25±0,15) %.

Глубокую деструкцию целлюлозосодержащего сырья с образованием сбраживаемых сахаров возможно осуществить под действием мультиэнзимной системы целлюлолитических ферментных препаратов, включающих в себя целлюлазы, эндоглюканазы, целлобиогидролазы, гемицеллюлаза и β-глюкозидазы. Дозировку ФП определяли по ведущей активности (ЦлС или

КС). Обоснование выбора ФП базировалось на его эффективности и экономичности. Оптимальные параметры применения ФП были рекомендованы производителями. Сводные данные, отражающие накопление РВ и дозировки ФП, представлены на рисунке 3.

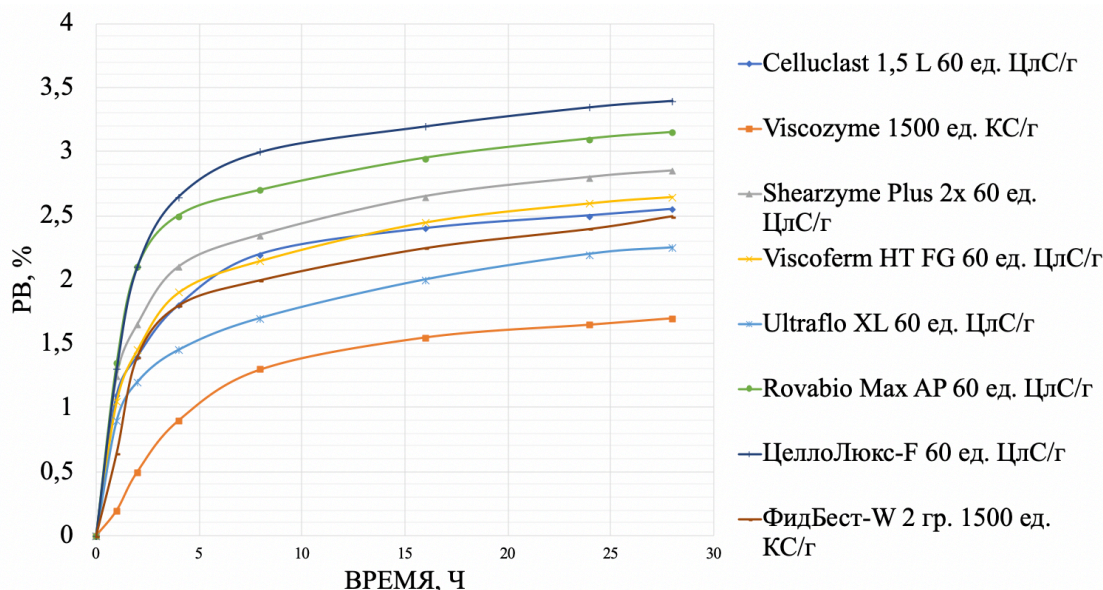


Рисунок 3 – Накопление РВ при использовании ФП различных производителей

По данным рисунка видно, что ФП «ЦеллоЛюкс-F» является предпочтительным для проведения ферментативного гидролиза подсолнечной лузги. Получаемый ферментолизат содержит 3,4 % РВ. Ближайшим конкурентом выбранного препарата является ФП французской компании Adisseo – «Rovabio Max AP», ферментолизат содержит на 10 % меньше РВ.

Для разработки технологии ферментативного гидролиза подсолнечной лузги на первом этапе подбирали рациональную дозировку ФП «ЦеллоЛюкс-F», проводя гидролиз при температуре 50° С, рН 5,0 и содержании подсолнечной лузги – 15 %. Дозировку ферментного препарата варьировали от 15 до 75 ед. ЦлС/г, продолжительность ферментативной обработки – 24 ч. Результаты определения количества образующихся редуцирующих веществ в гидролизате приведены на рисунке 4.

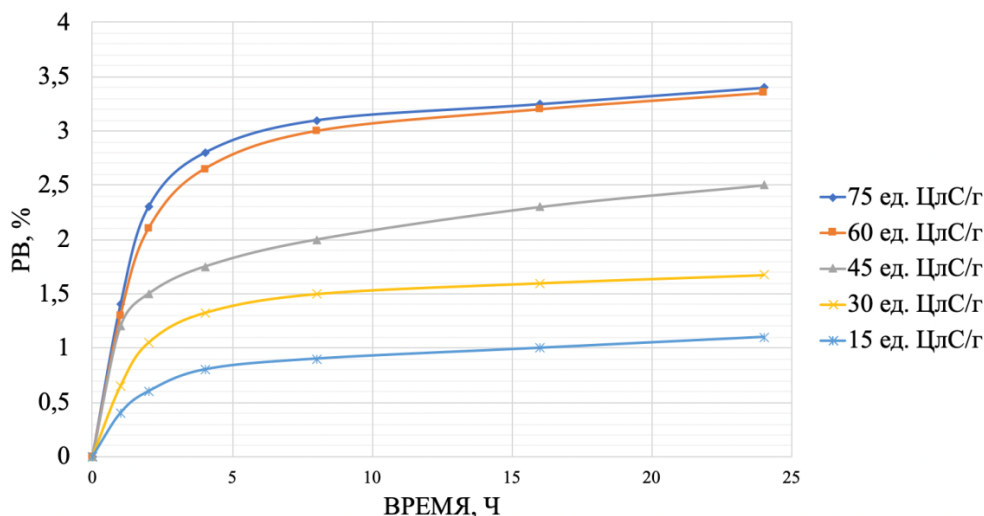


Рисунок 4 – Накопление РВ при различной концентрации ФП «ЦеллоЛюкс-F»

Установлено, что накопление 3,4 % РВ достигается за 20 ч при применении исследуемого ферментного препарата в количестве 60 ед. ЦЛС/г субстрата.

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 ($40^{\circ} \text{C} \leq X_1 \leq 60^{\circ} \text{C}$), рН 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: концентрация подсолнечной лузги (15 %), дозировка ФП «ЦеллоЛюкс-Ф» (60 ед. ЦЛС/г). Функцией отклика являлось содержание РВ (Y), %, в полученном гидролизате.

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

$$Y = -41,51 + 0,997X_1 + 6,345X_2 + 0,332X_3 - 0,01X_1^2 - 0,62X_2^2 - 0,008X_3^2 \quad (1)$$

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

Установлены рациональные 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 ч. Ферментолитат, полученный при установленных параметрах, исследовали на содержание глюкозы и целлобиозы методом ВЭЖХ и использовали в дальнейшей работе. Хроматограмма (рисунок 5) ферментолитата подсолнечной лузги получена при проведении высокоэффективной жидкостной хроматографии на колонке MetaCarb 67C. По данным ВЭЖХ было определено соотношение сахаров: глюкоза – 73,65 %; целлобиоза – 12,49 %; олигосахариды – 13,86 %.

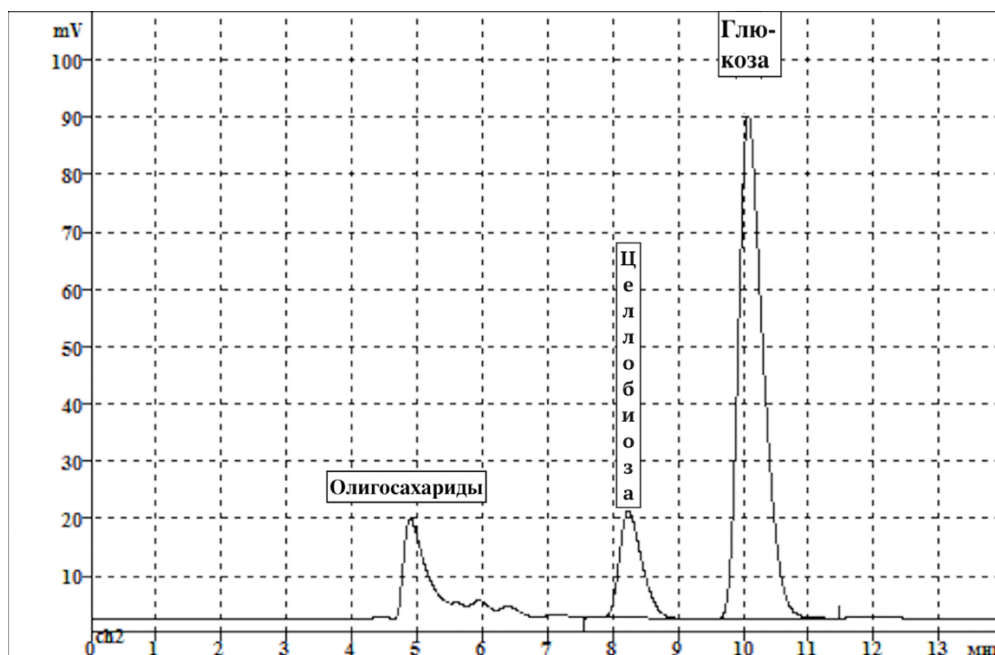


Рисунок 5 – Хроматограмма образца ферментолитата подсолнечной лузги

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

Основу технологии промышленного получения микробного белка составляет глубинная ферментация дрожжевой культуры, являющейся продуцентом высокоусваиваемого белка. Тенденции рыночной экономики «диктуют» требования, предъявляемые к кормовому белку: содержание сырого протеина – не менее 60 %; перевариваемость за 1 ч – не менее 90 %.

На первом этапе разработки технологии промышленного культивирования дрожжей на ферментоллизате подсолнечной лузги был проведен скрининг штаммов дрожжей, способных утилизировать сахара, содержащиеся в ферментоллизате, накапливать большое количество биомассы (не менее 20 г/дм³), содержащей значительное количество СП (не менее 45 %). Для первичного скрининга были приготовлены агаризованные питательные среды на основе ферментоллизата подсолнечной лузги. Для обогащения питательной среды в ее состав были введены неорганические соли: $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ – 0,5 %; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$ – 0,065 %, pH 5,0.

Количественно определить рост микроорганизмов на агаризованной среде не представляется возможным, поэтому его оценивали визуально. Из 19 штаммов 18 показали способность утилизировать углеродсодержащие питательные вещества из ферментоллизата. 14 штаммов характеризовались обильным ростом, среди них представители родов *Candida* (*C. tropicalis* RCAM1050, *C. blancii* RCAM3343, *C. blancii* RCAM3360, *C. utilis* Y-797, *C. parapsilopsis* D-18), *Debaryomyces* (*D. hansenii* Y-3863, *D. hansenii* Y-2519) и *Kluyveromyces* (*K. marxianus* Y-4570, *K. marxianus* Y-4557).

Следующим этапом отбора стало глубинное культивирование исследуемых штаммов в колбах на качалке. Для культивирования была приготовлена модифицированная среда Крючковой ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ – 0,5 %; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3\text{H}_2\text{O}$ – 0,065 %; дрожжевой экстракт – 0,2 %), содержащая ферментоллизат подсолнечной лузги. pH питательной среды до стерилизации – 5,0; в качестве титранта использовали химически осажденный карбонат кальция – 0,3 %. После культивирования для каждого штамма определяли количество потребленных СВ (в том числе РВ), определяли количество БМ (г/дм³) и содержание СП (%) (таблица 3).

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 для больших аппаратов держать температуру не выше 30 °С очень затратно, поэтому для крупнотоннажного производства преимущественно надо выбирать термотолерантные мезофилы (способные расти при 40 °С). Среди культур с оптимальной температурой роста 40 °С оказались все представители рода *Candida*, кроме *C. utilis*. Дрожжи родов *Kluyveromyces* и *Pichia* и единственный представитель рода *Hansenula* также оказались термотолерантными мезофилами. Напротив, дрожжи рода *Debaryomyces* и штаммы из коллекции Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной микробиологии (RCAM) оказались способны расти только при температуре 30 °С.

Таблица 3 – Данные по скринингу дрожжевых культур при глубинном культивировании

Исследуемый штамм	СВ, %	t, °C	20 ч			40 ч		
			СВ, % (PB, %)	БМ, г/дм ³	СП, %	СВ, % (PB, %)	БМ, г/дм ³	СП, %
<i>Candida tropicalis</i> RCAM1050	8,0 (3,2)	30 °C	5,0 (0,16)	17,6	42,5	4,5 (0)	28,8	40,2
		40 °C	5,0 (0,1)	19,2	47,2	4,4 (0)	26,2	44,3
<i>Candida blancii</i> RCAM3343		30 °C	4,5 (0,33)	16,1	45,4	4,0 (0)	30,6	44,2
		40 °C	4,5 (0,3)	16,4	46,9	4,5 (0)	27,4	45,3
<i>Candida utilis</i> Y-797		30 °C	5,0 (0,36)	15,4	47,7	4,8 (0,16)	21,8	42,6
		40 °C	7,0 (2,5)	3,27	–	7,0 (2,3)	3,39	–
<i>Candida parapsilopsis</i> D-18		30 °C	4,0 (0,6)	24,4	42,4	3,8 (0,33)	23,9	43,7
		40 °C	4,2 (0,6)	23,3	44,7	4,0 (0,33)	27,6	43,6
<i>Wickerhamomyces anomala</i> RCAM1039		30 °C	5,0 (0,16)	17,6	51,2	4,5(0)	24,0	47,9
		40 °C	7,0 (3)	–	–	7,0 (3)	–	–
<i>Guechomyces pollulans</i> RCAM03356		30 °C	6,0 (1,6)	13,6	46,3	5,5 (0,8)	16,1	44,6
		40 °C	7,5 (3,0)	–	–	7,5 (3,0)	–	–
<i>Cutaneitrichosporon cutaneum</i> RCAM03569		30 °C	6,5 (0,92)	10,6	37,4	5,0 (0,2)	20,1	39,2
		40 °C	7,5 (2,9)	–	–	7,5 (2,9)	–	–
<i>Cylerlindnera sp.</i> RCAM03502		30 °C	6,5 (0,8)	7,1	35,5	6,5 (0,8)	11,1	37,7
		40 °C	7,5 (2,9)	–	–	7,5 (2,9)	–	–
<i>Hansenula polymorpha</i> D-21		30 °C	5,0 (1,25)	10,2	52,1	4,5 (0,96)	16,4	56,5
		40 °C	5,0 (1,32)	10,6	53,4	4,5 (0,72)	17,6	57,8
<i>Debaryomyces hansenii</i> Y-2519		30 °C	4,5 (0,36)	12,7	48,2	3,5 (0,16)	21,7	46,7
		40 °C	7,5 (2,9)	–	–	7,5 (2,9)	–	–
<i>Debaryomyces hansenii</i> Y-3863	30 °C	5,0 (0,53)	17,1	54,1	3,5 (0,2)	24,1	53,9	
	40 °C	7,5 (2,9)	–	–	7,5 (2,9)	–	–	
<i>Debaryomyces hansenii</i> D-15	30 °C	5,5 (0,96)	8,6	58,2	5,0 (0,72)	11,5	59,6	
	40 °C	7,5 (2,9)	–	–	7,5 (2,9)	–	–	
<i>Kluyveromyces lactis</i> Y-4444	30 °C	5,0 (0,2)	12,7	44,3	5,0 (0,2)	12,5	46,7	
	40 °C	5,0 (0,33)	10,3	46,8	5,0 (0,2)	14,3	46,9	
<i>Kluyveromyces marxianus</i> Y-4557	30 °C	5,0 (0,33)	14,3	45,2	5,5 (0,16)	19,2	45,2	
	40 °C	4,5 (0,33)	18,45	47,3	4,3 (0,16)	24,2	47,2	
<i>Kluyveromyces marxianus</i> Y-4570	30 °C	5,0 (0,3)	12,5	44,2	5,0 (0,3)	18,8	47,8	
	40 °C	4,5 (0,3)	13,1	46,7	4,5 (0,3)	19,1	48,7	
<i>Pichia membranifaciens</i> D-17	30 °C	5,5 (0,33)	14,1	42,1	4,5 (0)	17,7	52,2	
	40 °C	5,0 (0,33)	15,9	43,1	4,5 (0)	19,3	55,8	
<i>Pichia kudriavzevii</i> Y-3918	30 °C	4,5 (0,3)	16,3	46,7	4,5 (0,3)	16,9	51,6	
	40 °C	4,5 (0,3)	16,9	46,9	4,5 (0,3)	17,5	50,2	

Следующим критерием отбора для потенциальных продуцентов была максимальная ассимиляция восстанавливающих сахаров среды. Все штаммы, кроме *G. pollulans* RCAM03356 (0,8 % ПВ), *Cylerlindnera sp.*, *H. polymorpha* D-21 (0,72 % ПВ), *D. hansenii* D-15 (0,7 % ПВ), утилизировали редуцирующие вещества практически полностью.

Важнейшими показателями при отборе промышленных культур является количество образующейся сухой биомассы и высокое содержание СП. Эти параметры являются ценообразующими для готового продукта. Очевидно, что количество образующейся биомассы и содержание в ней СП в большей степени зависит от условий культивирования, однако на этапе скрининга необходимо определить потенциал штамма.

Среди факультативных мезофилов выделяются дрожжи рода *Debaryomyces* и *W. anomala*. Количество сухой биомассы для данных культур превышает 20 г/дм³ содержание СП выше 45 % и достигает 53 % для штамма Y-3863. Среди термотолерантных мезофилов выделяются представители трех родов: *Candida*, *Kluyveromyces* и *Pichia*. Дрожжи *Candida* исторически являются самыми распространенными на 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 лидерами, однако содержание СП в биомассе не велико и не превышает 45 %. Большое количество СП до 54 % накапливают дрожжи рода *Pichia*, количество биомассы не велико и составляет 16–18 г/дм³. Перспективным вариантом являются представители *Kluyveromyces*. Так называемые «молочные дрожжи» способны накапливать до 24 г/дм³ сухой БМ, содержащей до 48 % СП.

В результате проведения скрининга потенциальных продуцентов белка для дальнейшей работы по разработке технологии получения высококачественной биомассы были выбраны следующие штаммы: *K. marxianus* Y-4557, *D. hansenii* Y-3863, *C. blancii* RCAM3343, *C. parapsilosis* D-18. Первые два штамма могут являться основой для получения белковых ингредиентов пищевого назначения.

По отработанным технологиям (подобрана питательная среда, тип культивирования, условия культивирования) на технологической линии ОАО «Биохиммаш» было проведено культивирование штаммов *K. marxianus* Y-4557 и *C. parapsilosis* D-18, отобранных как наиболее перспективных по накоплению биомассы и «сырого» протеина. Процесс культивирования осуществляли в ферментере объемом 100 дм³. Культивирование вели в отъемно-доливном (многоцикличном) режиме, общий объем культуральной жидкости – 200 дм³. Биомассу отделяли сепарированием с промывкой (сепаратор «Westfalia» (Германия), тип SA1-04575), суспензию дрожжей плазмолизовали и высушивали в распылительной сушилке (РС-200 (Россия)). Количество полученной сухой биомассы с учетом потерь на всех стадиях технологического процесса: *K. marxianus* Y-4557 – 4,2 кг, *C. parapsilosis* D-18 – 4,52 кг.

Основные органолептические и физико-химические показатели полученной биомассы дрожжей и нормативные показатели по ГОСТ 20083 «Дрожжи кормовые. Технические условия» представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Органолептические и физико-химические показатели сухой биомассы дрожжей *K. marxianus* Y-4557 и *C. parapsilosis* D-18

Наименование показателей	Норма по ГОСТ 20083 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	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, по органолептическим и физико-химическим показателям дрожжи относятся к высшей группе. Следует 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 в условиях *in vitro*, полученные данные представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Данные по перевариваемости кормовых дрожжей и сравнение с аналогичными кормовыми продуктами

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	83,0 %	90,5 %
Рыбная мука по ГОСТ 2116-2000	86,0 %	93,0 %

По данным таблицы можно судить об эффективной перевариваемости белка дрожжевой биомассы, в сравнении с другими высокобелковыми кормовыми продуктами наблюдается переваривание более 95 % в первые 3 ч гидролиза.

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

Для получения микробного пищевого белка из дрожжевой биомассы необходимо удалять липиды и нуклеиновые кислоты. Липиды дрожжей способствуют порче продукта, ухудшают его органолептические показатели, окисляются, в результате чего образуются токсичные соединения, опасные для здоровья человека. Нуклеиновые кислоты опасны по причине накопления азота, поступающего в органы человека через кровь, где он откладывается в виде солей, способствуя возникновению различных заболеваний. Поэтому их содержание строго нормируется, и количество липидов и нуклеиновых кислот в концентратах не должно превышать 2 %.

В ходе оптимизации процесса обезжиривания варьировали концентрацию 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 (таблица 6).

Таблица 6 – Количество экстрагированных липидов по отношению к общему содержанию липидов в обезжиренной биомассе

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 6 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 превышает 1,5 % на АСВ. Однако использовать спирт с такой концентрацией нецелесообразно с экономической точки зрения. При использовании 60 %-ного этанола количество экстрагированных липидов больше, а остаточное количество не превышает 2 % на

АСВ. Использование 40 %-ного спирта показывает значительно меньшую эффективность при экстрагировании, остаточное количество липидов варьируется от 2 до 3 %.

Еще одной задачей оптимизации процесса обезжиривания дрожжевой биомассы было уточнение рациональной температуры экстракции. Из таблицы 6 видна линейная зависимость между температурой экстракции и количеством удаленных липидов. Максимальное удаление липидов наблюдается при прогревании растворителя до 70° С. При нагреве растворителя до температуры 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.

При использовании 60 %-ного этилового спирта, прогретого до 60 °С, оптимальное 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 использоваться для экстракции липидов из биомассы дрожжей на следующем цикле. Учитывая полученные данные, рациональными технологическими параметрами для экстракции липидов из биомассы дрожжей являются: 60 %-ный этиловый спирт; температура 60° С; соотношение биомасса (W = 18 – 22 %) : этанол = 1 : 2,5. При таких параметрах остаточное содержание липидов составляет 1,9 % к АСВ.

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 (таблица 7).

Таблица 7 – Удаление нуклеиновых кислот из дрожжевой биомассы при изменении технологических параметров

Наименование показателя		Количество удаленных нуклеиновых кислот по отношению к общему содержанию НК, %		
		Гидромодуль		
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

По полученным данным было определено, что рациональный гидромодуль – 1:7. При таком соотношении удаляется наибольшее количество нуклеиновых кислот (таблица 7). 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 оптимальную температуру и время выдержки суспензии. По данным таблицы 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.

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

Белок дрожжевой биомассы *K. marxianus* имеет недостаток по лизину, треонину и серосодержащим аминокислотам (таблица 8). Белковый концентрат приближен к «идеальному» белку ФАО/ВОЗ по всем незаменимым аминокислотам, кроме серосодержащих, фенилаланина и тирозина.

Таблица 8 – Сравнение аминокислотного состава белкового концентрата и 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	–

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 эти аминокислоты разрушаются при нагревании. Определение аминокислот вели согласно ГОСТ 32195.

По описанной технологии получен белковый концентрат из дрожжевой биомассы *K. marxianus*, содержащий до 65 % истинного белка (таблица 9).

Таблица 9 – Сравнение биохимического состава дрожжевой биомассы и концентрата

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

Увеличение содержания белка объясняется тем, что в процессе экстракции липидов и нуклеиновых кислот их доля по сухим веществам уменьшается в то время, как увеличивается удельная доля белка по отношению к АСВ. Сравнение аминокислотного состава дрожжевой биомассы и белкового концентрата с «эталонным» белком (таблица 8) позволяет сделать вывод, что содержание аминокислот в обоих образцах практически полностью удовлетворяет требования ФАО/ВОЗ.

ГЛАВА 6 Разработка малоотходной технологии

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

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.

Сток, образовавшийся после щелочной делигнификации подсолнечной лузги, подкисляли ортофосфорной или соляной кислотой до pH 1,0. При таком значении кислотности среды фитомеланины выпадают в осадок, который отделяли центрифугированием, промывали, нейтрализовали гидроксидом натрия до pH 6,5 – 7,0 и высушивали. В полученной субстанции определяли общую антиоксидантную активность и сорбционную способность по отношению к метиленовой сини, полученные данные представлены в таблице 10.

Таблица 10 – Данные об общей антиоксидантной активности и адсорбционной способности субстанции фитомеланинов

АС, мг метиленовой сини/г субстанции		ОАО, %	
HCl	H ₃ PO ₄	HCl	H ₃ PO ₄
82,71	91,63	28,2	31,6

При использовании в качестве осадителя ортофосфорной кислоты наблюдается повышение адсорбционной способности и общей антиоксидантной активности в получаемой субстанции на 10 и 12 %, соответственно, по сравнению с вариантом с применением HCl.

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. Наилучший рост на средах, содержащих непрогидролизированный осадок лузги, показали штаммы: *M. thermophila* F-244 и *T. reesei* F-427. Хороший рост на среде Чапека с добавленной лузгой, помимо тех же культур, показали *A. foetidus* и *I. lacteus* F-452.

Штаммы мицелиальных грибов культивировали поверхностным способом на питательных средах, содержащих в качестве источника углерода 30 % непрогидролизированный 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.

Сравнивая значения целлюлолитических активностей, полученных на средах с внесением различных концентраций солодовых ростков, с показателями активностей, накопленных на контрольной среде, можно отметить повышение активности целлюлолитических ферментов в отношении всех культур при внесении в среду даже малого (5 %) количества ростков. Наибольшая активность была получена при культивировании штамма *M. thermophila* F-859 и составила 240 ед. ЦдС/г АСВ при содержании солодовых ростков в питательной среде, равном 10 %.

Разработанная комплексная технология переработки подсолнечной лузги в белковые препараты кормового и пищевого назначения представлена на рисунке 6.



Рисунок 6 – Технологическая блок-схема переработки подсолнечной лузги

Лузга, образующаяся при лущении семян подсолнечника на масличных производствах, высушивается до влажности не более 6 %. Подсушенная лузга измельчается на роторной ударной мельнице Retsch SR 200 или аналогичной до размера частиц не более 100 мкм.

Измельченная подсолнечная лузга суспендируется при гидромодуле 1:8,5 и подвергается щелочной делигнификации в присутствии 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 ФП «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. Полученную суспензию центрифугируют. Фугат, содержащий до 3,5 % РВ, направляют на стадию приготовления ПС, нерастворимый осадок используют для получения кормового ФП.

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 (отъемно-доливном) режиме с подпиткой субстратом. В качестве титранта используется 25 %-ная аммиачная вода, температура культивирования 40° С. Культуральную среду подвергают флотации и 2-м степеням сепарации. Отделенную биомассу дрожжей *Candida parapsilosis* D-18 плазмолизуют, высушивают на распылительной сушилке, гранулируют и упаковывают. Сырую биомассу *Kluveromyces marxianus* Y-4557 подвергают обезжириванию с использованием 60 %-ным раствором этанола при гидромодуле 1:2,5, температуре 60° С в течение 1 ч, далее биомассу подвергают денуклеинизации за счет активации собственных эндонуклеаз клетки. Параметры денуклеинизации: гидромодуль 1:2,5, температура 50° С, длительность 1 ч. Обезжиренную и денуклеинизированную биомассу сепарируют, промывают и сушат на распылительной сушилке, получая таким образом белковый концентрат пищевого назначения.

В качестве продукта комплексной переработки лузги в рамках разработанной технологии получают водорастворимую субстанцию фитомеланинов, для этого образовавшуюся жидкую фазу на стадии делигнификации подкисляют ортофосфорной кислотой до pH 1,0, при этом фитомеланины выпадают в осадок, который отделяют центрифугированием, ресуспендируют и нейтрализуют раствором гидроксида натрия. Полученный нейтрализат подвергают сушке. Еще одним продуктом комплексной переработки является кормовой ферментный препарат целлюлолитического действия, который получают путем поверхностного культивирования мицелиального гриба *Myceliophthora thermophila* F-859 на непрогидролизованном осадке подсолнечной лузги, обогащенном 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 ферментализат, 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 работ, опубликованных по материалам диссертации

Статьи в изданиях, индексируемых Scopus и WoS

1. **Фоменко, И. А.** Разработка технологии белкового концентрата из дрожжевой биомассы *Kluyveromyces marxianus* Van der Walt (1965) / И. А. Фоменко, И. А. Дегтярев, Л. А. Иванова, Н. Г. Машенцева // Сельскохозяйственная биология. – 2021. – Т. 56. – № 6. – С. 1172–1182.
2. Ivanova, L.A. Overview of Mycelial Fungi - Lignin Destructors / L. A. Ivanova, **I. A. Fomenko**, L. A. Churmasova, T. P. Kuzmicheva // KnE Life Sciences. – 2022. - № 7 (1) – P. 175–180.

Статьи в изданиях, входящих в Перечень рецензируемых научных журналов ВАК РФ

3. **Фоменко, И.А.** Делигнификация подсолнечной лузги как исходная стадия ферментативного гидролиза / И. А. Фоменко, Л. А. Иванова, А. А. Мижева // Проблемы развития АПК региона. - 2021. – № 3 (47). – С. 170–175.

4. **Фоменко, И. А.** Влияние ферментных препаратов с различной субстратной специфичностью на гидролиз лузги семян подсолнечника / И. А. Фоменко // XXI век: итоги прошлого и проблемы настоящего плюс. - 2021. – № 3 (55). – С. 121–124.
5. **Фоменко, И. А.** Скрининг дрожжевых культур как потенциальных продуцентов полноценного белка на отходах масличного производства / И. А. Фоменко, А. А. Мижева // XXI век: итоги прошлого и проблемы настоящего плюс. - 2021. – № 4 (56). – С. 132–137.
6. **Фоменко, И. А.** Получение водорастворимых фитомеланинов с использованием различных минеральных кислот / И. А. Фоменко, Л. А. Иванова, Л. А. Чурмасова, И. А. Дегтерев // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. - 2021. – № 2 (17). – С. 64–68.
7. **Фоменко, И. А.** Разработка способа активации продуцентов в технологии целлюлолитических ферментных препаратов / И. А. Фоменко, Л. А. Иванова, Т. П. Кузьмичева, А. Э. Жданова // Естественные и технические науки. - 2021. – № 4 (155). – С. 60–64.

Патенты на изобретения

8. Патент № 2762425. Российская Федерация, МПК А 23 К 10/18, А 23 К 10/30. Способ биоконверсии подсолнечной лузги в кормовой продукт с высоким содержанием белка / **Фоменко И. А.**, Иванова Л. А., Комбарова С. П., Бельский И. Д., Дегтярев И. А., Мижева А. А.; патентообладатель ФГБОУ ВО «Московский государственный университет пищевых производств». – № 2021112214; заявл. 28.04.2021; опубл. 21.12.2021, Бюл. № 36. – 12 с.

Статьи в других научных изданиях

9. Иванова, Л. А. Разработка технологии получения фитомеланинов из отходов масличного производства / Л. А. Иванова, **И. А. Фоменко**, Д. А. Сергеева // Health, Food & Biotechnology. - 2019. – № 1 (2). – С. 136-146
10. Иванова, Л. А. Мицелиальные грибы рода *Aspergillus*, *Fusarium* и *Alternaria* – продуценты целлюлолитических ферментов / Л. А. Иванова, Л. А. Чурмасова, **И. А. Фоменко**, Т. П. Кузьмичева // Наукосфера. - 2020. – № 5. – С. 37–43.
11. Керимова, Г. М. Скрининг мицелиальных грибов для биоконверсии подсолнечной лузги / Г. М. Керимова, С. Е. Кочнева, **И. А. Фоменко** // Наукосфера. - 2021. – № 6 (1). – С. 60–64.
12. Фоменко, И. А. Мицелиальные грибы *Aspergillus* и *Trichoderma* продуценты кормовых целлюлолитических ферментных препаратов на отходах АПК / **И. А. Фоменко**, А. Э. Жданова // Заметки ученого. - 2021 – № 8. – С. 475–481

Статьи в сборниках научных трудов, материалов конференций

13. **Фоменко, И. А.** Получение фитомеланинов из растительного сырья / И. А. Фоменко, Л. А. Иванова, Т. М. Жила // Сборник научных статей и докладов 6й Международной Научно-практической конференции «Продовольственная безопасность: научное, кадровое и информационное обеспечение». – Воронеж. - 2019. – 669 с.
14. **Фоменко, И. А.** Скрининг мицелиальных грибов как потенциальных продуцентов кормовых целлюлолитических ферментов на отходах масличного производства / И. А. Фоменко, Т. П. Кузьмичева, И. Д. Бельский // Материалы международного форума «Биотехнология: состояние и перспективы развития». – Москва. - 2020. – 468 с.
15. Дегтярев, И. А. Изучение возможности получения белковых концентратов из дрожжевой биомассы *Kluyveromyces marxianus* / И. А. Дегтярев, **И. А. Фоменко**, Л. А. Иванова // Материалы 10й Международной научно-практической интернет-конференции «Современные вызовы и актуальные проблемы науки, образования и производства: межотраслевые диспуты». – Киев. - 2020. – 809 с.
16. **Фоменко, И. А.** Белковая недостаточность в питании человека / И. А. Фоменко // Сборник научных работ 77й Международной научной конференции Евразийского Научного Объединения. – Москва: ЕНО. - 2021. – 336 с.

17. **Фоменко, И. А.** Применение дрожжевых ингредиентов в пищевой промышленности / И. А. Фоменко // Сборник статей 8й Международной конференции «Приоритетные направления инновационной деятельности в промышленности». – Казань. - 2021. – 198 с.

18. **Фоменко, И. А.** Микробный синтез целлюлолитических ферментов / И. А. Фоменко // Сборник научных статей 8й Международной научной конференции «Инновационные технологии, экономика и менеджмент в промышленности». – Волгоград: ООО «Конверт». - 2021. – 184 с.

Сокращения

СВ – сухие вещества, БМ – сухая биомасса, СП – сырой протеина к АСВ, К – конверсия по отношению к редуцирующим веществам, ФП – ферментный препарат, РВ – редуцирующие вещества, ПС – питательная среда, АС – адсорбционная способность, ОАО – общая антиоксидантная активность

SUMMARY

The dissertation work was carried out at the Department of Biotechnology and Technology of Bioorganic Synthesis Products of the Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education, Moscow State University of Food Production. In the course of the work, a complex bioconversion of sunflower husk into protein preparations for feed and food purposes was developed. The relevance of the work is substantiated by two main problems: the lack of complete protein in human nutrition and the complexity of the disposal of large-tonnage oilseed production waste – sunflower husks.

In the course of the research, a method was developed for preparing sunflower husks for enzymatic hydrolysis, which makes it possible to obtain the basis of a nutrient medium for cultivating yeast. A method has been developed for obtaining a protein preparation for feed purposes based on strains of *Kluyveromyces marxianus* Y-4557 and *Candida parapsilosis* D-18 with a crude protein content of at least 60 % and a digestibility of pepsin and pancreatin of more than 95 % in 3 hours. A method has been developed for producing a yeast concentrate for food purposes based on the *Kluyveromyces marxianus* Y-4557 strain, containing more than 65% of true protein and no more than 2% of nucleic acids and lipids.