Юскина Ольга Николаевна. Разработка биотехнологического способа получения препарата белка из биомассы дрожжей Saccharomyces Cerevisiae на основе направленного гидролиза клеточных стенок : диссертация ... кандидата биологических наук : 03.00.23 / Юскина Ольга Николаевна; [Место защиты: Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности]. - Кашинцево, 2008. - 211 с. : 21 ил.

**ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ПИЩЕВОЙ**

**БИОТЕХНОЛОГИИ**

**Россельхозакадемии**

УДК 663.1

04 200 о 12837 “ *пРавах рукописи*

**Юскина Ольга Николаевна**

**РАЗРАБОТКА БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО СПОСОБА ПОЛУЧЕНИЯ ПРЕПАРАТОВ БЕЛКА ИЗ БИОМАССЫ ДРОЖЖЕЙ Saccharomyces cerevisiae НА ОСНОВЕ НАПРАВЛЕННОГО ФЕРМЕНТАТИВНОГО ГИДРОЛИЗА КЛЕТОЧНЫХ СТЕНОК**

**Специальность 03.00.23 - Биотехнология ДИССЕРТАЦИЯ на соискание ученой степени кандидата биологических наук**

**Научный руководитель д.т.н., профессор Римарева Л.В.**

Москва -2008

**ОГЛАВЛЕНИЕ**

***Стр.***

[**ВВЕДЕНИЕ 7**](#bookmark3)

**Глава I ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ И ПАТЕНТОВ 11**

1. Мониторинг перспективности выбранного направления 11

исследований

1. [Микроорганизмы как продуценты белка 22](#bookmark5)
2. [Рост и развитие микробных культур 26](#bookmark6)
3. [Фазы роста микроорганизмов при периодическом 27](#bookmark7)

культивировании

1. [Двухфазность развития популяций в условиях процесса 29](#bookmark9)

брожения

1. Структура клеточной стенки и биохимический состав 30

дрожжевой клетки

1. [Перспективные способы деструкции клеточной стенки 40](#bookmark13)

дрожжей

1. [Основы ферментативного гидролиза клеточной стенки 46](#bookmark16)

дрожжей

1. Применение белковых препаратов, полученных на 51

основе микробной биомассы в пищевой промышленности

1. [Использование цельной биомассы 51](#bookmark18)
2. Использование частично облагороженной биомассы 52

микроорганизмов

1. Белковые изоляты 52
2. Использование аминокислотных смесей в качестве 54

пищевых и биологически активных добавок

з

Глава П ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ 58

1. ЦЕЛЬ И ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЯ 58
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ 59
3. [Методы определения биохимических показателей 60](#bookmark21)
4. [Методы определения каталитической 62](#bookmark22)

способности ферментных препаратов

1. Методы определения функциональных 66 характеристик получаемых продуктов
2. Методика математической обработки 68

экспериментальных данных

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Глава HI СКРИНИНГ ДРОЖЖЕЙ Saccharomyces cerevisiae - 70

НАИБОЛЕЕ ПЕРСПЕКТИВНОГО ПРОДУЦЕНТА БЕЛКА

1. Изучение продуктивности штаммов 70

хлебопекарных дрожжей

1. Отбор штаммов дрожжей, отличающихся 70

высокой скоростью роста

1. Влияние начальной концентрации растворимых 73

углеводов в сусле на скорость роста и накопление биомассы дрожжей

1. Исследование влияния pH пшеничного сусла на 85

скорость роста и накопление биомассы дрожжей Saccharomyces cerevisiae

1. Влияние различных значений pH на скорость 86

роста дрожжей в разных точках кривой роста

1. Влияние исходных значений pH пшеничного 89 сусла на скорость роста и накопление биомассы дрожжей Saccharomyces cerevisiae
2. Исследование влияния различных солей, 90 внесенных в пшеничное сусло, на скорость роста и накопление биомассы дрожжей

**Глава IV ИЗУЧЕНИЕ БИОКАТАЛИТИЧЕСКОЙ СПОСОБНОСТИ 97 ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ РАЗЛИЧНОГО СПЕКТРА ДЕЙСТВИЯ МИКРОБНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ**

4.1

4.2

Определение состава ферментного комплекса 100 ферментных препаратов микробного

происхождения

**4.2.1**

Изучение механизма гидролиза клеточной стенки 105 дрожжей с применением ферментных препаратов Модельные опыты по биокатализу 105 индивидуальных субстратов — структурных полимеров клеточной стенки дрожжей

1. Модельные опыты по биокатализу полисахаридов 106

клеточных стенок

1. Модельные опыты по биокатализу полимеров 108

клеточной стенки дрожжей под действием различных ферментативных систем

1. Модельные опыты, направленные на подбор 110 оптимальной мультиэнзимной композиции для эффективного катализа полимеров клеточных

стенок дрожжей

115

116

124

128

134

137

139

139

141

1. Исследование процессов ферментативной

деструкции клеточных стенок дрожжей при получении препарата белка (I стадия)

1. Исследование процессов деструкции |3-глюканов

и белковых полимеров клеточных стенок

дрожжей (I стадия)

1. Изучение динамики деструктивных воздействий ферментных препаратов на клеточную стенку дрожжей на I стадии ферментолиза
2. Исследование процессов деструкции

полисахаридов клеточных стенок дрожжей (II стадия)

1. Изучение возможности повышения

проницаемости клеточной стенки дрожжей поверхностно-активными веществами

* 1. Результаты электронно-микроскопического

исследования дрожжевых клеток после

воздействия ферментных препаратов Глава V ВЫДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВЫХ ВЕЩЕСТВ ИЗ БИОМАССЫ ДРОЖЖЕЙ ПОСЛЕ ПРОВЕДЕНИЯ ФЕРМЕНТАТИВНОГО

ГИДРОЛИЗА КЛЕТОЧНЫХ СТЕНОК

1. Подбор эффективного осадителя для извлечения

белковых фракций из супернатанта

1. Фракционирование белковых веществ дрожжей

5.3

Глава VI ИССЛЕДОВАНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНО­ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БЕЛКОВОГО

ПРЕПАРАТА ИЗ БИОМАССЫ ДРОЖЖЕЙ

[**Глава VII ТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ 153**](#bookmark29)

**ВЫВОДЫ 157**

[**СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ 159**](#bookmark30)

**ПРИЛОЖЕНИЯ 172**

**ВВЕДЕНИЕ**

Актуальность. Актуальность выбранного направления исследований обусловлена сложившимся дефицитом белка в структуре питания населения России. Продовольственная проблема, связанная с недостатком биологически полноценных продуктов, со временем не только не теряет своей остроты, но и становится одной из актуальнейших. Эффективность решения этой проблемы определяется использованием качественно новых методов производства пищи, а также привлечением новых сбалансированных источников пищевого белка, одним из которых является белок микроорганизмов. Работы многих ученых посвящены вопросам изучения возможности использования микроорганизмов как источников белковых веществ (Коновалов В.А., 1975; Беликов В.М. 1977; Шкляр Б.Х.,1977; Латов В.К., 1990; Римарева Л.В., 1993; Иванова Л.А., 1998; Неклюдов А.Д., 2000; и

ДР-)-

Наиболее перспективным источником пищевого белка является дрожжевая биомасса, что объясняется полноценностью белковых веществ, аминокислотный^ скор которых приближается к животному белку, а также безопасностью\* и абсолютным отсутствием токсичности дрожжей. Кроме того, наличие витаминов, ценных полисахаридов и микроэлементов позволяет рассматривать дрожжи как перспективные субстраты для получения биологически активных добавок. Более того, к настоящему времени разработано много способов производства белковых концентратов и изолятов микробного происхождения. Однако, до сих пор не созданы эффективные методы выделения белка из дрожжевой клетки, которые обеспечивали бы его полноценное усвоение. Существующие физические и химические методы биотрансформации клеточной стенки дрожжей имеют ряд недостатков технического и технологического характера и не обеспечивают получение качественного белкового продукта с высокой биологической ценностью. Поэтому перспективным направлением является использование ферментативных процессов, которые позволяют в «мягких» условиях получать пищевые белковые добавки с функциональными свойствами для решения проблемы коррекции питания населения и получения сбалансированных биологически полноценных продуктов.

**Цель и\* задачи исследования.** Цель настоящих исследований состояла в разработке научно обоснованного способа получения белкового препарата на основе направленного ферментативного катализа полимеров клеточных стенок дрожжей. Для достижения поставленной цели исследований предусмотрено решение ряда задач:

* на основе анализа структуры строения клеточной стенки дрожжей и возможных способов, ее деградации научно обосновать состав ферментативной системы, необходимой для деструкции дрожжевой клетки и экспериментально исследовать степень воздействиям индивидуальных ферментов на структурообразующие биополимеры клеточной стенки;
* провести сравнительные исследования ферментных препаратов отечественного и импортного производства по составу основных и минорных ферментов комплекса; уровню их активностей и осуществить скрининг наиболее перспективных;
* разработать эффективную мультиэнзимную композицию (МЭК) с научно­обоснованным соотношением ферментов в составе выбранного комплекса для трансформации биополимеров клеточной стенки дрожжей;
* исследовать процессы выделения белковых веществ протоплазмы клеток и разработать принципиальную схему получения белковых продуктов с использованием энзиматической деструкции дрожжевой биомассы с максимально возможным выделением белковых веществ из исследуемого сырья;
* охарактеризовать полученный белковый препарат по биохимическим и функционально-технологическим показателям;
* разработать научно-техническую документацию для производства белкового препарата.

**Научная новизна- работы.** Получен новый экспериментальный материал, позволивший выявить закономерности биокатализа структурообразующих полимеров клеточной стенки дрожжей. Теоретически обоснованы и экспериментально подтверждены состав МЭК и условия ферментативной деструкции полимеров клеточной стенки. Выявлен синергизм действия ферментов

МЭК, повышающий степень деградации биополимеров. На основе установленной зависимости выхода белка от состава МЭК и уровня в нем ферментативных активностей (протеазы, Р-глюканазы, маннаназы и хитиназы) разработан принципиально новый способ направленного ферментативного гидролиза клеточной стенок, дрожжей с выделением белковых веществ протоплазмы.

Практическая значимость. Осуществлен скрининг продуктивного по белку штамма дрожжей и разработаны оптимальные МЭКи и условия ферментативной деструкции клеточных стенок.

Разработана технологическая схема получения, белковых препаратов из биомассы дрожжей Saccharomyces cerevisiae, позволяющая:

* исключить применение химических реагентов (кислот и щелочей) в результате использования подобранного МЭК для деструкции клеточных стенок;
* повысить выход белковых веществ в сравнении с технологией без применения ферментативной обработки; .
* улучшить качество целевого продукта за счет сохранения полимерности структуры белка и повышения его биологической полноценности;
* получать белковый препарат (67% белка), обладающий влагоудерживающей- (1:2,5) и жироудерживающей (1:0,7) способностью.

Разработана нормативная документация на технологический процесс и получаемую продукцию (Технологическая инструкция по производству белкового препарата на основе биомассы дрожжей, Технические условия на препарат белковый дрожжевой). Проведены производственные испытания и наработаны опытные партии белкового препарата на Мичуринском экспериментальном заводе и во ВНИТИБП- ЗАО «Биопрогресс».

Апробация работы. Основные положения работы были представлены\* на следующих конференциях:

* XII Всероссийской научно-практической конференции «Проблемы создания продуктов здорового питания. Наука и технологии», Углич, 2006 г;

-V Юбилейной школе - конференции «Высокоэффективные пищевые технологии, методы и средства для их реализации» Московский Государственный университет пищевых производств, 2007г;

* Научно-практической конференции «Интеграция фундаментальных и прикладных исследований - основа развития современных аграрно-пищевых технологий», Углич, 2007г;
* X Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы мясной промышленности: инновации, качество, управление», ВНИИ мясной промышленности им. В.М. Горбатова, Москва, 2007г.
* Международной научно-практической конференции «Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов», ВНИТИБП, Щелково, 2007г.
* 4-м Международном научно-практическом симпозиуме «Микробные биокатализаторы и их роль в нано- и биотехнологиях», Москва, 2008г.

Публикации. По теме диссертационной работы подготовлено и опубликовано 7 печатных работ.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы и патентов, экспериментальной части, состоящей из 7 глав, выводов, списка литературы, включающего 140 наименования работ отечественных и иностранных авторов и приложения. Диссертация изложена на 171 страницах машинописного текста, содержит 22 таблицы, 34 рисунков.

ВЫВОДЫ

1. Осуществлен скрининг дрожжей, обладающих высокой скоростью роста (0,17-0,18 час'1) и белоксинтезирующей способностью (содержание белка 39-48%).
2. Проведены сравнительные исследования гидролитической способности ФП различного спектра действия по отношению к структурным полимерам клеточных стенок дрожжей и осуществлен выбор наиболее перспективных, содержащих в составе комплекса ферменты протеолитического, [З-глюканазного, маннанолитического и

хитинолитического действия, необходимых для катализа белково­полисахаридных полимеров клеточной оболочки.

1. Разработаны условия проведения ферментативного гидролиза клеточных стенок, включающие две стадии и использование двух МЭК:

* для I стадии ферментолиза: МЭК-1- 0,2 ед ПС+ 80 ед (3-ГкС при 50°С, длительность ферментолиза 1 час;
* для II стадии ферментолиза: МЭК- II- 300 ед р-глюканазы+ 6,2 ед маннаназы+0,44 ед хитиназы при 50°С, в течение 2 часов.

1. Разработана принципиальная схема производства препарата белка, апробированная в промышленных условиях МЭЗ и ВНИТИБП -ЗАО «Биопрогресс». Наработаны экспериментальные образцы белкового препарата, содержащего 63-67% белковых веществ и изучены его аминокислотный состав, а также функционально-технологическая характеристика (ВУС=2,58 г воды/г препарата, ЖУС= 0,72 г масла/г препарата).
2. Научно обоснована целесообразность использования белкового препарата для повышения качества и биологической полноценности пищевой продукции