Рачков Кирилл Виктрович. Разработка технологии белково-аминокислотных корректоров кормов и биологически активных добавок на основе направленной ферментативной конверсии полимеров дрожжевой биомассы: диссертация ... кандидата биологических наук: 03.01.06 / Рачков Кирилл Виктрович;[Место защиты: Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности], 2014.- 152 с.

ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ

ПИЩЕВОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ НАУК

04201458115

На правах рукописи

РАЧКОВ КИРИЛЛ ВИКТОРОВИЧ

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ БЕЖОВ О-АМИНОКИСЛОТНЫХ КОРРЕКТОРОВ КОРМОВ И БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ДОБАВОК

НА ОСНОВЕ НАПРАВЛЕННОЙ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ КОНВЕРСИИ ПОЛИМЕРОВ ДРОЖЖЕВОЙ БИОМАССЫ

Специальность 03.01.06 - Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель - Серба Елена Михайловна, кандидат технических наук

Москва, 2014

ОГЛАВЛЕНИЕ

Стр.

[Введение 5](#bookmark0)

Глава 1 Обзор литературы 11

1. Состояние проблемы и задачи исследований 11
2. Получение биологически активных добавок на основе

[микроорганизмов 16](#bookmark2)

1. [Структура и биохимический состав дрожжевой клетки 20](#bookmark3)

[1.4Методы трансформации дрожжевой клетки 32](#bookmark4)

1. Физические методы дезинтеграция микробных клеток 34
2. Химические методы дезинтеграции микробных клеток 35
3. Биологические методы деструкции полимеров дрожжевой биомассы 36
4. Автолиз дрожжевых клеток 36
5. Ферментативный гидролиз 40

1.5 Методы получения биологически активных препаратов из микробной

биомассы и исследования их структурно-спектральных свойств 44

1. Электрофоретические методы разделения белка 46
2. Изоэлектрическое фокусирование белков 47
3. Хроматографическое разделение белков 47
4. [Гель-хроматография (гель-фильтрация) 48](#bookmark7)
5. [Аффинная хроматография 49](#bookmark8)
6. [Распределительная хроматография 50](#bookmark9)
7. Масс-спектрометрический анализ белков и пептидов 51

Заключение по обзору литературы 55

Глава 2 Объекты и методы исследований 57

1. Объекты исследования 57
2. Методы исследований 57
3. Исследование влияния физико-механических способов

предобработки дрожжевой биомассы 57

1. Исследование биохимического состава ферментолизатов... 58
2. Методы математического планирования эксперимента и обработка экспериментальных данных 63
3. Структура проведенных исследований 63

Глава 3 Результаты экспериментов и их обсуждение 64

* 1. Исследование различных способов деструкции клеточных стенок для подготовки дрожжевой биомассы к ферментативному влядейстрию ,..64
		1. Изучение влияния ультразвукового излучения на интенсификацию процесса ферментолиза клеточной стенки дрожжей 64
		2. Влияние баротермического воздействия на степень подготовки дрожжевой биомассы к ферментативной деструкции. Исследование влияния баротермического воздействия на степень деструкции клеточных стенок дрожжей (КС) в технологии получения белковых препаратов 69
		3. Влияние баротермического воздействия на эффективность процесса ферментативной деструкции внутриклеточных структур дрожжей 77
	2. Изучение степени деструкции клеточных структур дрожжей Saccharomyces cerevisiae под действием ферментативных систем 85
		1. Влияние длительности процесса ферментолиза на степень деструкции клеточных стенок и внутриклеточных структур дрожжевой биомассы 85
		2. Влияние ферментативных систем с различной субстратной специфичностью на степень деструкции дрожжевой биомассы 92

3.3Изучение степени деструкции клеточных структур с применением электронной и сканирующей микроскопии 95

3.4Научное и экспериментальное обоснование получения функциональных продуктов пищевого и кормового назначения с использованием ферментолизата дрожжевой биомассы 101

Заключение и основные выводы 113

Список сокращений.... „,л, 115

Список литературы 116

Приложения 130

Приложение 1 Технические условия и технологические инструкции на

разработанные продукты 131

Приложение 2 Акт испытаний и наработки опытных партий ферментолизатов 136

Приложение 3 Акт выработки и испытаний в производстве косметических кремов, протокол испытаний их эффективности 139

Приложение 4 Акт выработки и испытаний в производстве шампуней и протокол испытаний их эффективности 143

Приложение 5 Акт испытаний в составе стартового комбикорма для личинок осетровых рыб 148

Приложение 6 Диплом за «Ферментолизат с антиканцерогенными свойствами и специфической цитотоксичностью по отношению к онкоклеткам» 151

**Введение**

В современном мире с быстро растущим населением и недостаточно развитым сельским хозяйством, чрезвычайно важным становится поиск альтернативных источников пищевого белка. Большая часть населения Земли голодает из-за нерационального распределения продовольствия и отсутствия сбалансированного питания. Ученых волнует вопрос, сможет ли уровень развития производства продуктов питания и кормов идти в ногу с темпом роста населения. Данная проблема обусловлена ограниченными сырьевыми ресурсами и сельскохозяйственными угодьями, необходимыми для глобального

продовольственного снабжения и производства.

В последнее время с подобной проблемой столкнулись и в России. Анализ структуры питания населения России свидетельствует о дефиците пищевого белка, который по прогнозам экспертов, сохранится и в ближайшем будущем. В структуре питания россиян стала преобладать углеводная пища, что повлекло за собой острый дефицит таких биологически важных нутриентов, как белки, незаменимые аминокислоты, витамины и минералы. Белки в живых организмах играют очень важную роль, выполняя регуляторные, структурные, каталитические, транспортные, защитные и другие функции. Они обеспечивают обмен веществ организма, в котором участвуют как структурные белки клеток и тканей, так и ферментные и гормональные системы. Белки в организме человека находятся в постоянном обновлении, при котором распад компенсируется ресинтезом из фонда свободных аминокислот, полученных при переваривании пищи.

Эффективность белкового обмена в значительно степени зависит от количественного и качественного состава пищи. Минимально необходимая норма потребления белка - 49г/сутки. При поступлении белков с пищей ниже рекомендуемых норм в организме начинают распадаться белки тканей, а полученные после их распада аминокислоты расходуются на синтез ферментов, гормонов и других жизненно необходимых компонентов. В то же время, клетки

б

организма человека не могут синтезировать необходимые белки, если в составе пищи будет отсутствовать, хотя бы одна незаменимая аминокислота. В итоге в результате неправильного питания понижается сопротивляемость населения неблагоприятным факторам, развиваются хронические заболевания, снижается продолжительность жизни.

Одними из самых перспективных продуцентов белка, аминокислотный скор которого приближается к животному, являются микроорганизмы, особенно таких таксономических групп как: дрожжи, микроскопические грибы,

актиномицеты, одноклеточные водоросли, бактерии. Однако питательная ценность микробной биомассы ограничена малой доступностью содержимого клетки для действия пищеварительных ферментов. Для повышения усвояемости внутриклеточных биологически ценных компонентов разрабатываются различные способы обработки дрожжей, из которых наиболее перспективным является процесс направленной ферментативной деструкции полимеров микробной клетки с целью выделением белковых веществ и получения белково-аминокислотных обогатителей пищи [24, 57, 66, 86].

В связи с вышесказанным следует, что в условиях высокого дефицита пищевого белка, несбалансированности питания основной задачей является поиск перспективных микроорганизмов - источников белковых веществ и разработка эффективного способа конверсии микробной биомассы на основе регулируемого процесса деструкции субклеточных структур для получения

конкурентоспособных биологически полноценных корректоров пищи и кормов с заданными структурно-функциональными свойствами.

Цель и задачи исследования. Основная цель диссертационной работы состояла в совершенствовании биотехнологии белково-аминокислотных корректоров пищи, кормов и биологически активных добавок (БАД), получаемых на основе направленной ферментативной конверсии высокомолекулярных полимеров микробной биомассы, для повышения эффективности производства и получения пищевых добавок с заданными структурно-функциональными свойствами, обеспечивающих повышение качества питания и создание социально значимых функциональных продуктов.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

* проведение мониторинга и сравнительного анализа существующих методов подготовки микробной биомассы к ферментативной деструкции субклеточных структур;
* изучение степени баротермического воздействия на клеточные стенки дрожжей Saccharomyces cerevisiae для выделения белковых веществ;
* исследование влияния баротермического воздействия на эффективность процесса ферментативной деструкции внутриклеточных структур дрожжей;
* проведение спектрального анализа ферментолизатов микробной биомассы в процессе деструкции белковых веществ протоплазмы дрожжевой клетки;
* электронно-микроскопические исследования ферментолизатов дрожжевых клеток Saccharomyces cerevisiae;
* исследование взаимосвязи спектрального состава белковых веществ и функциональных свойств ферментолизатов дрожжевой биомассы;
* проведение испытаний и наработка опытной партии биокорректора пищи;
* научное и экспериментальное обоснование получения функциональных продуктов пищевого и кормового назначения с использованием ферментолизата дрожжевой биомассы.

Научная новизна работы. Получены и научно обоснованы экспериментальные данные в области биокаталитической деструкции полимеров дрожжевой биомассы:

- изучено влияние баротермической обработки дрожжевой биомассы на степень конверсии белково-полисахаридных полимеров клеточных стенок дрожжей;

* установлена зависимость глубины гидролиза субклеточных структур дрожжевой биомассы от параметров предобработки дрожжевой биомассы (давления, температуры, длительности воздействия);
* исследован спектральный состав белковых веществ ферментолизатов дрожжевой биомассы;
* установлено влияние ферментативных систем на степень деструкции белковых веществ дрожжевой клетки;
* определены параметры процесса направленной биокаталитической конверсии субклеточных полимеров дрожжей с получением ферментолизатов с заданным структурно-фракционным составом; :
* установлена взаимосвязь спектрального состава дрожжевых гидролизатов с функциональными свойствами получаемых продуктов.

Практическая значимость. На основе установленных закономерностей баротермической и ферментативной конверсии полимеров микробной клетки усовершенствована технология получения белково-аминокислотных обогатителей пищи и кормов. Разработанная технология позволяет повысить степень деструкции внутриклеточных структур дрожжей и получать добавки целевого назначения с заданными структурно-функциональными свойствами аппаратурно-технологическая схема. На целевые продукты разработана нормативная документация (ТУ 9182-056-00334586-2012 «Белково­аминокислотный биокорректор пищи»; ТИ по производству белково­аминокислотного биокорректора пищи; ТУ 9182-114-00334586-2013 «Кормовая белково-аминокислотная добавка Протамин»; ТИ по производству кормовой белково-аминокислотной добавки Протамин; ТУ 9182-115-00334586­2013 «БАД Суперпротамин»). Проведена наработка опытных партий белково­аминокислотных обогатителей пищи и кормов на ЗАО «Биопрогресс» ВНИТИБП (Московская область, Щелковский район).

Показана перспективность использования продуктов конверсии дрожжевой биомассы, в качестве эффективных добавок повышающих биологическую ценность пищи и кормов. Проведены испытания по использованию ферментолизатов дрожжей для обогащения ферментированных молочных продуктов, косметических изделий и стартовых комбикормов для личинок осетровых рыб, подтвердившие их высокую биологическую эффективность.

Положения, выносимые на защиту:

1. Результаты исследований по влиянию баротермической предобработки дрожжевой биомассы на повышение степени биокаталитического воздействия ферментативных систем на высокомолекулярные полимеры клеточных стенок и протоплазмы клетки.
2. Закономерности направленной ферментативной деструкции дрожжевой биомассы с получением ферментолизатов с заданным фракционным составом белковых веществ.
3. Усовершенствованная технология получения биологически активных добавок (БАД), белково-аминокислотных корректоров пищи и кормов.
4. Спектральный состав целевых добавок и перспектива их применения для повышения биологической ценности продуктов питания и кормов.

Апробация работы. Основные положения работы были представлены на следующих конференциях: Международная конференции «Биология — наука XXI века». Москва, 2012 г; 46-ая Международная научная конференция молодых ученых, докторантов, аспирантов и соискателей ученых степеней доктора и кандидата наук «Эффективность применения средств химизации в современных технологиях возделывания сельскохозяйственных культур. ГНУ ВНИИ агрохимии им. Д.Н. Прянишникова, Москва, 2012 г; Международная конференции «Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана», Мурманск, 2012 г; Всероссийская научно-практическая конференция «Научно­инновационные аспекты при создании продуктов здорового питания», Углич, 2012 г; VII Международный Конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы

развития», Москва, 2013 г; Всероссийская научно-практическая конференция «Пищевые ингредиенты и инновационные технологии в производстве продуктов питания» С.-Петербург, 2013.

Заключение и основные выводы

1. Выявлена эффективность баротермического воздействия на повышение степени проницаемости клеточной стенки дрожжей и разработаны оптимальные условия: температура 50°С, давление 5 МПа, длительность обработки - 30 мин, обеспечивающие увеличение содержания растворимых углеводов в 1,70-1,85 раза и белковых веществ в 1,40-1,55 раза.
2. Установлено, что баротермическая предобработка дрожжевой биомассы способствует повышению степени ферментативной деструкции субклеточных структур, что выразилось в увеличении выхода растворимых белковых - на 40­43% и редуцирующих веществ на 126-130%, по сравнению с контрольным вариантом (термолиз).
3. Установлена эффективность применения комплексной обработки дрожжевой биомассы, включающая предварительную обработку давлением и процесс ферментолиза подобранными ферментативными комплексами, состоящими из протеолитических и глюканолитических гидролаз.
4. Исследованы закономерности биокатализа полимеров микробной биомассы и выявлена взаимосвязь субстратной специфичности ферментов, используемых в качестве катализаторов, и степени биодеструкции внутриклеточных полимеров дрожжевой биомассы.
5. Исследован спектральный состав белковых веществ и показано наличие заменимых и незаменимых аминокислот и биологически активных пептидов в ферментолизатах дрожжей, способных выполнять важнейшие нейромедиаторные и др. функции, обеспечивающие функциональные свойства целевых продуктов
6. С помощью электронной микроскопии проиллюстрировано влияние ферментативных систем различной субстратной специфичности на степень деструкции субклеточных структур дрожжей, подтверждающее эффективное действие ферментов, катализирующих биодеструкцию клеточных стенок и белковых веществ дрожжевой биомассы.
7. Разработана усовершенствованная технология получения биологически активных добавок, биокорректоров пищи и кормов, обеспечивающая направленный процесс биокаталитической деструкции полимеров дрожжевой биомассы с получением ферментолизщатов с заданным структурно­фракционным составом.
8. Проведены производственные испытания и наработаны опытные партии биокорректоров пищи и кормов, функциональные свойства и биологическая эффективность которых исследована при создании новых ферментированных молочных продуктов, косметических изделий и стартовых комбикормов для личинок осетровых рыб.

**Список сокращений:**

КС - клеточные стенки

ФП - ферментные препараты

ФС - ферментативная система

р-ГкС - р-глюканазная способность

ПС— протеолитическая способность

ГПС - комплекс грибных протеиназ и пептидаз

КФПА - комплексный ферментный препарат ( р-глюканазы, грибные протеиназы и пептидазы)

РСВ - растворимые сухие вещества РВ - редуцирующие вещества ММ - молекулярная масса

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| гли- | Глицин | ТРП- | Триптофан |
| AJIA- | Аланин | СЕР- | Серин |
| ВАЛ- | Валин | ТРЕ- | Треонин |
| ЛЕЙ- | Лейцин | АСП- | Аспарагиновая кислота |
| ИЛЕ- | Изолейцин | ГЛУ- | Глутаминовая кислота |
| ПРО- | Пролин | АСН- | Аспарагин |
| ФЕН- | Фенилаланин | ГЛН- | Глутамин |
| ТИР- | Тирозин | ЦИС- | Цистеин |

Список литературы

1. Александров, М.Л. Прямая стыковка микроколоночного жидкостного хроматографа с массспектрометром / М.Л. Александров, Л.Н. Галль, Н.В. Краснов, В.И. Николаев, В.А. Павленко, В.А. Шкуров, Г.И. Барам, М.А. Грачев, В.Д. Кнорре, Ю.С. Куснер // Биоорганическая химия 198410, С.710- 712
2. Артеменко, К.А. Масс-спектрометрическое de novo секвенирование пептидов / К.А. Артеменко, Т.Ю. Самгина, А.Т. Лебедев // Масс- спектрометрия,- 2006.- №3.- С. 225-255
3. Бабаян, Т.Л. Выделение физиологически активного маннана и других полисахаридов из автолизатов пекарских дрожжей./ Т.Л. Бабаян, В.К. Лат’бв4\*' 5 //Биотехнология.- 1992.- №2.-С.23-26
4. Базлов, Г.В. Совершенствование технологии получения экстракта автолизата пекарских дрожжей. / Г.В. Базлов, А.В. Комиссаров, Е.К. Никифоров, М.В. Антонычева, А.Д. Белоусов // Вестник Саратовского госагроуниверситета им. Н.И. Вавилова. Саратов, 2012.- №1.- С.11-14
5. Безрукова, М.Г. Использование биомассы микроорганизмов для пищевых целей./ М.Г. Безрукова, Н.Б. Градова // Сб. науч. Трудов Институт биохимии и физиологии микроорганизмов АНСССР.- Пущино.- 1985.- С.119
6. Беликов, В.М. Пластеины, их получение, свойства и применение в питании /

В.М. Беликов, М.Ю. Гололобов // Die Nahrung. 1986. V. 26. № 3-4.- Р.427- 433.

1. Беликов, В.М. Аминокислотный состав препаратов из автолизатов пекарских дрожжей./ В.М. Беликов, С.В. Гордиенко, В.К. Латов, В.А. Цыряпкин, В.В. Андрианов, Г.И. Бернова, А.Д. Неклюдов //Прикладная биохимия и микробиология, 1978.- 14.- №1.- С.60.
2. Беликов, В.М.. Биомасса дрожжей как источник аминокислот./ В.М. Беликов, В.К. Латов, В.А. Цыряпкин, В.А. Сергеев // Микробиол. пр-сть.- 1976.- т.З (134).- С.6.