**Иванова Ирина Сергеевна. Разработка технологии биологически активной добавки к пище в виде белково-углеводного концентрата из биомассы хлебопекарных дрожжей : Дис. ... канд. техн. наук : 05.18.10 Москва, 2003 250 с. РГБ ОД, 61:03-5/2855-6**

**МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ПИЩЕВЫХ ПРОИЗВОДСТВ**

на правах рукописи

**ИВАНОВА ИРИНА СЕРГЕЕВНА**

**РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНОЙ ДОБАВКИ К ПИЩЕ В ВИДЕ БЕЛКОВО-УГЛЕВОДНОГО КОНЦЕНТРАТА ИЗ БИОМАССЫ ХЛЕБОПЕКАРНЫХ ДРОЖЖЕЙ**

**Специальность 05.18.10** - Технология чая, табака, биологически активных веществ и субтропических культур

**ДИССЕРТАЦИЯ на соискание ученой степени кандидата технических наук**

**НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ**

доктор технических наук, профессор **Л. А. Иванова**

Москва - 2003

**СОКРАЩЕНИЯ**

1. АСБ - абсолютно сухая биомасса
2. АСВ - абсолютно сухое вещество
3. АСД - абсолютно сухие дрожжи
4. ACM - абсолютно сухая масса
5. БАД - биологически активная(-ые) добавка(-и)
6. БМ - биомасса
7. ВС - водосвязывающая способность
8. ДСД - допустимая суточная доза
9. ДСП - допустимая суточная потребность
10. ЖСС - жиросвязывающая способность 11 .ММ - молекулярная масса

12.НК - нуклеиновые кислоты 13.ОЛА - общая литическая активность

1. РВ - редуцирующие вещества
2. СВ - сухие вещества
3. ТСХ - тонкослойная хроматография 17.ЧК - чистая культура

18.W - влажность

з

**СОДЕРЖАНИЕ**

[ВВЕДЕНИЕ 7](#bookmark3)

[ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ... 13](#bookmark4)

1. Общее состояние проблемы обеспечения населения

пищевым белком 13

1. [Основные критерии качества пищевого белка 19](#bookmark6)
2. [Понятие биологической ценности белков 19](#bookmark7)
3. [Функциональные свойства белков 21](#bookmark8)
4. [Безвредность белка для организма человека 23](#bookmark9)
5. [Дрожжи как источник пищевого белка 25](#bookmark10)
6. Технологические особенности получения

хлебопекарных дрожжей 32

1. Особенности строения дрожжевой клетки и классификация дрожжей. Расы дрожжей, используемые

в хлебопекарной промышленности ' 33

1. Влияние условий культивирования на

метаболизм дрожжей 39

1. [Принципы составления питательных сред 42](#bookmark14)
2. [Стимуляторы роста биомассы микроорганизмов 52](#bookmark15)
3. Применение дрожжевых белковых препаратов

в пищевой промышленности 59

1. 6.1. Применение пищевых добавок

в хлебопекарной промышленности 63

ГЛАВА II. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ 71

II. 1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ 71

ГІ. 1.1. Материалы исследований 71

1. 1.2. Определение содержания редуцирующих

веществ в мелассном сусле, исходных

дрожжах и белково-углеводных концентратах 75

II. 1.3. Определение содержания "сырого протеина" и белка

в дрожжах и белково-углеводных концентратах 76

II. 1.4. Определение pH растворов 76

[II. 1.5. Определение содержания сухих веществ 77](#bookmark18)

1. Определение выхода абсолютно

сухой биомассы дрожжей 77

1. [Подсчет числа клеток дрожжей 77](#bookmark20)

II. 1.8. Постановка экспериментов по выращиванию

хлебопекарных дрожжей 77

II. 1.9. Определение нуклеиновых кислот в дрожжах

и белково-углеводных концентратах 78

II. 1.10. Экстракция липидов из биомассы дрожжей, определение содержания общих липидов

и группового состава экстрагированных липидов 78

[II. 1.11. Денуклеинизация биомассы дрожжей 79](#bookmark24)

[II. 1.12. Определение молекулярной массы белка 80](#bookmark25)

[II. 1.13. Определение функциональных свойств белков 81](#bookmark26)

II. 1.14. Определение сорбционной способности

белково-углеводных концентратов по отношению к различным микроорганизмам 83

[II. 1.15. Определение аминокислотного состава белка 83](#bookmark28)

1. 1.16. Определение содержания ионов тяжелых металлов в белково-углеводном концентрате и его

сорбционной способности по отношению к металлам 84

11.1.17. Методика изготовления хлеба и оценка его качества

с учетом весомости основных показателей 84

П.2. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ 87

1. Выбор наиболее продуктивного штамма

хлебопекарных дрожжей 87

1. Определение оптимального состава питательной среды для выращивания дрожжей Saccharomyces

cerevisiae J1K-14 в лабораторных условиях 89

1. Определение оптимальной концентрации сухих веществ питательной среды при выращивании

биомассы хлебопекарных дрожжей 91

1. Влияние концентрации азота в среде на выход биомассы дрожжей S. cerevisiae

[ЛК-14 и содержание в ней "сырого протеина" 92](#bookmark33)

1. Влияние концентрации фосфора в среде на выход биомассы дрожжей S. cerevisiae

ЛК-14 и содержание в ней "сырого протеина" 94

1. Влияние стимулятора полифенольной природы Гипоксена на рост и накопление биомассы

дрожжами Saccharomyces cerevisiae JIK-14 96

1. Определение оптимальной концентрации Гипоксена при выращивании хлебопекарных дрожжей

S. cerevisiae ЛК-14 в лабораторных условиях в колбах объемом 750 см3 97

1. [Определение оптимального момента внесения стимулятора в питательную среду в процессе культивирования хлебопекарных дрожжей 99](#bookmark37)
2. [Влияние возраста посевного материала на выход биомассы дрожжей S. cerevisiae ЛК-14 при использовании стимулятора роста Г ипоксена 100](#bookmark38)
3. Влияние порционного введения стимулятора Г ипоксена в питательную среду

на увеличение выхода АСБ дрожжей 103

1. Изучение влияния стимулятора Г ипоксена на динамику накопления клеток дрожжей

S. cerevisiae ЛК-14 в лабораторном ферментере 105

1. Изучение влияния стимулятора Гипоксена

на динамику накопления клеток дрожжей S. cerevisiae ЛК-14 в опытно-промышленном ферментере 108

1. Разработка основ технологии

белково-углеводного концентрата 112

1. [Экстракция липидов из биомассы дрожжей 113](#bookmark43)
2. Денуклеинизация обезжиренной дрожжевой биомассы 120
3. Обработка дрожжевой биомассы ферментами литического действия и их влияние на

экстрагируемость внутриклеточных компонентов 129

1. Определение молекулярной массы белков в

полученных белково-углеводных концентратах 138

П.2.6. Определение аминокислотного состава белков белково-углеводных концентратов

и их пищевой ценности 141

1. Определение сорбционной способности

белково-углеводных концентратов из хлебопекарных дрожжей по отношению к патогенным и

условно-патогенным микроорганизмам 146

1. Исследование белково-углеводных концентратов на

содержание тяжелых металлов и способность к деметаллизации 149

1. Функциональные свойства

белково-углеводных концентратов 156

1. Изучение возможности применения полученных белково-углеводных концентратов

в хлебопекарной промышленности 161

[ВЫВОДЫ 172](#bookmark57)

[СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 175](#bookmark58)

198

ПРИЛОЖЕНИЯ

**ВВЕДЕНИЕ**

**Актуальность темы.** В настоящее время потребность населения нашей планеты в продуктах питания полностью не удовлетворяется. Проблема ос­ложняется неравномерностью распределения как производства, так и потреб­ления продовольствия между отдельными регионами, государствами и груп­пами населения. Особенно остро ощущается дефицит пищевого белка, кото­рый оценивается в 10-25 млн. т/год и в ближайшее время, вероятно, сохра­нится.

Потребность человека в белке может быть частично удовлетворена с помощью растительных и животных белков. Однако общим для них является недостаток отдельных аминокислот, таких как лизин, триптофан, метионин, изолейцин, тирозин. Кроме того, в связи с возрастанием интереса потребите­ля к здоровому образу жизни, в развитых странах наблюдается снижение спроса на мясо и повышение спроса на низкокалорийные, протеиновые про­дукты с низким содержанием холестерина.

Одним из перспективных путей получения белковых веществ является микробный синтез - это реальное решение проблемы снятия дефицита белка в пище и кормах. Широкие исследования проводились и проводятся в раз­личных странах по получению и применению в пищевых целях облагоро­женной биомассы микроорганизмов. В этом отношении наиболее исследо­ванными микробиологическими объектами являются дрожжи, которые со­держат 40-55 % белка и усваиваются организмом человека на 85-88 %, зани­мая по этому показателю промежуточное положение между белками расти­тельного и животного происхождения. Белок дрожжей обычно беден метио­нином и цистеином, но богат лизином и треонином.

Белковые добавки производят в виде трех основных типов продуктов, которые различаются по содержанию белка (около 50, 60-65, 80 % и выше) и его фракционному составу. К первому типу продуктов с содержанием около 50 % белка относят дезинтеграт биомассы дрожжей. Ко второму типу про­дуктов - концентраты из биомассы микроорганизмов с содержанием белка

60-65 %. Изоляты, содержащие 80 % и более белка, - наиболее дорогой и безопасный тип белковых продуктов на основе микробной биомассы.

Дрожжевая клетка содержит ряд нежелательных компонентов, главны­ми из которых являются липиды и нуклеиновые кислоты. При получении очищенных белковых препаратов необходимо удалять реакционноспособные и легко окисляемые липиды, т.к. взаимодействие продуктов окисления липи­дов и белков приводит к падению питательно-физиологических показателей препарата. Кроме того, липиды микроорганизмов отличаются по химическо­му составу от липидов традиционных продуктов питания растительного и животного происхождения и, как показали медико-биологические испыта­ния, могут проявлять токсичность.

Полученный дрожжевой белок должен быть очищен и от нуклеиновых кислот, что определяется специфическими особенностями пуринового обме­на человека и выделением основной массы продуктов трансформации в виде пуриновых оснований. Трудная растворимость уратов и способность солей мочевой кислоты откладываться в тканях организма, делают их накопление во внутренних органах весьма нежелательным.

Практически все натуральные пищевые продукты не являются сбалан­сированными, так как не содержат незаменимых нутриентов в необходимых количествах и соотношениях. В связи с этим одна из острейших проблем со­временности - "расстройство питания", под которым понимают патологиче­ские состояния, вызванные несбалансированным питанием. Поэтому адек­ватный рацион питания должен включать достаточно большое количество пищевых и биологически активных веществ.

По прогнозам специалистов, в питании людей все возрастающую роль будут играть биологически активные добавки, основу которых составляют биологически активные вещества.

В классификации, представленной в Дополнениях к "Медико­биологическим требованиям и санитарным нормам качества продовольст­венного сырья и пищевых продуктов", концентраты и изоляты белка относят­ся к группе БАД, которые являются нутрицевтиками и применяются для кор­рекции химического состава пищи (Тихомирова Н. А., 2002).

В связи с вышеизложенным, разработка новых научно-обоснованных технологий биологически активных добавок, полученных из биомассы мик­роорганизмов и обладающих органолептическими и функциональными свой­ствами, позволяющими использовать их в пищевой промышленности, явля­ется актуальной и перспективной.

**Цель и задачи исследования.** Основная цель диссертационной работы состояла в разработке научных основ технологии БАД к пище из биомассы хлебопекарных дрожжей, теоретическом и экспериментальном обосновании целесообразности использования полученной БАД в хлебопекарной и пище- концентратной промышленности в качестве нутрицевтика и парафармацев­тика. Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

* поиск наиболее продуктивного по биомассе и белку штамма хлебопекар­ных дрожжей Saccharomyces cerevisiae;
* подбор оптимального состава питательной среды для максимального на­копления биомассы и белка выбранным штаммом дрожжей;
* исследование влияния стимулятора полифенольной природы Г ипоксена на рост и накопление биомассы и белка дрожжами Saccharomyces cerevisiae;
* подбор оптимальных условий экстракции внутриклеточных компонентов дрожжей, таких как липиды и нуклеиновые кислоты, после ферментолиза малой степени конверсии, с сохранением нативного аминокислотного со­става белка дрожжей;
* определение биологической ценности полученных белково-углеводных концентратов и проверка их токсичности;
* исследование сорбционной способности полученных белково-углеводных концентратов к патогенной и условно-патогенной желудочно-кишечной микрофлоре с позиции возможного их использования в хлебобулочных из­делиях диетического и лечебно-профилактического назначения;
* изучение наиболее важных функциональных свойств полученных БАД с целью их использования в хлебопекарной промышленности;
* исследование влияния БАД из хлебопекарных дрожжей на свойства и ка­чество хлебобулочных изделий.

**Научная новизна работы.** Для экспериментального и теоретического

обоснования нового биотехнологического способа получения БАД к пище в

виде белково-углеводного концентрата из биомассы хлебопекарных дрожжей

на основе выбора технологических условий, было произведено следующее:

* впервые исследовано влияние стимулятора полифенольной природы Ги- поксена на рост и развитие дрожжей Saccharomyces cerevisiae ЛК-14, опре­делены параметры его внесения в питательные среды для выращивания дрожжевой биомассы;
* подобраны оптимальные условия частичного ферментативного гидролиза биополимеров клеточных стенок дрожжей отечественными ферментными препаратами, впервые использованными с этой целью, установлены зави­симости остаточного содержания липидов и нуклеиновых кислот от усло­вий очистки дрожжевой биомассы;
* подтверждена биологическая ценность полученных БАД на основе анали­за аминокислотного состава их белков и расчета аминокислотного скора незаменимых аминокислот;
* впервые исследована сорбционная способность белково-углеводных кон­центратов из дрожжей по отношению к патогенной, условно-патогенной микрофлоре кишечника *и* тяжелым металлам, позволившая обосновать их лечебно-профилактические свойства;
* определено содержание тяжелых токсичных металлов в БАДах из дрож­жевой биомассы, показавшее их безвредность;
* впервые полученные зависимости функциональных свойств белково­углеводных концентратов из дрожжей от физико-химических факторов по­зволили дать научное обоснование и рекомендации по их использованию в хлебопекарной промышленности и при введении в концентраты для полу­чения пищевых продуктов, обладающих повышенной питательной ценно­стью и лечебно-профилактическими свойствами

**Практическая значимость и реализация результатов работы.** Про­веденные исследования явились основой для решения задачи по созданию новой экономичной биотехнологии БАД из биомассы хлебопекарных дрож­жей.

В результате лабораторного и полупроизводственного изучения влия­ния стимулятора Гипоксена на рост биомассы и накопление белка дрожжами Saccharomyces cerevisiae при подобранном оптимальном составе питательной мелассно-солевой среды разработан способ выращивания хлебопекарных дрожжей с повышенным содержанием белка, позволяющий увеличить выход биомассы на 10,31 %. Опытная партия дрожжей наработана на полупромыш­ленной установке в условиях ЗАО «МАСТЕРЛЕК».

Разработана и экспериментально обоснована технология получения из дрожжей порошкообразного белково-углеводного концентрата с понижен­ным содержанием липидов и нуклеиновых кислот. Доказана его высокая биологическая ценность, определяемая содержанием белка со сбалансиро­ванным аминокислотным составом, показана сорбционная способность по отношению к тяжелым металлам, патогенной и условно-патогенной желу­дочно-кишечной микрофлоре человека. На основании изучения его функ­циональных свойств, - растворимости, водо- и жироудерживающей способ­ности, - дано обоснование целесообразности его введения в рецептуры хле­бобулочных изделий и пищеконцентратов диетического и лечебно­профилактического назначения. В производственных условиях секции хлеб­ных технологий МГУПП проведена апробация способа приготовления хлеба с добавлением белково-углеводного концентрата в качестве БАД, повышаю­щей питательную ценность хлебобулочных изделий и оказывающей норма­лизирующее действие на состав микрофлоры пищеварительного тракта. Да­ны рекомендации по повышению биологической ценности концентратов вто­рых блюд и круп и приданию им лечебно-профилактических свойств в ре­зультате замены части крупы и муки, входящих в рецептуру, на белково­углеводный концентрат.

Разработана нормативная документация на способ получения БАД из дрожжей для хлебопекарной промышленности. Подана заявка на выдачу па­тента РФ на способ производства биологически активной добавки (заявка № 2002132035, приоритет от 28.11.2002).

Разработанная технология получения биологически активной добавки к пище в виде белково-углеводного концентрата из биомассы хлебопекарных дрожжей излагается в дисциплине "Технология белковых и биологически ак­тивных веществ" учебного плана специальности 070100 Биотехнология.

**Апробация работы.** Основные положения работы докладывались на российских и международных конференциях и конгрессах: Международной конференции молодых ученых "Химия и биотехнология пищевых веществ. Экологически безопасные технологии на основе возобновляемых природных ресурсов" (Москва, 2000 г.); научно-технической конференции "Молодые ученые пищевым и перерабатывающим отраслям АПК (технологические ас­пекты производства)" (Москва, 2000 г.); научно-технической конференции "Биотехнология - народному хозяйству 2000" (Москва, 2000 г.); Междуна­родной конференции молодых ученых "Химия и биотехнология биологиче­ски активных веществ, пищевых продуктов и добавок. Экологически безо­пасные технологии" (Москва-Тверь, 2001 г.); Международной научно­практической конференции "Пищевые продукты XXI века" (Москва, 2001 г.); Всероссийской заочной конференции "Катализ в биотехнологии, химии и химических технологиях" (Тверь, 2002 г.); Международном конгрессе "Биотехнология - состояние и перспективы развития" (Москва, 2002 г.); Все­российской научно-технической конференции-выставке "Качество и безопас­ность продовольственного сырья и продуктов питания" (Москва, 2002 г.).

ВЫВОДЫ

1. Для разработки технологии БАД в виде белково-углеводного концентрата из биомассы хлебопекарных дрожжей на основании сравнительного исследова­ния продуктивности промышленных штаммов S. cerevisiae был выбран штамм ЛК-14, накапливающий в биомассе до 54,0 % "сырого протеина" при выращивании на мелассно-солевой среде оптимизированного состава.
2. Установлено положительное влияние стимулятора полифенольной природы Гипоксена на выход биомассы хлебопекарных дрожжей S. cerevisiae и определены условия его введения в культуральную жидкость, позволившие увеличить выход АСБ на 10,31 % за счет пролонгирования экспоненциаль­ной фазы роста.
3. Дано научное обоснование разработанной новой технологии биологически активных добавок в виде белково-углеводных концентратов с пониженным содержанием липидов (1,65-2,18 %) и нуклеиновых кислот (2,35-2,38 %), включающей следующие стадии: обработку биомассы хлебопекарных дрож­жей ферментными препаратами литического действия для увеличения про­ницаемости клеточных стенок; экстракцию липидов водным раствором эта­нола; денуклеинизацию обезжиренной биомассы под действием собственных эндонуклеаз клетки; сушку и измельчение продукта.
4. Получены новые биологически активные добавки к пище в виде:

* белково-углеводного концентрата из биомассы хлебопекарных дрожжей, не обработанной ферментными препаратами, имеющего состав: белок - 57,5 %, липиды - 2,18 %, нуклеиновые кислоты - 2,38 %, углеводы - 21,0 %, зольность - 6,59 %;
* белково-углеводных концентратов из биомассы хлебопекарных дрожжей, предобработанной ферментными препаратами литического действия, имеющих состав: белок - 60,5-61,5 %, липиды - 1,65-1,68 %, нуклеино­

вые кислоты - 2,35-2,37 %, углеводы - 20,0-20,5 %, зольность - 5,20-5,22 %.

1. Изучены массово-молекулярные характеристики полученных белково­углеводных концентратов; показано, что они содержат 60-64 *%* глобулино- вой фракции белка с молекулярной массой 98000-100000 Да и 22-25 % аль­буминовой фракции с молекулярной массой 21500-21800 Да. Отсутствие низкомолекулярных фракций белка (с молекулярной массой менее 2000 Да) дало основание считать возможным применение этих концентратов в качест­ве биологически активных добавок к пище.
2. Экспериментально доказано, что полученные белково-углеводные концен­траты обладают лечебно-профилактическими свойствами благодаря способ­ности сорбировать и выводить из организма тяжелые металлы, патогенные и условно-патогенные бактерии за счет сохраненных биополимеров (глюканов и маннанов) клеточных стенок дрожжей.
3. Теоретически обоснована и практически доказана возможность использова­ния белково-углеводных концентратов с пониженным содержанием липидов и нуклеиновых кислот в качестве БАД, повышающих питательную ценность хлебобулочных изделий и придающих им лечебно-профилактические свой­ства. Замена 5 % пшеничной муки высшего сорта белково-углеводными кон­центратами в рецептурах хлебобулочных изделий приводит к повышению биологической ценности выпеченного хлеба за счет увеличения содержания белка на 24,13-25,82 %, незаменимых аминокислот, за исключением лизина, - на 22-50 %.
4. Исследованные функциональные свойства полученных белково-углеводных концентратов позволяют рекомендовать их для введения в рецептуры пище­вых концентратов вторых блюд вместо муки зерновых культур, что позволит повысить их пищевую ценность на 37,4-42,3 % в зависимости от состава ре­цепта, улучшить аминокислотный скор незаменимых аминокислот и придать этим продуктам лечебно-профилактические свойства.
5. Предложена технологическая схема производства БАД в виде белково­углеводного концентрата из биомассы хлебопекарных дрожжей, а также раз­работано ее аппаратурное оформление.

Ю.Проведенный расчет экономической эффективности разработанной техноло­гии белково-углеводных концентратов и применения их в хлебопекарной промышленности показал, что стоимость хлебобулочных изделий массой 400 г, выпеченных с заменой 5 % пшеничной муки высшего сорта белково- угле­водным концентратом, в розничной торговле на 0,84-0,88 руб. выше, чем из­делий, выпеченных по традиционной технологии. Однако новые хлебобу­лочные изделия могут быть рекомендованы для использования в качестве диетических и лечебно-профилактических продуктов питания, что позволяет судить о технологической и экономической эффективности предложенного способа их изготовления.