Серба Елена Михайловна. Разработка биотехнологического процесса ферментативного гидролиза дрожжевой биомассы с целью получения биологически активных добавок : Дис. ... канд. техн. наук : 05.18.07 Москва, 2005 175 с. РГБ ОД, 61:06-5/303

ГОСУДАРСТВЕННОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ПИЩЕВОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ (РАСХН)

На правах рукописи

**Серба Елена Михайловна**

**Разработка биотехнологического процесса ферментативного гидролиза дрожжевой биомассы с целью получения биологически активных добавок**

Специальность 05.18.07 - Биотехнология пищевых продуктов

(по отраслям)

Диссертация на соискание ученой степени кандидата технических наук

**Научный руководитель:**

доктор технических наук, профессор, член-корр. РАСХН, лауреат премии Правительства РФ Поляков Виктор Антонович

Москва - 2005

Содержание

[Введение 5](#bookmark1)

1 Обзор литературы 8

1. Экспериментальная часть 59
	1. Материалы и методы исследований 59
		1. [Объекты исследований 59](#bookmark10)
		2. Методы исследований 60
			1. [Культивирование микроорганизмов 60](#bookmark11)
			2. [Определение ферментативной активности 61](#bookmark12)
			3. [Изучение зависимости протеолитической и амилолитической активностей от pH и температуры 63](#bookmark18)
			4. [Изучение степени гидролиза белковых субстратов 63](#bookmark19)

[**2.2 Результаты экспериментов и их обсуждение 65**](#bookmark20)

1. [Скрининг эффективной ферментативной системы для гидролиза дрожжевой биомассы 65](#bookmark21)
2. [Сравнительная характеристика микробных протеаз различного происхождения по степени гидролиза белковых субстратов 65](#bookmark22)
3. [Скрининг активных продуцентов комплекса ферментов протеолитического и р-глюканазного действия 65](#bookmark23)
4. Получение комплексного ферментного препарата КФПА

протеолитического и Р-глюканазного действия 74

1. Влияние ферментативного комплекса Aspergillus oryzae 387-4-1

на степень гидролиза биополимеров дрожжевой биомассы 82

1. [Влияние индивидуальных ферментов грибного протеолитического комплекса на степень гидролиза дрожжевого белка 83](#bookmark26)
2. [Исследование оптимальных условий ферментативного гидролиза дрожжевой биомассы ферментами гриба Aspergillus oryzae 85](#bookmark27)
3. Подбор оптимальной мультиэнзимной композиции для эффективного гидролиза дрожжевой биомассы 92

з

2.2.2.4 Гидролиз дрожжевой биомассы различного происхождения

побранным ферментативным комплексом 96

1. [Исследование процесса и разработка технологических параметров энзиматического гидролиза дрожжевой биомассы амилопротооризином КФПА 98](#bookmark28)
2. [Исследование влияния физико-химических методов обработки дрожжевой биомассы на эффективность процесса гидролиза полимеров клетки 98](#bookmark29)
3. [Разработка технологического процесса гидролиза дрожжевой биомассы подобранным ферментативным комплексом 106](#bookmark30)
4. [Производственные испытания разработанного процесса ферментативного гидролиза дрожжевой биомассы 110](#bookmark31)
5. [Получение получение пищевой добавки «Протамина» - белково­аминокислотного обогатителя и БАД «Суперпротамин» на основе регулируемого процесса биокатализа дрожжевой биомассы 114](#bookmark32)
6. [Биохимические и санитарно-гигиенические исследования белково­аминокислотного обогатителя - ферментолизата дрожжевой биомассы «Протамина» пищевого 118](#bookmark33)
7. [Клинические испытания БАД «Суперпротамин» 122](#bookmark34)
8. Исследования и испытания эффективности применения

ферментолизатов дрожжевой биомассы в различных производствах 125

1. Применение пищевой добавки - гидролизата дрожжевого

«ПРОТАМИН» в хлебопечении 127

1. Использование ПРОТАМИНА в ликероводочном производстве... 128
2. Использование ПРОТАМИНА при производстве сухих завтраков.. 129
3. Применение Протамина в косметологии 129
4. Использование Протамина для генерации дрожжей в спиртовом производстве 130
5. Применение Протамина для повышения биологической полноценности сухого корма для собак с нормальной активностью 130
6. Вывод ы
7. Список литературы
8. Приложение

**Введение**

В настоящее время в структуре питания населения России преобладает углеводная пища при остром дефиците белка, пищевых волокон, незаменимых аминокислот, витаминов, микроэлементов и других биологически важных нутриентов. Только половина населения России обеспечена минимально необходимой нормой потребления белков (49 г/сутки). Мировой дефицит белка составляет около 15 млн тонн. Особенно остро ощущается недостаток животного белка, отличающегося высокой биологической ценностью. В результате неправильного питания понижается резистентность населения к неблагоприятным факторам, развиваются заболевания, сокращается продолжительность жизни.

Поэтому одним из актуальных и перспективных направлений в решении проблемы коррекции питания для поддержания адаптивно­компенсаторных механизмов организма человека является использование пищевых белково-аминокислотных добавок, способствующих повышению биологической полноценности продуктов питания, созданию сбалансированных продуктов и напитков функционального назначения.

Дрожжевая биомасса является полноценным источником белковых веществ, аминокислотный скор которых приближается к животному белку, особенно по содержанию лизина. Кроме того, наличие витаминов, ценных полисахаридов и микроэлементов позволяет рассматривать микроорганизмы, как перспективные субстраты для получения биологически активных добавок.

Питательная ценность дрожжевой биомассы ограничена низкой доступностью внутриклеточных биополимеров для действия пищеварительных ферментов. Для полноценного усвоения этого субстрата необходимо разрушить клеточные стенки дрожжей и перевести все содержащиеся в них биологически ценные высокомолекулярные полимеры в растворимые легко усвояемые соединения.

Одним из наиболее применяемых способов переработки клеточной биомассы является метод автолиза. Однако этот метод недостаточно эффективен, энергоемок, так как требует проведения длительного процесса. Состав автолизатов полностью зависит от качества и физиологической активности используемых дрожжевых клеток. Вместе с тем известно о способности различных ферментативных систем разрушать клеточные стенки микроорганизмов.

В связи с этим, проблема подбора активной мультиэнзимной системы, обеспечивающей интенсивный и глубокий гидролиз высокомолекулярных полимеров микробной биомассы, и создание эффективного биотехнологического процесса получения конкурентоспособных пищевых белково-аминокислотных добавок, весьма актуальна и перспективна. Реализация этого направления исследований позволит повысить удельный вес наукоемкой отечественной продукции на мировом рынке, произвести импортозамещение на отечественном рынке, т.к. высокая цена биопрепаратов и добавок ограничивает их широкое применение в пищевой промышленности России.

**Цель и задачи исследования.** Основная цель диссертационной работы состояла в разработке научных основ биотехнологии белково­аминокислотных обогатителей и биологически активных добавок (БАД) на основе энзиматического гидролиза высокомолекулярных полимеров дрожжевой биомассы, теоретическом и экспериментальном обосновании целесообразности использования полученных препаратов для повышения качества питания.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

• провести анализ и исследовать биохимическую характеристику и гидролитическую способность ферментных препаратов различного спектра действия по отношению к структурным полимерам дрожжевой клетки;

* обосновать необходимость использования комплекса ферментов и осуществить скрининг эффективной ферментативной системы, гидролизующей белковые вещества и полисахариды дрожжевых клеток;
* исследовать влияние ферментативного комплекса на процессы гидролиза биополимеров дрожжевой биомассы;
* исследовать влияние индивидуальных ферментов протеолитического комплекса на степень гидролиза дрожжевого белка;
* разработать оптимальные условия и мультиэнзимную систему для направленного ферментативного гидролиза дрожжевой биомассы;

 разработать и испытать в производственных условиях биотехнологический процесс ферментолиза дрожжевой биомассы с получением биологически активных добавок со специальными свойствами.

**ВЫВОД Ы:**

1. Проведены сравнительные исследования гидролитической способности ферментных препаратов различного спектра действия по отношению к структурным полимерам дрожжевой клетки и осуществлен скрининг наиболее перспективных.
2. Теоретически и экспериментально обоснован состав комплекса ферментов протеолитического и р-глюканазного действия, необходимых для эффективного гидролиза белковых веществ и полисахаридов дрожжевых клеток.
3. Осуществлен скрининг активных продуцентов комплекса ферментов протеолитического и р-глюканазного действия и получен комплексный ферментный препарат КФПА, содержащий активные протеиназы, пептидазы и |3-глюканазы. Показана способность КФПА к глубокому гидролизу дрожжевой биомассы.
4. Исследовано влияние ферментов комплекса на степень гидролиза высокомолекулярных биополимеров дрожжевой биомассы.

Впервые установлено влияние индивидуальных ферментов протеолитического комплекса на эффективность гидролиза дрожжевого белка: выявлена высокая гидролитическая способность пептидаз комплекса, а также синергизм действия аминопептидазы, карбоксипептидазы, карбоксильной и сериновой протеиназ.

Установлена зависимость степени гидролиза белковых веществ протоплазмы дрожжей и полисахаридов клеточных стенок от концентрации вводимых протеаз и (3-глюканаз.

1. Разработаны оптимальные условия и дозировки мультиэнзимной системы для осуществления регулируемого целенаправленного ферментативного гидролиза дрожжевой биомассы: 7-10 ед ПС, 10 ед (3-ГкС; 50° С, 4-12 ч в зависимости от планируемых свойств получаемых ферментолизатов.
2. На моделях дрожжей Saccharomyces cerevisiae и S. carlsbergensis разработана и испытана в производственных условиях гибкая биотехнологическая схема энзиматического гидролиза дрожжевой биомассы с получением биологически активных добавок функционального назначения со специальными свойствами, позволяющая по сравнению с существующей технологией автолиза дрожжей:
* интенсифицировать процесс гидролиза дрожжевой биомассы в 4-5 раз;
* повысить степень гидролиза белка на 15-23%;
* в 2-3 раза увеличить содержание аминного азота и свободных аминокислот;
* получать биологически активные пищевые добавки с различными функциональными свойствами.
1. Полученные пищевые и биологически активные добавки конкурентоспособны по отношению к лучшим зарубежным аналогам; импортозамещение позволит экономить 0,5 млн рублей с 1 тонны продукта.
2. Наработаны опытные партии пищевых добавок и БАД, исследованы их функциональные свойства; разработана нормативная документация и рецептуры новых биологически полноценных продуктов и лечебно­профилактических средств.

Теоретически и экспериментально обоснована целесообразность использования полученных препаратов в качестве БАД иммуномодулирующего действия и для повышения биологической полноценности продуктов питания, напитков и кормов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авакянц С.П., Шакарова Ф.И., Сергеева А.М. Действие нагревания и охлаждения вина с дрожжами на структуру и свойства дрожжевой клетки. // Прикладная биохимия и микробиология., 1969, т.5, в.1, с. 72­

77.

1. Аникеева Н.В. Научные основы новых технологий белковых препаратов и диетических продуктов с использованием нута// Автореферат диссертации на соиск. уч.степени доктора техн.наук. -М. -2003.-25 с.
2. Антипова Л.В., Осминин О.С., Шамханов Ч.Ю., Струкова Т.Н. Получение белковой пищевой добавки из вторичных продуктов птицеперерабатывающей промышленности. //Хранение и переработка сельхозсырья. 2003, №2, с.62-64.
3. Антонов В.Ф. Липиды и ионная проницаемость мембран. //М.:

Наука. 1982.

1. Бабаян Т.Л., Латов В.К. Выделение физиологически активного маннана и других полисахаридов из автолизатов пекарских дрожжей.// Биотехнология, 1992, №2, с.23-26.
2. Байрамов Р.Б. Перспективы использования микроводрослей.//Ашгабат: Издательство Туркмен НИИНТИ, 1992, с. 19.
3. Безрукова М.Г., Градова Н.Б. Использование биомассы микроор­ганизмов для пищевых целей // Сб. науч. трудов/ Институт биохимии и физиологии микроорганизмов АНСССР. - Пущино, 1985, с. 119.
4. Беликов В.М., Латов В.К., Цыряпкин В.А., Сергеев В.А. Биомасса дрожжей как источник аминокислот.// Микробиол. пр-сть, 1976, т.З (134), с. 6.
5. Беликов В.М., Бабаян Т.Л., Латов В.К., Князькова А.В. Способ автолиза дрожжевой биомассы. Авт. свид. СССР № 667194 // Б.И. 1979, №22, с.7.
6. Беликов В.М., Бабаян T.JL, Харатьян С.Г., Латов В.К., Князькова
7. В. Способ автолиза дрожжевой биомассы. Авт. свид. СССР № 554854 // Б.И. 1977, №15, с.12.
8. Беликов В. М., Гололобов М. Ю.// Die Nahrung. 1986. V. 26. № 3-4. Р.427-433.
9. Беликов В.М., Гордиенко С.В., Латов В.К., Харатьян С.Г., Сергеев
10. А., Коган А.С., Андрианов В.В. Способ получения аминокислот из низших пептидов. Авт. свид. СССР № 602543 // Б.И. 1978, №14, с.92.
11. Беликов В.М., Гордиенко С.В., Латов В.К., Цыряпкин В.А., Андрианов В.В., Бернова Г.И.,Неклюдов А.Д. Аминокислотный состав препаратов из автолизатов пекарских дрожжей. //Прикл. биохим. и микробиол. 1978, 14, №1,с.60.
12. Белозерский А.Н., Проскуряков Н.И. Практическое руководство по биохимии растений. - М.; Совнаука, 1951.
13. Белоусова Н.И., Гордиенко С.В., Ерошин В.К., Ильченко В.Я. Получение смесей аминокислот на основе автолизатов дрожжей Saccharomyces, выращенных на этаноле или сахарах.// Биотехнология. 1990, №3, с.6
14. Берри Д. Биология дрожжей. //М.: Мир. 1985, с.95
15. Бирюзова В.И. Ультраструктурная организация дрожжевой клетки. - М.: Наука, 1993.-146 с.