Российская академия наук

Уральское отделение

Коми научный центр

Институт биологии

На правах рукописи

Тарабукин Дмитрий Валерьянович

ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ НАПРАВЛЕННОЙ БИОКОНВЕРСИИ ЦЕЛЛЮЛОЗО- И КРАХМАЛСОДЕРЖАЩЕГО

РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ

Специальность 03.00.23 «Биотехнология»

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель - доктор биологических наук, профессор В.В. Володин

Сыктывкар 2009

Г

СОДЕРЖАНИЕ

Стр.

ВВЕДЕНИЕ 5

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 9

1.1 Целлюлоза как возобновляемый источник углеводов 9

1.2 Общая характеристика структуры целлюлозы 10

1.3 Продуценты целлюлолитических ферментов 13

1.4 Характеристика ферментов, участвующих в ферментативном

гидролизе целлюлозы ^ 5

1.5 Влияние физико-химических и структурных характеристик субстрата

на эффективность ферментативного гидролиза 19

1.6 Аппараты и режимы ферментативного гидролиза целлюлозы 22

1.7 Применение целлюлаз, амилаз и других гидролаз в промышленности и 24 сельском хозяйстве

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ 31

2.1 Субстраты, методы получения и анализа порошковых целлюлоз 31

2.2 Условия совместного ферментативного гидролиза целлюлозы и

крахмала 32

2.3 Методика фотометрического определения восстанавливающих

сахаров 33

2.4 Методика ВЭЖХ-анализа сахаров в продуктах ферментативного

гидролиза целлюлозы и крахмала 34

2.5 Методики определения активностей ферментов гидролаз 34

2.6 Методика определения аминокислот в ферментированном белково-углеводном корме 4Q

2.7 Методика определения (3-глюкана в кормах 41

ъ

Глава 3. ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРЫ И ФЕРМЕНТАТИВНОЙ 43 ДЕСТРУКЦИИ ПОРОШКОВЫХ ЦЕЛЛЮЛОЗ

44

ЗЛ Физико-химическая характеристика порошковых целлюлоз

45

3.2 Ферментативная деструкция порошковых целлюлоз

3.3 Исследование структуры модифицированных порошковых целлюлоз и

низкомолекулярных продуктов ферментативной деструкции 5Q

Глава 4. ПОЛУЧЕНИЕ ПОРОШКОВОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ И ГЛЮКОЗЫ ФЕРМЕНТАТИВНЫМ ГИДРОЛИЗОМ ЛИСТВЕННОЙ БЕЛЕНОЙ ЦЕЛЛЮЛОЗЫ В СМЕСИ С КРАХМАЛОМ 60

4.1 Обоснование выбора субстрата для получения порошковой целлюлозы

и исследование фермент-субстратных взаимодействий амилаз с g j

целлюлозой

4.2 Особенности процесса совместного ферментативного гидролиза

лиственной беленой целлюлозы и крахмала 64

4.3 Оптимизация процесса ферментативного получения порошковой

целлюлозы и анализ продуктов совместного гидролиза лиственной ^g

целлюлозы и крахмала

Глава 5. ФЕРМЕНТАТИВНЫЙ ГИДРОЛИЗ IN VITRO КАК СПОСОБ ПОВЫШЕНИЯ ПИТАТЕЛЬНОЙ ЦЕННОСТИ

ТРУДНОУСВАИВАЕМЫХ КОРМОВ 72

5.1 Особенности процесса ферментативного гидролиза

многокомпонентных трудноусваиваемых кормов 73

5.2 Биотехнология получения новой белково-углеводной кормовой

основы для птицеводства из трудноусваиваемого растительного сырья 33

5.3 Биохимическая характеристика ферментированного белково¬углеводного корма . g5

ВЫВОДЫ 92

ЛИТЕРАТУРА 94

ВЫВОДЫ

1. Выявлена связь между особенностями строения порошковых целлюлоз, полученных с использованием модифицирующих агентов различной природы, и их способностью к ферментативной деструкции. Впервые установлено, что ПЦ, полученные продолжительным воздействием на исходную целлюлозу кислотами Льюиса, обладают низкой адсорбционной емкостью по отношению к целлюлазам, характеризуются наибольшей начальной реакционной способностью при наименьшем изменении степени полимеризации целлюлозы, что обусловлено ослаблением субстрат-ферментных взаимодействий за счет разупорядоченности надмолекулярной структуры и химической модификации макроцепей в порошковых целлюлозах указанного типа. Несмотря на то, что ПЦ из льна, полученные продолжительным воздействием пероксиуксусной кислоты, обладают высокой адсорбционной способностью по отношению к целлюлазам, они оказались наиболее устойчивы к ферментативной деструкции.

2. Оптимизирован состав целлюлазного и амилазного ферментативного комплекса для одновременного получения ПЦ заданной структуры и глюкозы путем совместного гидролиза целлюлозы и крахмала. Выявлено, что амилолитические ферменты способны сорбироваться на лиственной беленой целлюлозе с частичной потерей активности, что необходимо учитывать при совмещении данных процессов. Показано, что характеристики получаемой ПЦ в значительной мере определяются вязкостью водной среды, задаваемой концентрацией крахмала в исходной смеси. Предложен режим гидролиза лиственной беленой целлюлозы в присутствии крахмала, позволяющий увеличить выход ВС за счет гидролиза лиственной беленой целлюлозы на 17% по сравнению с ожидаемым выходом сахаров из крахмала и получить ПЦ со степенью полимеризации 240 и индексом кристалличности 0.8, что удовлетворяет требованиям для коммерческих образцов ПЦ.

Исследован и оптимизирован процесс совместного ферментативного гидролиза целлюлазами и глюкоамилазами растительного сырья (стебли травянистых растений и неочищенные зерна злаковых культур). Разработанная схема позволяет повысить выход моно- и дисахаридов не только за счет гидролиза лигноуглеводного, но и крахмального компонентов. Показана возможность исключения стадии обработки коммерческим препаратом содержащим а-амилазу растительных субстратов с большим содержанием некрахмалистых полисахаридов. На основе отходов растениеводства и трудноусвояемых зерновых культур с использованием ферментативного гидролиза разработана новая белково-углеводная основа кормов для птицеводства. Технология получения продукта заключается в оптимальной дозировке трудноусваеваемых компонентов, их ферментативном осахаривании, сгущении и выпарке прогидролизованной смеси в присутствии натуральной сои, обогащающей конечный продукт рядом незаменимых аминокислот и жиров. По данным биохимического анализа ферментированный корм содержит до 30% легкоусваиваемых углеводов; характеризуется оптимальным составом незаменимых аминокислот, близких к идеальному белку (эталон FAO) и практически не содержит (3-глюкана и других антипитательных веществ, содержащихся в исходном субстрате