

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Сибирский государственный университет науки и технологий
имени академика М. Ф. Решетнева

О. В. Киселева
В. В. Тарнопольская
П. В. Миронов

БИОТЕХНОЛОГИЯ ПИЩЕВОГО БЕЛКА

*Утверждено редакционно-издательским советом университета
в качестве учебного пособия для студентов магистратуры
по направлению подготовки 19.04.01 «Биотехнология»
всех форм обучения*

Красноярск 2021

УДК 561.284.579.61(075.8)
ББК 30.16я7
К44

Рецензенты:

доктор химических наук, профессор С. Р. ЛОСКУТОВ
(Институт леса Сибирского отделения Российской академии наук);
кандидат технических наук, доцент Н. С. РЕШЕТОВА
(Сибирский государственный университет науки и технологий
имени академика М. Ф. Решетнева)

Киселева, О. В.

К44 Биотехнология пищевого белка : учеб. пособие / О. В. Киселева, В. В. Тарнопольская, П. В. Миронов ; СибГУ им. М. Ф. Решетнева. – Красноярск, 2021. – 92 с.

Изложены ключевые современные технологии получения пищевого белка на основе микробиологического синтеза. В числе рассмотренных вопросов – глобальная проблема дефицита белка и пути ее решения; перспективы получения белковых продуктов методами биотехнологии; технологии получения белка на основе грибного мицелия.

Предназначено для студентов магистратуры по направлению подготовки 19.04.01 «Биотехнология». Также будет полезно аспирантам и исследователям, чей круг научных интересов включает, помимо биотехнологии, биохимию микроорганизмов, технологию биологически активных соединений и другие родственные научные направления.

УДК 561.284.579.61(075.8)
ББК 30.16я7

© СибГУ им. М. Ф. Решетнева, 2021
© Киселева О. В., Тарнопольская В. В.,
Миронов П. В., 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|--|----|
| Список сокращений | 4 |
| Предисловие | 5 |
| 1. Проблема дефицита белка и перспективные пути ее решения | 7 |
| 1.1. Обзор существующих биотехнологий получения микробного белка | 7 |
| 1.2. Обзор биотехнологий получения микробного белка | 9 |
| 1.3. Питательная ценность белков | 13 |
| 1.4. Принципы создания сбалансированных по аминокислотному составу белковых композиций | 22 |
| Контрольные вопросы и задания | 24 |
| 2. Сырье, продуценты и принципиальные технологические схемы получения микробного белка | 25 |
| 2.1. Безвредность микробной биомассы. Сырье и продуценты белка | 25 |
| 2.2. Принципиальная технологическая схема получения микробных белковых препаратов | 35 |
| 2.3. Технологические особенности культивирования микроорганизмов – продуцентов белка на гидролизатах растительного сырья | 47 |
| Контрольные вопросы и задания | 54 |
| 3. Перспективные биотехнологии получения белковой микробной биомассы | 55 |
| 3.1. Технологические особенности культивирования микроорганизмов – продуцентов белка на альтернативных источниках углеродсодержащего сырья | 55 |
| 3.2. Принципы проектирования малотоннажных производств для получения микробного белка | 66 |
| 3.3. Процесс и принципы контроля выращивания микроорганизмов – продуцентов белка | 71 |
| 3.4. Биотехнология глубинного культивирования грибного мицелия как источника полноценного белка | 78 |
| 3.5. Основные характеристики штамма <i>Laetiporus sulphureus</i> и пищевого белка на его основе | 83 |
| Контрольные вопросы и задания | 86 |
| Заключение | 87 |
| Библиографический список | 88 |
| Приложение. Ключевые слова | 90 |

Список сокращений

| | |
|-----------|--|
| АС | аминокислотный скор |
| АСВ | абсолютно сухое вещество |
| БПК | биологическое потребление кислорода |
| БЦБ | биологическая ценность белков |
| БЦЗ | биологическая ценность заменимых аминокислот |
| БЦН | биологическая ценность незаменимых аминокислот |
| ВОЗ | Всемирная организация здравоохранения |
| ЖКЛ | жидкий концентрат лизина |
| КЖ | культуральная жидкость |
| НД | нефтяной дистиллят |
| НКФ | нестандартная клубневая фракция |
| ОКЖ | отработанная культуральная жидкость |
| ОМФ | оксиметилфурфурол |
| ПАВ | поверхностно-активное вещество |
| ПДК | предельно допустимая концентрация |
| РВ | редуцирующие вещества |
| РЭМ | растровая электронная микроскопия |
| СЖТ | серно-желтый трутовик |
| ФАД | флавинаденинуклеотид |
| ФАО (FAO) | Продовольственная и сельскохозяйственная организация ООН (Food and Agriculture Organization) |
| ХПК | химическое потребление кислорода |

ПРЕДИСЛОВИЕ

Поиск перспективных и доступных источников белка пищевого и кормового назначения является весьма актуальной проблемой в области питания населения разных стран и планеты в целом. Сегодня основной поставщик пищевого белка – сельское хозяйство, однако его развитие сдерживается дефицитом кормового белка. Проблема дефицита белка в ближайшее время, по-видимому, не может быть решена без изыскания новых дополнительных его источников.

Реальные перспективы в этом отношении имеют биотехнологические производства микробной биомассы, необходимость создания которых становится все более очевидной. При этом продуцентами белка могут быть бактерии, дрожжи, высшие и низшие грибы, одноклеточные водоросли. В последнее время к перспективным источникам белка относят биомассу некоторых насекомых. Известно, что белок некоторых видов микроорганизмов, как правило, хорошо сбалансирован по аминокислотному составу, а его содержание в общей биомассе может достигать 70 %, что превосходит другие его источники.

Вместе с тем биотехнологические производства остро нуждаются в профессионалах, которые не только хорошо представляют себе проблему дефицита белка в мире и в России, но и видят пути ее решения. Для этого необходимы знания основных принципов создания новых, более продуктивных штаммов – продуцентов белка и других биологически активных веществ; научных основ перспективных биотехнологий получения белка с использованием популяций микробных клеток и клеток растений; теоретических основ создания производственных процессов получения белковых пищевых и кормовых продуктов.

С целью формирования профессиональной компетентности в магистратуре направления 19.04.01 «Биотехнология» в вариативную часть профессионального цикла основной образовательной программы включена дисциплина «Биотехнологии пищевого белка». Дисциплина базируется на знаниях, приобретенных ранее при освоении дисциплин бакалавриата: математики, физики, физической, органической и неорганической химии, экологии, а также в ходе параллельного изучения основ биохимии и молекулярной биологии, общей биологии и микробиологии, общей биотехнологии.

Цель освоения дисциплины – обретение знаний и умений в области существующих биотехнологий, в области проектирования

и анализа новых биотехнологических процессов синтеза белковых продуктов.

Задача учебного пособия – помочь студентам в овладении типовыми методиками и новыми методами инженерных расчетов технологических параметров биотехнологических производств; в осуществлении эффективного химико-технического, биохимического и микробиологического контроля производства.

Пособие состоит из трех глав.

Первая глава содержит обзор технологий получения микробного белка, существующих в настоящее время. В ней также раскрывается понятие биологической ценности белка и описываются принципы создания белковых композиций, сбалансированных по аминокислотному составу.

Вторая глава посвящена технологическим схемам получения микробных белковых препаратов.

В третьей главе рассказывается о перспективных биотехнологиях.

Материал учебного пособия изложен в соответствии с программой дисциплины «Биотехнология пищевого белка». Каждая глава снабжена контрольными вопросами и заданиями, что позволяет студенту самостоятельно контролировать уровень усвоения материала. Рекомендательный библиографический список содержит литературу, необходимую для более глубокого изучения учебного материала.

В приложении имеется перечень ключевых слов.

Пособие предназначено для студентов, обучающихся в магистратуре по направлению подготовки 19.04.01 «Биотехнология», а также будет полезно аспирантам и исследователям, чей круг научных интересов включает, помимо биотехнологии, биохимию микроорганизмов, технологию биологически активных соединений и другие родственные научные направления.

1. ПРОБЛЕМА ДЕФИЦИТА БЕЛКА И ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ПУТИ ЕЕ РЕШЕНИЯ

1.1. ОБЗОР СУЩЕСТВУЮЩИХ БИОТЕХНОЛОГИЙ ПОЛУЧЕНИЯ МИКРОБНОГО БЕЛКА

Численность населения земного шара достигла 7,7 млрд человек и ежегодно увеличивается приблизительно на 35–40 млн. В то же время объем природных ресурсов не увеличивается. Уже сейчас на нашей планете ощущается значительный недостаток пищевых продуктов в целом и белковых пищевых продуктов в частности. По данным ФАО/ВОЗ, до 15 % населения планеты страдают от недостаточного питания в связи с пониженным содержанием общего количества белков и недостаточной калорийностью пищевого рациона. Еще больше – около 60 % населения земного шара, преимущественно в странах Юго-Восточной Азии, Африки и Латинской Америки, несмотря на достаточную калорийность пищевого рациона, получают качественно неполноценное питание в результате недостаточного потребления белка животного происхождения. Даже население развитых стран (в том числе и России), составляющее в настоящее время одну треть населения земного шара, не обеспечено необходимым количеством полноценного белка. На сегодняшний день люди во многих странах мира в разной степени испытывает так называемое белковое голодание. Известно, что дефицит белка в питании является одним из главных факторов снижения средней продолжительности жизни. В связи с этим проблема питания включена ООН в число десяти важнейших глобальных проблем, которые стоят перед человечеством.

Эта проблема заключается еще и в том, что в настоящее время традиционное сельскохозяйственное производство высококачественного белка в виде продукции животноводства и птицеводства практически достигло предела своих возможностей. Уменьшение дефицита белка должно осуществляться в первую очередь за счет как повышения производства и максимального использования в рационах людей обычных продуктов питания, так и употребления дополнительных нетрадиционных источников белка. В этих условиях эффективным путем решения дефицита кормового белка является создание промышленных производств микробиологического синтеза.

Перспективным является создание крупнотоннажных биотехнологических производств.

Биотехнология производства протеина направлена на создание биологически полноценных кормовых и пищевых продуктов микроб-

ного синтеза – естественных концентратов белка и витаминов. Широкое использование микроорганизмов как продуцентов белка обусловлено значительной скоростью роста, высоким содержанием белка, относительной простотой культивирования. Постоянно проводится селекционная работа по созданию и отбору более продуктивных штаммов, разрабатываются биотехнологические процессы, по-новому решающие традиционные задачи производства. В ряде случаев они оказываются не только экономически более эффективными, но и экологически более чистыми. В последние годы существенно возрос интерес к мицелиальным грибам как продуцентам пищевого белка. В разных странах, в том числе и в России, разрабатываются биотехнологии получения грибного протеина, основанные на процессах биоконверсии растительных субстратов. В отличие от дрожжей макро- и микромицеты синтезируют многочисленные ферменты и способны конвертировать в белковую биомассу крахмал, пектин, гемицеллюлозу, целлюлозу и даже лигнин без или после несложной предварительной обработки субстрата. Грибная биомасса не уступает по кормовой ценности дрожжам, сравнительно легко переваривается, имеет волокнистую структуру, что облегчает ее отделение от культуральной жидкости и позволяет применять для получения текстурированных продуктов. Использование отходов переработки растительного сырья в качестве субстратов для культивирования грибов может явиться выгодной формой их утилизации.

Наряду с крупномасштабным биотехнологическим производством целесообразно создавать и малотоннажные производства и установки и использовать их для утилизации ежегодно возобновляемых отходов переработки растительной биомассы как с целью защиты окружающей среды, так и для получения дефицитного протеина.

Микробиологическое производство белка по сравнению с традиционным сельскохозяйственным с большой эффективностью использует энергетические и материальные ресурсы, не требует земельных площадей и не зависит от климатических условий. По качеству и содержанию белка микробная биомасса близка к продуктам животного происхождения.

Наращивание темпов микробиологического производства сдерживается сырьевой базой, в качестве которой служат отходы пищевой, целлюлозно-бумажной и гидролизной промышленности, углеводороды. В последние годы разрабатываются технологии микробиологического получения белка на спиртах и природном газе, перспективным направлением является микробиологический синтез на водороде, получение грибной биомассы в условиях глубинного культивирования.

1.2. ОБЗОР БИОТЕХНОЛОГИЙ ПОЛУЧЕНИЯ МИКРОБНОГО БЕЛКА

Структура питания человечества в целом, в том числе и населения нашей страны, требует серьезного научного анализа и совершенствования. Известно, что наиболее дефицитным компонентом пищи является белок, особенно белок высокой питательной ценности. Традиционные источники белка – продукты животноводства и растениеводства, не покрывают все возрастающую потребность в белковой пище, особенно увеличившуюся в связи с интенсивным приростом населения. Альтернативным источником белка могут служить различные микроорганизмы – дрожжи, высшие съедобные грибы, некоторые микроводоросли и т. д.

Биотехнологическое производство белка обладает рядом преимуществ по сравнению с традиционными способами получения белковой пищи – животноводством и растениеводством. Такое производство не требует посевных площадей, не зависит от климатических и погодных условий, поддается точному планированию и способно достичь высокого уровня автоматизации, позволяет получать продукцию стандартного качества. Продукты микробиологического синтеза можно назвать новыми видами кормов и пищи. Разнообразие микроорганизмов и типов их питания позволяет легко маневрировать в использовании различных видов сырья для биосинтеза.

При всестороннем исследовании микробной биомассы была выявлена ее чрезвычайно высокая технологическая и экономическая эффективность для обеспечения кормовым белком мясного и молочного животноводства, птицеводства и целого ряда других направлений народного хозяйства. Кормовые дрожжи содержат в 5 раз больше белка (в том числе лизина в 10, метионина в 5 и триптофана в 3 раза больше), чем ячмень или овес. Кроме того, в сухих дрожжах имеются практически все витамины группы В и целый ряд ростовых факторов. В результате этого 1 т кормовых дрожжей, добавленных в корма сельскохозяйственных животных, обеспечивает экономию до 7 т зерна и дополнительное производство 0,8 т свинины, 5 т мяса птицы или до 15 тыс. шт. яиц. Включение 1 т дрожжей в рацион телят и поросят высвобождает для питания населения 6 т цельного или 1,5 т сухого обезжиренного молока. Получение белковых веществ не является единственным направлением развития промышленного микробиологического синтеза, это лишь наиболее крупнотоннажная отрасль современной биотехнологии, дающая в мире миллионы тонн продукции ежегодно и продолжающая быстро расти.

Более века назад, экспериментируя с дрожжами, Л. Пастер открыл микробиологический синтез белка из аммиака и органических соединений, не содержащих азота. Заводы по выращиванию дрожжей, созданные вскоре после исследований Пастера, выпускали дрожжевые закваски. С течением времени совершенствовалась технология производства дрожжей и в 1876 г. в США начали применять в хлебопечении прессованные дрожжи.

Идею использования микроорганизмов как белковых компонентов в питании в 1890-х гг. начал пропагандировать М. Дельбрюк, рекомендовавший для этой цели пивные дрожжи.

Первые заводы по выращиванию пищевых дрожжей на мелассе были открыты в Германии в Первую мировую войну. После Первой мировой войны в различных странах приступили к производству кормовых дрожжей. К середине 1930-х гг. началось производство дрожжей из гидролизатов отходов сельского хозяйства и деревообрабатывающей промышленности, из сульфитных щелоков, барды гидролизно-спиртовых заводов. В 1935 г. в СССР был пущен первый опытный завод по производству кормовых дрожжей на основе использования соломы, кукурузных кочерыжек и древесных опилок, предварительно гидролизованных серной кислотой. В это время горячим поборником использования дрожжей в питании выступал Р. В. Гивартовский, рассматривавший дрожжи как ценный источник витаминов группы В. Во время Второй мировой войны во многих странах развернулось широкое производство пищевых дрожжей: в Германии – на основе сульфитных щелоков и гидролизатов древесины, в СССР, на Ямайке (тогда колонии Великобритании).

В последующие годы встал вопрос о получении белка на новых субстратах. Идет экспериментальная работа по получению бактериального белка из метана. Бактерии, размножающиеся на метане, весьма своеобразны, так как растут только на одноуглеродных соединениях, что облегчает их культивирование в связи с отсутствием конкурентов. С экономической точки зрения выгоднее каталитически окислять метан в метанол. Метанол хорошо растворим в воде и легко усваивается многими микроорганизмами, как бактериями, так и некоторыми дрожжами. В Великобритании действует завод, вырабатывающий дрожжевой белок на метиловом спирте. Изучается возможность производства микробного белка на этиловом спирте, на котором развивается более высокая биомасса дрожжей.

Однако в настоящее время большинство крупнотоннажных заводов нашей страны бездействуют, что связано с экономическим

кризисом и, как следствие, падением производства в последние десятилетия. Однако как у нас в стране, так и за рубежом наблюдается возрождение интереса к получению микробного белка пищевого и кормового назначения с использованием в качестве сырья отходов сельского хозяйства и перерабатывающей промышленности, а также к получению белка с помощью автотрофных микроорганизмов. Большое внимание также уделяется получению белка с помощью автотрофных водородных бактерий. Используя окисление водорода как энергетический процесс, в качестве источников питания они довольствуются лишь минеральными соединениями. Следует отметить, что по некоторым химическим показателям дрожжевой белок имеет преимущества по сравнению с бактериальным. Разрабатываются методы получения пищевого и кормового белка из различных отходов. Одни методы пригодны для промышленного получения белка, другие – в условиях небольших хозяйств.

Возможным сырьем для получения микробного белка представляются различные целлюлозосодержащие отходы промышленности и сельского хозяйства. Для обогащения белком измельченных целлюлозных отходов целесообразнее использовать культуры микроскопических грибов, которые активно разрушают целлюлозу, одновременно накапливая белок. Успешно работают в этом направлении В. И. Билай (Украина), которая использует гриб *Trichoderma viride*, и А. Г. Лобанок (Белоруссия), применяющий гриб рода *Penicillium*.

Таким путем можно получать корм, содержащий до 30 % белка. Работы по получению кормового белка на отходах лесной и целлюлозной промышленности проводят в Швеции и Финляндии, где для этого используют грибы. В Канаде в провинции Онтарио функционирует небольшой завод по переработке на корм древесных отходов с помощью микроскопического гриба *Chaetomium*.

Для выращивания биомассы грибного мицелия можно использовать не только целлюлозу, но и другие вещества – крахмальные гидролизаты, отходы зерна и т. д. Так, в Институте микробиологии Белоруссии разработан метод глубинного культивирования мицелия базидиального трутового гриба *Daedaleopsis confragosa* на средах с молочной сывороткой. Из 1 т молочной сыворотки может быть выработано до 20 кг высушенной измельченной массы, имеющей около 50 % белка и содержащей ряд незаменимых аминокислот. На молочной сыворотке с успехом размножается базидиальный съедобный гриб *Panus tigrinus* (пилолистник тигровый). Выращенный и измельченный мицелий гриба содержит около 45 % сырого белка, близкого по составу к животным белкам.

Институт микробиологии и вирусологии Казахстана рекомендует в качестве белковой добавки к бедным кормам кормовые дрожжи *Candida*, выращенные на разваренной зерновой дерти, муке или других субстратах. Перед использованием дрожжевую массу прогревают для разрушения дрожжевых клеток, что повышает их усвояемость. Кормовые дрожжи следует готовить в местах их потребления, а не на заводах.

Многие микроорганизмы пригодны для получения на их основе незаменимых кормовых аминокислот и витаминов. Только правильное сочетание всех компонентов корма дает наилучший результат, а недостаток хотя бы одного из них снижает эффективность остальных.

Сбалансированное питание в ряде случаев упрощает и удешевляет набор ингредиентов, входящих в комбикорм. Например, обогащение кормов витамином В позволяет заменять дефицитный и дорогой животный белок растительным. При этом продуктивность животных не снижается.

До Второй мировой войны производства аминокислот не было почти ни в одной стране. Сейчас уже доказана целесообразность использования аминокислот в животноводстве, где их применение обеспечивает огромный экономический эффект. Для кормления животных нет нужды в получении чистых препаратов, достаточно иметь концентраты, производство которых дешевле и проще.

Замечательное свойство многих микроорганизмов – накапливать в среде огромное количество некоторых ценных аминокислот. Объем такого «сверхсинтеза» может быть очень большим. Так, некоторые микроорганизмы на 1 л среды производят до 200 г аспарагиновой кислоты, до 100 г – глутаминовой, до 16 г – валина. Существуют микроорганизмы, синтезирующие значительные количества L-лизина, L-валина, L-метионина и триптофана.

В России микробиологическим способом получают лизин. Для синтеза L-лизина используют культуру *Brevibacterium sp.*, сырьем служат уксусная кислота, минеральные соли, меласса, кукурузный экстракт и некоторые отходы пищевой промышленности. Лизин выпускают в виде жидкого концентрата (ЖКЛ), сухого концентрата и кристаллического препарата.

За рубежом микробиологическим способом, помимо L-лизина, получают L-глутаминовую кислоту, используя культуру *Micrococcus glutaminus* и некоторые бактерии рода *Brevibacterium*. В небольших количествах готовят L-аланин, продуцирующий который некоторые актиномицеты, а также бактерии рода *Brevibacterium* и *Corynebacterium*. Возможно получение триптофана с использованием культуры гриба *Candida utilis*.

1.3. ПИТАТЕЛЬНАЯ ЦЕННОСТЬ БЕЛКОВ

Белки имеют особое значение в сбалансированном питании человека и животных. При этом белки сами по себе не являются незаменимыми компонентами рациона человека. Для нормального питания необходимы лишь содержащиеся в них незаменимые аминокислоты (табл. 1.1). Незаменимые аминокислоты не синтезируются в организме человека и должны поступать в организм в виде белков в основном животного происхождения. Как правило, растительные белки по показателю количества незаменимых аминокислот являются неполноценными. В связи с этим для достижения необходимого человеку количества отдельных незаменимых аминокислот при употреблении растительной пищи потребуются значительно большие количества растительного белка. Это, в свою очередь, приведет к превышению калорийности рациона, поступлению в организм излишних количеств азота с всеми вытекающими последствиями (избыточный вес, отложение солей мочевой кислоты и др.).

Таблица 1.1

Аминокислоты в питании человека и сельскохозяйственных животных

| Незаменимые | Заменимые |
|-------------------------|-----------------------|
| Изолейцин | Аланин |
| Лейцин | Гистидин |
| Лизин | Аргинин |
| Метионин – цистин * | Аспарагиновая кислота |
| Треонин | Глутаминовая кислота |
| Валин | Глицин |
| Фенилаланин – тирозин * | Пролин |
| Триптофан | Серин |
| | Гидроксипролин |

* пары взаимозаменяемых аминокислот.

Для взрослых людей незаменимыми являются девять аминокислот, суточная потребность в которых варьирует от 0,5 до 2 г. Новорожденным и растущим детям необходима еще одна, десятая аминокислота – аргинин. У взрослых аргинин образуется в достаточных количествах в печени в процессе синтеза мочевины. Минимальная суточная потребность человека в полноценных белках оценивается величиной около 50 г, максимальное потребление – до 100 г в сутки. Нормой считается потребление 0,8 г белка на 1 кг массы тела человека в сутки.

Приблизительную оценку суточного потребления количества полноценного белка можно сделать на основе следующих данных. Известно, что средняя скорость полураспада белков в теле человека составляет около 80 суток. В массе тела человека доля костных тканей оценивается величиной 17–20 %. Для человека массой 75 кг масса тканей мышц и органов составит около 50 кг. При среднем содержании белка около 20 % масса всех белков тела составит приблизительно 10 кг, т. е. за период 80 суток распадается и должно быть заменено новыми белками до 5 кг белка, или 62,5 г в сутки.

При этом следует иметь в виду, что у различных белков различная скорость обмена. Например, белки плазмы крови человека имеют период полураспада около 10 суток; белки мышц сердца – около 24 суток, скелетных мышц – до 180 суток; белки и пептиды гормонов живут всего несколько минут. У человека за 1 сутки деградации и синтеза подвергается около 400 г белка. Примерно 2/3 образовавшихся в результате деградации белка аминокислот идет на новый синтез белка, а 1/3 безвозвратно окисляется в энергетических цепях и должна пополняться экзогенными аминокислотами из пищи. Часть необходимых аминокислот синтезируется самим организмом из других аминокислот, другая часть не синтезируется и должна обязательно поступать с пищей. Это незаменимые аминокислоты. Белки, содержащие полный набор незаменимых аминокислот в необходимом количестве, являются биологически полноценными белками. В связи с этим за одни сутки в организм человека должно поступать 80–100 г белка (0,8–1 г белка на 1 кг массы тела – *белковый оптимум*), причем как минимум 30 г белка должно быть животного происхождения. Животный белок способен почти полностью усваиваться организмом и превратиться в его белковые структуры.

Для характеристики качества белка как составной части рационов кормления животных или питания человека обычно используются различные термины: «пищевая ценность», «питательная ценность», «белковая ценность», «усвояемость белка», «биологическая ценность», а также «химическая ценность». Остается неясным, следует ли все эти термины считать синонимами или же они характеризуют различные стороны полезности корма или пищи. Также неясно, следует ли включать в понятие биологической ценности отсутствие токсичности. Все эти вопросы являются достаточно сложными. По мнению А. А. Покровского, нецелесообразно отождествлять термины биологической и пищевой (кормовой) ценности и тем более включать в понятие биологической ценности показатель токсичности.

Предложенный впервые в начале XX в. термин «биологическая ценность» в настоящее время рассматривается как зависящая от аминокислотного состава и других структурных особенностей белка степень задержки азота в теле растущих животных.

Биологическая ценность – это свойство определенного вида белка, связанное с особенностями его структуры, которое при соблюдении необходимых условий исследования является достаточно постоянной характеристикой. Предлагались следующие определения для терминов «биологическая ценность» и «пищевая ценность». Термин «биологическая ценность» отражает качество белковых компонентов продукта, связанное с оценкой перевариваемости белка и со степенью сбалансированности его аминокислотного состава. Термин «пищевая ценность» отражает всю полноту полезных качеств продукта, связанных с оценкой содержания в нем широкого перечня пищевых веществ. Знание химического состава пищевых и кормовых продуктов послужило этапом в становлении научных представлений о биологической и пищевой ценности белков. В связи с этим также появился термин «химическая ценность». В этом случае после полного гидролиза определяют аминокислотный состав белка и сравнивают его со стандартным (эталонным) белком, например полученным из молока и яиц, и тем самым определяют его потенциальную химическую ценность.

Значительные успехи были достигнуты в области изучения метаболизма белка. Стали понятными различия биологической роли отдельных аминокислот, путей их превращения в организме человека и животных, их участия в синтезе белка. Эти данные позволили на основании определения переваримости и аминокислотного состава отдельных белков предвидеть степень их утилизации организмами человека и различных животных. Сопоставление данных о химическом составе белков с результатами опытов по скармливанию этих же белков животным позволило выявить аминокислоты, необходимые для питания человека.

Проведено большое количество исследований по сравнительной ценности отдельных белков в зависимости от их аминокислотного состава. В 1935 г. были открыты почти все аминокислоты, входящие в состав белков. Стало возможным применять рационы, содержащие вместо белков смесь аминокислот. Методами исключения аминокислот из рациона были установлены незаменимые для человека и животных аминокислоты. Было установлено, что для роста молодых крыс незаменимыми являются 10 аминокислот – аргинин, валин, гис-

тидин, изолейцин, лейцин, лизин, метионин, треонин, триптофан, фенилаланин. В дальнейшем было установлено, что для обеспечения нормального роста свиньям требуются те же 10 незаменимых аминокислот, а птице, кроме того, еще и глицин. Однако оказалось, что аргинин и гистидин являются полузаменимыми аминокислотами, так как могут частично синтезироваться в организме животных. Имеются также две пары взаимозаменяемых аминокислот; при этом допустимо присутствие в достаточном количестве той или иной кислоты или смеси обеих аминокислот в любой пропорции.

Биологическая потребность животных и человека в аминокислотах – динамический показатель. Она зависит от возраста, состояния, вида животного, наличия в кормах сопутствующих компонентов, особенно ингибиторов ферментов желудочно-кишечного тракта, витаминов, минеральных солей и других компонентов. Учесть все названные факторы невозможно, отмечал А. А. Покровский. Кроме того, применение биологических методов определения биологической ценности белков ограничивается в силу следующих причин:

- невозможности биологическими методами выявить низкую или нулевую биологическую ценность;
- неоднозначности результатов вследствие различной калорийности, ставящей в зависимость от точного знания калорийных потребностей объектов исследования;
- зависимости получаемых результатов от уровня снабжения организма белком и необходимости проведения исследований на весьма низком уровне белкового питания;
- весьма большой трудоемкости и длительности исследований, значительного разброса получаемых результатов;
- необходимости проводить изучение показателей на 3–4 уровнях снабжения белком, что значительно увеличивает объем исследований.

Вследствие вышеуказанных причин усилия ученых были направлены на выявление таких свойств белковых компонентов корма, которые позволяли бы оценивать качество белка на основе его химического состава. Эти усилия привели к разработке методов оценки качества белков с помощью показателя «биологическая ценность белков». Важные преимущества этого показателя состоят в аналитическом выделении из многих биологических свойств тех, которые связаны с особенностями строения именно белковых компонентов корма или пищи. Определение этих показателей позволяет дифференцировать полезные качества белка от широкого ряда других факторов,

могущих существенно менять усвоение продуктов организмом, в том числе и от наличия в продуктах или кормах посторонних веществ.

Последнее обстоятельство имеет первостепенное значение, так как помогает специалистам в области кормления животных или питания получить достаточно точные количественные показатели максимальной усвояемости наиболее ценной белковой части продукта организмом и нередко подсказывает им рациональные изменения в технологических процессах.

Многими учеными предлагались различные способы вычисления показателей биологической ценности белков, но наибольшее распространение получили два метода: метод аминокислотного сора и подсчет так называемого индекса биологической ценности белков по методу И. Корпачи и К. Ланднера и методу К. Варги. Оба метода определения биологической ценности белков (БЦБ) основаны на сопоставлении результатов определения аминокислотного состава исследуемого белка с так называемыми шкалами аминокислот, соответствующими полностью сбалансированному составу гипотетического «идеального» белка. Следует отметить, что в разное время в качестве идеальных белков шкал аминокислот предлагались суммарный белок куриных яиц и белок молока. В 1973 г. Объединенный экспертный комитет ФАО/ВОЗ предложил новую идеальную шкалу аминокислот.

Метод аминокислотного сора (от англ. *score* – счет) – вычисление процентного содержания каждой из аминокислот в исследуемом белке по отношению к их содержанию в белке, принимаемом за идеальный, проводится по следующей формуле:

$$AC_x = \frac{AK_x \text{ в 1 г исследуемого белка}}{AK_x \text{ в 1 г идеального белка}} \cdot 100, \quad (1)$$

где AC_x – аминокислотный скор для определяемой кислоты, %; AK_x – одна из аминокислот, мг, приведенных в табл. 1.2.

Лимитирующей биологическую ценность аминокислотой считается та, скор которой имеет наименьшее значение.

Второй метод оценки биологической ценности белков также основан на аминокислотном составе и при его расчете также применяется идеальная шкала аминокислот. Этим методом получается интегральный показатель, характеризующий сбалансированность незаменимых аминокислот в белке. Такой показатель и формула для его вычисления впервые были предложены Р. Л. Осером и этот показатель иногда называют индексом Осера.

Индекс Осера вычисляют по следующей формуле:

$$\text{ЦБ} = \frac{A_{x1}}{A_{y1}} \cdot \frac{A_{x2}}{A_{y2}} \cdot \frac{A_{x3}}{A_{y3}} \cdot \dots \cdot \frac{A_{x8}}{A_{y8}} \cdot 100, \quad (2)$$

где ЦБ – ценность белков по содержанию незаменимых аминокислот; $A_{x1} \dots A_{x8}$ – содержание одной из незаменимых аминокислот в исследуемом белке; $A_{y1} \dots A_{y8}$ – содержание соответствующей аминокислоты в эталонном белке.

Таблица 1.2

Аминокислотная шкала, рекомендуемая для расчета аминокислотного сгора по проценту адекватности (стандарт ФАО)

| Аминокислота | Количество АК _x , мг | |
|-------------------------|---------------------------------|-----------------|
| | мг на 1 г белка | мг на 1 г азота |
| Изолейцин | 40 | 250 |
| Лейцин | 70 | 440 |
| Лизин | 55 | 340 |
| Метионин – цистин * | 35 | 220 |
| Треонин | 60 | 380 |
| Валин | 40 | 250 |
| Фенилаланин – тирозин * | 10 | 60 |
| Триптофан | 50 | 310 |
| Всего: | 360 | 2250 |

Исследования показали, что степень корреляции между величиной биологической ценности, полученной расчетным путем по этой формуле, и этой же величиной, полученной в опытах на животных, для некоторых белков незначительна. Оказалось, что имеют значение и заменимые аминокислоты. Поэтому была предложена следующая формула расчета БЦБ с учетом в балансе и заменимых аминокислот:

$$\text{БЦБ} = 75 \cdot \text{БЦН} + 25 \cdot \text{БЦЗ}, \quad (3)$$

где БЦН – биологическая ценность незаменимых аминокислот; БЦЗ – биологическая ценность заменимых аминокислот.

Биологическая ценность незаменимых аминокислот определяется по формуле

$$\text{БЦН} = \frac{A_{x1}}{A_{y1}} \cdot \dots \cdot \frac{A_{x8}}{A_{y8}}, \quad (4)$$

где A_{xi} – содержание незаменимой аминокислоты в исследуемом белке, %; A_{yi} – содержание незаменимой аминокислоты в эталонном белке, %.

Биологическая ценность заменимых аминокислот определяется по формуле

$$\text{БЦЗ} = 1 - \frac{\sum B_x - \sum B_э}{\sum B_э}, \quad (5)$$

где B_x – сумма заменимых аминокислот в исследуемом белке, %; $B_э$ – сумма заменимых аминокислот в эталонном белке, %.

Некоторые белки могут содержать повышенное, по сравнению с эталоном, количество незаменимой аминокислоты. В этом случае сбалансированность их нарушается ($A_x/A_э > 1$) и величину БЦН следует рассчитывать, по мнению А. Г. Груздева, таким образом:

$$\text{БЦН} = \sqrt[8]{\frac{A_{x1}}{A_{э1}} \cdot \dots \cdot \frac{A_{э1}}{A_{x1}} \cdot \dots \cdot \frac{A_{x8}}{A_{э8}}}, \quad (6)$$

где $\frac{A_{э1}}{A_{x1}}$ – отношение для незаменимой аминокислоты, подчиняющейся неравенству $A_x/A_э > 1$.

Из этих формул получим окончательную запись формулы расчета индекса биологической ценности белков:

$$\text{БЦБ} = 75 \cdot \sqrt[8]{\prod_1^8 \frac{A_{x1}}{A_{э1}}} + 25 \cdot \left(1 - \frac{\sum B_x - \sum B_э}{\sum B_э} \right), \quad (7)$$

При проведении кислотного гидролиза белков, предшествующего аминокислотному анализу, незаменимая аминокислота триптофан полностью разрушается и поэтому не может быть количественно определена. Определение же содержания триптофана другими методами далеко не всегда возможно. Поэтому индекс БЦБ можно рассчитывать без триптофана по приближенной формуле

$$\text{БЦБ} = 75 \cdot \sqrt[7]{\prod_1^7 \frac{A_{x1}}{A_{э1}}} + 25 \cdot \left(1 - \frac{\sum B_x - \sum B_э}{\sum B_э} \right), \quad (8)$$

Еще одно уточнение при расчете БЦБ рекомендует В. П. Крищенко. Дело в том, что при гидролизе белков около 10 % от суммы аминокислот разрушается. Поэтому рекомендуется принимать сумму их молярных концентраций за 90 % и относительно этой величины рассчитывать содержание каждой аминокислоты. Относительно стан-

дарты рассчитывается молярная концентрация каждой аминокислоты, молярные концентрации суммируются, принимаются за 90 %, а относительно 90 % уже рассчитывается количество каждой.

Следует отметить, что предлагались и некоторые другие способы оценки биологической ценности белков. Это индекс Н/О – отношение суммы незаменимых аминокислот (Н, мг) к общему содержанию азота белков (О, мг), который помогает определению соотношений азота незаменимых, иногда называемых эссенциальными, аминокислот и неспецифического азота. Чем ниже величина Н/О, тем выше содержание неспецифического азота.

Предлагается также несколько иной метод расчета аминокислотного сора $J_{\text{иссл}}$ по формуле

$$J_{\text{иссл}} = A_{\text{иссл}}/N_{\text{иссл}}, \quad (9)$$

где $A_{\text{иссл}}$ – содержание незаменимой аминокислоты в исследуемом белке, мг; $N_{\text{иссл}}$ – сумма незаменимых аминокислот в исследуемом белке, г;

$$J_{\text{станд}} = A_{\text{станд}}/N_{\text{станд}}, \quad (10)$$

где $A_{\text{станд}}$ – содержание незаменимой аминокислоты в стандартном белке, мг; $N_{\text{станд}}$ – сумма незаменимых аминокислот в стандартном белке, г;

$$AC = \frac{J_{\text{иссл}}}{J_{\text{станд}}} \cdot 100. \quad (11)$$

Были предложения определять биологическую ценность белков с помощью так называемой химической суммы. Каждая незаменимая аминокислота испытуемого протеина выражается в процентах к стандарту и наименьший процент берется за основу оценки. Сумма аминокислот в стандарте принимается за 100 %. Разница между суммой стандартного протеина и процентом наиболее дефицитной аминокислоты в испытуемом протеине и определяется как химическая сумма.

Многими специалистами подчеркивается, что оценка качества белков только лишь на основе их аминокислотного состава не может быть достаточной. Так, А. Харпер с соавторами указывают, что при определении полноценности белков необходимо учитывать три фактора: содержание белка, его аминокислотный состав и усвояемость аминокислот белка; Д. Аллисом указывается на некоторые причины расхождений между химической оценкой белков и результатами био-

логической проверки качества белков: это различия в доступности белков или в скорости освобождения отдельных аминокислот в пищеварительном тракте животных; А. П. Дмитроченко с сотрудниками отмечают, что кормовые свойства протеина зависят от порядка чередования аминокислот, а также от доступности белка для расщепления протеазами. В связи с этим предлагается еще один метод оценки биологической ценности белков. Этот метод, в отличие от описанных выше, основанных на аминокислотном анализе белков, заключается в определении количества (доли) отдельных белковых групп в общем протеиновом комплексе.

Дело в том, что физико-химическое состояние белков кормов зависит от степени подвижности и характера их связи с водой и другими веществами клеток. Оказывается, что качество, обусловливаемое этим состоянием белков, имеет не меньшее биологическое и практическое значение, чем качество, определяемое содержанием отдельных аминокислот. Поэтому разная способность растворяться в различных растворителях связана с биологической ценностью белков и может служить ее показателем. Оценка качества белка этим методом основана на определении содержания водо-, соле- и щелочерастворимых белковых фракций, имея в виду, что они наиболее полноценны по содержанию доступных для организма белков. Сторонники этого метода считают, отмечает В. В. Щеглов, что доступность протеинов для ферментативного расщепления тесно связана с их растворимостью в воде и солевых растворах или слабых растворах щелочей. Обычно протеины с низкой растворимостью имеют низкую переваримость, и наоборот. Следовательно, степень растворимости протеина является одним из примеров, влияющих на усвояемость аминокислот организмом человека и животных.

Следует отметить, что многими специалистами подчеркивается необходимость применения комплекса показателей – как химических, так и основанных на биологических тестах и испытаниях для объективной оценки биологической ценности белков, так как ни один из рекомендованных в настоящее время методов не может быть принят в качестве единственного критерия. О недостатках биологических методов было сказано выше. Недостатками химических методов, основанных на определении аминокислотного состава, являются следующие:

– эталонный белок для разных животных сам по себе может не быть эталоном;

– белки, сильно различающиеся по своему аминокислотному составу, могут иметь очень близкий индекс БЦБ;

– дефицит в одной аминокислоте не может быть покрыт избытком другой.

С другой стороны, оценивая достоинства и недостатки химических методов определения БЦБ, подчеркивается их значительная простота и логичность. Несмотря на то что полученная химическими методами величина БЦБ в некоторых случаях и отличается от той величины усвоения белка, которую можно получить в прямом эксперименте, все результаты расчетов БЦБ на основании химического состава белков достаточно корректны для достоверной характеристики пищевых и кормовых достоинств белка.

1.4. ПРИНЦИПЫ СОЗДАНИЯ СБАЛАНСИРОВАННЫХ ПО АМИНОКИСЛОТНОМУ СОСТАВУ БЕЛКОВЫХ КОМПОЗИЦИЙ

Для многих регионов мира, в которых наблюдается дефицит белка, характерно наличие избытка углеводов (особенно в форме крахмалосодержащих продуктов). Превращение части таких крахмальных субстратов в белки с помощью микроорганизмов позволит улучшить белково-калорийный баланс пищевых продуктов.

В качестве добавок в корм или в пищу, составляемых в основном из злаковых, целесообразно использовать такие продукты, белок которых неполноценен сам по себе. Нужно, чтобы неполноценность добавляемого белка была противоположной, «комплементарной» к неполноценности белка злаковых, чтобы после внесения добавки полученная смесь по аминокислотному составу белков приблизилась бы к показателям эталонного белка. В качестве такого рода добавок успешно используются соя или кормовые дрожжи, а для пищевых продуктов – пищевые дрожжи.

Проведенные исследования не обнаружили достоверной связи между таксономическим положением микроорганизмов и аминокислотным составом их белков.

В белках различных штаммов дрожжей содержание лизина составляло от 3,8 до 10,2 %. Таким образом, среди дрожжей встречаются штаммы с исключительно высоким содержанием лизина. В природе не встречаются растения или животные, белки которых были бы столь же богаты лизином, как белки некоторых дрожжей.

Рассмотрим кривые сора белковой ценности при добавлении к пшеничной муке высушенной биомассы *Saccharomyces cerevisiae*, полученной на среде с этиловым спиртом (рис. 1.1).

Расчет сора выполнен для 1-й и 2-й лимитирующих аминокислот пшеничной муки (лизин и треонин) и лимитирующих аминокислот дрожжей (серосодержащие аминокислоты). Питательная ценность белка смеси определяется теми отрезками кривых, которые на рисунке расположены ниже остальных. Следовательно, если дрожжей в смеси меньше 14 %, ее белковая ценность лимитируется лизином, если больше 22 % – серосодержащими аминокислотами. Малые добавки особенно резко повышают белковую ценность смеси в расчете на добавленные дрожжи.

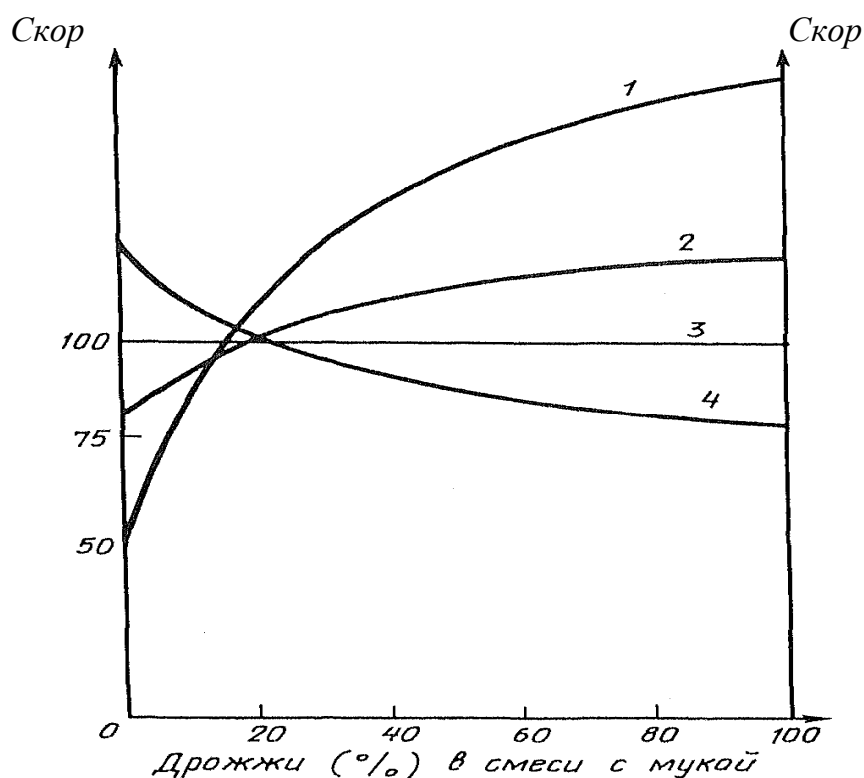


Рис. 1.1. Изменение сора по лимитирующим аминокислотам при добавлении дрожжей к пшеничной муке:

1 – лизин; 2 – треонин; 3 – женское молоко;
4 – серосодержащие аминокислоты

Общее содержание белка в злаках невелико.

Для покрытия потребности организма в белке некоторым категориям населения, особенно детям, трудно употребить достаточное по объему количество такого продукта, как пшеничный хлеб. Другим категориям, если и удастся съесть необходимое по белку количество пшеничного хлеба, то это сопровождается избыточным потреблением калорий.

Белковая ценность кормовых и пищевых продуктов, состоящих в основном из злаков, может быть повышена добавлением к ним биомассы микроорганизмов, содержащей много белка и лизина, – 1-й лимитирующей аминокислоты в белках злаков.

Перевариваемость биомассы дрожжей в организме животных и человека обычно составляет 80–90 %. Перевариваемость белка яиц, молока, мяса и рыбы близка к 100 %, а многих растительных белков – около 80 %.

Входящие в состав белка аминокислоты усваиваются лучше, чем свободные аминокислоты, добавляемые в корм; следует также иметь в виду, что лизин может довольно легко взаимодействовать с различными органическими соединениями по α -аминогруппе и становиться недоступным организму животного. Таким образом, неверно говорить о нехватке белка вообще без учета как содержания белка в продукте, так и качества белка.

Контрольные вопросы и задания

1. В чем состоит проблема дефицита пищевого и кормового белка?
2. Охарактеризуйте биотехнологию производства микробного протеина как альтернативу традиционным сельскохозяйственным технологиям.
3. Опишите историю использования микроорганизмов для производства белка.
4. Перечислите заменимые и незаменимые аминокислоты, входящие в состав белков.
5. Дайте определение понятия эталонного белка по шкале ВОЗ.
6. Дайте определение понятия и приведите расчет аминокислотного сора белка.
7. Какие аминокислоты являются лимитирующими?
8. Поясните смысл индекса Осера, укажите его значение. Каким образом он рассчитывается?
9. Дайте определение понятия и приведите расчет биологической ценности белка.
10. Опишите биологические и химические методы определения биологической ценности белков, укажите их достоинства и недостатки.

2. СЫРЬЕ, ПРОДУЦЕНТЫ И ПРИНЦИПИАЛЬНЫЕ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ СХЕМЫ ПОЛУЧЕНИЯ МИКРОБНОГО БЕЛКА

2.1. БЕЗВРЕДНОСТЬ МИКРОБНОЙ БИОМАССЫ. СЫРЬЕ И ПРОДУЦЕНТЫ БЕЛКА

Для современной науки и технологии продолжают оставаться актуальными вопросы изыскания новых источников питания, повышения питательной ценности кормов сельскохозяйственных животных и обогащения их белком.

В последние десятилетия интенсивно разрабатываются биотехнологические процессы, направленные на создание биологически полноценных кормовых и пищевых продуктов микробного синтеза. Такие продукты являются естественными концентратами белка, витаминов, антиоксидантов и других биологически активных соединений.

Безвредность микробной биомассы. На микробную биомассу, предназначенную для использования в качестве компонента корма или пищи, полностью распространяются ограничения, наложенные на другие кормовые и пищевые добавки. Это относится к допустимым нормам содержания патогенных микроорганизмов, канцерогенов, токсинов, тяжелых металлов и т. д. Вместе с тем к микробной биомассе предъявляются и специфические требования, связанные как с особенностями микроорганизма вообще, так и с особенностями конкретной биомассы. Специфика штамма, условия выращивания скажутся на том, что в клетке будут накапливаться и такие компоненты, как нуклеиновые кислоты, липиды, свободные жирные кислоты, углеводороды и др.

Нуклеиновые кислоты являются непременным компонентом клетки. И содержание их в быстроразвивающихся микроорганизмах будет выше, чем в клетках животных и растений. В состав нуклеиновых кислот входят пуриновые основания (C_5H_4N), которые в организме животных превращаются в мочевую кислоту ($C_5H_4O_3N_4$). У многих млекопитающих, рыб, сельскохозяйственных животных мочевая кислота за счет фермента уриказы превращается в более растворимое соединение аллантиин ($C_4H_6O_3N_4$). Поэтому даже довольно высокое содержание пуринов в корме практически не опасно для сельскохозяйственных животных.

В организме же человека фермента уриказы мало, поэтому основной продукт катаболизма пуринов у человека – плохо растворимая

мочевая кислота. Она выводится из организма в основном с мочей. Высокое содержание мочевой кислоты приводит к образованию камней в мочевыводящих путях у предрасположенных к этому лиц и подагре. В связи с этим консультативная группа по белку Продовольственной и сельскохозяйственной организации ООН и ВОЗ в 1975 г. пришла к заключению, что при введении в диету человека биомассы микроорганизмов он не должен потреблять более 2 г/сут нуклеиновых кислот (в дополнение к традиционной диете).

На содержание нуклеиновых кислот у микроорганизмов, особенно бактерий, значительное влияние оказывает скорость их роста: чем больше удельная скорость роста, тем больше в получаемой биомассе нуклеиновых кислот и тем ниже отношение белок/нуклеиновые кислоты. Обычно 2 г нуклеиновых кислот содержится в 20–30 г высушенной биомассы дрожжей или 10–20 г бактерий. Освободить клетки от большей части нуклеиновых кислот позволяет метод теплового шока. По этому методу дрожжи в течение нескольких секунд подвергают действию высокой температуры, а затем выдерживают несколько часов при 50–55 °С. Другие способы снижения нуклеиновых кислот в клетках основаны на применении специфических ферментов либо на обработке клеток растворами некоторых кислот, щелочей или метанолом.

В липидах микроорганизмов встречаются компоненты, физиологическое действие которых на организм животного недостаточно изучено. В ряде бактерий широко распространен полимер β-оксимасляной кислоты, безвредность которого исследована лишь частично. Содержание полимера зависит от условий культивирования и может колебаться в широких пределах. В липидах бактерий имеются циклопропановые кислоты, способные угнетать окисление жирных кислот в организме животного. Неблагоприятное воздействие биомассы водородных бактерий на организм человека частично связывается с наличием в их клетках C₁₇-циклической кислоты. В клетках у некоторых бактерий обнаружены разветвленные жирные кислоты, которые могут нарушать обменные процессы микроорганизма. В дрожжах указанные компоненты липидов отсутствуют, поэтому они не вызывают каких-либо опасений. Вместе с тем при выращивании некоторых бактерий удается добиться весьма высокого (до 70 % от массы высушенной биомассы) содержания белка, что определяет значительный интерес к исследованию бактерий как продуцентов белка.

В стандартах на кормовые дрожжи, получаемые на углеводородах, содержатся ограничения на так называемые остаточные углево-

дороды. Эти разнообразные вещества одно время рассматривали как не свойственные биологическим объектам, попадающие в организм человека из нефти через посредство кормовых дрожжей и сельскохозяйственных животных.

Для снижения содержания углеводов в дрожжах разработаны специальные технологические приемы. Дрожжи, выращенные на дизельном топливе или нефтяных дистиллятах, должны подвергаться глубокой экстракционной очистке органическими растворителями, а дрожжи, полученные на *n*-алканах, можно выдерживать в режиме голодания по органическому субстрату, а затем обязательно подвергать промывке. Некоторое количество углеводов удаляется из дрожжей в процессе сушки, что приводит к снижению токсичности.

Для производства белка следует использовать микроорганизмы, не вызывающие аллергических реакций у производственного персонала. Оценка пригодности конкретной микробной биомассы дается на основании химических, санитарно-гигиенических, ветеринарно-зоотехнических и медико-биологических исследований. Анализуются как собственно кормовая белковая добавка, так и пищевые продукты животноводства, полученные при ее использовании.

Белоксодержащие продукты, предназначенные непосредственно для питания человека, подвергаются еще более тщательному исследованию. Все это позволяет разработать технологии производства и способы применения белоксодержащих продуктов микробного происхождения, гарантирующие их полную безопасность для человека.

Сырье и продуценты белка. Следует учитывать, что подготовка субстратов для биоконверсии должна точно соответствовать свойствам микроорганизмов. Например, избыток моносахаридов в субстрате может вызвать катаболитную репрессию синтеза целлюлаз, что приведет к остановке ферментативного разложения деполимеризованной фракции целлюлозы и рост микроорганизмов будет осуществляться только за счет фракции моносахаридов. Полнота усвоения субстрата будет точно соответствовать степени распада полисахаридов древесины на стадии предгидролиза. Поэтому подходы к предобработке растительного сырья для биоконверсии в белок целлюлолитическими микроорганизмами должны разрабатываться с учетом особенностей этих продуцентов и базироваться на понимании механизмов ферментативного гидролиза целлюлозы.

По современным представлениям, разрушение целлюлозы происходит под действием целлюлазного комплекса, в состав которого могут входить четыре типа ферментов, гидролизующих 1,4-β-глико-

зидные связи между остатками глюкозы в молекуле целлюлозы: эндоглюканаза, экзоцеллобиогидролаза, целлобиаза, экзоглюкозидаза. На начальном этапе изучения ферментативного расщепления целлюлозы существовало мнение о том, что один фермент осуществляет первичную атаку на кристаллическую целлюлозу, а другие действуют на аморфную. Сейчас установлено, что в обоих случаях в расщеплении участвуют одни и те же ферменты. Эндо-1,4-β-глюканаза разрывает водородные связи на поверхности фибрилл, затем гидролизует гликозидную связь. Экзоцеллобиогидролаза (кофермент), по видимому, отщепляет глюкозные или целлобиозные остатки от нередуцирующих концов в месте разрыва цепей, вызываемого действием эндо-1,4-β-глюканаза. Таким образом, функция ее заключается в освобождении мест на поверхности целлюлозы для последующего действия этого фермента.

Экзоглюкозидазы образуют глюкозу в основном из промежуточных олигосахаридов, в то время как гидролиз промежуточной целлобиозы ферментом целлобиазой приводит к образованию лишь небольшого количества глюкозы. Первичная атака на целлюлозу осуществляется по аморфным зонам цепей, после чего по мере разрушения структуры кристаллических участков волокон ферменты диффундируют в эти участки. Именно поэтому индекс, характеризующий отношение аморфных участков к кристаллическим, является существенным показателем, определяющим скорость ферментативного гидролиза целлюлозы. Природное целлюлозосодержащее сырье характеризуется не только высокой степенью кристалличности, но и содержанием значительного количества примесей (главным образом лигнина, гемицеллюлоз), затрудняющих доступ целлюлолитических ферментов к реакционноспособным связям субстрата, поэтому для повышения эффективности деструкции необходима предварительная обработка – прежде всего механическое измельчение и делигнификация.

Большинство исследований по биологической деградации целлюлозы выполнено с культурой микроскопического гриба *Trichoderma viride*, синтезирующей большие количества целлюлолитических ферментов. Неконцентрированный фильтрат ферментов этого гриба за 24 ч произвел деградацию 15,2 % пшеничной соломы, 24,6 % соломы риса, 10,6 % арахисовой шелухи, 35 % газетной бумаги, 31,9 % картона. Дальнейшая химическая и физическая обработка целлюлозного материала делает его еще более разлагаемым и вызывает увеличение образования сахаров. Показано, что предварительная

обработка щелочью рисовой соломы, багассы и нативной целлюлозы увеличивает степень их ферментативной деградации до 53 %. Выход редуцирующих сахаров из рисовой соломы достигает 28 %, а целлюлозные гидролизаты содержат 2–3 % сахара и пригодны, по мнению ряда авторов, для роста дрожжей или бактерий. Увеличение выхода сахаров из целлюлозных субстратов возможно за счет концентрирования или очистки фермента.

Среди микроорганизмов – деструкторов лигноцеллюлозы уникальное значение имеют базидиальные грибы, многие представители которых способны эффективно разлагать и целлюлозу, и лигнин, используя их как ростовой субстрат. Установлено, что разложение древесины грибом *Phanerochaete chrysosporium* происходит при тесном взаимодействии циклов деструкции и утилизации целлюлозы и лигнина. В цикл вовлечено более десяти ферментов – пять различных эндоглюканаз, одна экзоглюканаза (действующая в синергизме с эндоглюканазами), две глюкозидазы. Кроме гидролитических ферментов, гриб синтезирует окислительные – целлобиозооксидазу и целлобиозохиноноксидоредуктазу, участвующие в расщеплении как целлюлозы, так и лигнина.

Установлена также важная роль в деградации лигнина внеклеточной фенолоксидазы, лакказы и пероксидазы. Лишенные фенолоксидазы мутанты гриба не способны расщеплять лигнин. Наряду с этим встречаются данные об отсутствии полной корреляции между деструкцией лигнина и наличием фенолоксидаз. Фенолоксидазы способны разлагать лигнин только в сочетании с другими окислительными ферментами. Чаще всего они выполняют функцию регуляторов ферментов, ответственных за разложение полисахаридов и лигнина древесины. Также установлено, что фенолоксидазы участвуют в детоксикации низкомолекулярных фенолов, которые образуются в процессе деструкции лигнина.

Результаты исследований американских ученых, проведенные с грибом *Phanerochaete chrysosporium*, позволили установить, что действительным биологическим агентом, ответственным за расщепление лигнина на уровне полимера, является новый экстрацеллюлярный фермент лигниназа. При этом окисление лигнина осуществляется путем расщепления С–С-концевых связей, что приводит к постепенной деполимеризации молекулы лигнина. Фермент выделен, очищен и изучен.

Полученные данные создают прочную основу для использования ферментной технологии в процессах разложения лигнина и доказы-

вают возможность микробиологической переработки его высококонцентрированных препаратов – многотоннажных отходов гидролизной и целлюлозно-бумажной промышленности. Наиболее подходящими для биотехнологических целей являются отходы сульфитной варки древесины. Остаточная жидкость, полученная после обработки 2000 кг древесины, содержит 620 кг лигнина, 210 кг моносахаридов, 60 кг полисахаридов и 100 кг уксусной кислоты, т. е. свыше 1000 кг вполне утилизируемого органического вещества.

Наряду с древесиной и отходами ее промышленной переработки перспективным сырьем для микробного синтеза белка являются отходы сельскохозяйственного производства. В России ежегодное производство только одной соломы составляет свыше 150 млн т, около 25 % ее общего количества используется на кормовые цели без предварительного обогащения белком. Однако нативная солома содержит не более 2 % сырого протеина, плохо поедается, усваивается в организме животных наполовину (белок соломы – на 10–20 %). Ежедневное введение в рацион животных необработанной соломы ухудшает переваримость других кормов.

Более 100 лет предпринимаются попытки повышения питательности соломы путем улучшения переваримости ее компонентов за счет термической или химической обработки, например щелочью. Эти способы не обогащают солому протеином и потому не могут способствовать сами по себе преодолению дефицита переваримого протеина кормов в животноводстве. Однако вместе с биоконверсией они способны существенно уменьшить дефицит кормового белка.

Большой интерес для получения полноценного белкового корма для скота представляют крахмалсодержащие субстраты – отходы зерноперерабатывающей промышленности: всевозможные виды отрубей, отходы от переработки картофеля. При выращивании картофеля на пищевые, семенные или технические цели оставалось не менее 20–35 % так называемой нестандартной клубневой фракции (НКФ), которую в настоящее время считают целесообразным использовать на корм скоту, хотя при скармливании 1 млн т НКФ животным отдается только 10 тыс. т протеина (содержание его в картофеле приближается к 1 % в расчете на сырую массу).

Ресурсы картофеля воспроизводимы, а потери сырья во всех отраслях картофелеперерабатывающей промышленности высоки. При переработке картофеля в виде отходов производства образуется мезга, клеточный сок и соковые воды, количество которых зависит от крахмалистости сорта и схемы переработки. При среднем содержании

сухих веществ в картофеле 25 % (в том числе 18 % крахмала) и при коэффициенте извлечения крахмала 82 % количество отходов составляет 10,24 % общей массы сырого вещества картофеля, или примерно 41 % сухих веществ, в том числе 15–20 % крахмала. Выход мезги с содержанием сухих веществ 6 % достигает 75–100 % массы картофеля и более половины сухого веса ее приходится на долю крахмала.

Соковые и сточные воды практически не утилизируются. Сброс их кроме загрязнения биосферы влечет за собой потери 18 % сухих веществ картофеля, или до 4,6 % его массы. Между тем в 1972 г. в Швеции осуществлено промышленное производство кормового белка из сточных вод, содержащих крахмал картофельной шелухи. Производительность установки составила 2000 т кормового белка в год. Этот способ позволил одновременно с получением ценного продукта проводить очистку ранее не используемых сточных вод. Затем в 1986 г. белорусскими учеными были разработаны способы использования отходов переработки картофеля для получения дрожжевого и грибного белка.

Приведенные данные свидетельствуют о возможности и целесообразности широкого использования отходов переработки растительного сырья для получения микробного протеина. Необходимо лишь сделать методы микробиологического синтеза приемлемыми для промышленного применения.

Промышленное производство товарной микробной биомассы осуществляется путем непрерывного аэробного культивирования аспорогенных дрожжей в нестерильных условиях. Отличительной особенностью микроорганизмов этого класса является их неспособность образовывать аскоспоры и отсутствие полового процесса. На большинстве гидролизно-дрожжевых заводов основу ассоциаций составляют дрожжи *Candida scottii* (60 % и более). Эти дрожжи обладают высокой продуктивностью и качеством, они полностью флоатятся, хорошо сепарируются.

В ассоциацию микроорганизмов могут входить также *C. tropicalis*, *C. utilis*. Для переработки сульфитных щелоков используют дрожжи *C. utilis*. Их доля в дрожжевой массе составляет 80–100 %.

Производство кормовых дрожжей организовано на основе переработки углеводного и углеводородного сырья.

В качестве углеводного сырья используются гидролизаты древесины и растительных отходов (подсолнечной и рисовой лузги, кукурузных кочерыжек, стеблей хлопчатника и др.); сульфитные щелока и предгидролизаты сульфатно-целлюлозного производства; обесспир-

тованная барда. Сырье ежегодно возобновляется и, как правило, является отходами.

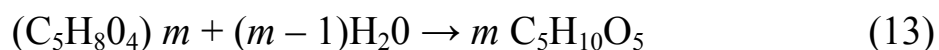
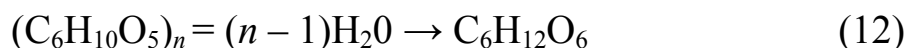
Способность к накоплению значительных количеств белковой биомассы встречается у представителей мицелиальных грибов (*Aspergillus* и *Fuzarium*), многих видов грибов семейства *Mucoraceae* и разных бактерий (*Pseudomonas methanica*). Лучшими видами дрожжеподобных грибов рода *Candida* являются *C. tropicalis*, *C. lipolytica*, *C. intermedia*, *C. guilliermondii*.

Гидролиз растительного, главным образом древесного сырья, предназначенный первоначально для получения гексоз, дающих при сбраживании этанол, служит почти исключительно для изготовления гидролизатов как сырья для аэробного культивирования дрожжей. Гидролизаты содержат смесь моносахаридов состава C_5 и C_6 – пентоз и гексоз, – и примеси, к сожалению, в большинстве своем нежелательные для микробиологического синтеза, но трудно отделяемые из получающегося разбавленного раствора углеводов. Важнейшим побочным продуктом гидролиза оказывается лишь фурфурол, химический синтез которого пока слишком затруднителен и не реализован в промышленности. Вследствие этого все схемы гидролиза предусматривают тщательное отделение фурфурола, а для так называемого пентозансодержащего сырья – подсолнечной и хлопковой шелухи, кукурузных кочерыжек и т. п. – режим гидролиза подбирается специально в расчете на наибольший выход фурфурола.

Химический состав растительного сырья, перерабатываемого на гидролизных заводах, неодинаков и колеблется в широких пределах. Главной частью этого сырья являются полисахариды, количество которых составляет 40–75 %, и лигнин, содержание которого может варьировать от 15 до 60 %. Обычно в гидролизной промышленности под лигнином понимают все нерастворимые при кислотном гидролизе полисахаридов компоненты растительного сырья.

Полисахариды растительного сырья делятся на легко- и трудногидролизуемые. Легкогидролизуемая часть полисахаридов состоит из гемицеллюлоз и пектиновых веществ, количество которых составляет 15–40 %. Трудногидролизуемая часть полисахаридов состоит из целлюлозы с небольшой примесью гемицеллюлоз, общее количество которых 25–50 % в зависимости от вида растительного сырья. Наибольшее количество редуцирующих веществ (РВ) может быть получено при гидролизе кукурузной кочерыжки и древесины хвойных и лиственных пород.

Полный гидролиз древесины (полисахаридов) можно представить следующими уравнениями:



Лигнин – нерастворенный при гидролизе остаток растительного сырья – находит ограниченное применение и в большинстве случаев является балластом. При гидролизе древесины хвойных пород, содержащих от 2 до 10 % смолистых веществ, часть смолы образует эмульсию и вместе с коллоидным лигнином и продуктами распада сахаров оседает на стенках труб и приемников.

Основным способом гидролиза растительного сырья был и остается перколяционный гидролиз разбавленной серной кислотой при повышенном давлении и температуре. По этому способу горячая разбавленная кислота (жидкая фаза) непрерывно протекает через слой неподвижной твердой фазы (измельченного растительного сырья), которая полностью погружена в жидкость. Имеющиеся разновидности перколяционного гидролиза позволяют изменять удельную производительность гидролизаторов, варьировать температуру гидролиза и уменьшать расход кислоты.

При использовании гидролизата для культивирования микроорганизмов необходимо оценить его биологическую доброкачественность, под которой понимают показатель, отражающий степень влияния вредных примесей гидролизата на процесс выращивания дрожжей или выход целевых продуктов их жизнедеятельности.

Таким образом, биологическая доброкачественность сред зависит от содержания в них примесей, мешающих развитию микроорганизмов, отрицательно действующих на их жизнедеятельность, тормозящих процессы обмена. Доброкачественность сред определяют биологическим методом по таким показателям, как выход биомассы в единицу времени, физиологическая активность клеток микроорганизмов и т. д.

В гидролизных средах основной примесью, подавляющей обмен веществ, рост и размножение дрожжей, является фурфурол, тормозящее действие которого проявляется при концентрациях выше 0,02 %. Оксиметилфурфурол (ОМФ) – также ингибитор процесса культивирования дрожжей, проявляет угнетающее действие при концентрациях выше 0,1 %. Однако при непрерывном культивировании допускается содержание ОМФ в гидролизате до 0,2 %, незначительно снижающее скорость роста дрожжей.

Поскольку полного удаления всех ингибирующих примесей достигнуть не удастся, установлены минимально допустимые концентрации (в %) основных ингибирующих примесей в питательной среде: фурфурол – не более 0,03–0,04; ОМФ – 0,05–0,1 (до 0,2); лигноуглинистые вещества – до 0,1.

Для получения биологически доброкачественных гидролизатов необходимо провести их обработку, включающую в себя следующие основные операции: нейтрализацию минеральных и части органических кислот; отделение осадков и коллоидных частиц; охлаждение субстрата до 30–35 °С; удаление вредных летучих примесей.

Основными недостатками процесса перколяционного гидролиза древесины являются образование крупнотоннажного отхода – лигнина и низкое качество гидролизата с точки зрения дальнейшего микробиологического синтеза. Наличие в смеси и пентоз, и гексоз, а также заметных количеств ингибирующих примесей ограничивает полную утилизацию гидролизата производством белкововитаминного концентрата (гидролизных дрожжей), в остальных биотехнологических производствах это сырье утилизируется менее эффективно.

В настоящее время интенсивно разрабатываются более совершенные процессы гидролиза растительного сырья, которые решают задачу повышения качества углеводного раствора и утилизации лигнина. Перспективными можно считать методы кислотного гидролиза или так называемого автогидролиза (без добавления кислот-катализаторов), предваряемые механическим или механохимическим воздействием на древесину. Особенно интересные возможности открываются при проведении не исчерпывающего, как это делается сейчас, а ступенчатого гидролиза с постепенным извлечением пентоз и гексоз, которые в этом случае могут быть получены отдельно. Следует учитывать, что подготовка субстратов для биоконверсии должна точно соответствовать свойствам микроорганизмов. Например, избыток моносахаридов в субстрате может вызвать катаболитную репрессию синтеза целлюлаз, что приведет к остановке ферментативного разложения деполимеризованной фракции целлюлозы и рост микроорганизмов будет осуществляться только за счет фракции моносахаридов. Полнота усвоения субстрата будет точно соответствовать степени распада полисахаридов древесины на стадии предгидролиза. Поэтому подходы к предобработке растительного сырья для биоконверсии в белок целлюлолитическими микроорганизмами должны разрабатываться с учетом особенностей этих продуцентов и базироваться на понимании механизмов ферментативного гидролиза целлюлозы.

Необходимо подчеркнуть, что растительность как единственный источник возобновляемого сырья, образующегося ежегодно в крайне широких масштабах за счет утилизации энергии солнца, углекислоты и воды, должна в принципе служить основой получения субстратов для микробиологического синтеза, который характеризуется высокими расходными коэффициентами по сырью. Можно полагать, что в недалеком будущем биотехнология будет базироваться на углеводном сырье растительного происхождения, чему в немалой степени должно способствовать и то обстоятельство, что подавляющее большинство промышленных штаммов-продуцентов быстро и эффективно растут на углеводных средах, предпочитая их многим другим источникам углерода.

2.2. ПРИНЦИПИАЛЬНАЯ ТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ СХЕМА ПОЛУЧЕНИЯ МИКРОБНЫХ БЕЛКОВЫХ ПРЕПАРАТОВ

Поскольку технология белковых веществ мало зависит от типа используемого сырья, целесообразно рассмотреть вначале общую технологическую блок-схему получения микробной биомассы, по всем входящим в нее отделениям, а затем перейти к особенностям проведения процесса в зависимости от вида субстрата и продуцента (рис. 2.1).

Всякое производство требует наличия нормативного и аварийного запаса исходных и вспомогательных веществ, обеспечивающего его нормальную эксплуатацию, в том числе и при временных перебоях в поставках. Вопросы поступления на завод и складирования веществ, служащих источниками углерода, азота, фосфора, макро- и микроэлементов для культивирования производственных штаммов, выходят за рамки данного пособия и не будут здесь рассматриваться.

Основу питательных сред для культивирования микроорганизмов составляют источники углерода. Исключительное многообразие микроорганизмов делает число таких соединений почти безграничным, так как, с одной стороны, существуют культуры, способные при осуществлении биосинтеза потреблять углерод только из высокоорганизованных молекул, например белков и пептидов, а с другой – многие бактерии и отчасти дрожжи утилизируют такие простейшие углеродсодержащие соединения, как метан, метанол и даже углекислота.

Клетки микроорганизмов в процессе роста испытывают необходимость не только в углероде, но и в азоте, фосфоре, макро- и микро-

элементах. Все вещества этого рода находятся в питательных средах в виде солей, исключением являются лишь среды, где азот и фосфор могут усваиваться растущими культурами из органических источников, например автолизатов или гидролизатов микробного или животного происхождения.

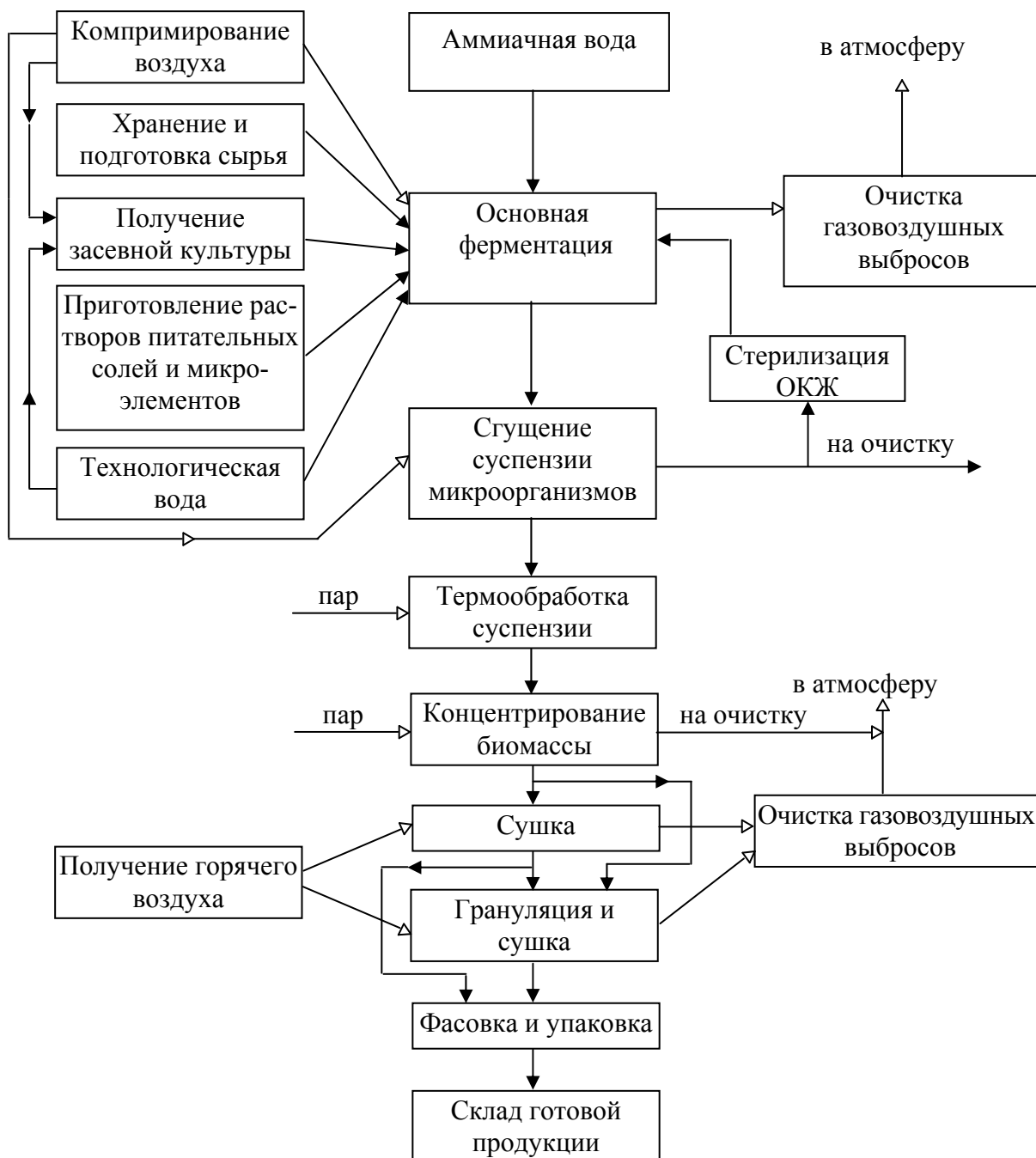


Рис. 2.12. Принципиальная технологическая схема получения белковой микробной биомассы (ОКЖ – отработанная культуральная жидкость)

В подавляющем большинстве случаев в промышленных средах для культивирования заранее содержатся все необходимые элементы питания, кроме кислорода.

Отделение приготовления питательной среды на современном микробиологическом производстве представляет собой, как правило, цех, оборудованный емкостями для хранения твердых и жидких веществ, средствами их транспортировки и аппаратами с перемешивающими устройствами для приготовления растворов, суспензий или эмульсий.

Жидкие и твердые источники углерода предпочитают обычно вводить в уже готовую питательную среду непосредственно перед ферментацией, так как это устраняет опасность заражения посторонней микрофлорой, вероятность которого, естественно, резко возрастает при хранении готовой питательной смеси.

В этой связи при непрерывном культивировании в производстве микробного белка потоки углеводов и питательных солей вводят в ферментатор отдельно по индивидуальным линиям подачи, а их смешение происходит уже в самом биореакторе.

Важнейшим элементом приготовления питательных сред является соблюдение требований асептики. В зависимости от жесткости принятых в этом отношении решений возникает необходимость либо только в создании заданного значения рН, обеспечивающего подавление посторонних микроорганизмов, либо в полной стерилизации всех подаваемых в биореактор потоков и самого биореактора.

Очень большое значение во всем процессе имеет отделение получения засевной культуры (или отделение чистой культуры), служащее для выделения чистой культуры посевного материала, используемого для засева, подсева и пересева промышленных ферментаторов основной ферментации. Обычно приготовление посевного материала проводится периодически, по мере необходимости, осуществляется в несколько стадий (рис. 2.2) и начинается в микробиологической лаборатории. Посевной материал *16* вносят в конические качалочные колбы *15* со стерильной питательной средой, состав которой соответствует составу среды, используемой в производстве. Колбы помещают на качалки и, проводя культивирование в оптимальных по температуре и рН условиях, контролируют развитие микроорганизмов.

Чистую культуру, находящуюся в логарифмической стадии роста, переносят в малый посевной аппарат *12* объемом 500 л с подготовленной питательной средой. Питательную среду готовят в специ-

альном смесителе 7, снабженном рубашкой для обогрева и мешалкой. Все компоненты питательной среды поступают из соответствующих сборников 1–5 через дозирующие устройства в биореактор 7, рН среды доводится до значения 5,5–5,8 аммиачной водой или известковым молоком. Одновременно в смеситель подается жидкий источник углерода (субстрат), используемый в данном производстве. Среду дополнительно обогащают автолизатом дрожжей из автолизатора 6.

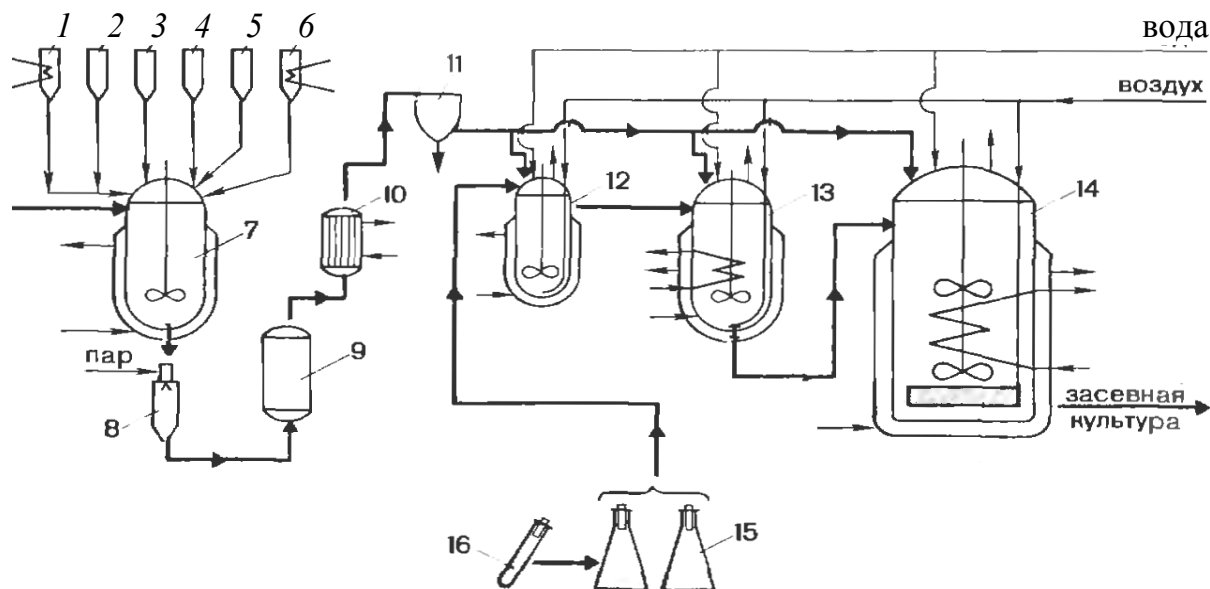


Рис. 3. Схема получения засевного материала
(по И. М. Грачевой и др., 1980)

После тщательного перемешивания в течение 20–30 мин готовую питательную среду перекачивают в отстойник 11, а если на заводе имеет место инфицирование процесса посторонней микрофлорой, то среду предварительно стерилизуют в греющей колонне 8 острым паром и выдерживателе 9 в течение 10–15 мин. Стерильную питательную среду охлаждают в теплообменнике 10 и подают в отстойник 11. На ряде производств питательная среда отдельно не готовится, а отбирается из основного производства и в отделении чистой культуры только отстаивается в отстойнике 11, а при необходимости предварительно стерилизуется.

Первоначально в посевной аппарат 12 подают около 40 л питательной среды, разбавляют ее в 4–4,5 раза стерильной водой и при интенсивной аэрации добавляют остальное количество питательной среды (80–100 л), поддерживая при этом значение рН на уровне 4,5–5,5 подачей аммиачной воды. Затем из качалочных колб вносят микробную суспензию объемом 1,5–2 л и проводят процесс культу-

вирования до накопления в среде 3,5–4,0 г клеток по абсолютно сухому веществу (АСВ).

Обычно продолжительность этого процесса не превышает 15–18 ч. Вся полученная в аппарате 12 суспензия (около 300 л) подается в большой посевной аппарат 13 объемом 4–5 м³, предварительно заполненный питательной средой (около 200 л) и стерильной водой (1,2–1,5 м³), включается аэрация и при постоянном доливе 70–75 л/ч питательной среды и добавлении аммиачной воды для поддержания заданного значения рН проводится культивирование в течение 10–12 ч.

На следующей стадии процесса проводится выращивание засевной культуры в ферментаторе 14 объемом 15–20 м³. Аппарат на 10 % (по объему) заполняется стерильной или прокипяченной водой, туда же вводится около 0,5 м³ питательной среды и полностью перекачивается все содержимое посевного аппарата 13 (2,5–2,7 м³).

Выращивание посевного материала без отбора суспензии продолжается 8–9 ч при интенсивной аэрации и постоянном доливе питательной среды (170–200 л/ч) до накопления в ферментаторе биомассы в количестве 4–5 г АСВ/л. После этого засевную культуру начинают отбирать на основное производство в количестве 1,3–1,7 м³/ч при одновременном доливе питательной среды.

Процесс ферментации длится от 5 до 10 сут, а затем цикл приготовления посевного материала возобновляется по мере надобности. При необходимости отбора засевной культуры на основную ферментацию с большей скоростью используется дополнительный ферментатор объемом 40–50 м³, в котором процесс идет, как описано выше для аппарата 14, а малый ферментатор 14 работает в схеме аналогично большому посевному аппарату 13. В этом случае удается получить поток засевной культуры в количестве 7–10 м³/ч.

К подготовительным стадиям производства относится приготовление растворов питательных солей и микроэлементов, необходимых для нормального развития микроорганизмов; технологическая схема этого участка приведена на рис. 2.3.

Необходимые соли со склада транспортером через дозировочные устройства (весы) подаются в заданном количестве в смесители 1 или 2 (объемом 10–15 м³), работающие поочередно для обеспечения непрерывной подачи растворов солей на стадию ферментации. Смеситель предварительно заполняется водой на 50–60 % (по объему), затем включается перемешивающее устройство и поочередно подаются необходимые соли, которые подбираются таким образом, чтобы при их совместном растворении не образовывался осадок.

Для повышения скорости растворения ряда солей в рубашку аппаратов 1 и 2 может подаваться греющий пар. Процесс растворения продолжается 20–30 мин, затем раствор поступает в отстойник 3, где удаляются нерастворимые примеси и осадок, если он образовался при совместном растворении солей. Осветленный раствор после отстойника 3 насосом 4 перекачивается на стадию ферментации. Если в качестве растворителя использовалась отработанная культуральная жидкость (ОКЖ), то для снижения инфицирования посторонней микрофлорой раствор проходит тепловую стерилизацию на установке непрерывной стерилизации, включающей в себя теплообменник-рекуператор 5 для подогрева исходного раствора до 60–70 °С отходящим после стерилизации горячим потоком; греющую колонну 6, где прямой поток прогревается острым паром (0,4 МПа) до температуры 120–130 °С, выдерживатель 7 – основной аппарат, где раствор находится в течение 10–15 мин и происходит гибель микроорганизмов. Обычно выдерживатель выполняют в виде реактора идеального вытеснения, так как время стерилизации при этом минимально.

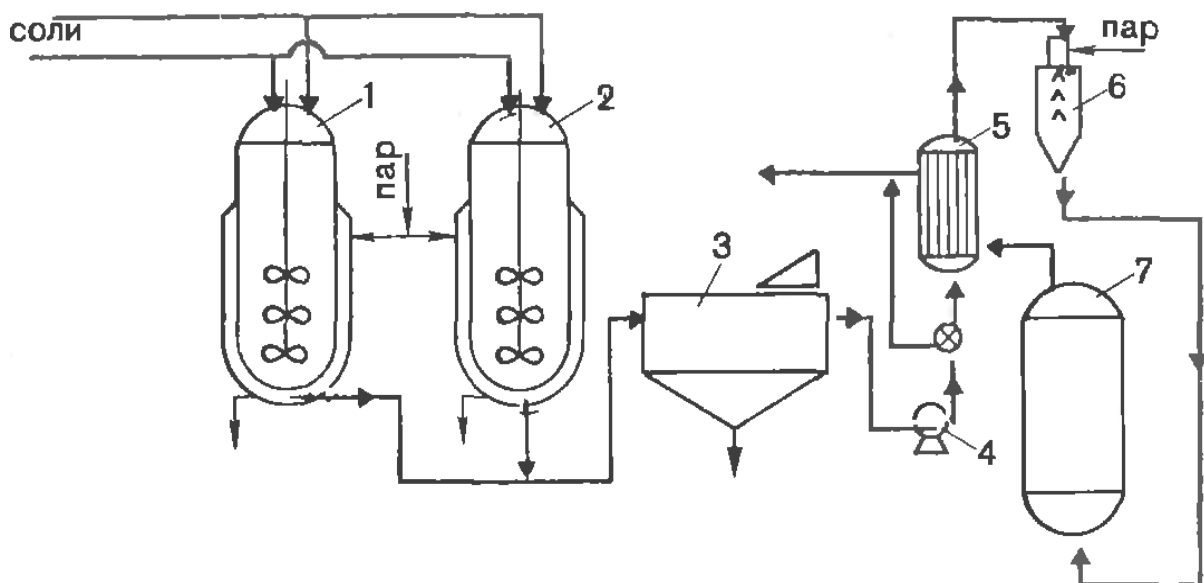


Рис. 2.3. Технологическая схема приготовления и стерилизации растворов питательных солей и микроэлементов (по М. С. Мосичеву, 1982)

Для повышения технологичности процесса обычно весь необходимый набор минеральных компонентов группируют в два раствора, которые параллельно подаются в основной ферментатор:

- раствор всех макроэлементов (N, P, K), необходимое количество которых составляет 5–70 г/л;
- раствор микроэлементов (Mg, Mn, Fe, Zn и т. д.), концентрации которых не превышают 5–10 мг/л.

Отделение компримирования воздуха существует только на тех заводах, где установлены ферментаторы, требующие для работы больших потоков воздуха под избыточным (около 0,3–0,5 МПа) давлением, и использует, как правило, центробежные компрессоры большой производительности. В случае применения на основной ферментации турбозжекционных самовсасывающих мешалок необходимость в сжатом воздухе ограничивается его подачей в отделение чистой культуры.

Технологические потоки из всех подготовительных отделений поступают на главную стадию производства – стадию ферментации.

Основным аппаратом в этом отделении является ферментатор – аппарат полного смешения по жидкой фазе, обеспечивающий:

- рост и развитие популяций микроорганизмов в объеме жидкой фазы;
- транспорт питательных веществ к клеткам микроорганизмов;
- отвод от микробных клеток продуктов их обмена (метаболизма);
- отвод из среды тепловыделения клеток как результата их жизнедеятельности.

Исходя из вышеприведенных требований к ферментатору, простейший аппарат должен иметь емкость, обеспечивающую большой рабочий объем для роста микроорганизмов; системы ввода и вывода жидкостных и газовых потоков; систему перемешивания, обеспечивающую полное смешение по жидкой фазе и интенсифицирующую массо- и теплопередачу при определенной турбулентности потока; систему диспергирования газовой фазы в ферментаторе, необходимую для ускорения массопередачи из газовой фазы в жидкую; теплообменные устройства, позволяющие быстро отводить теплоту из зоны реакции.

В промышленности получили широкое распространение несколько типов ферментаторов, отличающихся по своей конструкции, сложности работы с учетом вида используемого сырья (жидкое, газообразное, водорастворимое), количеству получаемой биомассы, и связанные в различные технологические схемы:

- батарея параллельно работающих ферментаторов позволяет обеспечить большую производительность завода, использующего в качестве исходного сырья моносубстрат;
- батарея последовательно работающих ферментаторов применяется в случае использования сложного субстрата, компоненты которого ассимилируются штаммом-продуцентом с различной скоростью, для обеспечения наиболее полной утилизации всех углеродсодержащих компонентов;

– батарея последовательно работающих ферментаторов с дополнительной промежуточной подачей питательной среды (с подпиткой) обычно необходима в том случае, когда высокая концентрация субстрата ингибирует или угнетает рост и развитие микробной популяции, а малая концентрация не позволяет достигнуть экономически оправданной концентрации биомассы в отходящей на стадию сгущения суспензии;

– батарея последовательно работающих ферментаторов с рециркуляцией части суспензии микроорганизмов используется в случае применения сложного трудноутилизируемого субстрата, когда микроорганизмам требуется длительное время адаптации к одному или нескольким компонентам сырья; в этом случае введение некоторого количества уже адаптированных к данному субстрату клеток позволяет значительно сократить время пребывания микроорганизмов в ферментаторе, увеличить скорость протока и повысить степень утилизации субстрата;

– батарея последовательно соединенных ферментаторов с подпиткой и рециркуляцией суспензии микроорганизмов позволяет успешно решить задачу наиболее полной утилизации многокомпонентного трудноусваиваемого субстрата, ингибирующего в высоких концентрациях микробные клетки.

Для решения проблемы повышения производительности завода, работающего на сложном сырье, возможно параллельное включение батареи ферментаторов по одной из вышеприведенных схем.

В обычных условиях стараются применять наиболее простое сочетание промышленных ферментаторов, обеспечивающее получение микробной суспензии после стадии ферментации с концентрацией 10–25 кг/м³ (1–2,5 % АСВ), которая и поступает в отделение сгущения суспензии микроорганизмов.

Основной задачей стадии сгущения или выделения является повышение концентрации биомассы до 12–16 % АСВ за счет механического отделения большей части межклеточной влаги за минимальное время.

На практике в процессе производства белковых веществ наиболее широко используется разделение на центробежных сепараторах, а в ряде случаев употребляется сочетание сепарации с такими малоэнергоемкими методами, как флокуляция, коагуляция, флотация или декантация:

– двухступенчатая сепарация с доочисткой ОКЖ на сепараторах наиболее часто применяется при сгущении бактериальной биомассы,

поскольку в этом случае концентрация клеток в ОКЖ после сепараторов I и особенно II ступени может достигать 1–3 г/л, что может вызвать заметные потери продукта; для снижения потерь в схему включен сепаратор, снижающий концентрацию клеток в ОКЖ до 0,1–0,3 г/л, а тяжелая фракция возвращается на сепараторы I ступени;

– трехступенчатая сепарация с предварительной флотацией широко применяется в случае хорошей флотуемости микробной суспензии, что имеет место при культивировании дрожжей на гидролизатах растительного сырья; использование флотатора позволяет повысить концентрацию биомассы, поступающей на сепараторы, в 2–3 раза (особенно при использовании двухступенчатого флотатора); наличие трех ступеней сепарации в данном случае вызвано необходимостью обязательной двукратной водной промывки суспензии от субстрата (в соотношении 1 : 1 после I ступени сепарации и 1 : 0,5 после II ступени), которая обеспечивает придание готовому продукту товарного цвета;

– двухступенчатая сепарация с предварительной декантацией используется только в случае культивирования микроорганизмов на нефтяных дистиллятах (НД) и позволяет достаточно эффективно отделить большую часть водной фазы от суспензии клеток в органической фазе в декантаторе; введение поверхностно-активного вещества (ПАВ) (сульфурид) в органическую фазу позволяет перевести дрожжевые клетки в водную фазу и на I ступени сепарации отделить их от депарафинизированного дизельного топлива, а в сепараторах II ступени повысить концентрацию клеток до 20–22 % АСВ.

Рассмотрим еще один вариант принципиальной технологической схемы, используемой в производстве белковых кормовых дрожжей.

Технологический процесс получения белковых кормовых дрожжей складывается из следующих операций: приготовления питательной среды, выращивания дрожжей, сгущения, упаривания и высушивания биомассы.

Процесс аэробного глубинного культивирования микроорганизмов осуществляется в ферментаторах непрерывного действия. Объемы ферментаторов достигают нескольких сот кубических метров (320–1700 м³).

В среду с размножающимися микроорганизмами непрерывно подаются водный раствор минеральных солей и применяемый в конкретном процессе органический субстрат. Культура подвергается перемешиванию, аэрированию и охлаждению.

Скорость выделения тепла в процессе роста аэробных микроорганизмов прямо пропорциональна скорости потребления ими молекулярного кислорода. На каждый грамм потребленного микроорганизмами кислорода выделяется 142,5 кДж. Количество потребляемого кислорода достигает 80 % от получаемого сухого вещества дрожжей. Так как дрожжи усваивают только мелкодиспергированный, растворенный в жидкой среде кислород, количество его должно быть достаточным для нормального размножения и роста дрожжей. В промышленности расход воздуха составляет от 20 до 40 м³ на 1 кг абсолютно сухих дрожжей. Колебание в расходе зависит от системы воздухораспределения в дрожжерастильном аппарате, природы дрожжей, технологического режима выращивания.

Для диспергирования воздуха в питательной среде, повышения скорости его растворения и увеличения времени соприкосновения пузырьков с жидкостью, содержащей дрожжи, применяют различные воздухораспределительные системы: барботажную; с механическими средствами распыления или турбоаэрационную; эрлифтную; вибрационную.

Барботажная система воздухораспределения воздуха основана на принципе распыления воздуха в начале ввода его в среду. Чем меньше распылен воздух, тем полнее он используется дрожжами при прохождении через слой жидкости. Барботажная система не обеспечивает достаточного диспергирования воздуха и интенсивного перемешивания среды в дрожжерастильном аппарате, что приводит к неравномерному распределению дрожжей по высоте аппарата и снижению выхода биомассы.

Для усиления диспергирования воздуха в жидкости применяют системы с механическим или турбоаэрационным распылением воздуха. Измельчение крупных пузырьков воздуха в жидкости осуществляется с помощью различных вращающихся приспособлений (лопастей, дисков и др.). Однако даже применение многоярусных мешальных устройств с большим числом оборотов не обеспечивает нужной вертикальной циркуляции жидкости.

Технологический процесс получения белковых кормовых дрожжей на гидролизатах растительного сырья складывается из следующих операций: гидролиза растительного сырья разбавленной серной кислотой, подготовки гидролизата к биохимической переработке, выращивания дрожжей, сгущения, упаривания и высушивания биомассы.

Технологическая схема приведена на рис. 2.4.

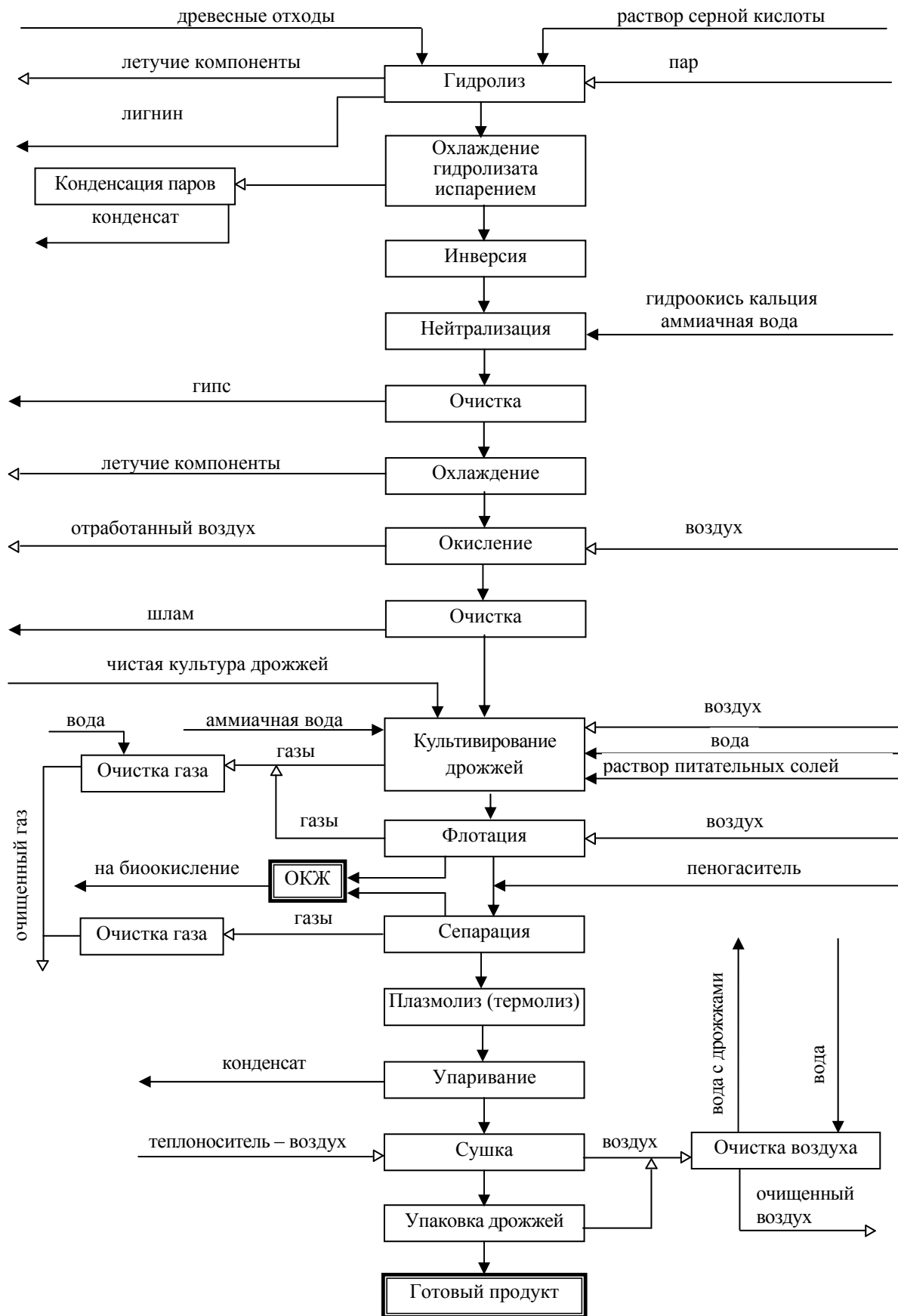


Рис. 2.4. Схема получения кормовых дрожжей из растительного сырья

В настоящее время в дрожжевом производстве при получении кормовых дрожжей на углеводном сырье используются высокопроизводительные ферментаторы эрлифтного типа.

При эрлифтной системе воздухораспределения давление воздуха не теряется при вводе в дрожжерастильный аппарат, а используется для создания циркуляционных потоков, выравнивающих концентрацию воздуха, дрожжей, питательных веществ по высоте и объему аппарата. Воздух, подаваемый в аппарат, должен быть чистым и не зараженным посторонними микроорганизмами.

Освобождение от механических примесей осуществляется с помощью фильтров, внутри которых находится гофрированная металлическая сетка с антикоррозийным покрытием. Затем воздух промывается в башне, представляющей собой вертикальный стальной цилиндр, заполненный керамическими кольцами, по которым сверху вниз течет холодная вода.

Для этих целей также возможно применение фильтров с наружным обогревом до 145 °С, внутри которых находится стекловата и активированный уголь.

При выращивании дрожжей образуется пена, которую можно гасить различными методами: химическими, механическими и гидравлическими. В ферментаторах эрлифтного типа происходит гашение пены за счет своей массы на стенках ферментатора.

Выращенные клетки дрожжей отделяют от водной среды флотированием, сепарированием или фильтрованием, если используют мицелиальные грибы. Флотационный способ основан на способности дрожжевых клеток сорбироваться на поверхности пузырьков воздуха и за счет этого переноситься из жидкой среды в пенный слой при продувании среды воздухом. На флотаторах происходит сгущение дрожжевой суспензии до 100–150 г/л. ОКЖ из флотатора направляется на биоокисление.

Дрожжевая суспензия после флотирования последовательно проходит через первую и вторую ступень сепарации с соответствующим повышением концентрации с 7,5–10 и 12,5–15 % по сухим веществам (или с 300–400 до 500–600 г/л по прессованным дрожжам). Сгущение дрожжевой суспензии в центробежном поле основано на разделении твердой фазы, дрожжевых клеток с плотностью около 1,1 и жидкой фазы с плотностью 1,01 г/см³. Потери дрожжей на стадии сепарации составляют 5–7 %. Отсепарированные дрожжи подвергаются термической обработке (плазмолизу) при 80–90 °С в аппаратах-плазмолизаторах, приводящей к отмиранию клеток. Полученную в результате такой обработки сметанообразную массу высушивают

до остаточной влажности 6–10 %, используя, как правило, распылительные сушилки либо барабанные (выбор зависит от производительности предприятия). В распылительных сушилках белок и аминокислоты лучше сохраняются от термического разложения, и выход белка возрастает на 5 % по сравнению с выходом при сушке на вальцовых сушилках. Температура в зоне сушки распылительных сушилок 90–95 °С, барабанных – 150–160 °С.

После высушивания получают порошкообразный или хлопьевидный продукт, который можно подвергнуть гранулированию. Продукт упаковывают и направляют на комбикормовые заводы и другим потребителям.

По показателям качества (ГОСТ 20083–74) кормовые дрожжи делятся на четыре группы: высшая (содержание истинного белка 44 %), первая (41 %), вторая (36 %) и третья (32 %). До 1987 г. в кормовых дрожжах регламентировалось содержание сырого протеина (56, 51, 46 и 43 % АСВ соответственно). Цвет дрожжей коричневый. Массовая доля влаги должна составлять не более 10 %, в гранулированных дрожжах – не более 11 %, диаметр гранул 5–13 мм, длина гранул до двух диаметров, фракции, проходящей через сито с диаметром отверстий 3 мм, не более 5 %. Гарантированный срок хранения дрожжей не более 6 мес.

Товарные дрожжи кроме белка содержат до 30 % углеводов, 3–5 % липидов, до 10 % неорганических веществ, а также нуклеиновые кислоты, лигногуминовые вещества и др.

По аминокислотному составу микробный белок близок к животному белку. С целью повышения кормовой ценности дрожжевого белкового продукта проводится его обогащение лизином – наиболее важной незаменимой аминокислотой (до 2 % от массы абсолютно сухих дрожжей) и витаминами группы В (холин, никотиновая и пантотеновая кислоты, рибофлавин, биотин, фолиевая кислота и др.), а также эргостерином (провитамин Д₂).

В целом получаемый продукт характеризуется высокой кормовой и биологической ценностью за счет сбалансированного аминокислотного состава и обогащения комплексом необходимых витаминов.

2.3. ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ – ПРОДУЦЕНТОВ БЕЛКА НА ГИДРОЛИЗАТАХ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ

Одним из главных преимуществ растительной биомассы перед другими источниками органического сырья является постоянное ее возобновление в процессе фотосинтеза. В результате фиксации

солнечной энергии на земном шаре ежегодно образуется $1,8 \cdot 10^{12}$ т растительной биомассы, что более чем в 20 раз превышает суммарную добычу угля, нефти и газа. Из всех видов растительной биомассы важнейшим для промышленной переработки является древесина.

Исторически одним из первых субстратов, используемых для получения кормовой биомассы, были гидролизаты растительных отходов, предгидролизаты и сульфитный щелок – отходы целлюлозно-бумажной промышленности. Интерес к углеводному сырью как основному возобновляемому источнику углерода значительно возрос еще и с экологической точки зрения, так как оно может служить основой для создания безотходной технологии переработки растительных продуктов.

Рассмотрим особенности культивирования микроорганизмов на гидролизатах растительного сырья и сульфитных щелоках. В связи с тем что гидролизаты представляют собой сложный субстрат, состоящий из смеси гексоз и пентоз, среди промышленных штаммов-продуцентов получили распространение виды дрожжей *C. utilis*, *C. scottii* и *C. tropicalis*, способные наряду с гексозами усваивать пентозы, а также переносить наличие фурфурола в среде. Сейчас на большинстве гидролизных заводов внедрены наиболее продуктивные штаммы кормовых дрожжей *C. scottii*, удовлетворительно утилизирующие наиболее трудноусвояемую арабинозу и развивающиеся при температуре 36–38 °С и рН 4,2–4,6. На гидролизных заводах широко используется также совместное культивирование *C. scottii* и *C. tropicalis*, так как штаммы *C. tropicalis* более урожайные, но в отличие от *C. scottii* они не являются прототрофами, так как не способны сами синтезировать все витамины. Совместное же выращивание этих культур обеспечивает высокий выход биомассы при относительно невысоких требованиях к субстрату.

Состав питательной среды в случае культивирования на углеводном сырье значительно отличается от применяемого при выращивании микроорганизмов на углеводородном субстрате.

В гидролизатах и сульфитных щелоках имеются в небольшом количестве практически все необходимые для роста дрожжей микроэлементы, перешедшие в раствор из растительных тканей, основных и вспомогательных материалов и внесенные с водой. Недостающие количества азота, фосфора и калия вводятся в виде общего раствора солей аммофоса, хлорида калия и сульфата аммония в количествах, обеспечивающих концентрацию каждого элемента в среде (мг/л): азота – до 900; фосфора (в пересчете на P_2O_5) – 400–450; калия – до 30.

Помимо неорганических добавок с сырьем в ферментационную среду поступает большое количество органических веществ, причем кроме углеводов, там содержатся и органические кислоты. В сульфитных щелоках это уксусная и муравьиная кислоты. Дрожжи утилизируют уксусную кислоту совместно с сахарами в такой последовательности: глюкоза, уксусная кислота, манноза, ксилоза, галактоза, арабиноза.

При использовании смешанных культур наблюдается практически полное потребление субстрата в случае применения двухступенчатой последовательной или параллельно-последовательной схемы соединения ферментаторов, что является одной из основных особенностей процесса культивирования. Ферментация осуществляется в эрлифтных аппаратах конструкции Лефрансуа–Марийе объемом 320 и 600 м³ (рис. 2.5).

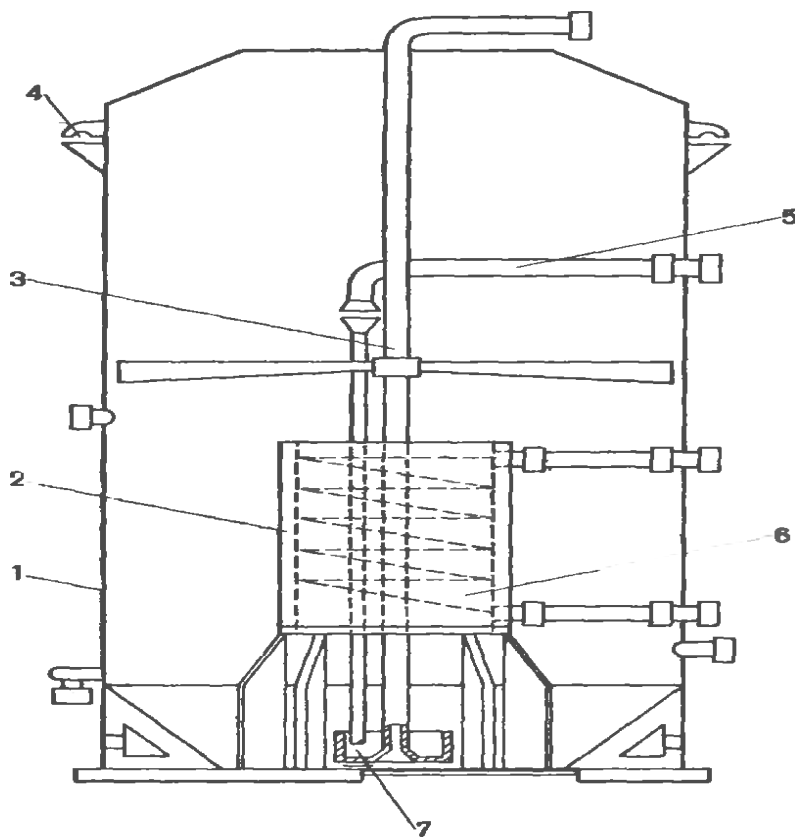


Рис. 2.5. Схема эрлифтного ферментатора объемом 600 м³
(по И. И. Бортникову, А. М. Босенко, 1982)

Резервуар ферментатора 1 имеет цилиндрическую форму с усеченным днищем, предотвращающую образование застойных зон. Рабочий объем ферментатора составляет 200–250 м³.

По воздуховоду 3 диаметром 400 мм от воздуходувки производительностью 10 тыс. м³/ч в ферментационную среду подается воздух под избыточным давлением 40–60 кПа.

В нижней части воздуховодная труба 3 выполнена в виде рас-труба с поднятыми вверх краями для образования кольцевой полости (кюветы) 7. В кювету по отдельному трубопроводу 5 подается питательная среда в смеси с субстратом, которая в виде тонкой пленки стекает с краев по внешним стенкам кюветы. Стекающая из кюветы жидкость подхватывается встречным потоком воздуха, проходящим со скоростью 20–25 м/с через кольцевой зазор высотой 20–25 мм между основанием кюветы и днищем аппарата. В процессе насыщения питательной среды образуется газожидкостная эмульсия, плотность которой (300–500 кг/м³) значительно меньше плотности среды между корпусом аппарата и циркуляционным диффузором 2.

Для отвода выделяющейся в процессе биосинтеза теплоты внутрь диффузора 2 встроены теплообменник 6 и предусмотрено орошение водой 4 внешней поверхности корпуса аппарата.

На биохимических заводах большой мощности по производству кормовых дрожжей на углеводном сырье успешно эксплуатируются барботажно-эрлифтные ферментаторы объемом 1300 м³ с многозонным воздухораспределением. Рабочий объем аппарата условно разделен на 4–5 зон, в каждой из которых расположен один циркуляционный диффузор, работающий аналогично описанному выше ферментатору. Процесс культивирования дрожжей во всех рассмотренных аппаратах осуществляется в непрерывном режиме при скорости потока, равной 0,2–0,25 ч⁻¹ и значении рН 4,2–4,6, что обеспечивает преимущественное развитие основного штамма-продуцента. Оптимальная температура ферментации при выращивании *C. utilis* составляет 30–35 °С, *C. tropicalis* – 36–37 °С, *C. scottii* – 38–40 °С.

При размножении дрожжей на гидролизатах растительного сырья или сульфитном щелоке происходит повышение кислотности среды за счет накопления в среде сульфат-ионов. Поэтому для поддержания рН среды проводят подтитровку аммиачной водой.

При рассмотрении особенностей технологической схемы получения дрожжевой биомассы остановимся на двух, наиболее широко используемых вариантах.

В первом варианте применяется двухступенчатая схема культивирования микроорганизмов на неразбавленном сусле с концентрацией редуцирующих веществ 3,0–3,5 % (по массе) при частичной их утилизации (остаток РВ = 1,0–1,2 % (по массе) на первой ступени.

Здесь дрожжами ассимилируются гексозы как наиболее легко усвояемые сахара, затем клетки отделяются от культуральной жидкости и направляются на стадии выделения и получения готового продукта. Отделенная культуральная жидкость с концентрацией РВ = 1,0–1,2 % (по массе), содержащая в основном пентозные сахара, поступает на вторую ступень ферментации, где для более полной утилизации пентоз используются другие штаммы дрожжей или микроскопических грибов.

В другом варианте процесс проводится в двух последовательно соединенных ферментаторах. В первый (головной) аппарат подается разбавленное до содержания РВ = 1,4–1,8 % (по массе) сусло, сюда же поступают питательные соли и все остальные компоненты и проводится ферментация, во время которой происходит утилизация гексозных сахаров и уксусной кислоты (при работе на сульфитных щелоках). Полученная дрожжевая суспензия непрерывно перетекает во второй ферментатор, где при интенсивной аэрации без добавки субстрата происходит доутилизация остаточных моносахаридов и увеличение концентрации дрожжей до 12–14 г/л. В этом случае использование смешанных культур позволяет довести усвоение до 80 % РВ субстрата при выходе биомассы (по отношению к РВ) до 70 %. Суспензия дрожжей из второго ферментатора поступает в одно- или двухступенчатый флотатор и с концентрацией 25–35 г/л и через газоотделитель подается в отделение сепарации. Трехступенчатая сепарация с двукратной промывкой дрожжевого концентрата водой для удаления пигментных примесей и снижения зольности готового продукта обеспечивает повышение концентрации дрожжей до 15–20 % АСВ. Дальнейший процесс получения кормовой биомассы не отличается от ранее описанного.

На ряде промышленных предприятий кормовые дрожжи обогащают витамином D₂ с помощью облучения их ультрафиолетовым светом. В этом случае содержащийся в липидной фракции дрожжей эргостерин в количестве 0,2–0,6 % (по массе) превращается в витамин D₂. Поскольку этот переход происходит через ряд изомерных продуктов, то при неравномерном облучении могут образовываться вредные соединения, а при слишком интенсивном облучении возможно частичное разрушение белка. Поэтому витаминизации чаще подвергают суспензию дрожжей, прокачиваемую по кварцевым трубкам при облучении кварцевыми лампами. Это позволяет получить содержание витамина D₂ до 5000 м. е. в 1 г сухой биомассы (1 мг чистого витамина D₂ соответствует 40 тыс. международных единиц – м. е.).

Кормовые дрожжи, полученные при культивировании на гидролизатах растительного сырья и сульфитных щелоках, имеют следующий состав (%): белок 43–58; липиды 2,3–3,0; углеводы 11–23; зола – до 11; влажность – не более 10.

В случае использования гидролизатов растительного сырья возможно, кроме рассмотренного пути непосредственного биосинтеза кормовой биомассы, осуществление процесса комплексной переработки гексоз и пентоз. По этой технологии в качестве готовых продуктов получают этанол, углекислоту и кормовые дрожжи.

В соответствии с этим направлением гидролизаты растительного сырья с большим содержанием гексоз на первой стадии подвергаются культивированию в анаэробных условиях, при этом гексозы сбраживаются дрожжами до этилового спирта и углекислоты с последующей отгонкой этанола ректификацией. Оставшаяся послеспиртовая барда, содержащая в основном пентозы и органические кислоты, поступает в ферментатор, где в аэробных условиях дрожжи утилизируют остаточные углеводы и кислоты, давая в качестве конечного продукта кормовую биомассу.

Так, при переработке 1 т хвойной древесины по прямой схеме получается 200–240 кг кормовых дрожжей, а в комплексном процессе – 175–180 л этанола, до 70 кг углекислоты и до 35 кг кормовой биомассы.

Одним из перспективных субстратов в производстве кормовой биомассы являются гидролизаты торфа, имеющие в своем составе большое количество легкоусвояемых моносахаров (в основном пентоз) и органических кислот. В процессе культивирования наиболее урожайных дрожжей *S. tropicalis* используется гидролизат торфа, разбавленный отработанной культуральной жидкостью до содержания РВ 1,6–1,7 % (по массе). Дополнительно в состав питательной среды вводятся лишь наибольшие количества суперфосфата и хлорида калия. Все остальные ингредиенты присутствуют в гидролизате торфа в достаточных количествах. Источником азота служит аммиачная вода, подаваемая в ферментатор для поддержания рН в интервале 4,2–4,6.

Для обеспечения максимальной степени утилизации источников углерода процесс культивирования проводят в двух последовательно соединенных ферментаторах по схеме, аналогичной ранее рассмотренной для гидролизатов растительного сырья. Выход дрожжей достигает 65–68 % от РВ.

Рассмотрим особенности культивирования микроорганизмов на зернокартофельной и меласной барде. Барда, являющаяся отхо-

дом спиртового и ацетонобутилового производства, содержит в своем составе до 12 % сухих веществ, среди которых в наибольшем количестве из усваиваемых микроорганизмами форм углерода (в %) присутствуют карбоновые кислоты (до 20 от сухих веществ); редуцирующие вещества (до 7 от АСВ), аминокислоты (до 3 от АСВ), глицерин и другие спирты (до 6 от АСВ). Учитывая, что наличие таких источников углерода позволяет получить из 1 м³ барды до 13–14 кг сухой кормовой биомассы, эти отходы также могут являться субстратом для производства микробных кормов. Для повышения выхода дрожжей в перерабатываемую барду приходится добавлять дополнительные вещества: свеклосахарную мелассу, кукурузный экстракт и другие углеродсодержащие вещества, что повышает себестоимость кормовых дрожжей. Поэтому экономически выгодным является выращивание дрожжей *S. guilliermondii* на смеси барды и гидролизатов растительного сырья.

Присутствующие в значительных количествах соли калия, натрия, кальция, магния и других микроэлементов делают ненужной специальную их добавку в ферментационную среду. Недостаток в барде азота и фосфора восполняется добавлением в питательную среду соответствующих солей и минеральных кислот. В связи с утилизацией дрожжами содержащихся в субстрате карбоновых кислот кислотность среды прогрессивно снижается (рН растет), поэтому для поддержания рН среды необходима добавка минеральных кислот. Наибольший выход биомассы наблюдается при рН 5,5–6,0 (до 74 г/л), но в этом случае культуральная жидкость сильно вспенивается, что ухудшает условия ферментации и выделения дрожжей. Поэтому в процессе культивирования поддерживают значение рН на уровне 4,5–4,8, при этом выход биомассы достигает 69 г/л при температуре 30–33°C.

Присутствие в барде микробных клеток, оставшихся после отделения спирта или ацетона, позволяет проводить культивирование как с отделением мертвых клеток, так и без него. При периодическом или полунепрерывном процессе отделять клетки нет необходимости, а в случае непрерывной ферментации возникает необходимость в отделении мертвых клеток с предыдущей стадии.

Состав кормовых дрожжей, полученных культивированием на зерно-картофельной и мелассной барде, следующий (%): сырой протеин 47–56; липиды 2–5; углеводы 14–22; зола 7–10; влажность – до 10.

Контрольные вопросы и задания

1. Какими показателями характеризуется безвредность микробной биомассы?
2. Какие свойства растительного сырья позволяют использовать его как субстрат для выращивания микроорганизмов – продуцентов белка?
3. Охарактеризуйте гидролиз растительного сырья как процесс и опишите его механизм. Какие вещества входят в состав растительных гидролизатов?
4. Изобразите принципиальную технологическую схему получения белковых продуктов, выделите основные стадии процесса.
5. Изобразите схему технологической стадии получения чистой культуры микроорганизма – продуцента белка.
6. Какие основные параметры ферментации должны контролироваться на стадии получения биомассы в промышленных биореакторах?
7. Охарактеризуйте основные технологические режимы стадии ферментации, опишите устройство и укажите принцип действия ферментатора.
8. Какое оборудование используется на стадии выделения и концентрирования биомассы?
9. Охарактеризуйте основные режимы и параметры флотации, сепарирования и сушки биомассы.
10. Назовите основные стадии технологии производства кормовых дрожжей.
11. Назовите основные компоненты состава кормовых белковых продуктов на основе биомассы дрожжей и укажите аминокислоты, входящие в состав белков.

3. ПЕРСПЕКТИВНЫЕ BIOTEХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ БЕЛКОВОЙ МИКРОБНОЙ БИОМАССЫ

3.1. ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ – ПРОДУЦЕНТОВ БЕЛКА НА АЛЬТЕРНАТИВНЫХ ИСТОЧНИКАХ УГЛЕРОДСОДЕРЖАЩЕГО СЫРЬЯ

В последние годы основные направления исследований по микробиологическому получению белковых веществ несколько изменились.

Прежде всего следует отметить повышение внимания к изысканию новых видов сырья для производства белковых веществ. В этой связи изучают фототрофные микроорганизмы, которые растут в автотрофных условиях, ассимилируя углекислоту.

Культивирование водорослей с целью получения белковых веществ исследуется уже несколько десятилетий. В настоящее время наиболее эффективный способ использования биомассы хлореллы, спирулины и других водорослей заключается в применении их в качестве биостимуляторов.

Может оказаться перспективным применение в качестве продуцентов белковых веществ водородных бактерий, относящихся к хемолитоавтотрофам.

Наиболее перспективными новыми видами сырья для микробного биосинтеза кормового белка на ближайшие годы являются спирты – метиловый и этиловый.

Повышение внимания к низшим спиртам объясняется рядом обстоятельств, среди которых следует отметить разработку новых эффективных способов крупнотоннажного производства метанола и этанола, высокую степень чистоты получаемых спиртов, хорошую растворимость их в воде.

Рост бактерий на метаноле. Выход биомассы составляет 50 % и более от массы спирта. Энергетические выходы роста бактерий на метаноле (доля химической энергии органического субстрата, сохраняющаяся как химическая энергия в выросшей биомассе) достаточно велики (более 50 %), но ниже, чем при росте микроорганизмов на углеводах (до 65 %).

При росте микроорганизмов на углеводородах энергетический выход ниже и составляет около 40 %. С этим связано более эффек-

тивное использование дорогостоящего растворенного кислорода и повышение производительности ферментаторов при использовании метанола по сравнению с культивированием микроорганизмов на н-алканах.

Процесс выращивания бактерий на метаноле уже доведен до реализации. Имеются сведения о работе западногерманской фирмы «Хехст», использующей в качестве продуцента *Methylomonas clara*, и английской компании «ISI», организовавшей промышленное производство на основе использования метанола бактериальной массы кормового назначения. Найден и интенсивно изучается ряд штаммов дрожжей, способных расти, используя метанол. Метанолассимилирующие дрожжи часто встречаются среди родов *Hansenula* и *Pichia*, к ним же относится *Candida boidinii*. Дрожжи, использующие метанол, наиболее часто выделяются из лесных почв, из коры деревьев или насекомых, живущих на поверхности деревьев. Возможно, это связано с наличием в таких местах лигнина – вещества, богатого метоксильными группами

Фермент, окисляющий метанол у дрожжей, является алкогольоксидазой, содержащей флавин (ФАД – флавинаденинуклеотид). Эта оксидаза может окислять и другие низшие спирты, но ее нет или содержание очень мало в клетках при выращивании дрожжей на этаноле или глюкозе. При окислении одной молекулы метанола до формальдегида метанолоксидазой образуется одна молекула пероксида водорода. Алкогольоксидаза, как и каталаза, локализована в пероксиосомах, содержание которых резко увеличивается при росте дрожжей на среде с метанолом.

Согласно современным представлениям, дрожжи ассимилируют углерод метанола на уровне формальдегида, включаемого через особый ксилулозо-монофосфатный цикл в строительный материал клеток.

Формальдегид – промежуточный продукт окисления метанола, может метаболизироваться в дрожжевой клетке разными путями, причем энергетическая эффективность путей существенно различается. Поэтому для целей практического выращивания микроорганизмов с высокими выходами роста следует изучить их зависимость от различных параметров выращивания. Наибольшие энергетические выходы при росте дрожжей на метаноле близки к 40 %.

Максимальные удельные скорости роста (μ) сравнительно невелики и обычно не превышают $0,2 \text{ ч}^{-1}$. Однако удельная скорость расхода субстрата на поддержание жизни (m_s) примерно в 10 раз меньше этой величины. Поэтому в соответствии с формулой Иерусалимско-

го–Перта, показывающей связь выходов продукта (Y и Y_{\max}) и скорости роста при скоростях, составляющих $1/3$ от максимальной, выходы биомассы уже близки к максимальным величинам для данных условий культивирования и практически не возрастают при дальнейшем повышении скорости роста:

$$1/Y = 1/Y_{\max} + m_s/\mu, \quad (14)$$

где Y – выход продукта; Y_{\max} – максимально возможный выход продукта; m_s – удельная скорость расхода субстрата на поддержание жизни, ч^{-1} ; μ – удельная скорость роста культуры, ч^{-1} .

Константа насыщения K_s для некоторых штаммов метанолюкисляющих дрожжей очень мала. Она составляет единицы миллиграммов метанола на 1 л среды.

Отсюда следует, что в случае промышленного выращивания дрожжей при лимитировании их роста метанолом, т. е. при его содержании в среде, близком величине K_s , вынос данного спирта с аэрирующим воздухом и связанные с этим потери и загрязнение атмосферы будут ничтожны.

Особенности культивирования микроорганизмов на метаноле. Основными преимуществами этого субстрата являются высокая чистота метанола, отсутствие канцерогенных примесей, хорошая растворимость в воде, высокая летучесть, позволяющая легко удалять его остатки из готового продукта.

Наличие в молекуле метанола атома кислорода снижает тепловыделение, а следовательно, и затраты на охлаждение (по сравнению с *к*-парафинами). Кроме того, биомасса, полученная на метаноле, не содержит нежелательных примесей, что дает возможность исключить из технологической схемы стадии очистки, а строительство установки производства кормовой биомассы в комплексе с цехом получения метанола – утилизировать теплоту синтеза метанола на стадиях выделения биомассы.

Одновременно с этим, однако, необходимо учитывать при проведении процесса и такие особенности метанола, как горючесть и возможность образования с воздухом взрывоопасных смесей в диапазоне концентрации 6–35 % (по объему), а также высокую токсичность метанола, что требует при работе с ним определенных мер предосторожности.

В качестве продуцентов, использующих метанол в конструктивном обмене, были изучены как дрожжевые, так и бактериальные штаммы. Из дрожжей были рекомендованы в производство *Candida*

boidinii, *Hansenula polymorpha* и *Piehia pastoris*, оптимальные условия развития которых (температура 34–37 °С; рН 4,2–4,6) позволяют проводить процесс с экономическим коэффициентом усвоения субстрата до 0,40 при скорости потока в интервале 0,12–0,16 ч⁻¹. Среди бактериальных культур применяется *Methylomonas clara*, *Pseudomonas rosea* и др., способные развиваться при температуре 32–34 °С, рН 6,0–6,4 с экономическим коэффициентом усвоения субстрата до 0,55 при скорости потока до 0,5 ч⁻¹.

Очень перспективными при культивировании являются смеси культур, одна из которых потребляет только метиловый спирт, а другие – остальные субстраты и продукты собственного метаболизма. В этом случае наблюдается значительное увеличение скорости роста клеток, повышение оптимальной скорости потока (с 0,2 до 0,64 ч⁻¹), большая устойчивость к инфицированию, возможное повышение температуры культивирования и возрастание коэффициента выхода.

При подготовке питательной среды, помимо традиционных неорганических источников макро- и микроэлементов, желателен в качестве дополнительного источника азота, а также биологических стимуляторов и витаминов внесение дрожжевого автолизата, так как максимальная скорость роста дрожжей наблюдается при содержании биотина 70 мкг/л; тиамин 100 мкг/л или дрожжевого экстракта в количестве 50 мг/л.

Особенности процесса культивирования во многом обусловлены применяемым штаммом-продуцентом (дрожжи или бактерии) и условиями асептики (асептическая или частично неасептическая ферментация).

Так, ряд зарубежных фирм предлагает использовать дрожжевые штаммы и проводить выращивание в отсутствие строгой асептики. В этом случае технологический процесс протекает в ферментаторе эжекционного типа производительностью до 75 т АСВ в сутки, а удельный расход метанола составляет 2,5 т/т АСВ.

При культивировании дрожжей в асептических условиях рекомендованы аппараты колонного или эрлифтного типа производительностью 75–100 т АСВ/сут при расходе метанола до 2,63 т/т АСВ. В том и другом случае процесс культивирования проводится одностадийно, без стадии «дозревания» с невысокой концентрацией субстрата (8–10 г/л), так как при концентрации выше 15 г/л наблюдается угнетение роста и гибель клеток. Остаточное содержание метанола в отходящей на сгущение суспензии не превышает 50 мг/л, а концентрация биомассы достигает 30 г/л. Низкое исходное содержание

метанола в среде, его малая остаточная концентрация в суспензии наряду с устранением неточностей ферментационного оборудования позволяют снизить потери спирта из-за его летучести, облегчить очистку сточных вод и повысить степень использования метанола.

В ряде стран в качестве продуцентов применяются бактериальные штаммы, процесс проводится в асептических условиях в ферментаторах эрлифтного или струйного типов производительностью 100–300 т/сут и расходом метанола до 2,3 т/т АСВ. Ферментация осуществляется одностадийно при невысоких концентрациях спирта (до 12 г/л) с высокой степенью утилизации метанола.

Наиболее перспективным по своей конструкции является струйный ферментатор, разработанный в Германии (рис. 3.1).

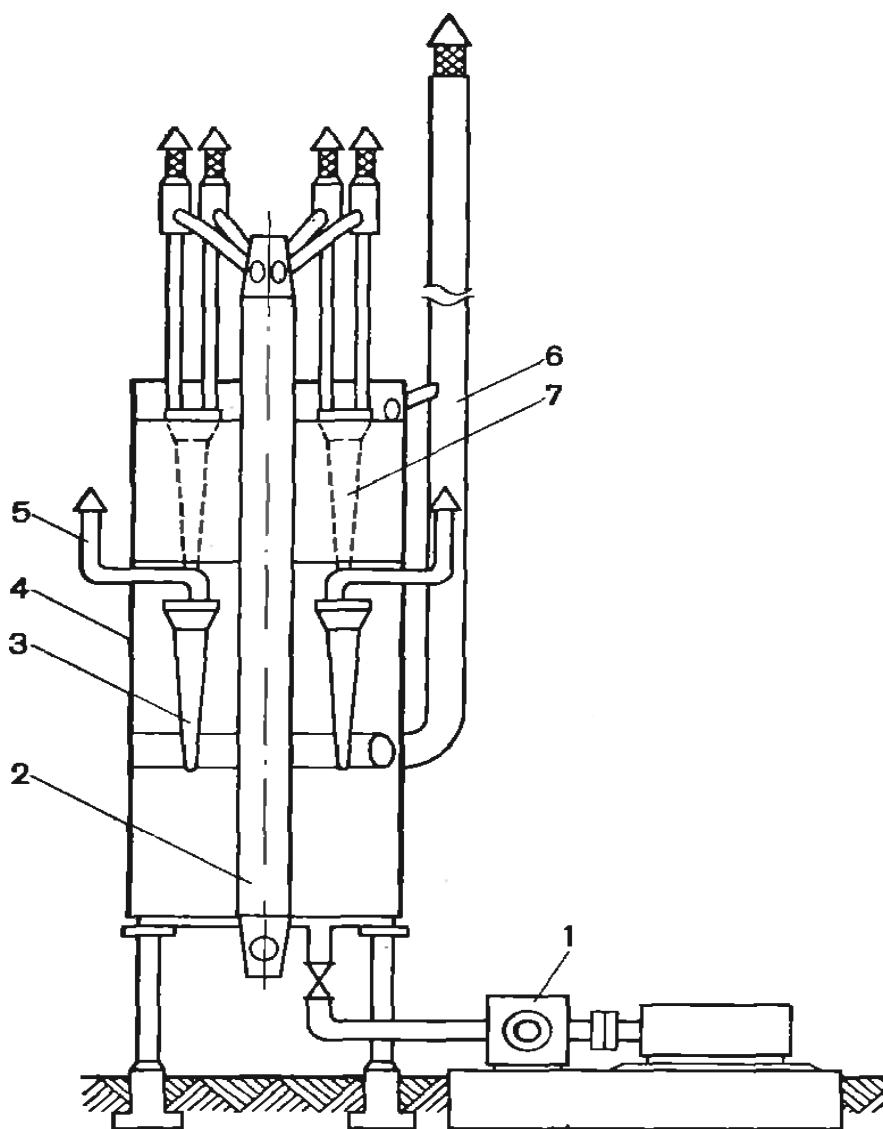


Рис. 3.1. Схема струйного ферментатора объемом 1000 м³
(по И. И. Бортникову, А. М. Босенко, 1982)

Ферментатор 4 объемом 1000 м³ состоит из секций, расположенных одна над другой и соединенных между собой шахтными переливами 3. Ферментационная среда из нижней секции ферментатора по напорному трубопроводу 2 подается центробежными циркуляционными насосами 1 в верхние шахтные переливы 7, через которые проходят в низлежащую секцию, подсасывая при этом воздух из газоваода 5. Таким образом, среда протекает из секции в секцию, постоянно подсасывая новые порции воздуха.

Шахтные переливы создают определенный уровень среды в секциях аппарата. Падающие струи в шахтных переливах обеспечивают интенсивное аэрирование среды (высокую степень диспергирования газа). Одновременно с этим интенсивная принудительная циркуляция ферментационной среды обеспечивает высокую турбулентность потоков, что улучшает массообменные характеристики ферментатора.

Питательная среда непрерывно подается в зону верхних шахтных переливов, а микробная суспензия отводится из выносных циркуляционных контуров. Отвод тепла осуществляется с помощью теплообменников, расположенных на линиях циркуляционных контуров. Выделившийся из жидкости газ собирается в воздушном трубопроводе 6 и через систему очистки газоздушных выбросов выбрасывается в атмосферу.

На стадии выделения для всех видов продуцентов предусмотрено отделение грануляции с целью получения готового продукта в гранулах.

Кормовые дрожжи, полученные на метаноле, имеют следующий состав (%): сырой протеин 56–62; липиды 5–6; зола 7–11; влага 8–10; нуклеиновые кислоты 5–6. Бактериальная биомасса характеризуется следующим составом (%): сырой протеин 70–74; липиды 7–9; зола 8–10; нуклеиновые кислоты 10–13; влажность 8–10.

Рост дрожжей на этаноле. Выход по массе составляет 80 % и более. Энергия, получаемая при окислении этого органического субстрата, используется дрожжами значительно более эффективно, чем при использовании n-алканов. Следовательно, при расчете на одну тонну биомассы, получаемой на этаноле, расходуется меньше энергии и соответственно меньше потребляется кислорода. Сэкономленный кислород позволяет перерабатывать дополнительное количество этилового спирта, что позволяет в час получать в 2–3 раза больше биомассы, чем на алканах. Существенной особенностью дрожжей,

выращенных на этаноле, является преобладание определенной алкогольдегидрогеназы, участвующей в его окислении.

Липиды, образующиеся в дрожжах, практически не содержат жирных кислот с нечетным числом атомов углерода. Это может быть связано с легким образованием ацетил-коэнзима А из C_2 -субстрата, который служит затравкой для биосинтеза жирных кислот с четным количеством углеродных атомов.

Применение этанола для получения белка не встречает психологических возражений, нередко выдвигаемых против таких субстратов, как углеводороды или метанол. Это делает этанол привлекательным сырьем для производства дрожжей пищевого назначения. Продукт, полученный на этаноле, называется эприн.

Особенности культивирования микроорганизмов на этаноле. К достоинствам этого высококачественного сырья можно отнести его малую токсичность, хорошую растворимость в воде, достаточно высокую летучесть, небольшое количество примесей и легкость его утилизации практически всеми микроорганизмами. Кроме того, за счет наличия в молекуле спирта кислорода потребность в кислороде или воздухе ниже, а значит, меньше тепловыделение и интенсивность аэрации, чем при использовании *n*-алканов, что снижает затраты на получение продукта. Одновременно с этим необходимо учесть, что этанол – легковоспламеняющаяся жидкость, образующая с воздухом взрывоопасные смеси в интервале концентраций 3–20 % (по объему).

В качестве микроорганизмов – продуцентов белка на этиловом спирте как единственном источнике углерода могут использоваться дрожжи (*Candida utilis*, *Saccharomyces lambica*, *Hansenula anomala* и бактерии *Acinetobacter calcoaceticus*), которые, однако, имеют гораздо меньшее практическое значение.

В случае использования дрожжевых культур оптимальное значение рН составляет 4,0–4,5, температура 31–34 °С, а при культивировании бактерий – температура 32–35 °С, рН 6,5–7,5.

При подготовке питательной среды для дрожжей здесь, как и для любого синтетического субстрата, готовятся отдельно растворы макро- и микроэлементов, имеющие следующие концентрации (в г/л). Раствор 1: $(NH_4)_2HPO_4$ – 4,0; K_2SO_4 – 0,7; $(NH_4)H_2PO_4$ – 1,0. Раствор 2: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,2; $CaCl_2$ – 0,1; $NaCl$ – 1, а также соли Mn^{2+} , Fe^{+2} и Zn^{+2} с концентрациями 10 мг/л. Добавка биотина (0,4 мкг/л) и дрожжевого автолизата (0,1 г/л) улучшает рост дрожжей.

Процесс культивирования проводят одностадийно в ферментаторах с высокими массообменными характеристиками при концен-

трации этанола не более 15 г/л (более высокие концентрации спирта вызывают ингибирование роста дрожжей). Обычно процесс выращивания проводят в асептических условиях без избытка кислорода в среде, который только усиливает холостое окисление спирта и снижает экономический коэффициент усвоения субстрата. Во время ферментации имеет место интенсивное пенообразование, которое тем больше, чем выше концентрация спирта в среде и инфицированность в аппарате.

На стадии выделения белковой биомассы в отделении сгущения с успехом может использоваться не только флотация, но и другие описанные выше способы.

Энергия, получаемая при окислении этанола, используется дрожжами значительно более эффективно, чем при использовании *n*-алканов. Следовательно, при расчете на 1 т биомассы, получаемой на этаноле, расходуется меньше энергии и соответственно этому меньше потребляется кислорода.

Сэкономленный кислород позволяет переработать в ферментаторе дополнительное количество этанола и получить больше биомассы. Поэтому технология, использующая ферментатор, работающий по методу непрерывного выращивания дрожжей на этаноле, позволяет получить в час вдвое-втрое больше биомассы, чем при использовании *n*-алканов.

В СССР был разработан способ производства на этаноле биомассы *Sacch. cerevisiae*. Используется штамм, применяемый в хлебопечении. Безвредность постоянного применения небольших количеств пекарских дрожжей в питании проверена опытом человечества на протяжении тысячелетий. Выход сахаромыцетов при росте на этаноле несколько ниже, чем при выращивании *S. utilis*. Однако в белках сахаромыцетов, выращенных на этаноле, содержание лизина очень высоко (около 10 % по массе). Как уже отмечалось, содержание лизина в белках злаков, особенно пшеницы, низкое. Поэтому добавление биомассы сахаромыцетов в пшеничный хлеб позволяет не только повысить содержание в нем белка, но и улучшить аминокислотный состав белков. Благодаря двум положительным эффектам: повышению содержания белка и улучшению аминокислотного состава суммарного белка – от каждого грамма высушенной биомассы сахаромыцетов, добавленной к пшеничной муке, белковая ценность хлеба повышается на один грамм в расчете на белок эталонного состава. При добавлении 5 % (от массы муки) биомассы сахаромыцетов белковая ценность получаемого пшеничного хлеба повышается в 1,5 раза.

В Англии организовано производство пищевого белка из гриба *Fusarium*. Продукт, названный микропротеином, используется как добавка к различным продуктам. В США производится торутин – продукт высушенной биомассы *S. utilis*, полученной на синтетическом этаноле. Торутин используется для добавления в продукты питания человека с целью улучшения их органолептических свойств (вида, вкуса, запаха и др.), снижения себестоимости и повышения белковой ценности.

В качестве продуцентов могут выступать водородные бактерии. Основным сырьем для производства биомассы водородоксиляющих микроорганизмов являются газы – водород, диоксид углерода, а также минеральные соли. В структуре себестоимости биомассы затраты на газовое сырье являются определяющими, и, в основном, зависят от стоимости водорода. Поэтому промышленная реализация микробиологического синтеза на водороде во многом зависит от роста объемов его производства и возможности использования, помимо электролизного, более доступных источников водорода, например получаемых конверсией природного газа или газификацией угля.

Водород, получаемый таким способом, значительно дешевле электролизного, но загрязнен окисью углерода, которая является дыхательным ядом и ингибирует развитие биологических объектов. Тем не менее способность усваивать это соединение в качестве источника углерода и энергии показано для ряда микроорганизмов, в частности карбоксидобактерий, которые для роста используют те же биогенные элементы, что и водородные, но обладают более высокой устойчивостью к окиси углерода.

Совместными усилиями ученых Института биофизики и Института химии и химической технологии СО РАН разработана технология выращивания биомассы карбоксидобактерий *Seliberia carboxydohydrogena* Z 1062 на синтез-газе, получаемом газификацией бурых углей (рис. 3.2).

Технологическая схема включает в себя получение синтез-газа (газификацией угля) и приготовление питательной среды, ферментацию, выделение клеток центрифугированием или сепарацией и высушивание биомассы.

Для получения синтез-газа бурый уголь фракцией 2–5 мм загружается в реактор, затем установка продувается инертным газом – аргоном, далее проводится пиролиз. По окончании пиролиза и достижения в реакторе заданной температуры запускается парогенератор и проводится газификация бурых углей при температуре 880–850 °С

и давлении 1,8–2,0 МПа, расходе водяного пара 0,5 кг/ч. Получаемый синтез-газ имеет следующий состав: H_2 – 55–65, CO – 15–25, CO_2 – 5–15 об. %, остальное CH_4 . С одного килограмма угля получается 2,2–2,5 м³ синтез-газа.

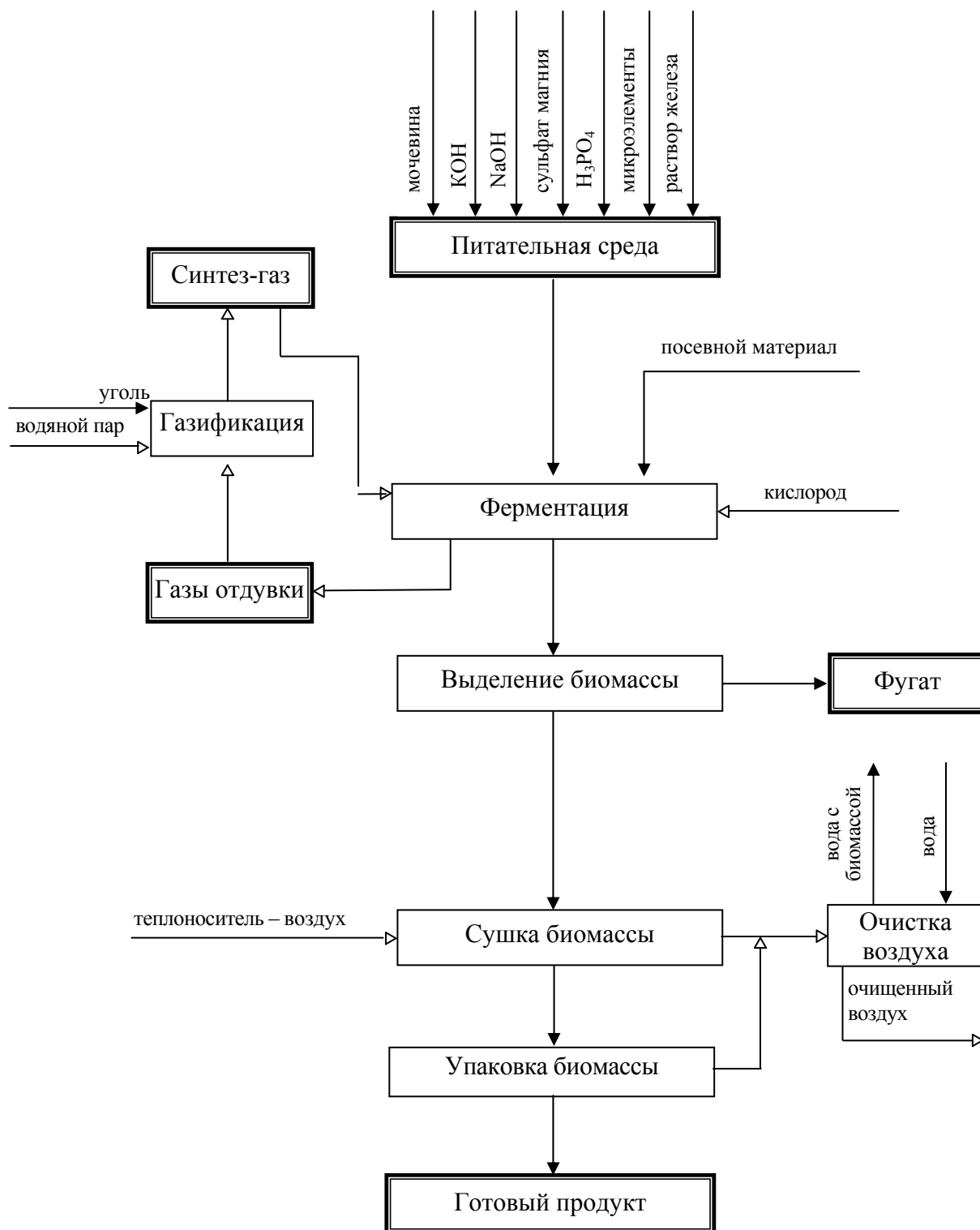


Рис. 3.2. Технологическая схема производства биомассы карбоксидобактерий

Полученная смесь газов направляется в холодильник первой и второй ступени, где происходит конденсация непрореагировавшего водяного пара и охлаждение синтез-газа до температуры 60–80 °С.

Далее газ направляется в фильтр-поглотитель для очистки от возможных механических примесей и летучих соединений серы. Охлажденный и очищенный синтез-газ собирается в газгольдере.

Культивирование бактерий проводят при стабилизации условий минерального питания, при рН $7 \pm 0,2$, температуре (32 ± 1) °С, концентрации клеток 2–5 г/л АСВ. В ферментатор непрерывно поступает питательная среда и с такой же скоростью отводится бактериальная суспензия. Слив бактериальной суспензии осуществляется в охлаждаемый сборник. Снабжение культуры газами осуществляется пропуском газовой смеси (синтез-газ и кислород) через слой культуры. Удельная скорость роста карбоксиобактерий $0,17–0,25 \text{ ч}^{-1}$, скорость потока среды через ферментатор 0,3–0,5 л/ч, производительность ферментатора 1,0–1,5 г АСВ/ч.

Высушенная бактериальная масса содержит сырого протеина от 60 до 65 %, углеводов 4,8–5,2 %, липидов 5,5–6,5 %, золы не более 8 %. Побочные продукты в процессе выращивания карбоксиобактерий отсутствуют. Ферментационная среда может быть использована повторно.

Требования к качеству белковых веществ и расходам на их получение связаны с областью применения продукта. Отходы нестабильного состава целесообразно использовать для получения белков, прежде всего технического назначения (добавки к кормам пушных зверей, компоненты питательных сред для микроорганизмов, агенты, придающие гидрофильность синтетическим волокнам, наполнители, загустители и т. д.).

Для получения белковых веществ пищевого назначения необходимо самое высококачественное сырье. Дополнительная норма для человека 10–20 г сухой биомассы в день. При высоких дозах нужно проводить денуклеинизацию биомассы.

Важное значение имеет совершенствование микробиологических методов получения белковых продуктов с точки зрения экологичности производства. Сюда относится сокращение выбросов в атмосферу при сушке биомассы; использование сточных вод в качестве эффективных жидких удобрений; снижение объема сточных вод за счет многократного использования воды, являющейся основным по массе компонентом ферментной среды.

3.2. ПРИНЦИПЫ ПРОЕКТИРОВАНИЯ МАЛОТОННАЖНЫХ ПРОИЗВОДСТВ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ МИКРОБНОГО БЕЛКА

Наряду с крупномасштабным производством целесообразно создавать малотоннажные установки и использовать их для утилизации региональных отходов переработки растительного сырья как с целью защиты от них окружающей среды, так и для получения дефицитного протеина.

В настоящее время для промышленного микробиологического синтеза белка открываются широкие перспективы, определяемые возросшим уровнем знаний и технических возможностей общества. В исследованиях по изысканию сырья для микробиологического производства белковых веществ прослеживаются две противоположные тенденции:

- ориентация на «чистые» виды сырья, желательны индивидуальные соединения;
- ориентация на использование различных отходов.

Использование «чистых» видов сырья соответствует общей тенденции технического прогресса. Применение «чистых» видов сырья позволит создать стабильно работающие крупные производства белка с получением продукта строго постоянного качества.

Применение разного рода отходов, сточных вод химических заводов (синтетических жирных кислот, фенольных вод, капролактама и др.), сульфитных щелоков, навоза, различных отходов пищевых производств означает, что сырье имеет отрицательную себестоимость, а это весьма заманчиво экономически. Важно и то, что переработка отходов способствует борьбе с местным загрязнением окружающей среды.

Таким образом, каждое из указанных направлений заслуживает развития. В связи с этим следует обратить внимание на изыскание новых сфер применения микробного белка.

Условно микробный белок может быть:

- технического применения (добавки в корм на фермах по выращиванию пушных зверей, компоненты питательных сред для микроорганизмов, агенты, придающие гидрофильность синтетическим волокнам, различного рода наполнители, загустители – эмульгаторы, стабилизаторы и т. д.);
- кормового применения для сельскохозяйственных животных;
- пищевого назначения.

Очевидно, что требования как к качеству белковых веществ, так и расходам на их получение связаны с областью применения продукта. Отходы нестабильного состава целесообразно использовать для получения белков прежде всего технического применения. Для получения белковых веществ пищевого назначения необходимо использовать самое высококачественное сырье.

Важное значение имеет совершенствование микробиологических методов получения белковых продуктов с точки зрения экологичности производства. Сюда относится сокращение выбросов в атмосферу при сушке биомассы, использование сточных вод в качестве эффективных жидких удобрений, снижение образования сточных вод путем многократного использования воды, являющейся основным по массе компонентом ферментационной среды. Поставленная задача предусматривает внедрение базовой модели бессточной технологии и прекращение сброса неочищенных сточных вод в водоемы.

В производстве кормовых дрожжей принято различать две категории сточных вод: производственно загрязненные и условно чистые.

Производственно загрязненные сточные воды образуются в процессе мойки и дезинфекции технологического оборудования: аппаратов чистой культуры, дрожжерастильных аппаратов, сборников для питательной среды и питательных солей, дрожжевой суспензии, плазмолизатора, барабанного сита, полов. Количество сточных вод принято в соответствии с технологическим регламентом очистки сточных вод спиртовых заводов, перерабатывающих крахмалсодержащее сырье (табл. 3.1).

Необходимо учитывать, что при мойке дрожжерастильного аппарата объемом 320 м^3 количество сточных вод увеличивается до $1,5 \text{ м}^3/\text{т}$ сухих дрожжей, а при стерилизации аппарата чистой культуры один раз в десять суток количество сточных вод увеличивается до 3 м^3 на большой аппарат чистой культуры и до $0,3 \text{ м}^3$ на малый аппарат чистой культуры на одну стерилизацию.

Среднединамические показатели загрязненных сточных вод в производстве кормовых дрожжей характеризуются следующими данными: температура – $22,4 \text{ }^\circ\text{C}$; рН среды – $5,75$; взвешенные вещества – $688,8 \text{ мг/л}$; окисляемость бихроматная (ХПК – химическое потребление кислорода) – $2337,9 \text{ мг/л}$; биологическое потребление кислорода через пять суток (БПК_5) – $779,0 \text{ мг/л}$; биологическое потребление кислорода полное ($\text{БПК}_{\text{полн}}$) – $1304,4 \text{ мг/л}$ (табл. 3.2).

Таблица 3.1

Количество и периодичность сброса производственно-загрязненных сточных вод

| Источник образования сточных вод | Количество, м ³ /т сухих дрожжей | Периодичность сброса |
|---|---|------------------------------|
| Дрожжерастильный аппарат | 1,00 | Не более одного раза в месяц |
| Сборник грубого фильтрата и барабанное сито | 0,15 | Три раза в сутки |
| Сборник коричневого сока | 0,15 | Три раза в сутки |
| Сборник дрожжевой суспензии | 0,15 | Один раз в сутки |
| Большой аппарат чистой культуры | 0,40 | Два раза в сутки |
| Малый аппарат чистой культуры | 0,15 | Два раза в сутки |
| Плазмолизатор | 0,25 | Один раз в сутки |
| Сборник дробины | 0,15 | Один раз в четверо суток |
| Мойка полов | 0,20 | Три раза в сутки |

Таблица 3.2

Характеристика производственно-загрязненных сточных вод в цехе кормовых дрожжей

| Источник образования сточных вод | Температура, °С | pH | Взвешенные вещества | ХПК | БПК ₅ | БПК _{полн} |
|---|-----------------|-----|---------------------|------|------------------|---------------------|
| | | | | | | |
| Мойка дрожжерастильного аппарата | 20 | 5,1 | 750 | 4000 | 900 | 3200 |
| Мойка сборника грубого фильтрата и барабанного сита | 25 | 5,5 | 470 | 3000 | 730 | 1200 |
| Мойка деэмульгатора | 20 | 5,3 | 383 | 2900 | 640 | 980 |
| Мойка сборника дрожжевой суспензии | 20 | 5,3 | 390 | 2700 | 600 | 730 |
| Мойка большого аппарата чистой культуры | 22 | 6,5 | 560 | 2500 | 700 | 1120 |
| Мойка малого аппарата чистой культуры | 20 | 6,1 | 104 | 1040 | 540 | 820 |
| Мойка плазмолизатора | 25 | 5,9 | 2100 | 3070 | 180 | 2190 |
| Мойка сборника дробины | 25 | 6,0 | 1162 | 1361 | 850 | 1100 |
| Мойка полов | 25 | 6,1 | 280 | 470 | 351 | 400 |

Условно чистые воды образуются в процессе охлаждения сред через поверхность теплообмена и охлаждения подшипников машин (табл. 3.3).

Таблица 3.3

Расход условно чистых вод, м³

| Потребители условно чистых вод | В сутки | В час | Температура обработавшей воды, °С |
|---|---------|-------|-----------------------------------|
| Теплообменник питательной среды | 177,1 | 7,7 | 50 |
| Аппарат чистой культуры большой: охлаждение питательной среды охлаждение массы при размножении дрожжевых клеток | 24,3 | 16,2 | 30 |
| | 120,5 | 20,1 | 27 |
| Аппарат чистой культуры малый: охлаждение питательной среды охлаждение массы при размножении дрожжевых клеток | 5,8 | 5,8 | 30 |
| | 15,5 | 3,1 | 26 |
| Дрожжерастильный аппарат: охлаждение массы при размножении дрожжевых клеток | 1096,8 | 45,7 | 30 |
| Воздуходувка: охлаждение подшипников | 172,8 | 7,2 | 25 |
| Итого | 1612,8 | | |

Количество условно чистых вод принимается согласно расчету теплообменных аппаратов и паспортных данных машин.

Расчет расхода воды производят исходя из условий работы оборотной системы с охлаждением воды на градирне. Температура воды, поступающей на охлаждение, равна 23 °С.

Водопотребление оборотной воды в летний период работы завода кормовых дрожжей составляет 1612,8 т/сут. С учетом использования условно чистых вод на приготовление питательных солей (1,2 м³/сут) и мойку технологического оборудования (11,9 м³/сут) на градирню будет сбрасываться 1612,8–1599,7 м³/сут воды с температурой 32–33 °С.

Количество воды, поступающей на градирню, может быть меньше, а температура ниже при условии использования воды с повышенной температурой на технологические или бытовые нужды.

Газоочистные сооружения должны предусматривать уменьшение выброса в атмосферу специфичных загрязнений (микробного белка, клеток продуцентов) до показателей, находящихся в пределах предельно допустимой концентрации (ПДК), а затем осуществить полное прекращение этих выбросов за счет внедрения замкнутых контуров теплоносителя.

Одновременно приобретает большое значение создание малотоннажных и малоотходных производств протеина на основе переработки отходов регионального растительного сырья, количество которых недостаточно для использования в крупномасштабном производстве, но которые необходимо переработать по экологическим и экономическим соображениям. Эти отходы могут служить перспективным сырьем для получения микробной белковой биомассы в условиях малотоннажных производств, а улучшение способов культивирования и создание экологически чистых технологий может достигаться путем применения таких подходов, как выращивание дрожжей в двухфазном потоке при повышенной плотности популяции, частичный возврат культуры в дрожжерастительный чан, применение высококонцентрированных питательных сред и осмофильных штаммов, комплексное и рациональное использование отходов и посткультуральных жидкостей, и др.

Большое значение имеет повышение содержания клеток в ферментационной среде. Уже разработаны способы, позволяющие достигать содержания биомассы (в расчете на высушенные клетки) до 100–150 г/л. При этом масса влажных клеток занимает половину объема ферментационной суспензии и ее можно направлять на сушку без сепарирования. Реализация таких способов в промышленном масштабе позволила бы понизить расход воды и энергии при микробиологическом производстве белка.

Тенденцией в промышленном производстве белка является переход к проведению процесса в асептических условиях, что позволяет получать продукт строго постоянного качества и облегчает автоматизированное управление производственным процессом.

Дальнейшую перспективу промышленного микробиологического производства белка трудно переоценить. Многие тысячелетия пищевая база человечества основывалась на культивировании высших растений и животных. Прогресс наших знаний и практических возможностей приводит к дополнению пищевой базы путем использования низших форм жизни – микроорганизмов.

3.3. ПРОЦЕСС И ПРИНЦИПЫ КОНТРОЛЯ ВЫРАЩИВАНИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ – ПРОДУЦЕНТОВ БЕЛКА

Современное промышленное использование микроорганизмов для производства белка осуществляется в ферментаторах, работающих по принципу хемостата. Объемы ферментаторов достигают нескольких сот кубических метров. В среду с размножающимися микроорганизмами непрерывно подаются водный раствор минеральных солей и применяемый в конкретном процессе органический субстрат. Культура подвергается перемешиванию, аэрированию и охлаждению. Скорость выделения тепла в процессе роста аэробных микроорганизмов прямо пропорциональна скорости потребления ими молекулярного кислорода. На каждый грамм потребленного микроорганизмами кислорода выделяется 142,5 кДж (3,4 ккал). Расходы на охлаждение тем ниже, чем больше разница температур между охлаждающим агентом и ферментационной средой. Поэтому в производстве желательно использовать термотолерантные штаммы, а процесс выращивания осуществлять при максимальной температуре, еще не приводящей к существенному снижению выхода биомассы.

Рациональный процесс выращивания осуществляют при лимитировании роста микроорганизмов кислородом или близко к такому лимитированию. Поэтому при рациональном проведении процесса выращивания, когда массообменная характеристика ферментатора используется наиболее полно, скорость физиологической теплопродукции в ферментаторе постоянна, она не зависит от используемого органического субстрата и применяемого штамма микроорганизма.

Выращенные клетки дрожжей отделяют от водной среды сепарированием или фильтрованием, если используют мицелиальные грибы. Разработаны и другие методы отделения биомассы, например флотация для концентрирования мелких бактериальных клеток. Их обычно промывают, концентрируют, после чего подвергают термической обработке при 80–90°C, приводящей к отмиранию клеток. Полученную в результате такой обработки сметанообразную массу высушивают, используя, как правило, распылительные сушилки. После высушивания получают порошкообразный или хлопьевидный продукт, который можно подвергнуть гранулированию. Продукт упаковывают и направляют на комбикормовые заводы и другим потребителям. Такие белоксодержащие добавки микробного происхождения имеют то или иное коммерческое название в зависимости от применяемого

органического сырья, штамма микроорганизма и особенностей технологии, используемой на различных фирмах или предприятиях.

Для микробиологического производства белковых веществ используются штаммы и процессы, не приводящие к образованию и накоплению в среде значительного количества органических продуктов метаболизма. Для такого случая баланс макроэлементов переработки органического субстрата в биомассу микроорганизмов можно представить в виде следующего уравнения:



В этом уравнении брутто-формула органического субстрата и высушенной биомассы даны в расчете на один атом углерода. Например, брутто-формула глюкозы принимает вид $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$. Индексы m и l характеризуют состав конкретного субстрата, а p , n и q – состав полученной биомассы.

На один атом углерода в клетках дрожжей приходится 1,7 атома водорода (мера изменчивости $\pm 5,4$ %) и 0,55 атома кислорода ($\pm 6,4$ %), а в клетках бактерий на один атом углерода приходится 1,82 ($\pm 4,5$ %) атома водорода и 0,47 ($\pm 11,3$ %) атома кислорода. Содержание азота подвержено большим колебаниям и его нужно определять в каждом конкретном случае. Доля массы углерода в безводной биомассе множества различных микроорганизмов равна 0,46 (мера изменчивости $\pm 4,9$ %).

В уравнении (15) y_c – выход по углероду. Доля углерода субстрата, равная y_c , перешла в биомассу, а остальная часть $(1 - y_c)$ приходится на углекислоту. Аналогичным образом коэффициент c в уравнении баланса соответствует числу образовавшихся молей воды. В процессе роста вода может потребляться и образовываться. Коэффициент c отражает суммарный баланс воды в процессе роста микроорганизмов в расчете на безводную биомассу. Коэффициент c показывает число молей воды, образовавшейся при использовании единицы субстрата в процессе роста с выходом по углероду (y_c), или с выходом углекислого газа $(1 - y_c)$, с расходом аммиака a , или с расходом кислорода b .

Коэффициенты приведенного уравнения связаны между собой. Конкретному значению какого-либо коэффициента соответствует только одно значение другого коэффициента. Поэтому материальный баланс можно рассчитать, зная количество потребленного микроорганизмами органического субстрата и коэффициент при каком-либо

из членов уравнения (15). Если количество использованного субстрата неизвестно, необходимо определить два коэффициента.

Можно составить формулы, таблицы и графики, позволяющие по отношению двух коэффициентов уравнения роста определить материальный баланс. Рассмотрение этих отношений имеет смысл только в термодинамически возможных пределах. Такими пределами являются, с одной стороны, случай, когда роста микроорганизмов нет и весь органический субстрат окисляется до углекислого газа и воды, а с другой – идеальный процесс, когда вся химическая энергия органического субстрата сохранилась бы как химическая энергия в выросшей биомассе. Иными словами, диапазон экспериментально получаемых выходов (по массе, по углероду, по кислороду) не может соответствовать энергетическому выходу роста, меньшему, чем ноль, и большему, чем единица.

Практически энергетические выходы роста микроорганизмов в аэробных условиях не бывают выше $2/3$. Фундаментальность понятия энергетического выхода роста позволяет использовать его для сравнения эффективности процессов выращивания различных микроорганизмов на разных органических субстратах в физиологически сопоставимых величинах. Значения энергетического выхода роста лежат в удобных пределах от 0 до 1. Определяемое в эксперименте или на производстве значение энергетического выхода роста сразу показывает, насколько полученная величина удалена от предельного значения.

Энергетический выход роста микроорганизмов позволяет наложить энергетические рамки на выход по углероду Y_C или выход по массе Y_s (биомасса (г), полученная из 1 г органического субстрата). Например, химическая энергия, содержащаяся в 1 г богатого энергией метана, допускает возможность получения 3 г биомассы, а из 1 г бедной энергией щавелевой кислоты нельзя получить более 0,1 г биомассы.

Значения выхода по массе (или по углероду), получаемые при выращивании микроорганизмов на различных субстратах, нельзя сравнивать для характеристики эффективности их использования. Можно ввести понятие нормализованных выходов, т. е. выходов в процентах от предельного значения для данного субстрата. Такие нормализованные выходы были бы ничем иным, как энергетическим выходом роста.

Рассмотрим связь отношений показателей материального баланса и энергетического выхода роста дрожжей на метаноле (рис. 3.3).

Кривая взаимосвязи выхода по кислороду Y_O (полученная биомасса (г) на 1 г потребленного кислорода) и энергетического выхода роста η имеет универсальный характер для роста любых аэробных микроорганизмов и органических субстратов и описывается формулой

$$Y_O = 0,75 \cdot \eta / (1 - \eta). \quad (16)$$

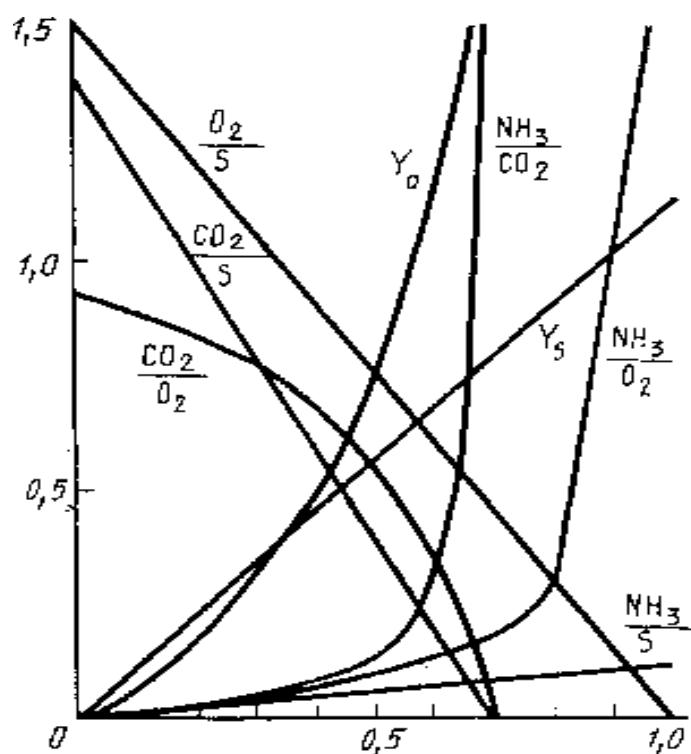


Рис. 3.3. Зависимость отношений материального баланса от энергетического выхода дрожжей на метаноле

Величина $\eta/(1 - \eta)$ показывает отношение химической энергии использованного органического субстрата, которая перешла в химическую энергию биомассы, к той части химической энергии субстрата, которая в процессе роста превратилась в тепло.

Значительную ценность представляет измерение так называемых неинерционных показателей материального баланса – скоростей потребления кислорода и аммиака, образования углекислого газа.

При выборе параметров для измерения баланса роста необходимо учитывать его специфические закономерности на том или ином субстрате и характер изменений показателей баланса в рабочей зоне измерений. При выращивании дрожжей на метаноле отношение

CO_2/O_2 менее удобно использовать в зоне низких выходов, чем в зоне средних и высоких значений выходов. А при выращивании на углеводах отношение CO_2/O_2 в зоне низких выходов крайне слабо зависит от выхода и, следовательно, неудобно для определения баланса роста. Наконец, важно знать, верно ли определен баланс. Поэтому целесообразно определить два или более отношений параметров баланса. Нужно сравнить значения энергетического выхода роста, получаемые при измерении различных компонентов баланса. Если энергетический выход роста, получаемый различными способами, оказывается одинаковым, результат можно учитывать. Это можно делать и автоматически, используя соответствующее программное обеспечение.

Важнейшими обобщающими физиологическими характеристиками роста микроорганизмов являются его скорость и эффективность. Эффективность роста, которую наиболее удобно выражать через энергетический его выход, является также технологическим показателем первостепенной важности. Нет условий, оптимальных для роста вообще, а есть условия, оптимальные для скорости роста, и условия, оптимальные для эффективности роста. Локализация оптимума для этих двух характеристик может быть различной.

При микробиологическом получении белка на любом конкретном субстрате важно, чтобы ферментатор работал с наибольшей производительностью, т. е. его массообменная характеристика использовалась бы в максимальной мере. Вместе с тем избыток органического субстрата подавать в ферментатор нецелесообразно, так как он не будет использован, что затруднит очистку сточных вод, а при выращивании микроорганизмов на углеводородах в избыточном количестве он попадает в продукт.

Рассмотрим зависимость производительности ферментатора по кислороду W_{O} от энергетического выхода роста η при лимитировании роста кислородом (рис. 3.4).

При лимитировании роста органическим субстратом зависимость производительности ферментатора от энергетического выхода роста описывается прямой, например прямой W_s (2). Если повысить содержание субстрата в подаваемой среде, то при лимитировании роста органическим субстратом производительность описывалась бы расположенной выше кривой W_s (1).

Поскольку зависимость производительности ферментатора по органическому субстрату от энергетического выхода роста описывается прямой, а по кислороду – гиперболой, эти линии могут пересечься. Реальная производительность ферментатора характеризуется тем

отрезком одной из этих линий, который расположен ниже при значении энергетического выхода, наблюдающегося при росте конкретной культуры. Следовательно, скорость подачи органического субстрата в ферментатор должна быть такой, чтобы пересечение линий производительности по органическому субстрату и по кислороду было бы как раз в зоне реального значения энергетического выхода роста. Добиться этого можно повышением или понижением скорости потока или концентрации органического субстрата в подаваемой среде. Если в заводском ферментаторе выход то повышается, то понижается, нужно, контролируя текущие значения энергетического выхода роста, повышать или понижать подачу органического субстрата. Такой алгоритм можно ввести в компьютеризированный блок контроля и управления, связанный прямой связью с ферментатором.

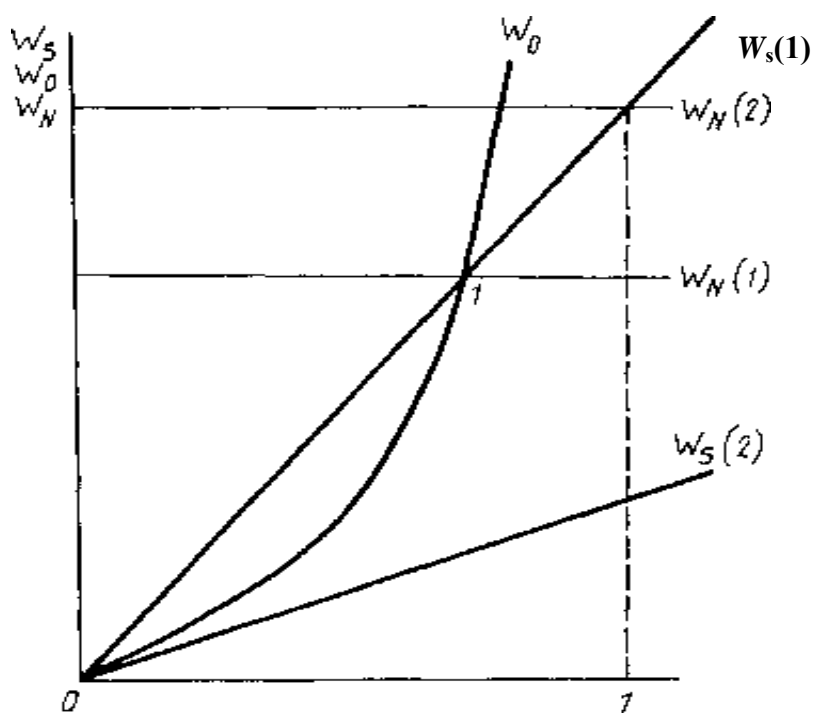


Рис. 3.4. Влияние энергетического выхода роста на производительность ферментатора (W_O – по кислороду, W_S – по органическому субстрату, W_N – по источнику азота)

Если нужно, чтобы лимитирующим фактором был кислород, следует увеличить подачу органического субстрата на небольшую величину, так как избыточный субстрат не будет использован. Наоборот, если необходимо лимитировать рост органическим субстратом, его подачу необходимо несколько уменьшить.

Производительность ферментатора по азоту не зависит от энергетического выхода роста. Она описывается горизонтальной линией W_N , расстояние которой от абсциссы определяется содержанием азота в исходной питательной среде (см. рис. 3.4). В ферменте, стабилизированном по рН автоматическим добавлением раствора аммиака, содержание азота в среде почти такое же, как в исходной. Поэтому, если азота давать мало, он будет лимитировать рост микроорганизма и производительность ферментатора даже при очень низких энергетических выходах роста, а также при всех более высоких выходах. Если азота давать много, часть его будет тратиться понапрасну, загрязняя сточные воды. Азота следует подавать столько, чтобы его концентрация в среде находилась вблизи точки одновременного лимитирования роста микроорганизмов кислородом и органическим субстратом. Другие минеральные компоненты нужно подавать в таком количестве, чтобы их содержание в ферментационной среде было бы несколько выше уровня одновременного лимитирования кислородом и органическим субстратом. В таком случае эти компоненты не будут лимитировать рост и производительность ферментатора и в случае некоторого повышения энергетического выхода.

Известно, что при изменении режима хеостатного выращивания даже при сохранении той же удельной скорости роста может измениться выход. Поэтому при изменении температуры или какого-либо другого фактора, влияющего на энергетический выход роста, может произойти смена лимитирующего рост фактора. В связи с этим при смене режимов культивирования микроорганизмов следует проверять, не произошла ли смена лимитирующего рост компонента питания. Для этого нужно внести в ферментатор разовую дозу компонента, предполагаемого лимитирующим рост. Если этот компонент среды действительно лимитирует рост, немедленно или в течение нескольких минут возрастет скорость потребления кислорода, аммиака, увеличится образование углекислого газа. Регистрируя реакцию по любому из этих неинерционных показателей баланса, можно увидеть, лимитирует ли добавленный компонент рост культуры. Если реакции на добавку не наблюдается, следовательно, рост культуры лимитирован каким-то другим компонентом питания. В таком случае для выявления лимитирующего рост фактора необходимо последовательно испытывать остальные компоненты питательной среды. Таким образом, применение некоторых подходов материально-энергетического баланса при выращивании биомассы микроорганизмов позволяет

оперативно оценивать и оптимизировать эффективность роста и производительность ферментатора с использованием современной вычислительной техники.

3.4. БИОТЕХНОЛОГИЯ ГЛУБИННОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ГРИБНОГО МИЦЕЛИЯ КАК ИСТОЧНИКА ПОЛНОЦЕННОГО БЕЛКА

Во многих странах традиционным является организация грибоводческих хозяйств для получения плодовых тел грибов, содержащих не менее 30 % белка. Для этого обычно используется поверхностное культивирование на растительных субстратах, составляемых из отходов сельскохозяйственных и деревообрабатывающих производств (опилки, кора, солома, мякина, мезга, несортное зерно и корнеплоды, и т. д.). Однако получение плодовых тел является энерго- и трудоемким процессом, кроме того, носит сезонный характер и довольно продолжительно по времени – от инокуляции субстрата мицелием до получения урожая зачастую проходит более месяца.

Современная биотехнология предлагает альтернативу традиционному грибоводству – выращивание мицелия высших грибов погружным способом в биореакторах. Глубинный мицелий, выращиваемый в оптимизированных условиях, не уступает, а зачастую превосходит плодовые тела по содержанию белка и биологически активных веществ. Такой продукт содержит до 50 % протеина; 2,5–5,0 % жира; 0,6–2 % нуклеиновых кислот, витамины группы В. Белки глубинного мицелия базидиальных грибов, как правило, характеризуются относительно сбалансированным аминокислотным составом, высоким содержанием незаменимых аминокислот и могут употребляться в пищу в любых количествах, вплоть до полного замещения животного белка. Кроме того, к неоспоримым преимуществам данного метода следует отнести существенное сокращение производственного цикла, возможность получения биомассы с контролируемым химическим составом, стерильность получаемого продукта.

Первым шагом в исследованиях по культивированию базидиомицетов были работы американского ученого Г. Хумфельда в 1960-х гг. Им впервые был разработан способ выращивания в глубинной культуре шампиньонов. Работы Хумфельда явились толчком для дальнейших исследований по культивированию съедобных макромицетов в глубинной культуре.

Наибольшей интенсивностью роста среди всех базидиомицетов характеризуются дереворазрушающие (ксилотрофные) грибы.

Многочисленные эксперименты показали, что почти все виды дереворазрушающих базидиальных грибов, как съедобных, так и не имеющих пищевого значения, могут развиваться в условиях глубоинного культивирования. При этом отмечается, что подавляющая часть активных культур относится к возбудителям светлой гнили древесины.

Для обеспечения рентабельности производства продуцент должен удовлетворять следующим условиям: содержать не менее 20 % белка с высокой питательной ценностью; обладать относительно высокой удельной скоростью роста, обладать способностью к накоплению биомассы до концентраций 10–50 г/л АСВ. Рост мицелия должен происходить на простых и дешевых средах.

На кафедре химической технологии древесины и биотехнологии Сибирского государственного технологического университета (СибГТУ) из плодовых тел базидиальных грибов были выделены чистые культуры, которые используются в качестве биотехнологических объектов для глубоинного культивирования мицелия в биореакторе. Высоким содержанием белка в глубоинном мицелии (не менее 40 %) характеризуются полученные штаммы ксилотрофных базидиомицетов *Pleurotus djamor* (вешенка розовая), *Pleurotus ostreatus* (вешенка обыкновенная), *Lentinus edodes* (шиитаке), *Laetiporus sulphureus* (серно-желтый трутовик, СЖТ).

Для культивируемых штаммов определены культурально-морфологические характеристики, позволяющие осуществлять текущий контроль чистоты культуры на вегетативной стадии роста в процессе культивирования (внешний вид, цвет и запах биомассы, строение и толщина гиф, образование бластоконидий и спорового материала в культуре). Постоянный контроль чистоты культуры в процессе выращивания биомассы крайне важен, поскольку инфицирование культуры мицелием несъедобных или токсичных видов грибов может быть опасным при использовании биомассы в пищевых и кормовых целях.

Грибы относятся к гетеротрофным организмам, использующим в питании готовые вещества растительного происхождения. Главную роль в питании базидиальных грибов играют углеродсодержащие соединения. В отличие от бактерий и дрожжей грибной мицелий способен конвертировать в белковую биомассу крахмал, пектин, гемицеллюлозы, целлюлозу и даже лигнин. Крахмал является одним из лучших источников углеводного питания за счет наличия в нем примесей ростовых стимулирующих веществ. Для глубоинного культиви-

рования мицелия базидиальных грибов на кафедре химической технологии древесины и биотехнологии СибГАУ использовали модифицированную крахмалсодержащую среду.

Азотистые соединения также являются одним из важнейших источников питания базидиальных грибов и основой синтезирующихся белков. Грибы не могут связывать атмосферный азот, они усваивают его только в форме неорганических солей или же органических соединений азота. Одним из наиболее технологичных источников азота являются аммонийные соли, которые легко ассимилируются мицелием.

Кроме источников азота и углерода для роста мицелия грибов необходимы минеральные компоненты, важнейшими среди которых являются фосфор, сера, калий, магний, также в основном усваивающиеся в виде солей. При недостаточном содержании в питательной среде фосфора нарушается усвоение азота и замедляется синтез аминокислот и витаминов; сера является составной частью белков в виде серосодержащих аминокислот цистеина и метионина.

Учитывая вышеперечисленные особенности метаболизма мицелия, в качестве дешевых технологичных сред могут применяться промышленные отходы переработки корнеплодов, кукурузы, зерновых и масличных культур; гидролизаты древесных и растительных отходов, сульфитные щелока, молочная сыворотка.

Экспериментально были определены количественные параметры роста, продукционные и массообменные характеристики, необходимые для технологических расчетов и проектирования опытного производства выращивания биомассы мицелия в глубинных условиях с целью получения белковых пищевых добавок при периодическом культивировании отъемно-доливным способом и непрерывном культивировании. Схема получения биомассы грибного мицелия приведена на рис. 3.5. В этом производственном процессе можно выделить следующие этапы.

Предферментационный этап. Осуществляется подготовка и стерилизация питательной среды. Для приготовления среды используется крахмал, который предварительно подвергается клейстеризации при 60 °С и обработке в течение 20 мин ферментом – термостабильной α -амилазой (термоамил 120 L) – для частичного гидролиза и снижения вязкости.

Растворы питательных солей готовятся и стерилизуются отдельно. Стерилизация проводится в автоклаве при избыточном давлении 0,05 МПа в течение 40 мин.

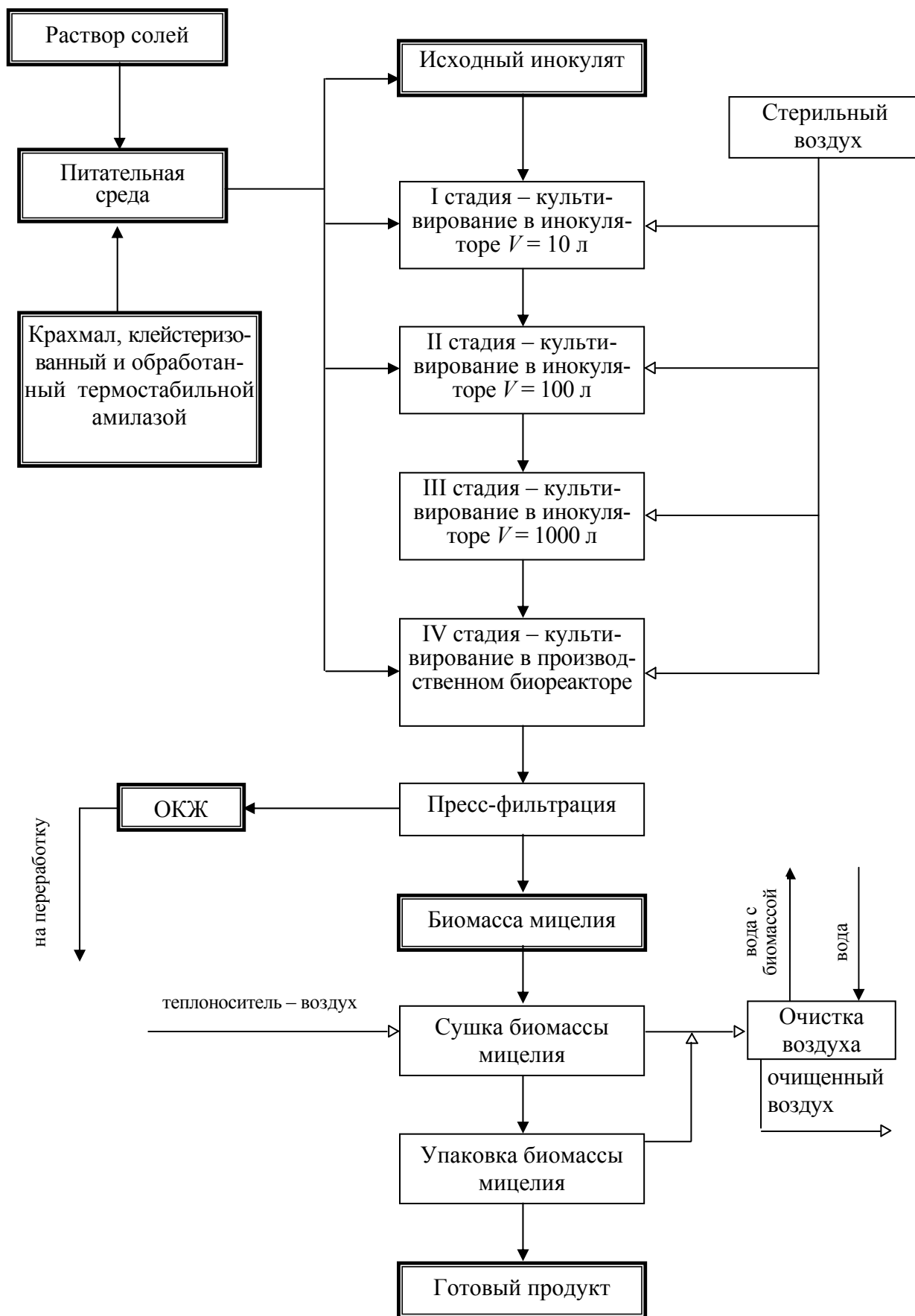


Рис. 3.5. Схема получения биомассы грибного мицелия

Этап получения посевного материала. Инокулят предварительно выращивается в поверхностных условиях в чашках Петри на суло-агаре или овсяном агаре. Поверхностная культура используется для дальнейшего выращивания и накопления биомассы в глубинной культуре в колбах на качалках. Далее исходный инокулят из колб передается в посевной биореактор-инокулятор первой стадии, где выращивание ведется при непрерывном перемешивании и аэрации в течение 72 ч при температуре 26–28 °С. Концентрация биомассы посевного мицелия на этапе приготовления инокулята 1–2 г/л. Накопление биомассы ведут до 10–12 г/л биомассы мицелия.

Выращенный инокулят по стерильному трубопроводу самотеком последовательно поступает в посевной биореактор-инокулятор второй стадии объемом 100 л.

Затем выращенная до концентрации биомассы 10–12 г/л культура поступает в большой посевной биореактор третьей стадии накопления посевного материала объемом 1 м³.

Из посевного биореактора культуральная жидкость (КЖ) перекачивается по стерильному трубопроводу в биореакторы основного производства объемом 10 м³.

Этап основного производства. Первый вариант технологического процесса предусматривает периодическое культивирование отъемно-доливным методом в реакторах объемом 10 м³ с коэффициентом заполнения 0,5. В данном случае при достижении концентрации биомассы 14 г/л (в расчете на АСВ) часть культуральной жидкости из биореактора сливается и передается на переработку. Биореактор заполняется питательной средой до конечного объема 5 м³ с исходными концентрациями субстрата 30 г/л и биомассы – 5 г/л. При этом полный цикл процесса составит около 30 ч с учетом времени на слив КЖ и заполнение биореактора свежей питательной средой. Урожай абсолютно сухой биомассы за один цикл культивирования составит около 45 кг, или товарной продукции влажностью ~10 % – около 50 кг.

Второй вариант технологического процесса предусматривает непрерывное культивирование также в реакторах объемом 10 м³ при скорости разбавления 0,04 ч⁻¹ и производительности по биомассе 0,39 г/л·ч. Далее КЖ с выращенной биомассой из биореакторов подается на пресс-фильтр, где биомасса отделяется от ОКЖ. Влажная биомасса подается в аппарат для сушки во взвешенном слое и далее на упаковку. ОКЖ передается либо на биологическую очистку, либо на вторую стадию культивирования для получения посевного материала и последующего засева в блоки растительного субстрата с целью получения кормовых продуктов, обогащенных белком.

Сухой продукт имеет вид светло-бежевого порошка с грибным запахом, содержит не менее 40 % белка, витамины, липиды, минеральные вещества и может быть использован в пищу как белковая добавка, источник незаменимых аминокислот, ненасыщенных жирных кислот, а также пищевых волокон.

3.5. ОСНОВНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ШТАММА *LAETIPORUS SULPHUREUS* И ПИЩЕВОГО БЕЛКА НА ЕГО ОСНОВЕ

В качестве примера приведем основные технологические характеристики штамма *L. sulphureus*, который может быть использован в качестве продуцента пищевой белковой биомассы.

Чистая культура данного штамма была выделена сотрудниками кафедры химической технологии древесины и биотехнологии Сибирского государственного технологического института и хранится в лаборатории кафедры, а также передана на депонирование во Всероссийскую коллекцию промышленных штаммов микроорганизмов.

На кафедре также была разработана технология получения пищевого белка способом глубинного культивирования штамма *L. sulphureus*.

Отличительной чертой данного штамма, как в поверхностной, так и в глубинной культуре, являлось образование овальных, шарообразных и грушевидных структур, расположенных на гифах терминально или интеркалярно.

Шарообразные структуры воздушного мицелия являются бластоконидиями, а грушевидные структуры – хламидоспорами. Оба указанных типа бесполого спороношения описаны у данного вида отечественными и зарубежными учеными.

На оптической микрофотографии мицелия в глубинной культуре (рис. 3.6) хорошо видны бластоконидии и хламидоспоры.

Микрофотография глубинного мицелия, полученная методом растровой (сканирующей) электронной микроскопии (РЭМ) приведена на рис. 3.7.

Воздушный и глубинный мицелий различаются по толщине гиф: пределы варьирования данного показателя составляют 4,8–11,2 и 1,0–8,5 мкм соответственно.

Исследование кинетики глубинного роста позволили установить основные кинетические и продукционные показатели штамма: $\mu_{\max} = 0,06 \text{ ч}^{-1}$; $K_s = 6 \text{ г/л}$; $Y = 0,48$ (удельная скорость роста, субстратная константа и экономический коэффициент соответственно).

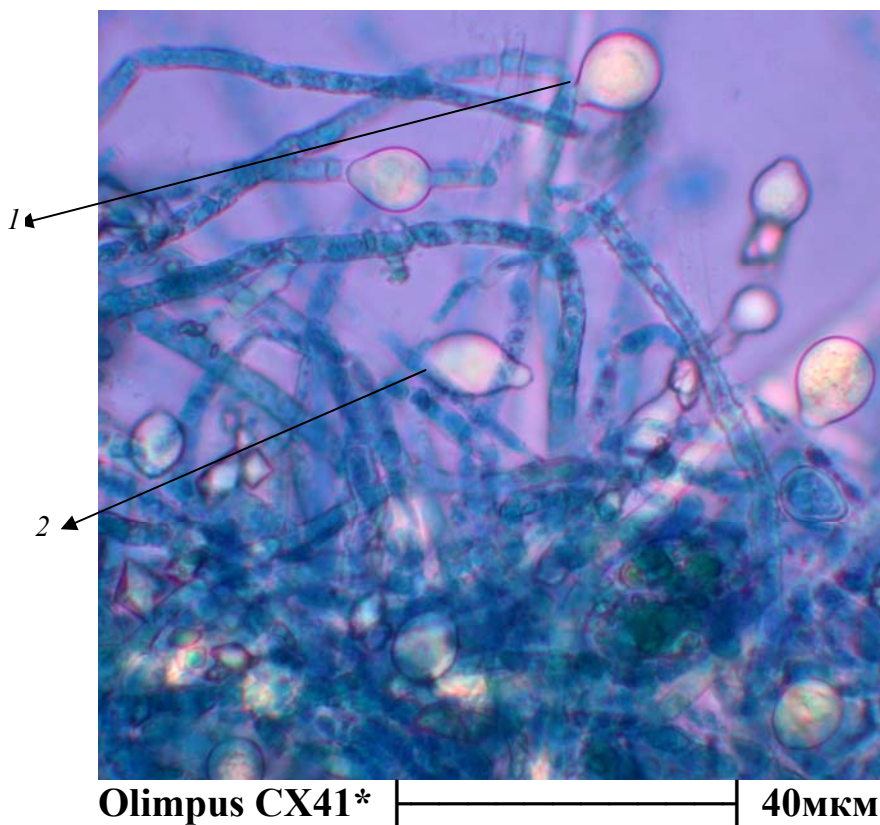


Рис. 3.6. Оптическая микрофотография глубинного мицелия штамма *L. sulphureus*
 1 – шаровидные образования (блестоконидии);
 2 – грушевидные образования (хламидоспоры)

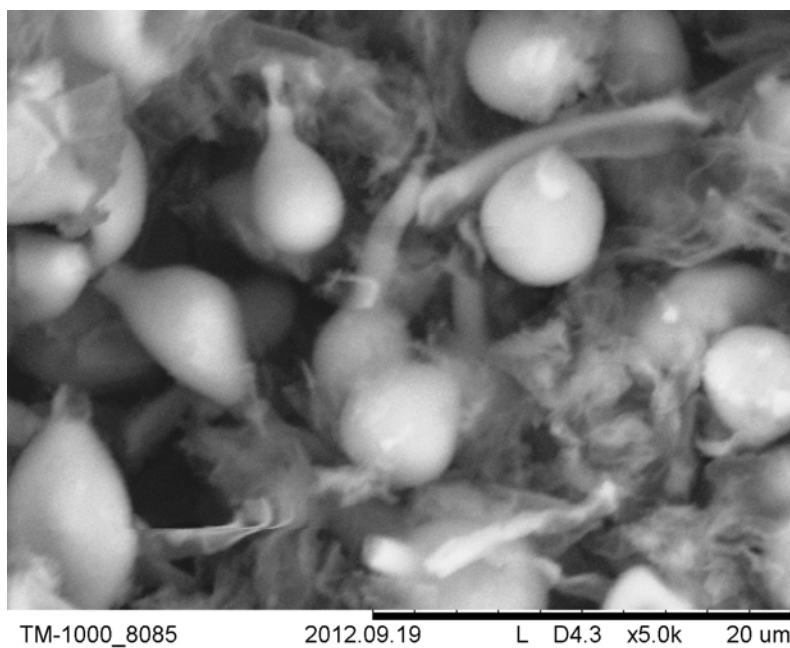


Рис. 3.7. РЭМ-микрофотография глубинного мицелия штамма *L. sulphureus*

Основные результаты анализа состава полученной биомассы глубинного мицелия приведены в табл. 3.4 и 3.5.

Таблица 3.4

Химический состав биомассы глубинного мицелия *L. sulphureus*

| Основные группы соединений | Содержание, % от АСМ |
|---|----------------------|
| Общий белок | 39,8± 4,1 |
| Липиды | 14,4 ± 0,7 |
| Углеводный комплекс, в том числе: | 31,9 ± 2,2 |
| моносахариды | 3,8 ± 0,2 |
| олигосахариды и легкогидролизуемые (в том числе водорастворимые) полисахариды | 22,7 ± 1,2 |
| трудногидролизуемые полисахариды | 5,5 ± 0,3 |
| Нуклеиновые кислоты | 0,7 ± 0,3 |
| Минеральные вещества (зольность) | 3,7 ± 0,3 |

Таблица 3.5

Аминокислотный состав белков биомассы глубинного мицелия *L. sulphureus* (Гарибова Л. В., 2005 ; Агафонова С. В., 2007)

| Аминокислоты | Содержание в белке, % | | | | | |
|-----------------------|--------------------------|---------|-------------|---------|--------------------|---------|
| | Эталонный белок (казеин) | Скор, % | Мицелий СЖТ | Скор, % | Плодовые тела СЖТ* | Скор, % |
| Изолейцин | 4,0 | 100 | 4,8 | 120 | 6,04 | 151 |
| Лейцин | 7,0 | 100 | 7,4 | 105 | 2,07 | 29,57 |
| Лизин | 5,5 | 100 | 7,4 | 148 | 5,77 | 104,91 |
| Метионин + цистин | 3,5 | 100 | 2,8 | 81 | 11,63 | 332,29 |
| Треонин | 4,0 | 100 | 4,8 | 121 | 2,89 | 72,25 |
| Валин | 5,0 | 100 | 7,4 | 148 | 3,34 | 66,80 |
| Фенилаланин + тирозин | 6,0 | 100 | 11,3 | 188 | 9,41 | 104,17 |
| Триптофан | 1,0 | 100 | 0,8 | 80 | 3,61 | — |
| Аспарагиновая | | | 6,9 | | 5,77 | |
| Аргинин | | | 7,1 | | 3,44 | |
| Серин | | | 4,8 | | 1,81 | |
| Глютаминовая | | | 9,0 | | 6,85 | |
| Пролин | — | — | 0,3 | — | 7,39 | — |
| Глицин | | | 10,0 | | 3,41 | |
| Аланин | | | 12,0 | | 2,4 | |
| Гистидин | | | 3,1 | | 3,7 | |

Относительная погрешность определения содержания аминокислот СЖТ ~7 %.

Несмотря на то что содержание таких аминокислот, как метионин и триптофан в биомассе мицелия меньше, чем в эталонном белке, по содержанию других высокоценных незаменимых аминокислот белок мицелия СЖТ превосходит эталон. Следует также отметить, что общее содержание незаменимых аминокислот в белке мицелия почти на 30 % превышает этот показатель в эталонном белке.

Контрольные вопросы и задания

1. Охарактеризуйте основные стадии технологии получения белковых препаратов на метаноле.
2. Охарактеризуйте основные стадии технологии получения белковых препаратов на этаноле.
3. Опишите основные стадии технологии получения белковой биомассы на водороде.
4. Какие задачи решает создание малотонножных производств микробного белка? Каким образом решаются вопросы охраны окружающей среды?
5. Приведите формулу баланса переработки макроэлементов органического субстрата в биомассу микроорганизмов. Поясните расчет.
6. Опишите кинетику процесса переработки макроэлементов органического субстрата в биомассу микроорганизмов.
7. Каким образом определяется производительность ферментатора по основным лимитирующим факторам?
8. Охарактеризуйте базидиомицеты как продуценты белка в условиях глубинного культивирования.
9. В чем состоят технологические особенности выращивания глубинного мицелия базидиомицетов?

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на усилия, прилагаемые учеными, на сегодняшний день вопрос дефицита белковых пищевых и кормовых продуктов остается нерешенным. Во многих странах мира актуальна проблема белкового голодания. Известно, что дефицит белка в питании является одним из главных факторов низкой продолжительности жизни.

В учебном пособии «Биотехнология пищевого белка» представлены как прошедшие успешную апробацию в условиях современного производства биотехнологии, так и инновационные разработки последних лет в области биотехнологии микробных белков.

Рассмотрены вопросы использования различных групп микроорганизмов в качестве биотехнологических агентов – продуцентов белков; изложены принципы проектирования и создания производств по переработке различных органических субстратов в белковую биомассу и анализа показателей технологического процесса на соответствие исходным научным разработкам. Показана перспективность решения проблемы острого дефицита белка в современном мире методами промышленной биотехнологии.

Материал пособия сформирован таким образом, чтобы продемонстрировать обучающимся, что сегодняшний прогресс биотехнологии связан с переходом к новым прогрессивным технологиям, основанным на последних достижениях в таких областях науки, как генная инженерия, селекция, молекулярная и клеточная биология, прикладная биохимия и микробиология, а также современных экологически чистых и ресурсосберегающих производственных принципах и подходах.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Биологические особенности лекарственных макромицетов в культуре : сб. науч. тр. : в 2 т. Т. 1 / под ред. С. П. Вассера. – Киев : Альтерпрес, 2011. – 212 с.
2. Биореакторы : учеб. пособие / С. М. Воронин и др. – Красноярск : СибГТУ, 2000. – 76 с.
3. Биотехнология : учеб. пособие : в 8 кн. / под ред. Н. С. Егорова, В. Д. Самуилова. – Кн. 1. Проблемы и перспективы / Н. С. Егоров, А. В. Олескин, В. Д. Самуилов. – М. : Высш. шк., 1987. – 159 с.
4. Бирюков, В. В. Основы промышленной биотехнологии : учеб. пособие / В. В. Бирюков. – М. : Колос, 2004. – 295 с.
5. Варфоломеев, С. Д. Биотехнология: кинетические основы микробиологических процессов : учеб. пособие / С. Д. Варфоломеев, С. В. Калюжный. – М. : Высш. шк, 1990. – 296 с.
6. Волова, Т. Г. Биотехнология / Т. Г. Волова. – Новосибирск : Изд-во Сиб. отд-ния Рос. акад. наук, 1999. – 252 с.
7. Волова, Т. Г. Микробиологический синтез на водороде / Т. Г. Волова, И. А. Терсков, Ф. Я. Сидько. – Новосибирск : Наука, 1985. – 117 с.
8. Гапонов, К. П. Процессы и аппараты микробиологических производств / К. П. Гапонов. – М. : Легкая и пищ. пром-сть, 1981. – 240 с.
9. Кафаров, В. В. Моделирование биохимических реакторов / В. В. Кафаров, А. Ю. Винаров, Л. С. Гордеев. – М. : Лесн. пром-сть, 1979. – 344 с.
10. Кафаров, В. В. Моделирование и системный анализ биохимических производств / В. В. Кафаров, А. Ю. Винаров, Л. С. Гордеев. – М. : Лесн. пром-ть, 1985. – 280 с.
11. Миронов, П. В. Основы кинетики ферментативных и микробиологических процессов / П. В. Миронов, Е. В. Алаудинова. – Красноярск : СибГТУ, 2013. – 130 с.
12. Перт, С. Дж. Основы культивирования микроорганизмов и клеток / С. Дж. Перт. – М. : Мир, 1978. – 332 с.
13. Пленочные биореакторы / Н. А. Войнов и др. – Красноярск : Боргес, 2001. – 252 с.
14. Промышленная микробиология / З. А. Аркадьева и др. – М. : Высш. шк., 1989. – 688 с.

15. Соколов, В. Н. Аппаратура микробиологической промышленности / В. Н. Соколов, М. А. Яблокова. – Л. : Машиностроение, 1988. – 278 с.
16. Стахеев, И. В. Биотехнология малотоннажного производства микробного протеина / И. В. Стахеев, Э. И. Коломиец, Н. А. Здор. – Минск : Навука і тэхніка, 1991. – 264 с.
17. Технология биоконверсии растительного сырья : учеб. пособие : в 2 ч. Ч. 2. Перспективные технологии микробиологической конверсии растительной биомассы / П. В. Миронов и др. – Красноярск : СибГТУ, 2016. – 150 с.
18. Уилсон, К. Принципы и методы биохимии и молекулярной биологии : пер. с англ. / К. Уилсон, Д. Уолкер. – М. : Бином, 2013. – 848 с.
19. Ферментационные аппараты для процессов микробиологического синтеза / А. Ю. Винаров и др. – М. : ДеЛи принт, 2005. – 278 с.
20. Шмид, Р. Наглядная биотехнология и генетическая инженерия : пер. с англ. / Р. Шмид. – М. : Бином, 2014. – 580 с.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Ключевые слова

Аминокислоты заменимые
Аминокислоты незаменимые
Аминокислотный скор
Ассоциативное культивирование
Аэрация
Бактерии
Базидиомицеты
Биологическая ценность белка
Биореактор
Гидролизат
Глубинный мицелий
Грибной протеин
Индекс Осера
Кормовые дрожжи
Крупнотоннажное производство
Культивирование
Малотоннажное производство
Метанол
Микробный белок
Микроорганизмы-продуценты
Мицелиальные грибы
Плазмолиз
Растительное сырье
Сепарирование
Субстрат
Сушка
Эталонный белок
Этанол
Ферментатор
Фильтрация
Флотирование
Чистая культура

Учебное издание

Киселева Ольга Владимировна
Тарнопольская Вероника Валентиновна
Миронов Петр Викторович

БИОТЕХНОЛОГИЯ ПИЩЕВОГО БЕЛКА

Учебное пособие

Редактор *Т. Е. Ильющенко*
Оригинал-макет и верстка *М. А. Светлаковой*

Подписано в печать 26.02.2021. Формат 60×84/16. Бумага офисная.
Печать плоская. Усл. печ. л. 5,4. Уч.-изд. л. 6,1. Тираж 50 экз.
Заказ . С 72/21.

Санитарно-эпидемиологическое заключение
№ 24.49.04.953.П.000032.01.03 от 29.01.2003 г.

Редакционно-издательский отдел СибГУ им. М. Ф. Решетнева.
660037, г. Красноярск, просп. им. газ. «Красноярский рабочий», 31.
E-mail: rio@mail.sibsau.ru. Тел. (391) 201-50-99.

Отпечатано в редакционно-издательском центре
СибГУ им. М. Ф. Решетнева.
660049, г. Красноярск, просп. Мира, 82.
Тел. (391) 227-69-90.