

ОДЕСЬКА НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ ХАРЧОВИХ ТЕХНОЛОГІЙ

**КИЛИМЕНЧУК ОЛЕНА ОЛЕКСАНДРІВНА**

УДК 636.087.2-035.2

**РОЗРОБКА БІОТЕХНОЛОГІЇ ОДЕРЖАННЯ КОРМОВОГО БІЛКА  
НА ОСНОВІ НЕТРАДИЦІЙНОЇ РОСЛИННОЇ СИРОВИНИ**

Спеціальність 03.00.20 – біотехнологія

**АВТОРЕФЕРАТ**

дисертації на здобуття наукового ступеня

кандидата технічних наук

Одеса – 2004

Дисертацією є рукопис

Робота виконана в Одеській національній академії харчових технологій Міністерства освіти і науки України

Науковий керівник: кандидат технічних наук,

доцент **Величко Тетяна Олексіївна**,

Одеська національна академія харчових технологій, доцент кафедри біохімії та мікробіології

Офіційні опоненти:

доктор технічних наук,

професор **Безусов Анатолій Тимофійович**, Одеська національна академія харчових технологій, завідувач кафедрою технології консервування;

кандидат хімічних наук,

доцент **Кулик Олександр Павлович**, Українській державний хіміко-технологічний університет, завідувач кафедрою біотехнології

Провідна установа:

Національний університет харчових технологій, кафедра біотехнології мікробного синтезу, Міністерство освіти і науки України, м. Київ

Захист відбудеться 28 травня 2004 року о 10-30 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Одеської національної академії харчових технологій (65039, м. Одеса, вул. Канатна, 112).

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Одеської національної академії харчових технологій за адресою:

Україна, 65039, м. Одеса, вул. Канатна, 112.

Автореферат розісланий 27 квітня 2004 року.

Вчений секретар

спеціалізованої вченої ради

Станкевич Г. М.

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Серед величезної кількості нерозв'язаних проблем людства найбільш складною та актуальною є ліквідація дефіциту білка. В Україні потреба у кормовому білку значно перевищує потребу у харчовому. Це пояснюється недовершеною структурою посівів зернових, які є найважливішим джерелом протеїну а також його низьким вмістом у рослинних культурах, які складають основу кормових раціонів. У деякій мірі дефіцит білка покривається за рахунок використання високобілкових сільськогосподарських культур, жмихів та шротів олійних, рибного та м'ясокісткового борошна. Загальний об'єм виробництва традиційних кормових добавок дозволяє забезпечити не більше 20 % потреби у білку.

Враховуючи неповноцінність рослинного білка, велику трудоемкість та тривалість його одержання, обмежені можливості у виробництві сухих тваринних кормів, дефіцит білкових добавок можна ліквідувати найбільш ефективним методом – шляхом мікробіологічного синтезу біологічно активних кормових дріжджів. Біотехнологічний спосіб одержання білка не залежить від природних факторів і здійснюється індустріальним методом. Темпи його розвитку залежать тільки від потреби у цільовому продукті та наявності сировини, яку необхідно утилізувати.

Зниження виробництва кормових дріжджів в Україні за останнє десятиріччя викликане як загальнодержавними економічними обставинами, так і відсутністю сировини для їх одержання. Основною сировиною для виробництва кормового білка є рослинні відходи, більше 70 % яких для діючих заводів України ввозились із Росії. Таким чином, необхідним є пошук альтернативних джерел сировини, використання яких дозволить у деякій мірі покрити дефіцит кормового білка.

Одним із джерел власної сировини можуть бути обрізки фруктових дерев (ОФД), стебла хмелю (СХ) та рицини (СР), які не використовуються, щорічно поновлюються і накопичуються до мільйона тонн за рік.

Розробка оптимальних умов використання ОФД, СХ та СР може вирішити не тільки складну технічну проблему, але й соціальну, тому що на сьогоднішній день ці відходи не використовуються, практично всі заорюються в землю або ж спалюються, завдаючи шкоди навколишньому середовищу.

Відомі декілька шляхів нарощування об'ємів кормової біомаси: вдосконалення технології за рахунок апаратурного оформлення; використання високопродуктивних дріжджових культур; інтенсифікація процесу культивування за рахунок введення біостимуляторів росту і розмноження дріжджових культур. Останній відрізняється простотою, технологічністю та ефективністю.

У зв'язку з вищесказаним, робота спрямована на розробку біотехнології, інтенсифікацію і нарощування обсягів виробництва кормового білка з використанням багатотоннажних рослинних відходів, які щорічно поновлюються, не використовуються і раніше не вивчалися, є актуальною.

За рахунок передбачуваного впровадження можна буде отримати 250 тисяч тонн високоякісного біологічно активного кормового білка.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Робота відповідає тематиці міжвузівської програми науково-дослідної роботи № 31 “Будова, склад, властивості і перетворення компонентів рослинної сировини як основи створення поліфункціональних добавок, збагачувачів і модулів для одержання продуктів з новими властивостями, які забезпечують продовольчу безпеку населення України”, затвердженій наказом Міністерства освіти і науки України № 271 від 15.08.96, темі досліджень проблемної лабораторії Одеської державної академії харчових технологій 1/97-2П” Розробка наукових основ і технологій виробництва харчових речовин і функціональних продуктів харчування на основі біотехнологічних методів переробки рослинної сировини, біомаси мікроорганізмів та екзометаболітів” (№ держреєстрації 0197U016054).

**Мета і задачі досліджень.** Метою даної роботи є розробка біотехнології одержання кормового білка із нетрадиційних рослинних відходів сільського господарства ОФД, СХ, СР та інтенсифікація процесів гідролізу сировини і культивування дріжджів.

Для досягнення цієї мети були поставлені наступні завдання:

- вивчити технологічні властивості, хімічний і біополімерний склад рослинних відходів;
- вивчити структуру і властивості окремих біополімерів сировини;
- теоретично обґрунтувати шляхи перетворення біополімерів сировини в умовах кислотної і ензиматичної деградації;
- розробити параметри гідролітичної деструкції полісахаридів сировини у лабораторних та дослідно-виробничих умовах;
- одержати поживне середовище на основі гідролізатів і вивчити його біологічну доброякісність;
- підібрати штами дріжджових культур, які активно ростуть на гідролізатах ОФД, СХ, СР, провести математичне моделювання та аналіз характеру взаємодії культур в асоціатах при вирощуванні;
- теоретично обґрунтувати і експериментально підтвердити доцільність інтенсифікації біотехнології одержання кормового білка;
- розробити параметри одержання кормового білка і передати їх у вигляді доповнення до існуючого виробничого регламенту.

**Об'єкти досліджень:** рослинні відходи ОФД, СХ, СР; біополімери сировини, гідролізати; культури дріжджів, дріжджова біомаса.

*Предмети досліджень:* технологічна і біохімічна характеристика рослинних відходів і їх біополімерів; ферментативна і кислотна деградація біополімерів сировини; культивування дріжджової біомаси, інтенсифікація технології виробництва кормового білка; мікробіологічна і біохімічна характеристика дріжджової біомаси.

*Методи досліджень:* при розробці біотехнології одержання кормової біомаси на основі рослинних відходів використовували комплекс традиційних і сучасних біохімічних, фізико-хімічних та мікробіологічних методів досліджень.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Виділені окремі біополімери ОДФ, СХ, СР, вивчено їх структуру, властивості, які значною мірою впливають на параметри кислотної та ензиматичної модифікації сировини. Науково обґрунтовано параметри гідролізу нетрадиційних рослинних відходів з метою одержання гідролізатів і наступною переробкою їх у кормовий білок. Доказано доцільність інтенсифікації технології одержання кормового білка природними мінеральними солями. Розроблено параметри біосинтезу, дана біохімічна характеристика готової продукції. Експериментально доказано можливість промислового виробництва кормового білка на основі ОДФ, СХ, СР з одночасною його інтенсифікацією природними мінеральними солями. Наукова новизна підтверджена авторським свідоцтвом.

**Практичне значення одержаних результатів.** Розроблено біотехнології одержання кормового білка на гідролізатах нетрадиційних рослинних відходів. Розроблено параметри інтенсифікації гідролізу і культивування дріжджової біомаси мінеральними солями. Розроблені технології апробовано на Миколаївському гідролізно-дріжджовому та Бендерському біохімічному заводах. Результати досліджень передані у вигляді розроблених технологічних режимів як доповнення до “Технологічного регламенту” даних заводів.

**Особистий внесок здобувача.** Особистий внесок здобувача полягає в забезпеченні методичного оформлення роботи, виконанні аналітичної та експериментальної роботи у лабораторних та дослідно-виробничих умовах, аналізі й узагальненні даних, формулюванні висновків і рекомендацій, підготовці матеріалів досліджень до публікацій, розробці технологічних параметрів виробничої апробації розробленої технології. Особистий внесок здобувача підтверджується поданими документами і науковими публікаціями.

**Апробація результатів дисертації.** Результати досліджень повідомлені на: міжнародній конференції “Биотехнология получения кормового белка, экологически чистых препаратов, повышающих урожайность, премиксов, ферментов и витаминов кормового назначения” (Дніпропетровськ, жовтень 1995 р.); міжнародній конференції “Экология человека и проблемы воспитания молодых ученых” (Одеса, грудень 1997 р.); міжнародній науково-практичній конференції “Розробка та впровадження прогресивних ресурсозаощаджуючих технологій в харчову та переробну промисловість” (Київ, 1997 р.); VII Українському біохімічному з’їзді (Київ,

1997 р.); четвертому установочному Українському мікробіологічному з'їзді (Чернігів, 2000 р.); (Чернівці, жовтень 2002 р.); 69-й науковій конференції молодих вчених, аспірантів та студентів “Розроблення, дослідження і створення продуктів функціонального харчування, обладнання та нових технологій для харчової і переробної промисловості” (Київ, квітень 2003 р.); щорічних конференціях Одеської національної академії харчових технологій за період 1995-2003 р.р.

**Публікації.** Результати дисертації опубліковані в 9 друкованих роботах, включаючи 6 статей, авторське свідоцтво, 2 тези доповідей наукових конференцій.

**Структура та обсяг роботи.** Дисертація складається зі вступу, шести розділів, висновків, списку літератури та додатків. Зміст роботи викладено на 232 сторінках, включаючи 28 таблиць (28 стор.), 33 рисунка (15 стор.), 4 додатки (56 стор.). Список використаних бібліографічних джерел містить 189 найменувань (18 стор.).

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

**У вступі** обґрунтовано актуальність теми досліджень, визначено наукову новизну та практичну цінність, сформульовано загальну мету та спрямованість роботи.

**У першому** розділі розглянуто принципово різні, найбільш перспективні та існуючі на діючих заводах технології деполімеризації рослинних відходів з метою одержання гідролізатів і подальшій їх переробці у біомасу, обґрунтовано доцільність використання нетрадиційної рослинної сировини та інтенсифікації процесу культивування дріжджів на її основі. На основі аналізу літературних джерел сформульовано мету, основні напрямки і завдання досліджень у даній роботі.

**У другому розділі** подано інформацію про об'єкти та методи досліджень. Наведено структурну схему основних напрямків досліджень та взаємозв'язок етапів вирішення поставлених задач (рис. 1).

Об'єктами досліджень у даній дисертаційній роботі були: ОФД найбільш розповсюджених сортів на півдні України, СХ з Житомирської області, СР з Миколаївської, ферментні препарати Ладжинського заводу, сіль морська ФС 42-1911-82, Р. 71.946.33 Сакського хімічного заводу, чисті культури дріжджів видів *Candida*, *Pichia*, *Trichosporon*, *Hansenula* інституту мікробіології і вірусології ім. М. Д. Заболотного АН України, науково-дослідного інститута гідролізу Санкт-Петербурга, Миколаївського гідролізно-дріжджового та Бендерського біохімічного заводів.

Основна частина досліджень була проведена в проблемній науково-дослідній лабораторії “Комплексної переробки рослинної сировини у харчові та кормові продукти” Одеської національної академії харчових технологій. Окремі дослідження проводились у лабораторіях інституту мікробіології і вірусології ім. М. Д. Заболотного АН України.

Промислову апробацію проводили на Миколаївському гідролізно-дріжджовому і

Бендерському біохімічному заводах.

В дослідженнях використовували стандартні, оригінальні, хроматографічні та спектральні методи аналізу.

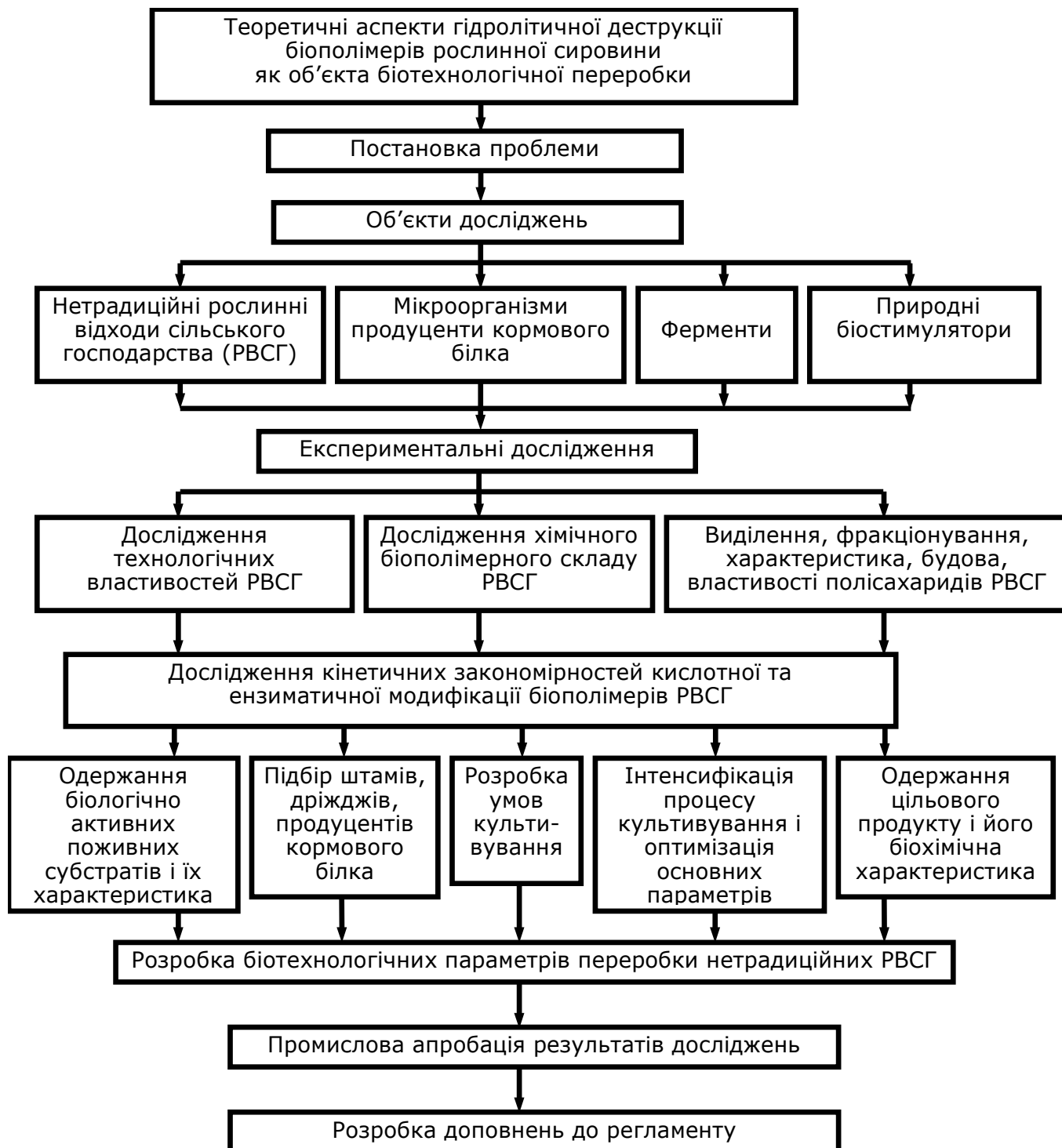


Рис. 1. Основні напрямки проведення досліджень

У третьому розділі наведено результати експериментальних досліджень з вивчення технологічних властивостей, хімічного та біополімерного складу ОФД, СХ і СР. Ці відходи мають

На основі результатів гельфільтрації, електрофорезу, періодатного окиснення, метилювання, газорідинної хроматографії, інфрачервоної спектроскопії показано, що основний ланцюг глюкуронооксиланів і арабіноглюкуронооксиланів анатомічних частин ОФД, СХ, СР побудований із залишків D-ксилопіраноз з'єднаних  $\beta$ -1-4-глікозидними зв'язками, а у бокових відгалуженнях мають місце залишки D-ксилози, арабінози та уронових кислот (рис. 2 і 3).

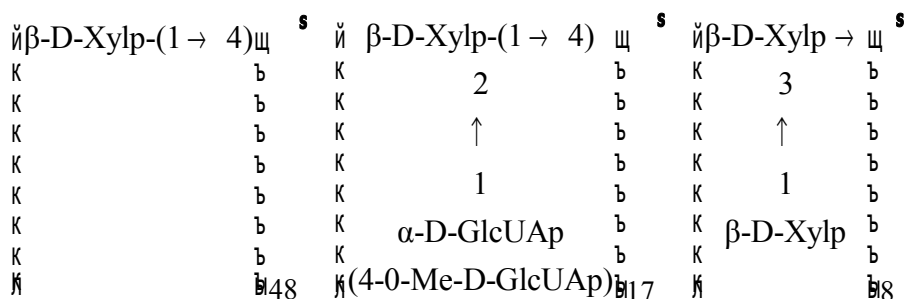


Рис. 2. Структурна формула глюкуроноксилану деревини ОФД

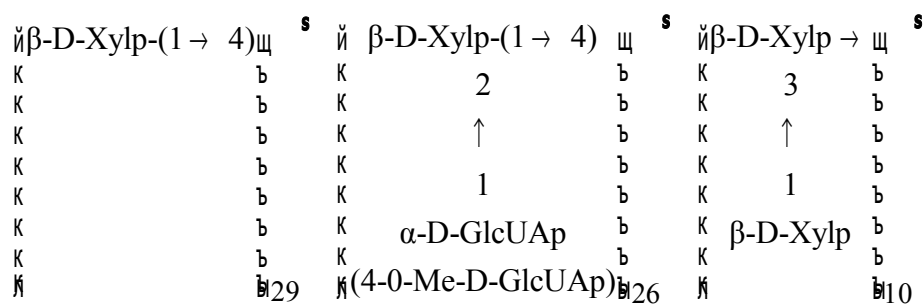


Рис. 3. Структурна формула арабіноглюкуроноксиану листя СР

На основі технологічних властивостей та біохімічного складу зроблено висновок, що ОФД, СХ і СР є перспективною сировиною для одержання дріжджової біомаси.

У четвертому розділі наведено результати досліджень з вивчення деполімеризації полісахаридів рослинних відходів під дією ферментів і водних розчинів кислот.

Наведена біохімічна характеристика виділених з сировини препаратів целюлози і сумарних геміцелюлоз (ГМЦ). Під дією ферментів Целокандину Г10Х і Амілоризину П10Х проведена деградація цих біополімерів (БП).

Експериментально доведено, що максимальна деградація БП ГМЦ і целюлози досягається при масовій концентрації ферментів у реакційному середовищі 4-4,5 мг/см<sup>3</sup> для ГМЦ і 5,5-6,0 мг/см<sup>3</sup> для целюлози. Характер кінетичних кривих свідчить про те, що ГМЦ і аморфна частина целюлози максимально деградують за 6 і 24 години відповідно (рис. 4, 5).

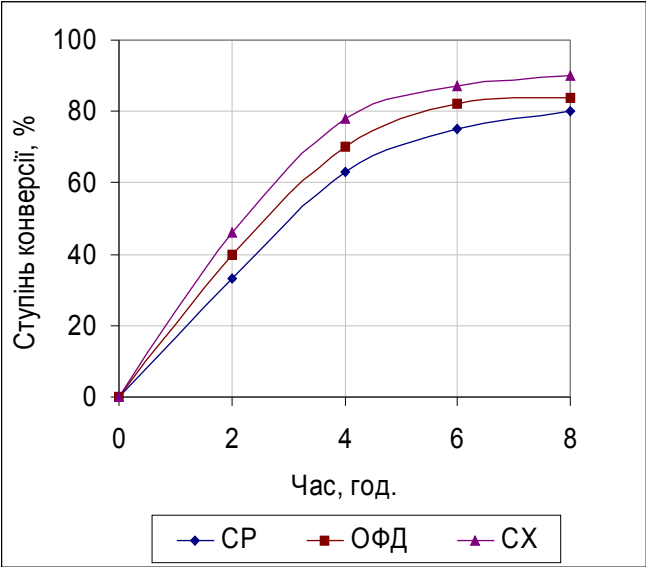


Рис. 4. Кінетика ферментативного гідролізу ГМЦ

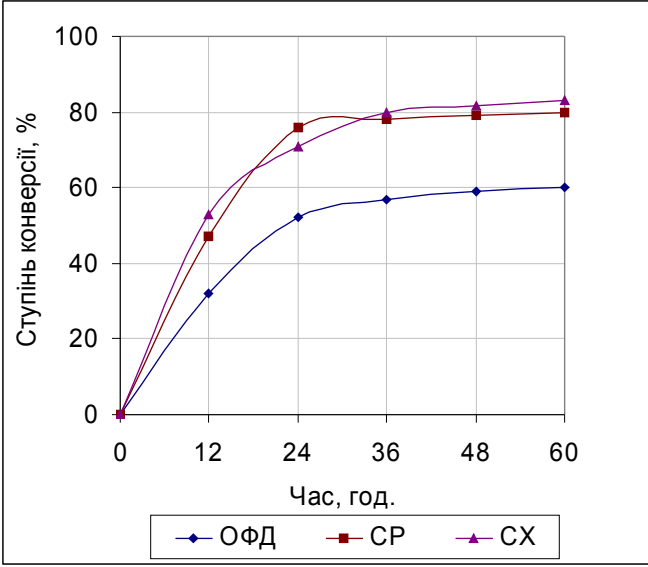


Рис. 5. Кінетика ферментативного гідролізу целюлоз



За 48 годин конверсія целюлози ОФД<sup>1</sup> складала — 58,0 %, СР — 79,0 % і СХ — 81,5 %.

У роботі показано, що масова частка аморфної фракції у целюлозах ОФД, СХ і СР складає 17,8, 34,6 і 37,8 % відповідно, що впливає на швидкість ферментативної реакції у перші години і визначає вибір режиму технологічного процесу. Проведені дослідження свідчать, що целюлоза, виділена із ОФД, СХ і СР, деградує подібно целюлозам інших рослин, у її гідролізатах переважає глюкоза, але знайдено і мономери супутніх їй ксиланів — ксилоза і глюкуронова кислота.

Проведено серію досліджень з деполімеризації всіх видів сировини як окремими, так і композицією ферментів Амілоризином і Целокандином у співвідношенні 1:1, що було визначено оптимальним за попередньо проведеними дослідженнями (рис. 6, 7).

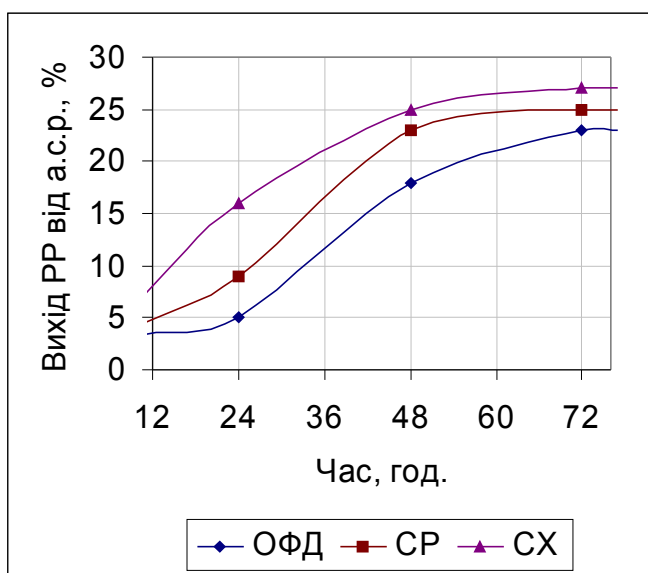


Рис. 6. Кінетика ферментативного гідролізу ОФД, СХ, СР Целокандином Г10Х

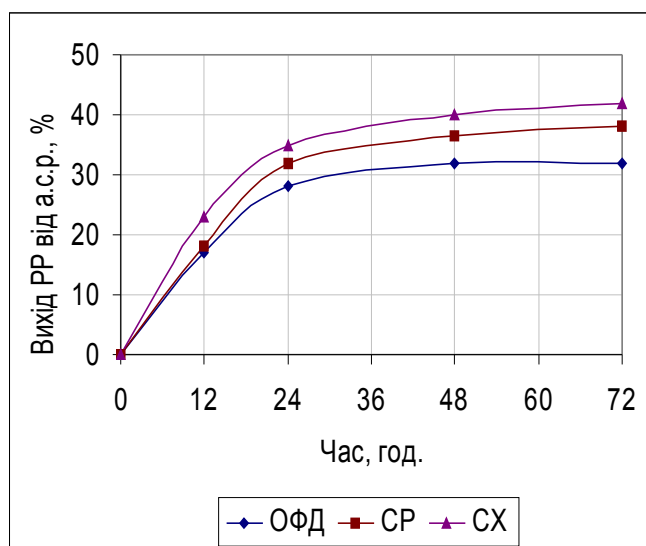


Рис. 7. Динаміка виходу РР при біоконверсії ОФД, СХ, СР Амілоризином і Целокандином у співвідношенні 1:1

Використання композиції ферментів з масовою часткою 5 мг/см<sup>3</sup> дозволило значно підвищити ефективність гідролізу. За 48 годин ступінь конверсії сировини складав для СХ — 73,1 %, СР — 68,6 %, ОФД — 51,6 %. Вивчення процесів ферментативного гідролізу окремих біополімерів підтвердило, що ступінь їх конверсії залежить від будови, розгалужень і розмірів молекул.

Реакційна здатність сировини у цілому залежить від попередньої обробки, характеру і локалізації БП та присутності лігніну. Швидкість ферментативної деградації підвищується за рахунок спільної дії ферментів, хоча ступінь конверсії БП залишається невисоким. Одержані ферментолізати містять однаковий набір моносахаридів, де домінують глюкоза до 21,6 %, ксилоза до 12,1 % і можуть бути використані як доброякісні поживні середовища для вирощування

кормових дріжджів.

Враховуючи результати досліджень хімічного складу та технологічних властивостей нетрадиційних видів сировини, було проведено серію експериментів з їх гідролітичної деструкції 0,6-відсотковим водним розчином сірчаної кислоти, гідромодулі (ГМ) 14 при різних температурах і умовах, максимально наближених до виробничих.

Аналіз одержаних кінетичних характеристик підтвердив, що у складі ЛГП усіх видів сировини присутні дві кінетичні фракції, кожна з яких описується рівнянням першого порядку і має різні константи швидкості реакції гідролізу. Кількісне співвідношення фракцій залежить від виду сировини, але за 40–60 хвилин при температурі 120–150 °С фракції майже повністю переходять у розчин при мінімальному розпаді моносахаридів.

При температурі 150 °С починає гідролізуватися аморфна частина целюлози і максимальний її розпад відбувається при 190–195 °С, що складає для СР, СХ та ОФД 92 %, 88 % та 78 % відповідно.

З урахуванням усіх досліджень було розроблено оптимальні режими гідролізу для кожного виду сировини. В режимах передбачались такі операції і їх тривалість: завантаження сировини — 30–45 хвилин; прогрівання нижньою парою — 20–25 хвилин з двома здуваннями, перколяція — 120–135 хвилин; промивання — 20–25 хвилин, віджимання — 30–40 хвилин, вивантаження і оглядання — 10 хвилин. Загальна тривалість гідролізу — 210–280 хвилин у залежності від виду сировини, що на 10–20 хвилин менше ніж існуючої у виробництві.

При таких режимах проведені дослідження інтенсифікації процесу гідролізу ОФД, СХ, СР морськими солями. Показано, що додавання морських солей у варильну кислоту 0,2–1,8 %, підвищує швидкість процесу гідролізу, вихід моносахаридів, покращує біологічну доброякісність гідролізатів і збагачує поживні середовища спектром макро- і мікроелементів, необхідних для вирощування дріжджів.

Одержані у таких умовах гідролізати містять 90–95 % легкозасвоюваних моносахаридів, органічні кислоти, азот, фосфор. Сумарний вміст інгібіторів росту (фурфуролу, оксиметилфурфуролу, лігнотумінових та бромованих речовин) нижчий норми. Одержані за таких умов гідролізати — доброякісні і можуть використовуватись як поживне середовище для вирощування дріжджів.

**У п'ятому розділі** наведено результати досліджень з культивування кормових дріжджів на гідролізатах ОФД, СХ, СР, одержаних ферментативним та кислотним методами.

Вибрано культури — продуценти *Candida tropicalis*, *Hansenula anomala*, *Candida agwatica*, *Candida skottii*, *Candida species* і *Pichia species*, *Trichosporon cutaneum*, котрі характеризуються максимальною швидкістю росту, здатні синтезувати вітаміни, утилізувати як гексози, так і пентози, можуть легко відділятися від рідкого середовища та розвиватися з симбіотичними культурами, стійкі

до підвищеного вмісту фурфуролу,<sup>3</sup> оксиметилфурфуролу і дубильних речовин.

Вибрані культури вирощували на гідролізатах ОФД, СХ, СР, одержаних методом ферментативної (Амилоризин П10Х, Целокандин Г10Х), кислотної та кислотної з додаванням морських солей, деполімеризації. Всі монокультури накопичували високу масову частку біомаси: 9-11 г/дм<sup>3</sup> абсолютно сухих дріжджів (АСД) при культивуванні на гідролізатах і 9-12,8 г/дм<sup>3</sup> – на ферментолізатах (рис. 8).

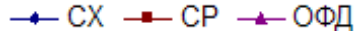
А – гідролізати ОФД, СХ, СР; Б – ферментолізати ОФД, СХ, СР;  СХ СР ОФД

Рис. 8. Динаміка накопичення біомаси *Candida tropicalis* при культивуванні на гідролізатах і ферментолізатах ОФД, СХ, СР

Результати хемостатного культивування монокультур і їх асоціатів у лабораторних та дослідно-виробничих умовах показали, що максимальне значення продуктивності спостерігалось при швидкості протікання  $D = 0,300 \text{ год}^{-1}$  для всіх монокультур та їх асоціатів (табл. 1).

Таблиця 1

Основні показники культивування *Candida tropicalis* на гідролізаті ОФД

| Гідролізат | Швидкість розведення середовища D, год <sup>-1</sup> | Масова частка а.с.р., % |                   |                        |                   | Вміст біомаси АСД, г/дм <sup>3</sup> | Вихід біомаси   |                     | Продуктивність г/дм <sup>3</sup> · год |
|------------|------------------------------------------------------|-------------------------|-------------------|------------------------|-------------------|--------------------------------------|-----------------|---------------------|----------------------------------------|
|            |                                                      | У середовищі            |                   | У культуральній рідині |                   |                                      | від внесених РР | від використаних РР |                                        |
|            |                                                      |                         |                   |                        |                   |                                      |                 |                     |                                        |
|            |                                                      | РР                      | Органічні кислоти | РР                     | Органічні кислоти |                                      |                 |                     |                                        |
| ОФД        | 0,10                                                 | 1,48                    | 0,58              | 0,10                   | 0,11              | 7,94                                 | 53,65           | 57,54               | 0,79                                   |
|            | 0,20                                                 |                         |                   | 0,14                   | 0,14              | 8,26                                 | 55,81           | 61,64               | 1,65                                   |
|            | 0,30                                                 |                         |                   | 0,12                   | 0,15              | 8,98                                 | 60,78           | 66,00               | 2,69                                   |
|            | 0,40                                                 |                         |                   | 0,16                   | 0,20              | 8,80                                 | 59,56           | 66,77               | 3,90                                   |

На основі проведених досліджень була створена асоціація культур *Candida tropicalis*, *Candida species*, *Pichia species* і *Trichosporon cutaneum*, котра найбільш активно росла на гідролізатах усіх видів сировини і накопичувала від 6,3 до 11,8 г/дм<sup>3</sup> біомаси.

Вивчено поведінку монокультур у створеній асоціації при безперервному культивуванні. Доведено, що незалежно від виду гідролізату, домінуючими культурами були *Pichia species* і *Candida tropicalis*, а тип взаємовідносин між ними визначено методом математичного моделювання та аналізу, як коменсалізм-аменсалізм (рис. 9).

A – масова частка культури, %; а – 0,100 год<sup>-1</sup>; б – 0,200 год<sup>-1</sup>; в – 0,300 год<sup>-1</sup>; г – 0,400 год<sup>-1</sup>;  
1 – *Candida tropicalis*; 2 – *Pichia species*; 3 – *Trichosporon cutaneum*; 4 – *Candida species* штамм П.

Рис. 9. Видовий склад змішаної культури дріжджів, вирощеної на гідролізатах СХ

Досліджено вплив морських солей на процес культивування дріжджів. Дані досліджень показали, що додавання у варильну кислоту 0,2-1,8 % морських солей на стадії <sup>???</sup>деградації <sup>???</sup>сировини забезпечує інтенсивний приріст дріжджової маси (до 98 % від РР) при високій швидкості протікання культурального середовища. Найкращі результати одержані на гідролізатах з масовою часткою морських солей один відсоток (рис. 10).

Рис. 10. Вплив масової частки морських солей на вихід дріжджів при різній швидкості протікання культурального середовища

Хіміко-технологічні показники процесу вирощування дріжджів при безпосередньому внесенні морських солей у біореактор свідчать, що їх масова частка 0,025 % забезпечує підвищення продуктивності дріжджів на 35 % порівняно з контролем, їх вихід від введених РР і 92-96-відсоткову утилізацію моносахаридів. Внесення морських солей 0,05 % сприяло росту всіх показників до найкращих їх значень.

Дослідженнями підтверджено, що за хімічним складом дріжджі, одержані на гідролізатах нетрадиційних видів сировини, а також з додаванням морських солей на різних стадіях технологічного процесу, відносяться до першої та вищої категорії. Вони характеризуються високим вмістом сирого протеїну 54,6-62,8 %, низьким вмістом вуглеводів, містять 18 амінокислот, у тому числі всі незамінні, сумарна частка яких від усіх амінокислот складає від 54,8 % до 68,8 %, відповідають вимогам ГОСТу 20083-74. Перетравлюваність білку дріжджів досягає 92,4-93,2 %.

Рис. 11. Схема технологічного процесу виробництва кормових дріжджів на гідролізатах ОФД, СХ і СР

**У шостому розділі** наведено принципову та апаратну схеми технологічного процесу виробництва кормових дріжджів на гідролізатах ОФД, СХ і СР (рис. 11).

Описано основні етапи розробленої технології, з урахуванням доповнень до технологічного процесу на тих етапах виробництва, де додаються морські солі.

Наведено результати апробації розробленої технології на Миколаївському гідролізно-

дріжджовому та Бендерському біохімічному<sup>5</sup> заводах.

Показано, що собівартість однієї тонни дріжджів, одержаних на гідролізатах досліджуваної сировини, знижується на 4,5 %, з використанням морських солей на стадії гідролізу — на 4,8 %, на стадії культивування — на 3,2 % порівняно з контролем.

Очікуваний економічний ефект від впровадження даної технології складає для заводу потужністю 10 тисяч тонн дріжджів від одного до двох мільйонів гривень на рік.

### Висновки

1. Дисертаційну роботу присвячено розробці біотехнології одержання кормових дріжджів на основі нетрадиційних видів рослинної сировини — ОФД, СХ і СР. Доведено доцільність інтенсифікації процесу гідролізу сировини та культивування кормової біомаси морськими солями.
2. Досліджено технологічні властивості ОФД, СХ, СР. Показано, що подрібнення сировини до 25–35 мм по довжині волокна забезпечує високу насипну масу, змочуваність, добрі фільтруючі властивості, активну дифузію кислоти всередину частинок і вихід моносахаридів.
3. Вивчено хімічний склад сировини та її окремих анатомічних частин. Серед усіх компонентів переважають полісахариди 51,2–60,7 %, а також присутні екстрактивні 3,0–8,0 %, азотовмісні 4,9–8,5 %, мінеральні речовини 1,2–8,1 % у залежності від виду сировини та інші. У гідролізатах ЛГП і ТГП ідентифіковано весь набір моносахаридів. Доведено можливість використання усіх видів сировини як потенціального вуглецевмісного джерела для конструювання поживних середовищ для дріжджів.
4. Розроблено схему виділення, фракціонування полісахаридів анатомічних частин ОФД, СХ, СР. Вивчено властивості і встановлено будову полісахаридів виділених 6-10-відсотковим гідроксидом калію, котрі представлені глюкуроноксиланами і арабіноглюкуроноксиланами. Показано, що основний ланцюг глюкуроноксиланів і арабіноглюкуроноксиланів анатомічних частин ОФД, СХ побудовано із залишків D-ксилопіраноз, з'єднаних  $\beta$ -1-4-глікозидними зв'язками, а у бокових відгалуженнях мають місце залишки D-ксилози, арабінози та уронових кислот.
5. Підібрано ферменти і визначено умови максимальної деградації сумарних препаратів ГМЦ, целюлози та сировини у цілому, яка досягається за 48 годин при масовій концентрації ферментів у реакційному середовищі 4–4,5 мг/см<sup>3</sup>, 5,5–6,0 мг/см<sup>3</sup>, і 5,0 мг/см<sup>3</sup> відповідно. Доведено, що використання композиції ферментів Амілоризину П10Х та Целокандину Г10Х у співвідношенні 1:1 значно підвищує ефективність гідролізу як окремих біополімерів, так і сировини у цілому. За 48 годин ступінь їх конверсії для СХ, СР та ОФД складав — 73,1 %, 68,6 %, 51,6 % відповідно. Встановлено, що ферментолізати мають повний набір

моносахаридів, не містять інгібуючих речовин і можуть використовуватись як доброякісні поживні середовища для культивування дріжджів.

6. Досліджено кінетичні характеристики гідролізу усіх видів сировини. Показано, що під дією 0,6-відсоткової сірчаної кислоти, температури 120–150 °С і ГМ 14, за 40–60 хвилин майже повністю розпадаються ЛПП. Максимальний ступінь гідролізу целюлози досягається при 190–195 °С і складає для СР, СХ і ОФД — 92 %, 88 % і 78 % відповідно. Розроблено оптимальні режими гідролізу, які передбачають: завантаження — 30–45 хв.; прогрівання нижньою парою — 20–25 хв. з двома здуваннями; перколяцію — 120–135 хв.; промивання — 20–25 хв.; віджимання — 30–40 хв.; вивантаження і огляд апарата — 10 хв. Загальна тривалість процесу 210–280 хв у залежності від виду сировини. Одержані за таких умов гідролізати біологічно активні і містять 90–95 % легкозасвоюваних моносахаридів, органічні кислоти, фосфор, азот та ін. речовини.
7. Підібрано монокультури та їх асоціацію (*Candida species*, *Candida tropicalis*, *Trichosporon cutaneum*, *Pichia species*) — продуценти кормового білка для вирощування на одержаних гідролізатах. Показано, що як монокультури, так і їх асоціація, при високій швидкості протікання культурального середовища, активно асимілюють їх компоненти і накопичують біомасу до 12 г/дм<sup>3</sup> АСД, з вмістом сирого протеїну до 56,7 %.
8. Домінуючими культурами в асоціації при культивуванні на гідролізатах усіх видів сировини були *Pichia Species* і *Candida tropicalis*. Математичне моделювання та аналіз визначили тип взаємовідносин між ними як коменсалізм-аменсалізм.
9. Досліджено і підтверджено в умовах виробництва, що додавання у реакційну суміш 0,2–1,8 % морських солей на стадії деградації сировини прискорює та підвищує вихід РР, біологічну доброякісність гідролізатів, збагачує їх всім спектром макро- і мікроелементів і скорочує тривалість процесу гідролізу. Одержані гідролізати забезпечують інтенсивний приріст біологічно активної дріжджової маси (до 98 % від РР) при швидкості протікання культурального середосища 0,300 год<sup>-1</sup>. Найкращі результати одержані на гідролізатах з масовою часткою морських солей один відсоток. Встановлено, що масова частка солей вже 0,025 %, безпосередньо внесена у біореактор, забезпечує підвищення продуктивності дріжджів на 35 % і 92–96-відсоткову утилізацію моносахаридів, а – 0,05 % сприяє росту всіх показників процесу культивування і готової продукції до найкращих.
10. Доказано, що дріжджі, одержані на основі нетрадиційних видів сировини, а також на їх гідролізатах з додаванням морських солей на різних стадіях технологічного процесу відносяться до вищої категорії, містять 54,6–62,8 % протеїну, вуглеводи, повний набір амінокислот, у тому числі всі незамінні, сумарна частка яких від усіх амінокислот складає від 54,8 до 68,8 %, відповідають вимогам ГОСТу 20083-74. Дріжджі не токсичні, не містять

важких металів, не викликають бродіння,<sup>7</sup> перетравлюваність їх білка досягає 92,4–93,2 %.

11. Розроблено біотехнології одержання кормових дріжджів на гідролізатах ОФД, СХ і СР, з їх інтенсифікацією морськими солями. Роботу апробовано на Миколаївському гідролізно-дріжджовому та Бендерському біохімічному заводах. Результати досліджень передані у вигляді розроблених технологічних режимів як доповнення до “Технологічного регламенту” даних заводів. Наукова новизна досліджень захищена авторським свідоцтвом.

### **Основний зміст роботи викладено у наступних публікаціях**

1. Килименчук Е.А. Растительное сырье – источник углеродного питания для микроорганизмов // Научные труды международной конференции "Экология человека и проблемы воспитания молодых ученых". – Одесса: Астропринт. – 1997. 4.2. – С. 243–245.

*Особистий внесок здобувача:* проведення досліджень хімічного складу гідролізатів нетрадиційних видів сировини, обробка результатів, підготовка матеріалів до публікації.

2. Величко Т.О., Килименчук О.О. Ріст асоціації дріжджових культур в умовах конкуренції за один і той же лімітуючий субстрат // Збірник наукових праць Одеської державної академії харчових технологій. – Одеса, – 1999. – Вип. 19. – С. 172–176.

*Особистий внесок здобувача:* дослідження хіміко–технологічних показників поживних середовищ, аналіз результатів, підготовка матеріалів до публікації.

3. Величко Т.О., Килименчук О.О. Інтенсифікація мікробіологічного синтезу кормового білка природними мінеральними солями // Збірник наукових праць Одеської державної академії харчових технологій. – Одеса, – 1999. – Вип. 20. – С. 172–176.

*Особистий внесок здобувача:* дослідження режимів гідролізу сировини, аналіз гідролізатів, культивування дріжджів, узагальнення матеріалів, підготовка їх до публікації.

4. Величко Т.О., Осадча А.І., Килименчук О.О. Біологічно–активні речовини на основі рослинної сировини // Бюлетень інституту сільськогосподарської мікробіології УААН. – №7, – С. 31.

*Особистий внесок здобувача:* вивчення поведінки дріжджових культур в асоціатах, узагальнення матеріалів досліджень, підготовка їх до публікації.

5. Величко Т.О., Килименчук О.О. Біотехнологія одержання біологічно активних речовин на основі рослинної сировини // Збірник наукових праць Одеської державної академії харчових технологій. – Одеса, – 2001. – Вип. 22. – С. 68–71.

*Особистий внесок здобувача:* дослідження біохімічного складу рослинної сировини, участь у підготовці субстратів для культивування дріжджів в дослідно–виробничих умовах, розробка параметрів вирощування з використанням активаторів росту, узагальнення і підготовка матеріалів

до публікації.

6. Величко Т.А., Килименчук Е.А. Получение кормовой биомассы из нетрадиционных растительных отходов в условиях производства // Зернові продукти і комбікорми. – 2001. – №4. – С. 38–40.

*Особистий внесок здобувача:* розробка режимів гідролізу і їх апробація в умовах виробництва, підготовка матеріалів до публікації.

7. Способ гидролиза растительного сырья. А.С. 1521778 СССР, МКИ С 1/02./ Голивец Г.И., Величко Т.А., Ваганова Г.В., Форсов В.И., Краев Л.Н., Килименчук Е.А. – №4265248/31–13. Заявлено 17.02.87; Опубл. 15.11.89, Бюл. №42, – 4с.

*Особистий внесок здобувача:* проведення експериментальних досліджень, підготовка матеріалів для розроблення авторського свідоцтва.

8. Величко Т.О., Килименчук О.О. Культивування дріжджових клітин на ферменталізатах рослинних відходів // Український біохімічний журнал. Матеріали VIII Українського біохімічного з'їзду. – Чернівці, – 2002, №4 б (додаток 2), – Т. 74, С. 152–153.

*Особистий внесок здобувача:* проведення досліджень з ферментативної деградації сировини і культивування дріжджів, узагальнення і підготовка матеріалів до публікації.

9. Величко Т.О., Килименчук О.О. Біоконверсія рослинних відходів для одержання кормового білка // Матеріали 69-ої наукової конференції молодих вчених аспірантів і студентів "Розроблення, дослідження і створення продуктів функціонального харчування, обладнання та нових технологій для харчової і переробної промисловості. – Київ: НУХТ. – 2003. – Ч. 2. С. 70.

*Особистий внесок здобувача:* характеристика ферментних систем, культивування дріжджів на ферментолізатах, узагальнення і підготовка матеріалів до публікації.

## АНОТАЦІЯ

Килименчук О.О. Розробка біотехнології одержання кормового білка на основі нетрадиційної рослинної сировини: – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата технічних наук за фахом 03.00.20 – біотехнологія. – Одеська національна академія харчових технологій, Одеса, 2003.

Дисертацію присвячено розробці технології одержання біологічно активних кормових дріжджів на основі нетрадиційної рослинної сировини.

Сукупність результатів теоретичних та експериментальних досліджень дозволила сформулювати доцільність використання нетрадиційних рослинних відходів, а саме, обрізків фруктових дерев, стебел хмелю та рицини для конструювання поживних середовищ з подальшим культивування на їх основі кормової біомаси.

Встановлено, що будова основних, виділених та досліджених біополімерів сировини

впливає на кінетичні характеристики їх<sup>9</sup> ензиматичної та кислотної деградації. Експериментально підтверджено, що поживні середовища, одержані кислотною та ензиматичною деполімеризацією нетрадиційної сировини, є доброякісними для культивування симбіотичної асоціації дріжджів *Pichia species*, *Candida species*, *Candida tropicalis*, *Trichosporon cutaneum*, підібраної за результатами теоретичних обґрунтувань і практичних досліджень.

Експериментально визначено і підтверджено, в умовах виробництва, оптимальну кількість внесення морських солей на стадії гідролітичної деструкції сировини і культивування дріжджів, котра інтенсифікує вихід біомаси і підвищує її біологічну доброякісність.

За результатами досліджень розроблено біотехнологію одержання біологічно активних кормових дріжджів. Робота була апробована на Миколаївському гідролізно-дріжджовому та Бендерському біохімічному заводах. Одержані дріжджі відповідають першій та вищій категоріях ГОСТу 20083-74, накопичують всі незамінні амінокислоти у підвищеній кількості.

Ключові слова: нетрадиційні рослинні відходи, ензими, гідролізати, поживне середовище, культура, дріжджі, асоціація, біомаса, технологія.

## АННОТАЦИЯ

Килименчук Е.А. Разработка биотехнологии получения кормового белка на основе нетрадиционного растительного сырья: – Рукопись.

Диссертация на соискание научной степени кандидата технических наук по специальности 03.00.20 – биотехнология. – Одесская национальная академия пищевых технологий, Одесса, 2003.

Диссертация посвящена разработке биотехнологии получения биологически активных кормовых дрожжей на основе нетрадиционного растительного сырья.

Исследованы технологические свойства, химический и биополимерный состав обрезки фруктовых деревьев, стеблей хмеля и клещевины районированных на Юге Украины и в Житомирской области.

Высокое содержание полисахаридов от 51 % до 60 % от абсолютно сухого сырья, экстрактивных веществ от 3,0 до 8,0 % и другие показатели подтвердили его пригодность для конструирования питательных сред и дальнейшего культивирования на них дрожжей.

Выделены, изучены свойства и установлено строение основных полисахаридов нетрадиционных растительных отходов. Показано, что основными биополимерами исследуемых видов сырья являются глюкуронооксианы, арабиноглюкуронооксианы и целлюлоза. Определены параметры энзиматической и кислотной деполімеризации этих биополимеров и сырья в целом. Показано, что выделенные биополимеры и сырьё в целом деградирует под действием композиции ферментов Целлокандина Г10х и Амилоризина П10х в соотношении 1 : 1, а ферментализаты являются доброкачественной питательной средой для выращивания дрожжей. Разработаны

режимы гидролитической деструкции всех видов сырья 0,6-процентной серной кислотой. Общая продолжительность процесса 210–280 минут в зависимости от вида сырья. Доказано, что гидролизаты полученные в этих условиях являются доброкачественными питательными средами для получения дрожжевой биомассы.

Культивирование монокультур дрожжей на кислотных гидролизатах и ферментализатах нетрадиционного сырья, показало, что отдельные культуры, и созданная на их основе ассоциация *Candida tropicalis*, *Candida species*, *Pichia species*, *Trichosporon cutaneum* активно ассимилируют компоненты среды и продуктивно наращивают биомассу, выход которой составил 43,4-78,9 % от внесенных редуцирующих веществ. Полученная биомасса содержит 50,0-56,7 % сырого протеина, 7,1-8,9 % липидов, 22,4-28,2 % углеводов и сбалансирована по аминокислотному составу.

На основании математического моделирования и анализа определен тип взаимодействия между доминирующими в подобранной ассоциации культурами, *Pichia species* и *Candida tropicalis*, как комменсализм-аменсализм.

Экспериментально определено и подтверждено, в условиях производства, оптимальное количество внесения морских солей на стадии гидролитической деструкции сырья и культивирования биомассы. Однопроцентный раствор морских солей в реакционной смеси на стадии деполимеризации сырья увеличивает скорость процесса и повышает выход сахаров, улучшает биологическую доброкачественность гидролизатов, обогащает среду макро- и микроэлементами необходимыми для дрожжей, а 0,05-процентный – на стадии выращивания, кроме повышения выхода биомассы, и продуктивности улучшает ее биологическую доброкачественность.

Полученные абсолютно сухие дрожжи содержат 54,6-62,8 % сырого протеина, углеводы, липиды, минеральные вещества, витамины, аминокислоты с массовой долей незаменимых — 68 % от суммы всех, не токсичны, не содержат солей тяжелых металлов, нитраты, нитриты в них отсутствуют.

Переваримость белка дрожжей составила 92,4-93,2 %, в зависимости от используемого гидролизата для их выращивания. Дрожжи соответствовали высшей группе и ГОСТу 20083-74, предъявляемому к кормовым дрожжам.

Ключевые слова: нетрадиционное растительное сырье, энзимы, гидролизаты, питательная среда, культура, дрожжи, ассоциация, биомасса, технология.

## ANNOTATION

Kylymenchuk E. A. Elaboration of biotechnology of obtaining forage protein on a base of untraditional vegetable raw material: – Manuscript.

The thesis for a candidate's degree of technical sciences for a speciality 03.00.20 –

biotechnology. – The Odessa State Academy of Food Technologies, Odessa, 2003.

The thesis is devoted to the development of the biotechnology of obtaining biologically active feed yeasts on a base of untraditional vegetable raw material.

The system of theoretical and practical results allow to formulate expediency of untraditional vegetable waste products use such as fruit tree cuttings, hop stalks, palmcrust for nutrient medium designing and feed biomass cultivation in the sequel.

That was proved that the structure of basic, isolated, explored biopolymers of raw material influences on kinetic characteristics of their enzymatic and acidic degradation. That was experimentally confirmed that obtained by untraditional materials using acidic and enzymatic depolymerization nutrient mediums were good quality for symbiotic association yeasts cultivation *Pichia* species, *Candida* species, *Candida tropicalis*, *Trichosporon cutaneum* which was chosen after theoretical substantiation and practical investigations.

Optimal quantity of seasalt bringing in on the hydrolytic raw material destruction and yeasts cultivation phase that intensified biomass recovery and biomass biological quality enhanced was experimental determined and confirmed in industrial conditions.

As a result of investigations biotechnology of obtaining biologically active feed yeasts was obtained. The work was approved on Mykolayiv hydrolisis yeast plant and Bendery biochemical plant. Obtained yeasts conditioned to first and extra categories of DOST 20083-74, cumulates all essential amino acids in large quantities.

Key words: untraditional vegetable raw material, enzymes, hydrolysates, nutrient medium, culture, yeasts, association, biomass, technology.

Підписано до друку XX.XX.XXXX р. Формат 60х90/16

Об.-вид. арк. X,X. Тираж XXX прим. Зак. № XXX

Одеська національна академія харчових технологій

65039, м. Одеса, вул. Канатна, 112

