

Занятие семинарского типа № 4

ТЕМА ЗАНЯТИЯ: Биотехнология получения белковых препаратов»

УЧЕБНЫЙ МАТЕРИАЛ

Общая характеристика.

Преимущества микробиологического синтеза белка заключаются в следующем:

- ✓ микроорганизмы обладают очень большой скоростью накопления биомассы (в 5000 раз выше, чем у животных или растений);
- ✓ микробные клетки способны накапливать очень большое количество белка;
- ✓ в биотехнологических процессах получения белка отсутствует многостадийность за счет высокой специфичности;
- ✓ процесс биосинтеза белка протекает в мягких условиях;
- ✓ данный способ получения белка менее трудоемок по сравнению с процессом органического синтеза.

В настоящее время в биотехнологии процесс производства белка является одним из самых крупномасштабных производств.

Белки являются обязательными компонентами клеток любого живого организма, выполняющими жизненно важные функции: каталитические, регуляторные, транспортные, биоэнергетические, защиту от инфекции и воздействия стрессовых факторов, структурные, запасные и др.

Для образования клеток и тканей организма, а также для поддержания его жизненных функций должен осуществляться постоянный биосинтез структурных и других форм белков.

В состав белков входят 20 аминокислот и два амида (аспарагин и глутамин).

Растения и большинство микроорганизмов способны синтезировать все входящие в их состав аминокислоты из простых веществ – углекислоты, воды и минеральных солей, тогда как в организме человека и животных некоторые аминокислоты не могут синтезироваться и должны поступать в готовом виде как компоненты пищи. Такие аминокислоты принято называть незаменимыми. К ним относятся: валин, лейцин, изолейцин, лизин, метионин, треонин, триптофан, фенилаланин и др. Отсутствие в пище хотя бы одной незаменимой аминокислоты приводит к тяжелым заболеваниям человека, а недостаток их в кормах снижает продуктивность сельскохозяйственных животных.

Главным источником незаменимых аминокислот для человека являются белки животного или растительного происхождения, входящие в состав про-

дуктов питания, а для сельскохозяйственных животных – главным образом растительные белки.

Поступающие с пищей или кормом белковые вещества под действием ферментов желудочного сока гидролизуются до аминокислот, которые затем используются для образования белковых молекул человеческого или животного организма.

Все незаменимые аминокислоты должны содержаться в белках пищи в определенных соотношениях, отвечающих потребностям данного организма. В соответствии с нормами питания человек должен ежедневно получать с пищей от 60 до 120 г полноценного белка.

Высокой интенсивностью биосинтеза белков отличаются многие микроорганизмы, причем белки микробных клеток, как правило, отличаются повышенным содержанием незаменимых аминокислот.

Микроорганизмы в качестве источника кормового белка имеют ряд преимуществ в сравнении с растительными и даже животными организмами. Они отличаются высоким (до 60% сухой массы) и устойчивым содержанием белков, тогда как в растениях концентрация белковых веществ значительно варьируется в зависимости от условий выращивания, климата, погоды, типа почвы, агротехники и др. Наряду с белками в микробных клетках накапливаются и другие ценные в питательном отношении вещества: легкоусвояемые углеводы, липиды с повышенным содержанием ненасыщенных кислот, витамины, макро- и микроэлементы.

При использовании микроорганизмов на ограниченной площади можно организовать промышленное производство и получать большое количество продукта в любое время года, причем микробные клетки способны синтезировать белки из отходов сельского хозяйства и промышленности и, таким путем, позволяют одновременно решать другую важную проблему – утилизацию данных отходов в рамках охраны окружающей среды. В качестве источников кормового белка наиболее часто используют различные виды дрожжей и бактерий, микроскопические грибы, одноклеточные водоросли и т.д.

Продуценты белка

Производство микробной биомассы – самое крупномасштабное микробиологическое производство. Микробная биомасса может быть хорошей белковой добавкой для домашних животных, птиц и рыб.

Производство микробной биомассы особенно важно для стран, не культивирующих в больших масштабах сою (соевую муку используют как традиционную белковую добавку к кормам).

При выборе микроорганизма учитывают удельную скорость роста и выход биомассы на данном субстрате, стабильность при поточном культивировании, величину клеток. Клетки дрожжей крупнее, чем бактерий, и легче отделяются от культуральной жидкости при центрифугировании. Можно выращивать полиплоидные мутанты дрожжей с крупными клетками. В настоящее время известны только две группы микроорганизмов, которым присущи

свойства, необходимые для крупномасштабного промышленного производства: дрожжи рода *Candida* на *n*-алканах (нормальных углеводов) и бактерии *Methylophilus methylotrophus* на метаноле.

Микроорганизмы можно выращивать и на других питательных средах: на газах, нефти, отходах угольной, химической, пищевой, винно-водочной, деревообрабатывающей промышленности. Экономические преимущества их использования очевидны. Так, килограмм переработанной микроорганизмами нефти дает килограмм белка, в то время, как килограмм сахара – всего 500 граммов белка.

Аминокислотный состав белка дрожжей практически не отличается от такового, полученного из микроорганизмов, выращенных на обычных углеводных средах. Биологические испытания препаратов из дрожжей, выращенных на углеводородах, которые проведены и у нас в стране и за рубежом, выявили полное отсутствие у них какого-либо вредного влияния на организм испытуемых животных. Исследования были проведены на многих поколениях десятков тысяч лабораторных и сельскохозяйственных животных.

В переработанном виде дрожжи содержат неспецифические липиды и аминокислоты, биогенные амины, полисахариды и нуклеиновые кислоты, а их влияние на организм пока еще плохо изучено. В этой связи, предлагается выделять из дрожжей белок в химически чистом виде. Его освобождение от нуклеиновых кислот является довольно простой процедурой.

В современных биотехнологических процессах, основанных на использовании микроорганизмов, продуцентами белка служат дрожжи, микроскопические грибы, бактерии и микроскопические водоросли.

С технологической точки зрения наилучшими из них являются дрожжи. Их преимущество заключается прежде всего в "технологичности": дрожжи легко выращивать в условиях биотехнологического производства. Они характеризуются высокой скоростью роста, устойчивостью к посторонней микрофлоре, способны усваивать любые источники питания, легко отделяются, не загрязняют воздух спорами. Клетки дрожжей содержат до 25% сухих веществ. Наиболее ценный компонент дрожжевой биомассы – белок, который по составу аминокислот превосходит белок зерна злаковых культур и лишь немного уступает белкам молока и рыбной муки. Биологическая ценность дрожжевого белка определяется наличием значительного количества незаменимых аминокислот. По содержанию витаминов дрожжи превосходят все белковые корма, в том числе и рыбную муку. Кроме того, дрожжевые клетки содержат микроэлементы и значительное количество жира, в котором преобладают ненасыщенные жирные кислоты.

При скармливании кормовых дрожжей коровам повышаются удои и содержание жира в молоке, а у пушных зверей улучшается качество меха. Интерес представляют и дрожжи, содержащие гидролитические ферменты и способные расти на полисахаридах без их предварительного гидролиза. Использование таких дрожжей позволит избежать дорогостоящую стадию гидролиза полисахаридсодержащих отходов.

Известно более 100 видов дрожжей, которые хорошо растут на крахмале как на единственном источнике углерода. Среди них особенно выделяются два вида, которые образуют как глюкоамилазы, так и β -амилазы, растут на крахмале с высоким экономическим коэффициентом и могут не только ассимилировать, но и сбраживать крахмал: *Schwanniomyces occidentalis* и *Saccharomycopsis fibuliger*. Оба вида дрожжей представляют собой перспективные продуценты белка и амилолитических ферментов на крахмалсодержащих отходах.

Кроме того, ведутся поиски дрожжей, которые могли бы расщеплять нативную целлюлозу. Целлюлазы обнаружены у нескольких видов, например, у *Trichosporon pullulans*, однако активность данных ферментов низкая и о промышленном использовании таких дрожжей говорить пока не приходится.

Дрожжи из рода *Kluveromyces* хорошо растут на инулине – основном запасном веществе в клубнях топинамбура – важной кормовой культуры, которая также может быть использована для получения дрожжевого белка.

В последнее время в качестве продуцентов белка стали использовать бактерии, которые отличаются высокой скоростью роста и содержат в биомассе до 80% белка. Бактерии хорошо поддаются селекции, что позволяет получать высокопродуктивные штаммы. Их недостатками являются трудная осаждаемость, обусловленная малыми размерами клеток, значительная чувствительность к фаговым инфекциям и высокое содержание в биомассе нуклеиновых кислот. Последнее обстоятельство неблагоприятно только в том случае, если предусматривается пищевое использование белкового продукта. Снижать содержание нуклеиновых кислот в биомассе, употребляемой на корм животным, нет необходимости, так как мочева кислота и ее соли, образующиеся при разрушении азотистых оснований, превращаются в организме животных в алантоин, который легко выделяется с мочой. В то время как, у человека избыток солей мочева кислоты может способствовать развитию ряда заболеваний.

Следующую группу продуцентов белка составляют микроскопические грибы. Они привлекают внимание исследователей благодаря способности утилизировать самое разнообразное по составу органическое сырье: мелассу, молочную сыворотку, сок растений и корнеплодов, лигнин- и целлюлозосодержащие твердые отходы пищевой, деревообрабатывающей, гидролизной промышленности. Грибной мицелий богат белковыми веществами, которые по содержанию незаменимых аминокислот ближе всего к белкам сои. Вместе с тем белок грибов богат лизином, основной аминокислотой, недостающей в белке зерновых культур. Это позволяет на основе зерна и грибной биомассы составлять сбалансированные пищевые и кормовые смеси. Грибные белки имеют достаточно высокую биологическую ценность и хорошо усваиваются организмом.

Положительным фактором является и волокнистое строение выращенной грибной культуры. Это обстоятельство позволяет имитировать текстуру мяса, а с помощью различных добавок – его цвет и запах. Хранят грибной мицелий, как правило, в замороженном состоянии.

В качестве субстрата грибами используются глюкоза и другие питательные вещества, а общим источником азота служат аммиак и аммонийные соли. После завершения стадии ферментации культуру подвергают термообработке для уменьшения содержания рибонуклеиновой кислоты, а затем отделяют мицелий методом вакуумного фильтрования.

Источниками белковых веществ могут служить и водоросли. При фототрофном способе питания и образования биомассы они используют углекислый газ атмосферы. Выращивают водоросли, как правило, в поверхностном слое прудов, где с площади 0,1 га можно получить столько же белка, сколько с 14 га посевов фасоли. Белок водорослей пригоден не только для кормовых, но и пищевых целей.

Наконец, хорошими продуцентами белка являются рясковые, которые накапливают протеина до 45% от сухой массы, а также до 45% углеводов. Однако, несмотря на свои малые размеры, они не принадлежат к вышеперечисленным производителям белка (микроорганизмам), так как не только являются многоклеточными организмами, но и относятся к высшим растениям.

Субстраты для культивирования микроорганизмов с целью получения белка

В качестве источников вещества и энергии микроорганизмы используют самые разнообразные субстраты – нормальные парафины и дистилляты нефти, природный газ, спирты, растительные гидролизаты и отходы промышленных предприятий.

Для выращивания микроорганизмов с целью получения белка оптимальным является наличие доступного, богатого углеродом субстрата. Этому требованию вполне отвечают нормальные (неразветвленные) парафины нефти. Выход биомассы при их использовании может достигать до 100% от массы субстрата. Качество продукта зависит от степени чистоты парафинов. При использовании парафинов достаточной степени очистки, полученная дрожжевая биомасса может успешно применяться в качестве дополнительного источника белка в кормовых рационах животных.

Первый в мире крупный завод кормовых дрожжей мощностью 70 тыс. т. в год. был пущен в 1973 г. в СССР. В качестве сырья на нем использовали выделенные из нефти *n*-алканы и несколько видов дрожжей, способных к быстрому росту на углеводородах: *Candida maltosa*, *Candida guilliermondii*, *Candida lipolytica*.

В дальнейшем в основном именно отходы от переработки нефти служили главным сырьем для производства дрожжевого белка, которое быстро росло и к середине 80-х гг. XX в. превысило 1 млн. т. в год, причем в СССР кормового белка получали вдвое больше, чем во всех остальных странах мира, вместе взятых. Однако в последующем масштабы производства дрожжевого белка на углеводородах нефти резко сократились. Это произошло как в результате экономического кризиса 90-х гг. XX в., так и из-за целого ряда специфических проблем, с которыми связано данное производство. Одна из

них – необходимость очистки готового кормового продукта от остатков нефти, имеющих канцерогенные свойства.

В нашей стране мало районов, пригодных для выращивания сои, являющейся основным источником белковых добавок. В этой связи, налажено крупнотоннажное производство кормовых дрожжей на *n*-парафинах. Действует несколько заводов мощностью от 70 до 240 тыс. тонн в год. При этом в качестве сырья используют жидкие очищенные парафины.

Одним из перспективных источников углерода для культивирования продуцентов белка высокого качества считается метиловый спирт. Его можно получать методом микробного синтеза на таких субстратах, как древесина, солома, бытовые отходы. Использование метанола в качестве субстрата затруднено из-за его химической структуры: молекула метанола содержит один атом углерода, тогда как биосинтез большинства органических соединений осуществляется через двухуглеродные молекулы. На метаноле как на единственном источнике углерода и энергии способны расти около 25 видов дрожжей, в том числе *Pichia polymorpha*, *Pichia anomala*, *Yarrowia lipolytica*.

Наилучшими продуцентами на этом субстрате считаются бактерии, потому что они могут расти на метаноле с добавлением минеральных солей.

Процессы получения белка на метаноле достаточно экономичны. По данным концерна Ай-Си-Ай (Великобритания), себестоимость целевого продукта, производимого на метаноле, на 10–15% ниже, чем при аналогичном производстве, базирующемся на основе высокоочищенных *n*-парафинов.

Высокобелковые продукты из метанола получают фирмы ряда развитых стран мира: Великобритании, Швеции, Германии, США, Италии.

При этом продуцентами белка служат бактерии рода *Methylomonas*. Выращивание на метаноле метилотрофных бактерий, таких как *Methylophilus methylotrophus*, выгодно, так как они используют одноуглеродные соединения более эффективно. При росте на метаноле бактерии дают больше биомассы, чем дрожжи. Первая реакция окисления метанола у дрожжей катализируется оксидазой, а у метилотрофных прокариот – дегидрогеназой. В настоящее время проводятся исследования с использованием методов генной инженерии по переносу гена метанолдегидрогеназы из бактерий в дрожжи, что, в свою очередь, позволит объединить технологические преимущества дрожжей с эффективностью роста бактерий.

Использование этанола в качестве субстрата снимает проблему очистки биомассы от аномальных продуктов обмена с нечетным числом углеродных атомов. Стоимость такого производства несколько выше. Биомассу на основе этанола производят в Чехии, Испании, Германии, Японии, США.

В США, Японии, Канаде, Германии, Великобритании разработаны технологические процессы получения белка на природном газе. В данном случае выход биомассы может достигать до 66% от массы субстрата.

В разработанном в Великобритании технологическом процессе используется смешанная культура: бактерии *Methylomonas*, усваивающие метан, *Hypermicrobium* и *Pseudomonas*, усваивающие метанол, и два вида неметиловых

трофных бактерий. Такая культура характеризуется высокой скоростью роста и продуктивностью.

Главные достоинства метана как субстрата – доступность, относительно низкая стоимость, высокая эффективность преобразования в биомассу метаноокисляющими микроорганизмами, значительное содержание в биомассе белка, сбалансированного по аминокислотному составу. Бактерии, растущие на метане, хорошо переносят кислую среду и высокие температуры, в связи с чем устойчивы к инфекциям.

Субстратом для микробного синтеза может быть и минеральный углерод – углекислый газ. Окисленный углерод в данном случае с успехом восстанавливается микроводорослями при помощи солнечной энергии и водородоокисляющими бактериями при помощи водорода. На корм сельскохозяйственным животным используют суспензию водорослей. Для работы установок по выращиванию водорослей необходимы стабильные климатические условия – постоянные температуры воздуха и интенсивность солнечного освещения.

Наиболее перспективно получение белка с помощью водородоокисляющих бактерий, которые развиваются за счет окисления водорода кислородом воздуха. Энергия, высвобождающаяся в данном процессе, идет на усвоение углекислого газа. Для получения биомассы используются, как правило, бактерии рода *Hydrogenomonas*. Первоначально интерес к ним возник при разработке замкнутых систем жизнеобеспечения, а затем их стали изучать с точки зрения использования в качестве продуцентов высококачественного белка. В институте микробиологии Геттингенского университета (Германия) разработан способ культивирования водородоокисляющих бактерий, при котором можно получать 20 г сухого вещества на 1 литр суспензии клеток. Возможно, в будущем данный вид бактерий станет основным источником пищевых микробных белков.

Исключительно доступным и достаточно экономичным источником углеводов для производства микробного белка является растительная биомасса. Любое растение содержит разнообразные сахара: целлюлоза – полисахарид, состоящий из молекул глюкозы; гемицеллюлоза состоит из остатков арабинозы, галактозы, маннозы, фруктозы. Проблема заключается в том, что полисахариды древесины связаны жесткими оксифенилпропановыми звеньями лигнина – полимера, почти не поддающегося деструкции (разрушению). В этой связи, гидролиз древесины происходит только в присутствии катализатора – минеральной кислоты в условиях очень высоких температур. При этом образуются моносахара – гексозы и пентозы.

На жидкой, содержащей сахара, фракции гидролизата выращивают дрожжи. При кислотном гидролизе древесины образуется ряд побочных продуктов (фурфурол, меланины), а из-за высоких температур может произойти карамелизация сахаров. Данные вещества препятствуют нормальному росту и развитию дрожжей, их отделяют от гидролизата и по возможности используют. В данном случае в качестве продуцентов используют штаммы *Candida vscotti* и *C. tropicalis*.

Наиболее крупным производителем сырья для гидролизного производства являются деревообрабатывающие предприятия, отходы которых достигают ежегодно десятки миллионов тонн. К сожалению, нерационально или не используются вообще отходы производства лубяных волокон (из льна и конопли), картофеле-крахмального производства, пивоваренной, плодоовощной, консервной промышленности, свекловичный жом.

Особого внимания заслуживают способы прямой биоконверсии продуктов фотосинтеза и их производных в белок с помощью микроскопических грибов. Данные организмы благодаря наличию мощных ферментных систем способны утилизировать сложные растительные субстраты без предварительной обработки.

Исследования условий биоконверсии растительных субстратов в микробный белок активно ведутся в США, Канаде, Индии, Финляндии, Швеции, Великобритании, России и других странах мира. Однако в научной литературе сведения о широкомасштабном производстве белков микробного происхождения довольно немногочисленны. В настоящее время наиболее известным и доведенным до стадии промышленной реализации является процесс "Ватерлоо", разработанный в университете Ватерлоо в Канаде. Данный технологический процесс, основанный на выращивании целлюлозоразрушающих грибов *Chaetomium cellulolyticum*, можно осуществлять как в глубинной культуре, так и поверхностным методом. Содержание белка в конечном продукте (высушенном грибном мицелии) составляет около 45%.

Финская фирма "Тампелла" разработала технологию и организовала производство белкового кормового продукта "Пекило" на отходах целлюлозно-бумажного производства. Целевой продукт содержит до 60% протеина с хорошим аминокислотным профилем и значительное количество витаминов группы В.

В большинстве стран – производителей молока традиционным способом утилизации молочной сыворотки является ее скармливание сельскохозяйственным животным. Степень конверсии белка сыворотки в белок животного весьма невысока (для выработки 1 кг животного белка необходимо 1700 кг сыворотки). В последние 10–15 лет из молочной сыворотки методом ультрафильтрации выделяют белки высокого качества, на основе которых делают заменители сухого обезжиренного молока и другие ценные продукты. Концентраты можно использовать как пищевые добавки и компоненты детского питания. Из сыворотки производится также молочный сахар – лактоза, применяемая в пищевой и медицинской промышленности. При этом объем промышленной переработки молочной сыворотки составляет 50-60% от ее общего производства, т.е. налицо большие потери ценнейшего молочного белка и лактозы. Более того, возникает проблема утилизации отходов, так как процесс естественного разложения сыворотки происходит очень медленно. Лактоза молочной сыворотки может служить источником энергии для многих видов микроорганизмов, сырьем для производства продуктов микробного синтеза (органических кислот, ферментов, спиртов, витаминов и др.) и белковой биомассы.

Из всех известных микроорганизмов наиболее высоким коэффициентом конверсии белка сыворотки в микробный белок обладают дрожжи. Способность к ассимиляции лактозы имеется примерно у 20% всех известных видов дрожжей. Гораздо реже встречаются дрожжи, сбраживающие лактозу. Активный катаболизм лактозы особенно характерен для дрожжей из рода *Kluveromyces*. Данный вид дрожжей можно использовать для получения на молочной сыворотке кормового белка, этанола, препаратов β -глюкозидазы.

Впервые дрожжи на молочной сыворотке стали выращивать в Германии. При этом в качестве продуцентов применяли различные штаммы сахаромицетов. Разработаны способы получения микробных продуктов, основанные на использовании лактозы как монокультурой, так и смесью дрожжей и бактерий. В настоящее время в качестве продуцентов используют дрожжи родов *Candida*, *Trichosporon*, *Torulopsis*. Молочная сыворотка с выросшими в ней дрожжами по биологической ценности значительно превосходит исходное сырье и ее можно использовать в качестве заменителя молока.

Приведенный перечень микроорганизмов и процессов получения белка одноклеточных не является исчерпывающим. Однако потенциал данной новой отрасли производства белковых препаратов используется далеко не полностью.

Кормовые дрожжи

Получение микробного белка на основе растительного сырья

В качестве исходного сырья при такой технологии получения кормового белка обычно используются отходы целлюлозной и деревообрабатывающей промышленности, солома, хлопковая шелуха, корзинки подсолнечника, стержни кукурузных початков, свекловичная меласса, картофельная мезга, виноградные выжимки, верховой малоразложившийся торф, барда спиртовых производств, отходы кондитерской и молочной промышленности.

Измельченное растительное сырье, содержащее большое количество клетчатки, гемицеллюлоз, пентазонов, подвергаются кислотному гидролизу при повышенном давлении и температуре. В результате 60–65% содержащихся в них полисахаридов гидролизуются до моносахаридов. Полученный гидролизат отделяют от лигнина; избыток кислоты, применяемой для гидролиза, нейтрализуют известковым молоком или аммиачной водой. После охлаждения и отстаивания в гидролизат добавляют минеральные соли, витамины и другие биологически активные вещества, необходимые для жизнедеятельности микроорганизмов.

Типовая технологическая схема кислотного гидролиза растительного сырья

В гидролиз аппарате производится кислотный гидролиз растительного сырья, при этом полученный гидролизат поступает на трехступенчатую ис-

парительную установку, где производится его охлаждение, после чего он поступает на конденсацию в теплообменник. Охлажденный гидролизат подвергается инверсии, которая происходит в инвенторе при температуре 100 °С и атмосферном давлении. Данный процесс осуществляется в течение 6–8 ч. Затем гидролизат поступает на нейтрализацию с целью освобождения его от серной кислоты. Процесс нейтрализации идет непрерывно в двух или трех последовательно соединенных нейтрализаторах и осуществляется известковым молоком или аммиачной водой. Затем полученный нейтрализат поступает на осветление, которое производится в отстойниках (при этом температура снижается до 40–25 °С). Окончательное охлаждение нейтрализата осуществляют в вакуум-охладительных установках и теплообменниках и в результате получают охлажденное нейтрализованное сусло.

Таким образом, основными стадиями приготовления питательной среды для получения белков (биомассы кормовых дрожжей) являются: гидролиз, инверсия, нейтрализация, отстаивание, охлаждение.

В некоторых случаях нейтрализованный гидролизат подвергают продувке воздухом для отделения от него летучих примесей.

Технология производства кормовых дрожжей с применением гидролизатов растительного сырья

Полученную вышеописанным способом питательную среду подают в ферментерный цех, в котором выращивают дрожжи.

Для культивирования на гидролизатах растительных отходов наиболее эффективны дрожжи родов *Candida*, *Torulopsis*, *Saccharomyces*, отличающиеся высокой скоростью роста, и использующие в качестве источника углерода гексозы, пентозы и органические кислоты.

Особенности выращивания данных видов дрожжей заключаются в том, что их культивирование осуществляют в нестерильных условиях.

Для получения кормовых дрожжей применяют технологию их глубинного выращивания в ферментерах, в которых обеспечивается режим постоянного перемешивания суспензии дрожжевых клеток в жидкой питательной среде и оптимальные условия аэрации.

К основным параметрам культивирования дрожжей относятся: концентрация источников углерода – 7%, температура культивирования – 33–35 °С, значение рН среды 4–4,2, конечная концентрация биомассы на этой стадии 43–54 г/л абсолютно сухого вещества.

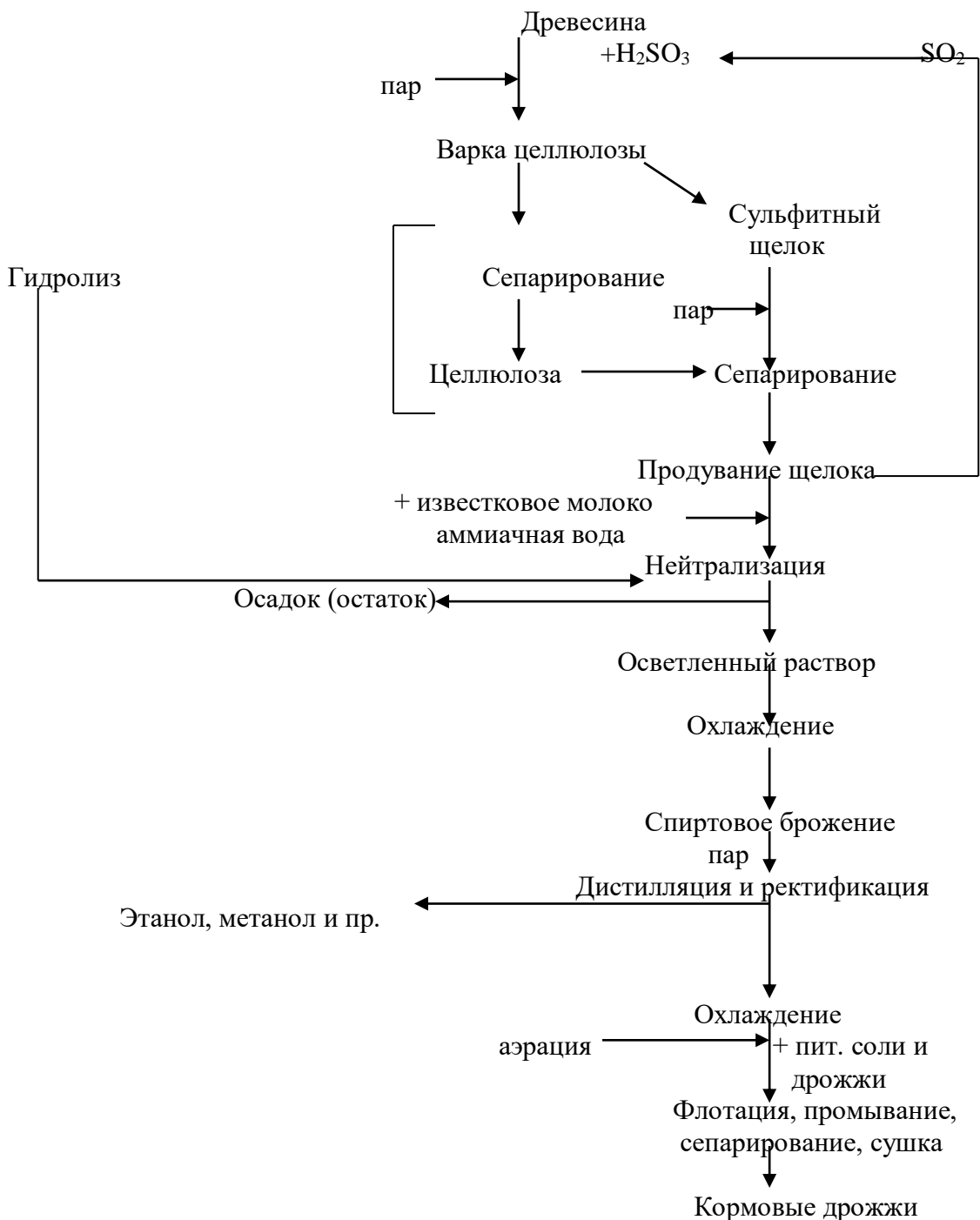
В целях поддержания заданного температурного режима в конструкции ферментера предусматривается система отвода избыточного тепла.

Рабочий цикл выращивания культуры дрожжей длится около 20 ч. По окончании рабочего цикла культуральная жидкость вместе с суспендированными в ней клетками дрожжей выводится из ферментера, а в него вновь подается питательный субстрат и культура дрожжевых клеток для выращивания.

Выведенную из ферментера суспензию микробных клеток подают на флотационную установку, с помощью которой отделяют биомассу дрожжей от культуральной жидкости. В процессе флотация суспензия вспенивается, при этом дрожжевые клетки всплывают на поверхность вместе с пеной, которая отделяется от жидкой фазы.

После отстаивания дрожжевую массу концентрируют в сепараторе.

Для достижения лучшей переваримости дрожжей в организме животных проводят специальную обработку (механическую, ультразвуковую, термическую, ферментативную) клеток, обеспечивающую разрушение их клеточных оболочек. Затем дрожжевую массу упаривают до необходимой концентрации и высушивают.



Посредством обработки дрожжей ультрафиолетовым светом проводится их обогащение витамином D₂, который образуется из содержащегося в них эргостерина.

Для улучшения физических свойств готового продукта кормовые дрожжи выпускают в гранулированном виде.

Очень часто путем ферментации гидролизатов растительного сырья, наряду с производством кормовых дрожжей, получают этиловый спирт. В этом случае особенность технологии заключается в том, что вначале проводится спиртовое брожение, в результате которого происходит утилизация содержащихся в гидролизате гексоз. После отгонки спирта остается неиспользованный субстрат – барда, содержащая в основном пентозы. Данную после-спиртовую барду используют как питательную среду для выращивания кормовых дрожжей.

Технология получения кормовых дрожжей на основе спиртовой барды была усовершенствована в ФГУП Госниисинтезбелок. В основу разработанной биотехнологии переработки спиртовой барды положен способ непрерывной аэробной ферментации с добавлением в культуральную жидкость углеродсодержащего источника – зерносырья, что позволяет увеличить выход белковой биомассы и сделать производство рентабельным.

В данном случае в качестве продуцента белка используется устойчивая ассоциация подобранных штаммов микроорганизмов: *Saccharomycopsis fibuligera* и *Rhodococcus erythropolis*.

Оптимизированный режим ферментации со скоростью протока 0,12 ч⁻¹ и уровнем аэрации среды 0,7 м³/м³×мин. обеспечивает получение готового продукта – кормовой белковой добавки, содержащей не менее 50–52% протеина, с выходом от исходного сырья (в пересчете на сухие вещества) – 85–90%.

Экологически безопасная биотехнологическая установка для промышленной реализации технологии включает в качестве основных стадий: ферментацию, концентрирование и сушку готового продукта и обеспечивает:

- круглогодичную переработку до 100 тыс. т. в год спиртовой барды;
- получение белковой кормовой добавки (порошок или гранулы), для обогащения протеином рационов сельскохозяйственных животных и птиц, содержащей полный набор необходимых аминокислот, витамины группы В, микроэлементы;
- рентабельность производства при удельных энергетических затратах на технологию 0,45–0,5 тыс. кВт·ч/т и сроке окупаемости установки 1,7–2 года.

Технология получения кормовых дрожжей с применением парафинов нефти

В 60-е гг. XX в. в России и за рубежом были разработаны технологии получения кормовых дрожжей на основе *n*-парафинов нефти. Дрожжевые клетки могут использовать в качестве источника углерода для роста неразветвленные углеводороды с числом углеродных атомов от 10 до 30. Они представляют собой жидкие фракции с температурами кипения 200–320 °С, которые выделяют из нефти путем ее перегонки.

Очищенные фракции углеводородов нефти, используемые для выращивания дрожжей, могут быть получены тремя основными методами:

- 1) низкотемпературной кристаллизацией;
- 2) карбамидной депарафинизацией;
- 3) адсорбцией на молекулярных ситах.

Первым методом проводится кристаллизация высококипящих фракций нефти после растворения их в смеси органических растворителей при постоянном охлаждении. Затем очищенные кристаллизацией продукты используют для приготовления питательной среды для культивирования дрожжей.

Второй метод очистки основан на способности *n*-парафинов нефти образовывать прочный комплекс с молекулами карбамида, который после отделения от остальных фракций при нагревании легко разлагается, в результате с помощью перегонки можно получить очищенную фракцию *n*-парафинов.

Третьим методом адсорбируют нужные фракции углеводородов нефти на молекулярных ситах, после чего проводят их десорбцию, и таким путем выделяют фракции *n*-парафинов высокой степени очистки.

При выращивании дрожжей на *n*-парафинах нефти в приготовленную на их основе питательную среду добавляют макро- и микроэлементы, витамины и аминокислоты, а в качестве источника азота, как правило, используют аммиачную воду.

В процессе культивирования дрожжей в ферментере поддерживается оптимальный температурный режим и уровень аэрации. Наиболее эффективны для выращивания на *n*-парафинах нефти отселектированные штаммы дрожжей *Candida*.

Выделение и сушка дрожжевой биомассы проводится примерно по такой же технологии, как и в гидролизном производстве. Высушенная дрожжевая масса гранулируется и используется в качестве белково-витаминного концентрата (БВК) для сельскохозяйственных животных, содержащего до 50–60% белковых веществ. При этом содержание в БВК остаточных углеводов допускается не более 0,1%.

В целях более полного использования сырья и снижения в товарном продукте содержания остаточных углеводов разработаны усовершенствованные технологии получения БВК, включающие двухступенчатую ферментацию и последующую экстракцию из дрожжей остаточных углеводов бензином. При этом содержание сырого белка в дрожжевой биомассе

может быть повышено до 58–65% в расчете на сухую массу, а содержание остаточных углеводов снижено до 0,05%.

Технология выращивания кормовых дрожжей на молочной сыворотке

В ФГУП Госниисинтезбелок был разработан биотехнологический процесс получения белкового продукта при культивировании смешанной культуры микроорганизмов на молочной сыворотке. Проведенное исследование было направлено на разработку промышленной биотехнологии переработки много тоннажных отходов молокозаводов и получение питательного белкового продукта.

Известно, что непосредственное использование молочной сыворотки в пищевой и комбикормовой промышленности нецелесообразно из-за неблагоприятного сочетания в молочной сыворотке углеводов, белков и минеральных веществ. Повышение питательных свойств молочной сыворотки возможно путем увеличения содержания в ней белка и снижения содержания углеводов.

Для решения данной задачи предложено использование симбиотического консорциума бактерий *Lactobacillus casei* и *Propionibacterium freudenreichii*.

При аэробном выращивании биомассы использовали питательную среду, состоящую из молочной сыворотки и фонового количества микроэлементов, а в отдельных опытах выращивание проводили на предварительно сконцентрированной молочной сыворотке до 16–22% сухих веществ. При этом в ходе проводившегося исследования были изучены кривые роста консорциума бактерий при двух способах засева культур (одновременный засев и последовательный засев), а также определен оптимальный режим подачи засевной культуры, построена математическая модель процесса, позволяющая по кинетическим и стехиометрическим коэффициентам рассчитать режим подачи кислорода и время накопления биомассы.

После окончания стадии ферментации получаемая биомасса подвергается автолизу и сушке.

Готовый белковый продукт содержит 24–28% протеина, в том числе, аминокислоты: лизин 5,5–6%, лейцин 7–8%, валин 37–8%, пролин 5,2–5,5% и др., витамины групп В, РР, А, микроэлементы.

Кроме того, изучены режимы обработки биомассы с целью повышения содержания белка в целевом продукте 60–70%.

Проведено опытное испытание по применению полученного биопродукта в качестве белковой добавки при производстве колбасных и мучных изделий, а также в составе корма для кошек и собак.

На основе разработанной биотехнологии планируется создание опытной установки производительностью 50 т/год готового продукта. Предложенная технология защищена патентом РФ.

Помимо этого, была разработана еще одна методика получения белкового продукта на основе молочной сыворотки: дрожжеванию подвергают молочную сыворотку без предварительного выделения из нее белков, при этом выращивают специальные расы кормовых дрожжей из рода *Torulopsis*.

На основе дрожжевания молочной сыворотки производят три вида кормовых белковых продуктов: заменитель цельного молока для кормления молодняка сельскохозяйственных животных – «БИО-ЗЦМ»; жидкий белковый продукт «Промикс» с содержанием белков в 2,5–3 раза выше, чем в исходной молочной сыворотке; сухой обогащенный дрожжевыми белками продукт «Провилакт», применяемый в качестве заменителя сухого обезжиренного молока.

Производство белковых продуктов на основе природного газа

Сырьем для получения белковых веществ может служить природный газ. В данном случае в качестве продуцентов используют бактерии рода *Pseudobacterium*, *Mycobacterium*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Metanomonas*.

Пути усвоения природного газа микроорганизмами могут быть различными. Выделяют два пути ассимиляции природного газа бактериями:

- 1) гетеротрофный путь – окисление природного газа через спирт и альдегид;
- 2) автотрофный путь сводится к образованию углекислого газа и активного водорода.

Выращивание бактерий на метане имеет ряд особенностей: медленный рост микроорганизмов, низкая растворимость метана (растворимость метана в 1 л культуральной жидкости составляет 0,02 г), повышенная потребность клеток в кислороде. По сравнению с выращиванием бактерий на мелассе необходимо в 5 раз больше кислорода, на парафинах – в 2–3 раза больше. Кроме того, в технологии производства кормового белка на метане очень важно создать высокоэффективное перемешивание.

При культивировании микроорганизмов рода *Metanomonas* в ферментере используют газовую среду, содержащую кислород – 8–11%, метан – 10–15%, углекислый газ – 5%, азот – 69–77%. Причем выращивание культуры продуцента осуществляют при повышенном давлении (при этом в начале ферментации давление составляет 4 МПа, а в конце – 0,1 МПа). Температура культивирования составляет 30 °С. Выращивание биомассы продуцента осуществляют в течение двух суток. В данном случае реализуется метод периодического культивирования, при этом конечная концентрация биомассы составляет 1 г в 1 л культуральной жидкости.

Как показывают исследования по изучению питательных свойств кормовых дрожжей, они достаточно хорошо перевариваются в организме животных (перевариваемость белков составляет 80–90%), по сумме незаменимых аминокислот близки к эталону ФАО, а по содержанию в белках лизина,

треонина, валина и лейцина существенно превышают эталон ФАО. Вместе с тем белки дрожжей частично не сбалансированы по метионину и в них мало содержится других серосодержащих аминокислот.

Таблица

Содержание незаменимых аминокислот в белках некоторых микроорганизмов (г на 100 г белка)

Аминокислота	Лизин	Триптофан	Метионин	Треонин	Валин	Лейцин
Дрожжи	6–8	1–1,5	1–3	4–6	5–7	6–9
ФАО	4,2	1,4	2,9	2,8	4,2	4,8

Продолжение таблицы

Аминокислота	Изолейцин	Фенилаланин
Дрожжи	4–6	3–5
ФАО	4,2	2,8

По сравнению с растительными источниками белков кормовые дрожжи имеют повышенное содержание нуклеиновых кислот (3–6% от сухой массы), которые в такой концентрации оказывают вредное воздействие на организм животных. В результате их гидролиза образуется много пуриновых оснований, превращающихся затем в соли мочевой кислоты, которые, откладываясь в организме, могут быть причиной мочекаменной болезни, остеохондроза и других заболеваний. Вследствие этого оптимальная норма добавления дрожжевой биомассы в корм сельскохозяйственных животных обычно составляет не более 5–10% от сухого вещества или 10–20% дрожжевого белка от общего количества белка в кормовом рационе.

Кормовые дрожжи, культивируемые на питательной среде из *n*-парафинов нефти, могут содержать многие вредные примеси – производные бензола, D-аминокислоты, липиды, различные токсины и канцерогенные вещества, поэтому их подвергают специальной очистке (экстракция бензином). При производстве кормовых дрожжей возникают проблемы очистки газообразных и жидких отходов, в связи с чем проводится работа по созданию экологически чистых безотходных технологий с замкнутым циклом водопользования.

Кроме совершенствования производственной технологии, важное значение имеет создание высокопродуктивных штаммов дрожжей, способных накапливать большое количество белка, быстро наращивать биомассу и эффективно использовать субстрат для жизнедеятельности. Для создания новых штаммов микроорганизмов применяют как методы обычной селекции, так и генно-инженерную биотехнологию.

Особенности получения пищевого белка

Наряду с использованием дрожжевых белков в качестве кормовой добавки при балансировании рационов сельскохозяйственных животных, разработана технология получения на их основе пищевых белков.

Потребность населения нашей планеты в продуктах питания полностью не удовлетворяется. Особенно остро ощущается недостаток пищевого белка, дефицит которого оценивается в 10–25 млн. т. в год, поэтому уже в 1930 – 1940-е гг. в некоторых странах были разработаны технологии культивирования пивных и других пищевых дрожжей (*Saccharomyces*, *Candida*), которые использовались в качестве белковых добавок к различным пищевым продуктам.

Наряду с интенсификацией традиционных методов, увеличению ресурсов пищевого белка могут способствовать новые промышленные способы производства продуктов питания. В последние годы во всем мире расширяется новое направление в пищевой биотехнологии – обогащение хорошо известных пищевых продуктов белком растительного, животного и микробного происхождения.

Дрожжи содержат 40–55% белка и усваиваются организмом человека на 85–88%, занимая по этому показателю промежуточное положение между белками растительного и животного происхождения.

Белок дрожжей обычно богат лизином и треонином, но беден метионином и цистеином. В этой связи, очевидна целесообразность его переработки вместе с белками зерновых культур.

Увеличен выход биомассы хлебопекарных дрожжей на 10–15% и повышено содержание «сырого протеина» на 52–54% путем выращивания на мелассно-солевой среде оптимизированного состава в присутствии стимулятора роста микроорганизмов Гипоксена.

Разработана технология получения белково-углеводного концентрата с содержанием липидов 2,0–3,0% и нуклеиновых кислот 2,0–2,5 % из биомассы дрожжей на основе частичной деградации клеточной стенки ферментативными препаратами гидролитического действия, обезжиривания раствором этанола и денуклеинизации собственными ферментами клетки.

Удовлетворительные функциональные свойства полученного концентрата и высокая биологическая ценность позволили наработать опытную партию хлебобулочных изделий профилактического назначения.

Основные принципы получения пищевого белка те же, что и при получении белкового препарата кормового назначения. Однако в технологии получения пищевого белка ограничен круг используемых субстратов, а также предъявляются более жесткие требования к составу биомассы и конечного целевого продукта. Так, в пищевой биомассе должно содержаться не менее 80% белка, 2% нуклеиновых кислот, 1% липидов. На одного человека в сутки должно приходиться 10–20 г сухой биомассы.

Продуцентами пищевого белка являются: микроскопические грибы рода *Fusarium*, цианобактерии рода *Spirulina*, зеленые водоросли рода *Chlorella*.

Для получения пищевых белков характерно использование в качестве субстрата этанола.

При переработке в пищевой белок биомассу дрожжей тщательно очищают. С этой целью клеточные оболочки дрожжевых клеток разрушают с помощью механической, щелочной, кислотной или ферментативной обработки, а затем экстрагируют гомогенную дрожжевую биомассу органическим растворителем. После такой очистки от органических и минеральных примесей полученный дрожжевой продукт обрабатывают щелочным раствором для растворения белков, затем белковый раствор отделяют от оставшейся биомассы дрожжей и направляют на диализ. В процессе диализа из белкового раствора удаляют низкомолекулярные примеси.

Очищенные с помощью диализа белки осаждают, высушивают и полученную белковую массу используют в качестве добавок в различные пищевые продукты: сосиски, студни, паштеты, мясные и кондитерские начинки.

Кроме того, белки дрожжей применяют при получении искусственного мяса, для этого проводят текстурирование белков, т.е. нагревание с последующим быстрым охлаждением и продавливанием белковой пасты через отверстия малого диаметра. Для улучшения свойств в белковую пасту добавляют полисахариды и другие биологически активные вещества. Гидролизаты белков используют в качестве вкусовых приправ, для приготовления медицинских препаратов и лечебного питания.