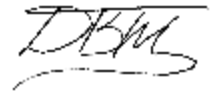


На правах рукописи



Тарабукин Дмитрий Валерьянович

ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ НАПРАВЛЕННОЙ
БИОКОНВЕРСИИ ЦЕЛЛЮЛОЗО- И КРАХМАЛСОДЕРЖАЩЕГО
РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ

Специальность 03.00.23 «Биотехнология»

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Уфа 2009

Работа выполнена в лаборатории биохимии и биотехнологии Института биологии Коми научного центра УрО РАН.

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Володин Владимир Витальевич

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Логинов Олег Николаевич
доктор биологических наук, профессор
Акопян Валентин Бабкенович

Ведущая организация: ОАО ГосНИИ СИНТЕЗБЕЛОК

Защита состоится 4 декабря 2009 г. в 16⁰⁰ на заседании диссертационного совета ДМ 002.136.01 при Учреждении Российской академии наук Институте биологии Уфимского научного центра РАН по адресу: 450054 г. Уфа, пр. Октября, д. 69. Тел./факс (347)2355362, E-mail: ib@anrb.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института биологии Уфимского научного центра РАН и на официальном сайте:

<http://www.anbr.ru/inbio/dissovet/index.htm>

Автореферат разослан 3 ноября 2009 г.

Ученый секретарь
Объединенного диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Р.В. Уразгильдин

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. К настоящему времени ферментативные технологии стали одним из наиболее эффективных средств трансформации многих видов биологического сырья (Биотехнология..., 1987; Болобова и др., 2001; Квеситадзе, Безбородов, 2002; Rabinovich, 2006; Шишков, 2007; Salazar, 2007). Применение ферментов в качестве биокатализаторов позволяет существенно расширить сырьевую базу пищевой промышленности и кормопроизводства, повысить глубину переработки сырья, создать новые виды пищевых продуктов и кормов, а также улучшить усвояемость и органолептические свойства известных (Кислухина, 2002; Nicemol, 2008). Кроме того, переход от традиционных химических к биотехнологическим методам во многих случаях становится единственной возможностью для создания малоотходных технологий и экологически чистых производств (Быков, 1989; Araujo et al., 2008; Sanchez, 2009). Ярким примером является процесс ферментативного получения глюкозы из крахмала (Производство..., 1967).

Однако, несмотря на очевидные преимущества получения глюкозы ферментативным гидролизом целлюлозосодержащего сырья и прогресс, достигнутый в этой области (создание теоретических основ, разработка аппаратов и опытно-промышленных установок для ферментативного гидролиза целлюлозы), до настоящего времени процесс не удается реализовать на промышленном уровне из-за его относительно низкой рентабельности по сравнению с традиционным кислотным гидролизом (Даниляк и др., 1989; Синицын и др., 1995). В то же время целлюлолитические и амилолитические ферменты получают широкое применение как улучшающие структуру целлюлозных материалов биологические агенты в текстильной промышленности, а также в качестве компонентов комбикормов для повышения их усвояемости (Быков, 1984; Чешкова, 1996, 2000; Кричевский, 1998; Bhat, 2000; Барышева, 2006). Следовательно, разработка новых ферментативных

процессов и продуктов с использованием целлюлаз и амилаз остается одной из актуальных задач современной биотехнологии.

Цель работы заключается в разработке научных основ ферментативных технологий получения новых материалов с заданными свойствами путем направленной биоконверсии целлюлозо- и крахмалсодержащего сырья.

Задачи работы:

1. Исследовать влияние надмолекулярной структуры порошковых целлюлоз, полученных с помощью различных модифицирующих агентов, на их реакционную способность к ферментативному гидролизу.

2. Оценить возможность одновременного получения порошковой целлюлозы заданной структуры и глюкозы при совместном ферментативном гидролизе листовенной беленой целлюлозы и крахмала.

3. Оптимизировать процесс осахаривания многокомпонентных трудноусвояемых растительных субстратов и разработать новую белково-углеводную основу кормов моногастричных животных.

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

Показана возможность получения порошковых целлюлоз заданной структуры и глюкозы при совместном ферментативном гидролизе листовенной беленой целлюлозы и крахмала. Выявлено, что характеристики получаемой

порошковой целлюлозы в значительной мере определяются вязкостью водной среды, задаваемой концентрацией крахмала в исходной смеси.

Исследован и оптимизирован процесс совместного ферментативного гидролиза целлюлазами и амилазами многокомпонентного растительного сырья (стебли травянистых растений и неочищенные зерна злаковых культур). Показана возможность исключения стадии обработки коммерческими препаратами α -амилаз растительных субстратов с большим содержанием некрахмалистых полисахаридов.

Практическая значимость. Показана принципиальная возможность получения новых устойчивых к биодеструкции функциональных материалов путем ферментативной деструкции порошковых целлюлоз, модифицированных кислотами Льюиса.

Предложен режим ферментативного гидролиза лиственной беленой целлюлозы в присутствии крахмала, позволяющий получать порошковую целлюлозу с физико-химическими характеристиками, оптимальными для использования в медицине и химической промышленности, и увеличить рентабельность процесса за счет дополнительного выхода восстанавливающих сахаров при гидролизе целлюлозы по сравнению с ожидаемым выходом сахаров из крахмала.

С использованием ферментативных биотехнологий трансформации трудноусваиваемых многокомпонентных растительных субстратов разработана новая белково-углеводная основа кормов для птицеводства, обогащенная сахарами, с оптимальным аминокислотным составом, близким к идеальному белку FAO, и не содержащей антипитательных веществ.

Апробация работы. Основные результаты исследований были представлены на республиканских Молодежных научных конференциях «Актуальные проблемы биологии и экологии» (Сыктывкар, 2004, 2005, 2007), IV Всероссийской научной конференции «Химия и технология растительных веществ» (Сыктывкар 2006), XI международной конференции «Эфиры целлюлозы и крахмала: синтез свойства, применение» (Владимир, 2007). I

Всероссийской молодежной научной конференции «Молодежь и наука на Севере» (Сыктывкар, 2008), II Всероссийской молодежной научной конференции «Молодежь и наука на Севере» (Сыктывкар, 2009).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 8 работ, в том числе 3 статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК и два патента Российской Федерации.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 112 страницах машинописного текста и включает введение, литературный обзор, материалы и методы исследований, три главы экспериментальной части, выводы, а также содержит 10 таблиц и 42 рисунка. Список литературы состоит из 180 ссылок.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали беленую сульфатную целлюлозу из лиственных пород древесины производства ОАО «Сыктывкарский ЛПК», ($СП_{ср} = 520$; $I_{кр} = 0.54$), хлопковую микрокристаллическую целлюлозу производства АО «Полиэкс», (г. Бийск), $СП_{ср} = 230$, льняную беленую целлюлозу ($СП > 2000$, содержание лигнина 2 %). В качестве субстрата для амилаз использовался картофельный крахмал (ГОСТ 7699-78), содержание углеводов 90%.

Источником целлюлаз являлись промышленный ферментный препарат Целловиридин Г20х (Ц) (активность по хроматографической бумаге 500 ед/г) и Пектофоетидин Г3х (П) (активность по целлобиазе 35 ед/г). Источником амилаз служили препараты Амилосубтилин Г3х (Ам) (α -амилазная активность 600 ед/г) и Глюкаваморин Г3х (Гл) (глюкоамилазная активность 400 ед/г).

ИК-спектры получены на ИК-Фурье спектрометре MIR-8000 (ORIEL) в таблетках KBr. Рентгенофазовый анализ (РФА) проведен на рентгеновском дифрактометре ДРОН-3 (начальный угол 5.00 град., шаг измерения 0.05 град., конечный угол 40.00 град.). Индекс кристалличности ($I_{кр}$) рассчитан по отношению интенсивностей рефлекса при углах 22° и 19° при углах дифракции 2θ – метод Сегала (Мартынов, 1972). Степень полимеризации ($СП_{ср}$) образцов определяли по вязкости растворов в кадоксене на вискозиметре Оствальда с

диаметром капилляра 0.82 мм (Болотникова, 1966). Концентрацию восстанавливающих сахаров (ВС) определяли методом Шомоди-Нельсона (Somogyi, 1945).

Ферментативный гидролиз порошковых целлюлоз (ПЦ) проводили на водяной качалке в герметично закрытых бюксах при 55°C и 150 об/мин. Масса образца – 50 мг, объем реакционной смеси – 2 см³. Концентрация ферментного препарата 0.25 мг/см³. Отбор проб осуществляли через 3, 6, 15, 24, 48 ч. Количество фермента, адсорбируемого на субстрате, рассчитывали по разности значений активности целлюлаз в ферментном растворе до и после адсорбции.

Ферментативный гидролиз крахмал-целлюлозной смеси проводили на термостатируемой качалке в герметично закрытых бюксах объемом 10 см³ в 0.1 М ацетатном буфере (рН 4.7) при 55°C, и 150 об/мин. Оценку эффективности совместного ферментативного гидролиза вели по динамике накопления ВС в реакционной смеси, снижению степени полимеризации лиственной целлюлозы, а также качественному составу продуктов гидролиза целлюлозы и крахмала (массы навесок целлюлозы и крахмала 250 мг). Адсорбцию амилаз на целлюлозе проводили при 20°C в течение 10 мин, соотношение целлюлоза/ферментный препарат – 5:1.

За единицу активности целлюлаз принято такое количество ферментов, которое, действуя на 50 мг хроматографической бумаги (Ватман 1) при 50°C и рН 4.7 в течение 1 часа, образует 1 мг восстанавливающих сахаров (в пересчете на глюкозу).

За единицу активности целлобиазы принято такое количество ферментов, которое, действуя на 1 г целлобиозы при 40°C и рН 4.7 в течение 1 мин, образует 1 мкмоль глюкозы.

За единицу глюкоамилазной активности принимали способность фермента катализировать гидролиз растворимого крахмала при 30°C и рН 4.7, высвобождая за 1 мин 1 мкмоль глюкозы.

За единицу амилолитической активности принимают такое количество фермента, которое катализирует гидролиз 1 г крахмала за 1 час.

Уреазную активность определяли по методу И.Н. Ромейко и С.М. Малинского (Хазиев, 2005) с применением реактива Неслера. Активность уреазы выражали в миллиграммах NH_4 на один грамм образца за 1 час.

Содержание β -глюкана в образцах определяли по ICC Standard Method No.168 (www.megazyme.com).

Содержание аминокислот в образцах определяли на аминокислотном анализаторе ААА Т-339М (Чехословакия) после предварительного гидролиза последних 20%-ным раствором соляной кислоты при 110°C в течение 24 часов и разделении гидролизата на хроматографической колонке, заполненной ионообменной смолой «Ostion».

Исследование углеводного состава гидролизатов проводилось методом ВЭЖХ на хроматографе Knauer (Германия), детектор рефрактометрический Smartline 2300, колонка 150×3 мм, сорбент Sepharon SGX NH_2 7 мкм, элюент ацетонитрил/ацетатный буфер (0.002 М, рН 5.0) 80:20 об.%, скорость подачи элюента $1 \text{ см}^3/\text{мин}$.

Глава 3. ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРЫ И ФЕРМЕНТАТИВНОЙ ДЕСТРУКЦИИ ПОРОШКОВЫХ ЦЕЛЛЮЛОЗ

В качестве объектов исследования были использованы ПЦ, полученные методами гидролиза целлюлозы перекислотами и обработки целлюлозы кислотами Льюиса в апротонных растворителях, а также коммерческий препарат хлопковой микрокристаллической целлюлозы (ТУ 64-11-124-90) (табл. 1).

В ходе ферментативного гидролиза препаратом Целловиридин Г20х для образцов 3 и 4 отмечена самая высокая скорость накопления ВС в начальный период реакции, однако после 6 ч ферментативной обработки скорость накопления ВС значительно снизилась и далее изменялась незначительно (рис. 1). Было предположено, что происходит сильное ингибирование ферментов продуктами реакции, однако после того, как к непрогидролизованым

промытым остаткам образцов 3 и 4 после 15 часов гидролиза был добавлен свежий ферментный раствор в том же объеме, увеличение скорости накопления ВС не происходило. Отмечено, что и для остальных образцов скорость накопления ВС уменьшается после 6 ч обработки.

Таблица 1

Условия получения и свойства ПЦ

Образец № п/п	Исходная целлюлоза	СП _{ср} исходного субстрата	Деструктурирующий агент и условия деструкции	СП _{ср} после деструкции	I _{кр} (ИКС)	I _{кр} (РФА)
1	Лиственная	520±10	H ₂ SO ₄ -H ₂ O ₂ , 120 мин	240±10	0.72	0.70
2	Лиственная	520±10	0.1% TiCl ₄ в CCl ₄ , 10 мин	260±10	-	0.54
3	Лиственная	520±10	1.5% TiCl ₄ в CCl ₄ , 60 мин	180±10	0.12	0.15
4	Лиственная	520±10	0.1% AlCl ₃ в CCl ₄ , 60 мин	210±10	0.00	0.00
5 ^а	Хлопковая	-	HCl	230±10	0.86	0.88
6 ^б	Льняная	> 10000	CH ₃ COOH-H ₂ O ₂ , 2 ч	330±10	0.74	0.84
7 ^б	Льняная	> 10000	CH ₃ COOH-H ₂ O ₂ , 4 ч	300±10	-	0.82

а – коммерческий образец; б – значения СП_{ср} приведены по литературным данным (Льноводство, 1967)

Исследование адсорбционной способности образцов ПЦ выявило следующие результаты: образец 7 при самой низкой реакционной способности, обладал наибольшей сорбционной способностью; образец 6, полученный, как и 7, обработкой целлюлозы льна перуксусной кислотой, однако при меньшей длительности обработки уступал по сорбционной способности исходной целлюлозе льна. В то же время образцы 3 и 4 при высокой реакционной способности, практически не сорбировали целлюлазы.

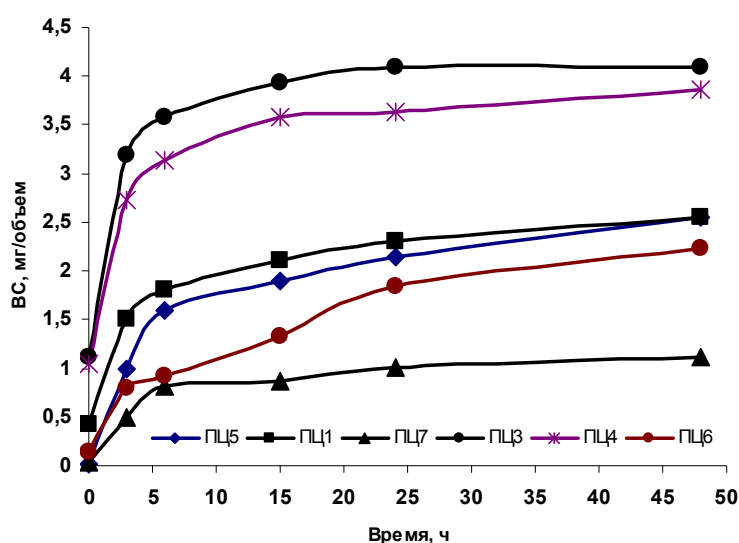


Рис. 1. Накопления восстанавливающих сахаров при ферментативном гидролизе ПЦ

Поскольку для атаки целлюлаз в начальный период реакции наиболее доступными являются аморфные области целлюлозного материала, следовало ожидать значительное снижение $СП_{ср}$ для образцов ПЦ 2, 3, 4, однако при относительно высокой реакционной способности по сравнению с другими образцами ПЦ значительное падения $СП_{ср}$ в данном случае наблюдалось лишь для образца 2, в то же время изменение данного показателя для образцов 3 и 4 оказалось небольшим (табл. 2).

Таблица 2

Изменение степени полимеризации целлюлозы в образцах ПЦ после ферментативной обработки

Образец	Исходная целлюлоза	$СП_{ср}$ в процессе ферментативной деструкции (время, ч)					
		0	3	6	15	24	48
ПЦ-1	Лиственная	240±10	170±10	170±10	170±10	170±10	162±10
ПЦ-2	Лиственная	260±10	260±10	210±10	180±10	180±10	160±10
ПЦ-3	Лиственная	180±10	180±10	180±10	180±10	180±10	140±10
ПЦ-4	Лиственная	210±10	190±10	190±10	190±10	190±10	190±10
ПЦ-5	Хлопковая	230±10	220±10	210±10	210±10	200±10	110±10
ПЦ-6	Льняная	300±10	280±10	280±10	280±10	270±10	140±10
ПЦ-7	Льняная	330±10	320±10	320±10	300±10	300±10	260±10
ЛЦ	Льняная	> 2000	1300±50	1280±50	1280±50	1280±50	1240±50

Для образцов 5, 6 и 7, полученных из целлюлозы хлопка и льна методами кислотного гидролиза, в начальный период реакции отмечали незначительное снижение $СП_{ср}$. Полученные данные для этих образцов может быть объяснено

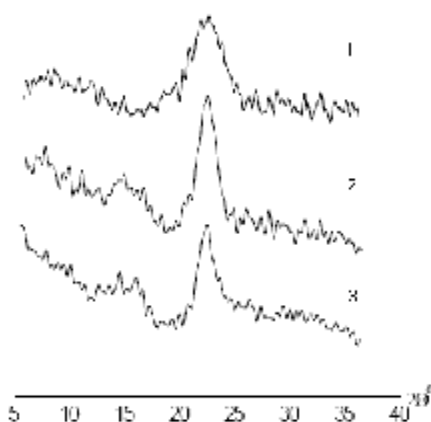


Рис. 2. Рентгенограмма ПЦ1 (1 - исходный образец; 2, 3 - после 6 ч и 24 ч ферментативного гидролиза)

быстрым ферментативным гидролизом присутствовавших в образцах низкомолекулярных фракций, по-видимому, образующих аморфные области, доля которых в исходном образце была относительно мала. В то же время у образца 1 при относительно высоком показателе индекса кристалличности, $СП_{ср}$ значительно падала в начальный период, но далее практически не изменялась.

Для образцов с преобладанием кристаллической структуры, как правило, происходил небольшой рост содержания упорядоченной части после 6 часов ферментативного гидролиза (рис. 2, 3), при продолжительности процесса до 24 ч наблюдается незначительное снижение содержания в целлюлозе упорядоченной части.

ВЭЖХ-анализ продуктов гидролиза образцов показал, что в состав ВС ПЦ-1, ПЦ-3 из лиственной целлюлозы входят ксилоза, глюкоза и целлобиоза. В то же время гидролизат ПЦ-4 при наличии ксилозы и глюкозы, характеризуется отсутствием целлобиозы. Для ПЦ-5 отмечено наличие, как глюкозы, так и целлобиозы.

Преобладающим восстанавливающим сахаром в гидролизатах ПЦ из льна является целлобиоза, причем ее доля возрастает для ПЦ-7 полученной более продолжительным действием перуксусной кислоты.

Таким образом, в процессе получения ПЦ каталитической деструкцией кислотами Льюиса, происходит значительная химическая модификация исходной целлюлозы, что вызывает ослабление фермент-субстратных взаимодействий. Отсутствие адсорбции целлюлаз на негидролизованном субстрате дает перспективу многократного использования ферментов с целью удаления оставшихся природных фрагментов целлюлозы. Это позволяет использовать химически модифицированный остаток целлюлозы для изготовления материалов устойчивых к биодеструкции.

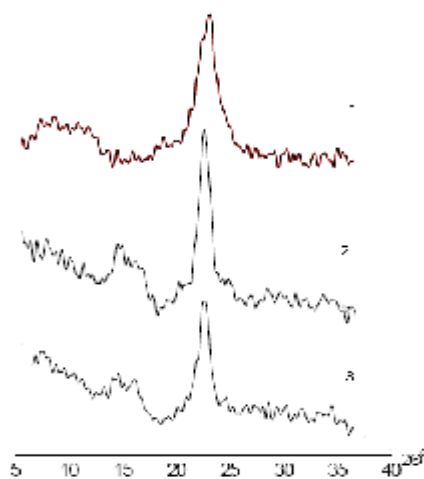


Рис. 3. Рентгенограмма ПЦ5 (1 - исходный образец; 2, 3 - после 6 ч и 24 ч ферментативного гидролиза)

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

Целью данного исследования являлась оценка возможности получения порошковой целлюлозы с характеристиками, близкими к образцам порошковых целлюлоз, получаемых традиционными кислотными методами, и глюкозы при совместном ферментативном гидролизе лиственной беленой целлюлозы и крахмала.

При проведении ферментативного гидролиза целлюлозы и крахмала при совместном присутствии была дана оценка влияния целлюлозы на активность различных типов амилаз, а также влияние мальтозы (продукта гидролиза крахмала) на целлюлазную активность. Показано, что после инкубирования с целлюлозой ферментный препарат Амилосубтилин ГЗх значительно теряет активность α -амилазы, однако в большей мере сохраняет экзоамилазную активность (табл. 3). Глюкаваморин ГЗх теряет около 50% глюкоамилазной активности. Полученные данные свидетельствуют о необходимости учета фермент-субстратных взаимодействий амилаз с целлюлозой, приводящих к частичной инактивации амилолитических ферментов.

Таблица 3

Остаточная амилолитическая активность ферментных препаратов после инкубирования с беленой лиственной целлюлозой, %

Ферментный препарат	α -амилазная активность, ед/г	Экзоамилазная активность, ед/г	Глюкоамилазная активность, ед/г
Амилосубтилин ГЗх	37±5	87±5	н/о
Глюкаваморин ГЗх	н/о*	н/о	53±5

*Примечание: н/о – данный тип активности в ферментном препарате не определялся

В свою очередь, установлено, что мальтоза (главный продукт действия β -амилазы) ингибирует целлюлазы, по нашему предположению, вследствие структурного сходства с целлобиозой.

Принимая во внимание известные в литературе факты, что гидролиз крахмала грибными и бактериальными амилазами проходит стадию разжижения крахмалсодержащей среды α -амилазой с последующим осахариванием субстрата глюкоамилазой (Жеребцов и др., 1995; Технология спирта, 2002), а также полученные нами экспериментальные данные по ингибированию ферментов амилазного и целлюлазного комплексов, нами

предложены следующие расходы ферментных препаратов (в расчете на использование в качестве субстрата 5%-ной смеси беленой лиственной целлюлозы и крахмала в соотношении 1:1): Целловиридин Г20х – 20 ед/г целлюлозы, Глюкаваморин Г3х – 8 ед/г крахмала, для Амилосубтилина Г3х – 5 ед/г крахмала. При использовании Амилосубтилина Г3х данный препарат вносили в начале процесса, а остальные ферментные препараты – после полутора часов, при этом расход Глюкаваморина Г3х был уменьшен вдвое. Общее время гидролиза – 8 часов.

При проведении совместного ферментативного гидролиза целлюлозы и крахмала было показано, что без предварительной активации крахмал в присутствии амилаз практически не подвергался гидролизу, концентрация ВС в гидролизатах была фактически равна концентрации ВС в гидролизате целлюлозы, полученном без добавления крахмала. При перемешивании реакционной смеси в течение 8 часов концентрация ВС в гидролизате увеличилась в два раза по сравнению с режимом без перемешивания.

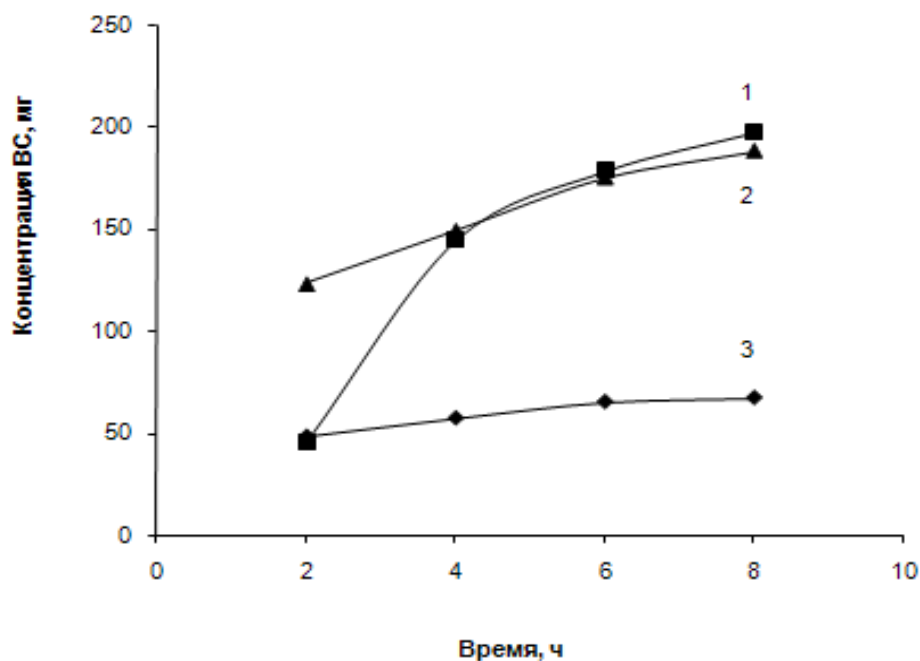


Рис. 4. Совместный гидролиз крахмал-целлюлозной смеси амилазами и целлюлазами в режиме с перемешиванием и предварительной активацией при 100°C в течение 5 мин (1 – Гл + Ц; 2 – Ам + Гл + Ц; 3 – Ам + Ц)

Предварительная активация крахмал-целлюлозной смеси в течение 5 мин при 100°C перед ферментативным гидролизом привела к значительному увеличению выхода ВС в конечном гидролизате, причем наличие Амилосубтилина ГЗх в композиционном ферментном препарате не сказывалось на увеличении выхода ВС (рис. 4). Применение препарата Амилосубтилин ГЗх без Глюкаваморина ГЗх оказалось не целесообразным, что, вероятно, обусловлено ингибированием целлюлаз мальтозой, с одной стороны, и неспособностью ферментов, входящих в состав Амилосубтилина, гидролизовать 1,6-α связи крахмала, с другой.

Для оптимизации режимов получения ПЦ и глюкозы в следующей серии опытов продолжительность процесса ферментативного гидролиза была увеличена до 17 часов, расход Целловиридина Г20х был уменьшен вдвое, добавлен Пектофоетидин ГЗх из расчета 0.72 ед/г целлюлозы. Остальные параметры состава композиционного ферментного препарата не изменяли.

Таблица 4

Гидролиз отдельных компонентов крахмал-целлюлозной смеси с помощью различных ферментных препаратов (время гидролиза 17 часов)

Режим	ВС, мг	СП _{ср} , непрогидролизованного остатка целлюлозы
Без целлюлозы, 250 мг крахмала (Гл)	230±5	н/о
Без целлюлозы, 250 мг крахмала (П)	100±10	н/о
Без крахмала, 250 мг целлюлозы (Ц)	30±3	240±10
Без крахмала, 250 мг целлюлозы (Ц + Гл + П)	50±5	210±10

За указанное время активированный крахмал в отсутствие целлюлозы гидролизуеться полностью препаратом Глюкаваморин ГЗх (табл. 4). Кроме того, было экспериментально показано, что способностью осахаривать крахмал обладает и препарат Пектофоетидин ГЗх. Этот факт является немаловажным в

том плане, что при гидролизе крахмала препаратом Глюкаваморин ГЗх в присутствии целлюлозы, часть активности глюкоамилазы уменьшается из-за сорбции фермента на целлюлозе и в то же время будет скомпенсирована за счет экзоамилазной активности, которой обладает Пектофоетидин ГЗх. Гидролиз целлюлозы препаратом Целловиридин Г20х с добавлением препаратов Глюкаваморин ГЗх и Пектофоетидин ГЗх дает сравнительно больший выход ВС за счет дополнительного количества вносимых целлюлаз.

При гидролизе 5%-ной крахмал-целлюлозной смеси наиболее оптимальным с позиции выхода ВС и характеристик ПЦ (непрогидролизованного остатка целлюлозы после ферментативного гидролиза) оказался режим с применением композиции препаратов Целловиридин Г20х, Глюкаваморин ГЗх и Пектофоетидин ГЗх, но без препарата Амилосубтилин ГЗх. Указанный режим позволяет увеличить выход ВС за счет гидролиза целлюлозы на 17% по сравнению с ожидаемым выходом ВС из крахмала (табл. 5). По данным ВЭЖХ-анализа главным продуктом совместного гидролиза крахмала и целлюлозы является глюкоза при незначительном содержании ксилозы, $СП_{ср}$ непрогидролизованного остатка целлюлозы – 240. Индекс кристалличности ПЦ составил 0.80 ± 0.02 .

Увеличение исходной концентрации крахмал-целлюлозной смеси до 10% при соотношении компонентов (1:1) и двукратное увеличение расходов ферментных препаратов при 17-ти часовом гидролизе, как и ожидалось, привело к увеличению выхода ВС до 510 ± 10 мг, однако негативно сказалось на величине $СП_{ср}$ непрогидролизованного остатка целлюлозы (400 ± 10 вместо оптимальной для ПЦ $СП_{ср} = 250$ и менее) вследствие более высокой вязкости реакционной среды (табл. 5). Режим с применением Амилосубтилина ГЗх не сказался ни на увеличении выхода ВС, ни на уменьшении величины $СП_{ср}$. Отмечено, что при всех режимах обработки наблюдали увеличение $I_{кр}$ целлюлозы в непрогидролизованных остатках до 0.75-0.85 ($I_{кр}$ исходной лиственной целлюлозы 0.54).

Учитывая полученные закономерности, нами был отработан следующий режим гидролиза крахмал-целлюлозной смеси: в конечный гидролизат 5%-ной крахмал-целлюлозной смеси объемом 8 см³ после 17 ч гидролиза вносили свежие порции крахмала, целлюлозы и ферментных препаратов, объем смеси доводили до 10 см³ и цикл повторяли заново. Использование двухстадийного процесса гидролиза позволяет не только повысить выход ВС (520±10 мг), но, главным образом, получить ПЦ с оптимальной СП_{ср} = 240. Последний результат, вероятнее всего, достигается благодаря проведению процесса гидролиза в менее вязкой среде.

Таблица 5

Режимы совместного гидролиза крахмал-целлюлозной смеси

Режим	ВС, мг	СП _{ср} , непрогидролизованного остатка целлюлозы	Остаток целлюлозы, % к исходной массе
Целлюлоза + крахмал, 500 мг (Ам + Гл + Ц + П)	260±5	290±10	85±2
Целлюлоза + крахмал, 500 мг (Гл + Ц + П)	270±5	240±10	85±2
Целлюлоза + крахмал, 1000 мг (Гл + Ц + П)*	510±10	400±10	88±2
Целлюлоза + крахмал, 1000 мг (Ам + Гл + Ц + П)*	510±10	400±10	88±2
Целлюлоза + крахмал, 2 раза по 500 мг (Гл + Ц + П)	520±10	240±10	85±2

*Двукратное количество вносимых ферментных препаратов (объяснение по тексту)

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

Была оценена эффективность применения ферментативного гидролиза модельной кормосмеси, содержащей в качестве субстратов трудноусваиваемые компоненты.

В качестве компонентов модельной кормосмеси нами использовались

измолотые неочищенные зерна овса *Avena sativum* L., измолотые стебли серпухи венценосной (*Serratula coronata* L.) (растительные отходы при получении экистероидсодержащей субстанции Серпистен из листьев этого вида растений) и подсолнечный шрот. Ферментативный гидролиз модельной кормосмеси проводили с использованием отечественных амило- и целлюлолитических ферментных препаратов, причем в случае применения препарата Амилосубтилин ГЗх использовали 0.01 М фосфатный буфер с рН 6.0, а в случае препаратов Целловиридин Г20х и Глюковаморин ГЗх – 0.01 ацетатный буфер с рН 4.7.

Совместное воздействие эндо-фермента α -амилазы и экзо-фермента β -амилазы препарата Амилосубтилин ГЗх (0.2% к массе смеси) на крахмал кормосмеси приводит к ускоренному накоплению в реакционной смеси ВС, однако процесс гидролиза выходит на стационарный уровень после четвертого часа, вероятно, вследствие недостаточного количества ферментов, способных расщеплять 1,6- α -связи крахмала (рис. 5).

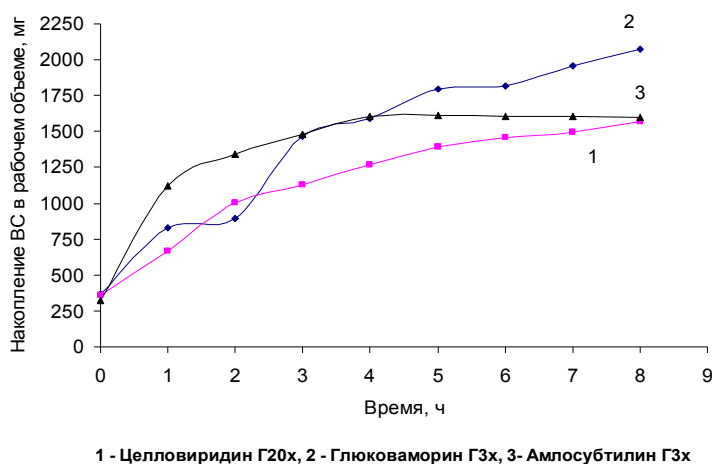


Рис. 5. Гидролиз двухкомпонентного субстрата отдельными ферментными препаратами (9 г измолотых неочищенных зерен овса + 1 г измолотых стеблей серпухи венценосной в 100 см³ буфера)

Под действием целлюлазно-гемицеллюлазного комплекса препарата Целловиридин Г20х (0.2% к массе смеси) гидролизуются некрахмальные полисахариды, однако, наличие основного полисахарида – крахмала не приводит к существенному образованию сахаров. Из-за низкой эндоамилазной

активности препарата Глюкаваморин ГЗх (0.2% к массе смеси) накопление сахаров на начальном этапе замедленно, однако после 8 часов гидролиза наблюдается наибольший выход ВС. Поскольку в кормосмеси и крахмал, и некрахмалистые полисахариды содержатся в значительном количестве, в дальнейших экспериментах в основное внимание было сконцентрировано на эффективном комбинировании данных препаратов между собой с учетом знания температурного и рН оптимумов действия используемых ферментов. Дозировка ферментных препаратов составляла (к массе смеси): для Амиласубтилина ГЗх – 0.1%, для Глюкаваморина ГЗх – 0.2%, для Целловиридина Г20х – 0.1% от массы кормосмеси. В случае применения препарата Амиласубтилин ГЗх ферментативный гидролиз проводился в две стадии: первая длилась три часа при рН 6.0 и температуре 60°C, вторая (с доведением рН до значения 4.7 и добавлением остальных ферментных препаратов) продолжалась 5 часов при температуре 55°C.

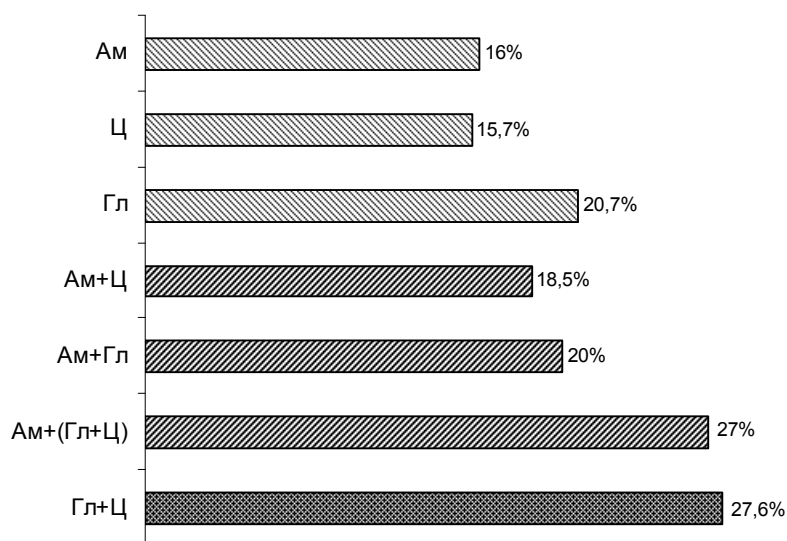


Рис. 6. Выход ВС после обработки различным составом гидролаз 10%-ой кормосмеси (9 г измолотых неочищенных зерен овса + 1 г измолотых стеблей серпухи венценосной)

В ходе отработки различных режимов ферментативного гидролиза выявлено, что наибольший выход ВС наблюдается при совместном воздействии ферментативных комплексов препаратов Глюкаваморин ГЗх и Целловиридин

Г20х (рис. 6). Режимы гидролиза модельной кормосмеси с применением препарата Амилосубтилин Г3х не выявили значительного преимущества в выходе ВС, поэтому в дальнейших экспериментах за основу был принят одностадийный процесс с применением ферментных препаратов Глюкаваморин Г3х и Целловиридин Г20х.

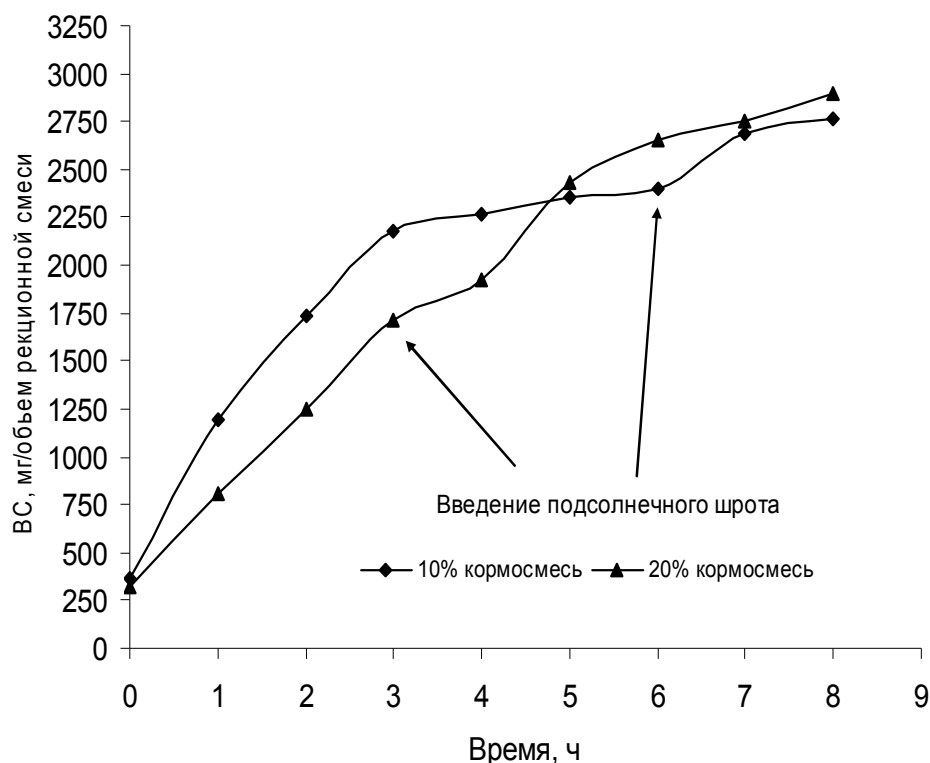


Рис. 7. Динамика накопления ВС при разных концентрациях субстрата

Оценка влияния количества подсолнечного шрота, вводимого перед гидролизом к двухкомпонентной кормосмеси (стебли серпухи + овес) выявила, что увеличение доли шрота приводит к снижению выхода ВС. В то же время подсолнечный шрот, введенный на конечной стадии гидролиза (25% от массы остальных компонентов кормосмеси) привел к некоторому увеличению выхода ВС. Для увеличения экономичности процесса концентрация кормосмеси была увеличена до 20%, при этом подсолнечный шрот вводился после третьего часа гидролиза, а для интенсификации гидролиза после четвертого часа температуру увеличили до 60°C. В данных условиях после проведения ферментативного гидролиза модельной кормосмеси (состав: 7 г измолотых неочищенных зерен

овса, 1 г измолотых стеблей серпухи венценосной, 2 г подсолнечного шрота в 50 см³ 0.01 М ацет. буфера рН 4.7) выход ВС составил 29% (рис. 7).

Замена таких компонентов кормосмеси как овес и стебли серпухи на кукурузу приводит почти к двухкратному снижению выхода ВС (рис. 8). Это указывает на то, что значительная часть определенных сахаров является продуктами ферментативного гидролиза именно некрахмалистых полисахаридов.

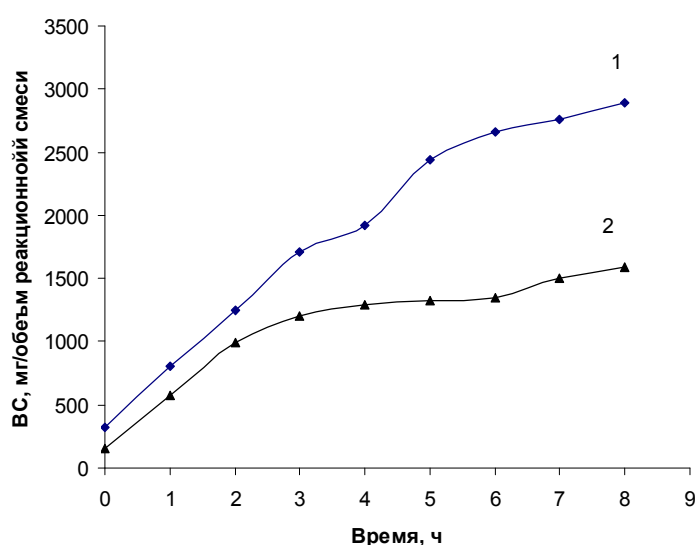


Рис. 8. Гидролиз кормосмесей различного состава
(1 – 7 г овса + 1 г стеблей серпухи + 2 г подсолнечного шрота;
2 – 8 г кукурузы + 2 г подсолнечного шрота)

Для сгущения полупродукта нами предложено использование натуральной полножирной сои (до 20% от массы остальных компонентов). В нашем случае при упаривании сгущенной смеси при повышенных температурах мы одновременно разрушаем находящиеся в сое антипитательные вещества и достигаем консистенцию смеси, достаточную для получения гранул.

Биохимическая характеристика белково-углеводного корма

Легкоусвояемые сахара. ВЭЖХ-анализ продуктов гидролиза кормосмеси после воздействия ферментных препаратов Глюкаваморин Г3х и Целловиридин Г20х до и после выпарки с добавлением сои показал, что преобладающими

сахарами являются глюкоза, целлобиоза и мальтоза, причем содержание дисахаридов после стадии термической обработки резко снижается. Также в гидролизатах наблюдается незначительное содержание невосстанавливающих сахаров – фруктозы и сахарозы (рис. 9).

Аминокислотный состав. Показано, что содержание серина, пролина, глицина, аланина, фенилаланина, гистидина, аргинана, трионина, валина в ферментированном корме после гидролиза и выпарки в присутствии сои не изменяется по сравнению с исходной смесью, однако наблюдается незначительное снижение содержание тирозина. Содержание изолейцина снижается почти вдвое, при этом содержание лейцина наоборот возрастает двукратно (рис. 10, 11).

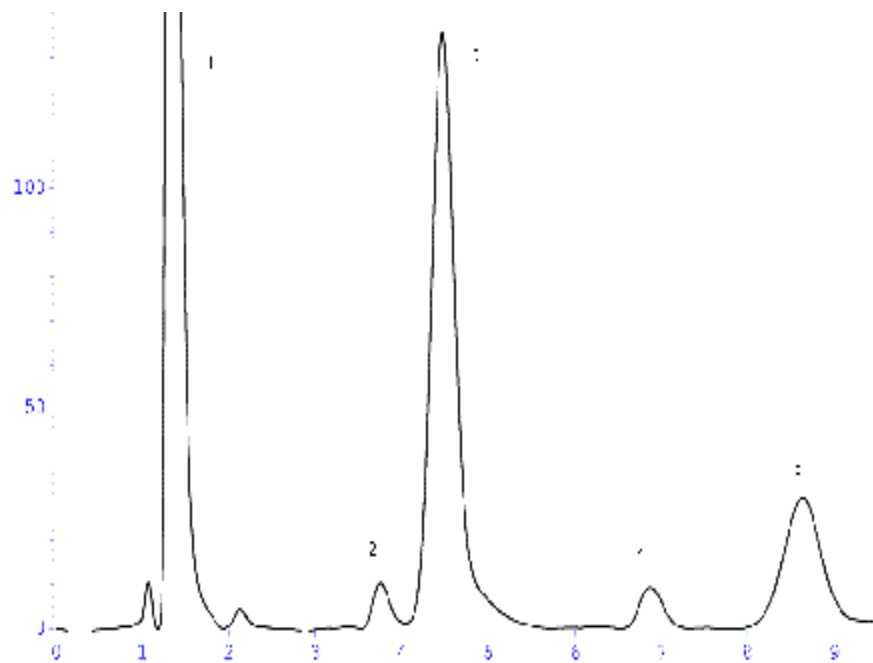


Рис. 9. ВЭЖХ-хроматограмма сахаров гидролизата кормосмеси после гидролиза с последующей выпаркой гидролизата в присутствии сои (1 – вода, 2 – фруктоза, 3 – глюкоза, 4 – сахароза, 5 – мальтоза+целлобиоза)

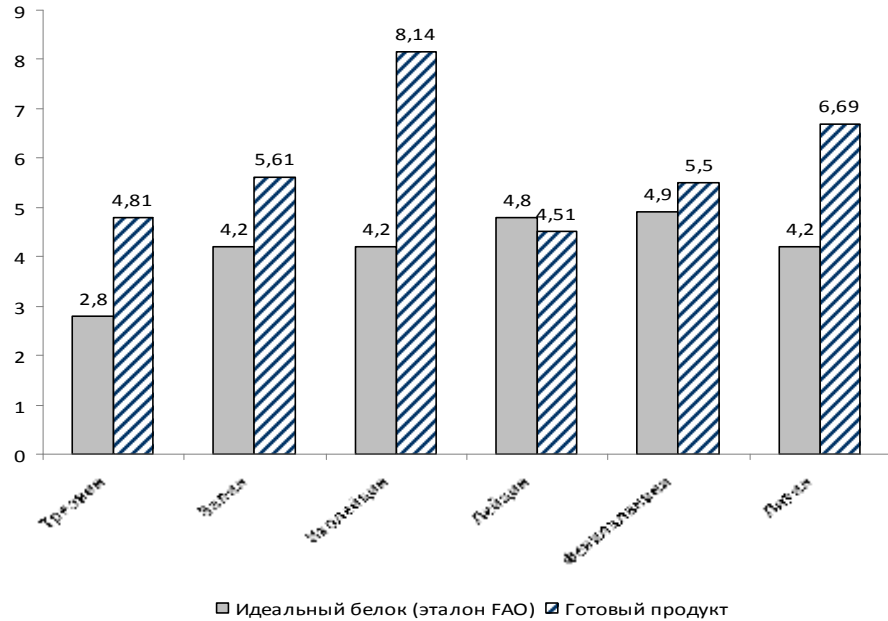


Рис. 10. Содержание незаменимых аминокислот в составе белка многокомпонентного субстрата без ферментативного гидролиза и выпарки (г/100 г белка)

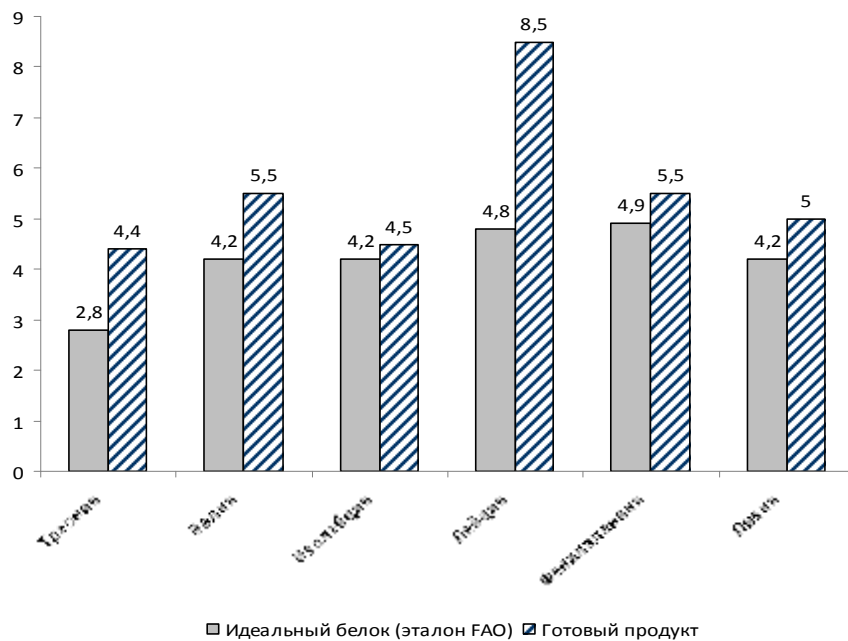


Рис. 11. Содержание незаменимых аминокислот в составе белка многокомпонентного субстрата после ферментативного гидролиза и выпарки (г/100 г белка)

Необходимо отметить ощутимое снижение содержания лизина в конечном продукте, что, предположительно, происходит в результате гликозилирования данной аминокислоты в процессе термической обработки кормосмеси в присутствии значительного количества восстанавливающих групп сахаров

(Степаненко, 1977), что требует более тщательного подхода к режиму выпарки. В целом, содержание незаменимых аминокислот в полученном конечном продукте соответствует данным для идеального белка FAO (Сельскохозяйственная..., 1998).

Содержание антипитательных веществ. Анализ на содержание β -глюкана (одного из основных растворимых некрахмалистых полисахаридов овса, обладающего антипитательными свойствами) показал, что в исходном овсе его содержание составляет 3.5%, что почти в шесть и 27 раз больше, чем в пшенице и кукурузе, для которых значения составляют 0.61% и 0.13% соответственно; в подсолнечном шроте и сое β -глюкан не обнаружен. В конечном продукте, прошедшем все стадии обработки содержание β -глюкана составило 0.21%/

Среди антипитательных веществ сои доминирующим является ингибитор трипсина, максимально допустимый уровень, которого зависит от содержания белка. На практике для оценки содержания антипитательных веществ в сое применяется косвенный показатель – активность уреазы, которая при тепловой обработке продукта теряет свою активность, как и ингибитор трипсина.¹ Исходная кормосмесь перед выпаркой характеризуется высоким значением уреазной активности (9,3 N-NH₄ мг/г сои за 1 час). После выпарки в конечном продукте уреазная активность не обнаружена.

ВЫВОДЫ

1. Выявлена связь между особенностями строения порошковых целлюлоз, полученных с использованием модифицирующих агентов различной природы, и их способностью к ферментативной деструкции. Впервые установлено, что ПЦ, полученные продолжительным воздействием на исходную целлюлозу кислотами Льюиса, обладают низкой адсорбционной

¹ <http://www.jasko.ru>

емкостью по отношению к целлюлазам, характеризуются наибольшей начальной реакционной способностью при наименьшем изменении степени полимеризации целлюлозы, что обусловлено ослаблением субстрат-ферментных взаимодействий за счет разупорядоченности надмолекулярной структуры и химической модификации макроцепей в порошковых целлюлозах указанного типа.

2. Оптимизирован состав целлюлазного и амилазного ферментативного комплекса для одновременного получения ПЦ заданной структуры и глюкозы путем совместного гидролиза целлюлозы и крахмала. Выявлено уменьшение активности амилаз в присутствии целлюлозы, причем по сравнению с β - и γ -амилазой ингибирование α -амилазы более выражено. Предложен режим гидролиза листовенной беленой целлюлозы в присутствии крахмала, позволяющий увеличить выход ВС за счет гидролиза листовенной беленой целлюлозы на 17% по сравнению с ожидаемым выходом сахаров из крахмала и получить ПЦ со степенью полимеризации 240 и индексом кристалличности 0.8, что удовлетворяет требованиям для коммерческих образцов ПЦ.

3. Исследован и оптимизирован процесс совместного ферментативного гидролиза целлюлазами и амилазами растительного сырья (стебли травянистых растений и неочищенные зерна злаковых культур). Показана возможность исключения стадии обработки коммерческим препаратом содержащим α -амилазу растительных субстратов с большим содержанием некрахмалистых полисахаридов. На основе отходов растениеводства и трудноусвояемых зерновых культур с использованием ферментативного гидролиза разработана новая белково-углеводная основа кормов для птицеводства. По данным биохимического анализа ферментированный корм содержит до 30% легкоусваиваемых углеводов; характеризуется оптимальным составом незаменимых аминокислот, близких к идеальному белку (эталон FAO) и практически не содержит β -глюкана и других

антипитательных веществ, содержащихся в исходном субстрате.

СПИСОК НАУЧНЫХ ТРУДОВ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в журналах, рекомендованных ВАК:

1. Торлопов М.А., Тарабукин Д.В., Фролова Т.П., Щербакова С.В., Володин В.В. Ферментативный гидролиз порошковых целлюлоз, полученных различными методами / Химия растительного сырья. – 2007. – № 3. – С. 69-76.
2. Тарабукин Д.В., Торлопов М.А., Володин В.В., Донцов А.Г. Получение порошковой целлюлозы и глюкозы ферментативным гидролизом целлюлозы в смеси с крахмалом / Биотехнология. – 2009. - № 4. – С. 57-63.
3. Тарабукин Д.В., Донцов А.Г. Биотехнология получения углеводно-белковой основы кормов для птицеводства с повышенной питательной ценностью / Естественные и технические науки. – 2009. - № 3. – С. 148-151.

Патенты

1. Тарабукин Д.В., Донцов А.Г. Способ приготовления макрокомпонентной смеси для комбикормов / Патент РФ 2367194, МПК А23К 1/00 // Институт биологии Коми Научного центра УрО РАН; № 2008112445/13; заявл. 31.03.2008; опубл. 20.09.2009. Бюл. № 26.
2. Тарабукин Д.В., Донцов А.Г. Макрокомпонентная смесь для комбикормов / Патент РФ 2368234, МПК А23К 1/00 // Институт биологии Коми Научного центра УрО РАН; № 2008112443/13; заявл. 31.03.2008; опубл. 27.09.2009. Бюл. № 27.

Остальные публикации

1. Тарабукин Д.В. Исследование мембранных способов очистки ферментов эндоглюканаз из целлюлазного комплекса штамма продуцента *Trichoderma viride* / Актуальные проблемы биологии и экологии. Материалы докладов XI молодежной научной конференции Института биологии УрО РАН. –

Сыктывкар, 2004. – Том II. – С. 289-291.

2. Тарабукин Д.В. Ферментативный гидролиз как способ повышения питательной ценности трудноусваиваемых компонентов кормов / Актуальные проблемы биологии и экологии. Материалы докладов I всероссийской Коми республиканской молодежной научной конференции. – Сыктывкар, 2007. – С. 246-249.

3. Тарабукин Д.В., Торлопов М.А. Особенности структуры и ферментативной деструкции порошковых целлюлоз / Молодежь и наука на Севере. Материалы докладов I всероссийской молодежной научной конференции. – Сыктывкар, 2008. – Том III. – С. 291-292.