

ОДЕССКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ АКАДЕМИЯ ПИЩЕВЫХ ТЕХНОЛОГИЙ

На правах рукописи

ЛАТ СУК ТУНКАРА

07

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ БИОСИНТЕЗА ЛИЗИНА  
НА ОСНОВЕ ВТОРИЧНЫХ ПРОДУКТОВ КОНСЕРВНОГО  
ПРОИЗВОДСТВА

Специальность: 03.00.23 - биотехнология

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т

диссертации на соискание  
ученой степени кандидата  
технических наук

Одесса - 1995

АВ 32.089

Диссертация есть рукопись.

Работа выполнена в Одесской государственной академии пищевых технологий.

Научный руководитель: доктор технических наук, профессор  
КАПРЕЛЬЯНЦ Леонид Викторович

доктор медицинских наук, профессор  
КИРИЛЕНКО Ольга Акимовна

Официальные оппоненты: доктор технических наук, профессор  
ЕГОРОВ Б.В.

кандидат биологических наук, доцент  
ИБАНИЦА В.А.

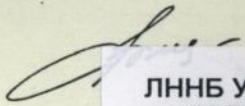
Ведущая организация: Одесский биотехнологический институт

Защита состоится "29" марта 1995 г, в "10"<sup>30</sup> часов на заседании специализированного совета Д 068.35.03 в Одесской государственной академии пищевых технологий (270039, г. Одесса, ул. Канатная, 112).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Одесской государственной академии пищевых технологий.

Автореферат разослан "27" февраля 1995 г.

Ученый секретарь специализированного совета, доктор технических наук, профессор



Л.Г. Винникова

ЛННБ України ім.В.Стефаника



00754452 (R)

ЛНБ ім. В. Стефаника  
АН України

Актуальность работы: Сегодня биотехнология стремительно выдвигается на передний край научно-технического прогресса. Этому способствуют два обстоятельства. С одной стороны, бурное развитие современной биологической науки, позволившее использовать потенциал живых организмов в интересах хозяйственной деятельности человека. С другой стороны, наблюдается острая практическая потребность в новых технологиях, призванных ликвидировать нехватку продовольствия, кормов, энергии, минеральных ресурсов, улучшить экологию окружающей среды. Биотехнология уже вносит немалую лепту в решение указанных проблем.

Одним из перспективных направлений биотехнологии является разработка новых способов биоконверсии растительных субстратов с целью расширения сырьевой базы для микробиологического производства аминокислот.

Одной из актуальных проблем современной биотехнологии является разработка способов получения незаменимых аминокислот, как источников дефицитных компонентов, вводимых в корма для ведения интенсивного животноводства. Важным условием развития микробиологической промышленности является наличие дешевого доступного сырья. Перспективным сырьем для микробиологической промышленности являются продукты энзиматической конверсии биополимеров побочных продуктов консервного производства.

При производстве микробной биомассы стоимость сырья составляет до 50-60 % от общей стоимости годовой продукции. Поэтому постоянно растущая потребность микробиологической промышленности в углеводсодержащем сырье диктует необходимость поиска новых видов сырья и свидетельствует о перспективности для народного хозяйства организации производства кормового лизина на ферментолизатах побочных продуктов консервного производства.

Цель и задачи исследования. Целью диссертационной работы является разработка технологии биосинтеза лизина на основе вторичных продуктов консервного производства.

В соответствии с поставленной целью были определены следующие основные задачи исследования:

- изучить количественный и качественный состав микрофлоры вторичных продуктов консервного производства - производства кон-

сервов из моркови и томатов;

- изучить влияние микрофлоры воздуха и почвы на жизнедеятельность микроорганизмов - продуцентов лизина;
- исследовать химический состав вторичных продуктов переработки моркови и томатов и условия гидролиза их полисахаридов промышленными ферментными препаратами;
- разработать математическую модель процесса ферментативной деградации полисахаридов побочных продуктов моркови и томатов;
- разработать синтетические среды на основе ферментативных гидролизатов побочных продуктов моркови и томатов для культивирования микроорганизмов - продуцентов лизина;
- разработать технологические основы биосинтеза лизина на ферментолизатах побочных продуктов консервного производства.

Научная новизна. Степень новизны результатов, полученных автором, определяется следующим:

- изучен химический состав побочных продуктов консервного производства (ППКП);
- изучен количественный и качественный состав микрофлоры ППКП;
- изучено влияние микрофлоры воздуха и почвы на жизнедеятельность микроорганизмов *Brevibacterium Sp. 22* продуцентов лизина;
- проведен ферментативный гидролиз ППКП, Разработана математическая модель процесса ферментативной деградации полисахаридов ППКП пектофуретидином Г20х;
- теоретически обоснован ферментативный способ получения питательной среды для выращивания микроорганизмов *Brevibacterium Sp. 22* на основе ППКП;
- получены гидролизаты методом ферментативной деградации полисахаридов ППКП. Доказана их биологическая доброкачественность;
- проведено выращивание микроорганизмов продуцентов лизина на ферментативных гидролизатах ППКП. Доказана возможность использования ППКП для биосинтеза лизина;
- разработана технологическая схема биосинтеза лизина на ферментативных гидролизатах ППКП.

Практическая значимость работ. Разработана технология биосинтеза лизина на ферментативных гидролизатах ППКП.

Внедрение разработанной технологии позволит расширить сырье-

вую базу комбикормов за счет дополнительного кормового концентрата лизина (ККЛ), полученного на основе ШКП, а также более эффективно использовать ШКП.

Ориентировочный экономический эффект от внедрения разработанной технологии составит около 4,5 млн. крб. на 1 т готовой продукции (в ценах 1993 г.).

Апробация диссертационной работы. Основные материалы диссертации докладывались на научно-практических конференциях профессорско-преподавательского состава ОТИП им. М.В. Ломоносова (Одесса, 1992, 1993, 1994) и Международной научно-технической конференции "Разработка и внедрение новых технологий и оборудования в пищевую и перерабатывающую отрасли АПК" (Киев, 1993 г.).

Публикации. По результатам исследований опубликовано 5 печатных работ, в том числе в изданиях Украинской информационной корпорации "УКРНТИ" в материалах международных и научно-технических конференциях.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, 4 глав, выводов, списка литературы и приложения. Работа изложена на 105 страницах машинописного текста, содержит 18 таблиц, 11 рисунков, 2 фотографии, 1 приложение. Список литературы включает 143 наименования, из них 32 иностранных. В приложении приведены таблицы математического планирования эксперимента.

На защиту выносятся:

- результаты исследований химического состава ШКП;
- результаты исследования микрофлоры ШКП и влияния микрофлоры воздуха и почвы на жизнедеятельность микроорганизмов продуцентов лизина;
- основные закономерности ферментативного гидролиза ШКП; биохимическая характеристика полученных ферментативных гидролизатов;
- результаты выращивания микроорганизмов *Brevibacterium Sp22* на ферментативных гидролизатах ШКП;
- технология биосинтеза лизина на ферментативных гидролизатах ШКП.

Автор выражает благодарность за научное консультирование и помощь в работе ст.н.с., к.т.н. Величко Т.А.

## Содержание работы

Во введении дано обоснование актуальности темы и практическая значимость работы.

В первой главе "Современные методы биосинтеза лизина на различных субстратах" на основании анализа современных тенденций в области промышленных методов биосинтеза лизина показана необходимость развития биотехнологических методов конверсии растительных биополимеров при подготовке углеводсодержащих субстратов. Дана характеристика лизина, как незаменимой аминокислоты в рационах питания и кормления, показаны продуценты лизина и методы биосинтеза на различных субстратах

Поставлены цель и задачи исследований.

Во второй главе "Организация экспериментальных исследований" приведена схема исследований, отражающая основные направления, последовательность проведения и взаимосвязь этапов работы, а также постановку экспериментов и методы исследований, применявшихся в работе.

Объектами исследования служили ППКП Одесского консервного завода им. Ворошилова.

В работе использовали ферментные препараты: протосубтилин Г2Ох; пектофоетидин Г2Ох; целлокандин Г1Ох. Культуры микроорганизмов из коллекции музея кафедры биохимии и микробиологии Одесской государственной академии пищевых технологий. В работе использованы стандартные, а также специальные физические, химические, биохимические и микробиологические методы анализа, включающие современные методы химии природных соединений, высокоэффективную жидкостную хроматографию, спектроскопию и др. При проведении эксперимента использованы методы математического планирования, оптимизации и моделирования. Экспериментальные исследования по биосинтезу лизина на ферментативных гидролизатах ППКП были проведены на стендовой установке в условиях опытного производства.

В третьей главе "Исследование биохимического состава ППКП и условий деполимеризации полисахаридов" приведен биохимический состав ППКП. В результате проведенных исследований установлено, что количественный состав ППКП не является строго постоянным и изменяется в зависимости от сорта, степени созревания, места выращивания, соотношения анатомических частей и других факторов.

Наибольшую часть побочных продуктов составляют полисахариды. Общий выход сахаров при количественном гидролизе составляет 43,0...50,0 % от абсолютно сухого сырья, в том числе 20,0...22,0 % пентозаны, 10,8...12,5 % пектиновые вещества (табл. I).

Массовая доля азотистых веществ составляет 11,0...20,0 %. Аминокислотный состав белков представлен 17-ю аминокислотами. Из незаменимых аминокислот преобладают лизин, аргинин, лейцин.

Гидролизаты легкогидролизуемых полисахаридов ШКП представлены урановыми кислотами, галактозой, глюкозой, арабинозой, ксилозой, рибозой; гидролизаты трудногидролизуемых полисахаридов, урановыми кислотами, глюкозой, ксилозой.

Побочные продукты характеризуются повышенным содержанием лигнина 21,3...28,4 % и зольных веществ. Они содержат водорастворимые витамины В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub>, аскорбиновую кислоту и β-каротин. Жирнокислотный состав ШКП от 67,8 до 84,3 % составляют ненасыщенные жирные кислоты.

На основании данных биохимического исследования следует, что ШКП могут служить сырьем для ферментативной дегградации с целью получения биологически активной среды с последующим выращиванием микроорганизмов продуцентов лизина.

Исследования по изучению микрофлоры ШКП показали, что сопрофитная микрофлора может сохраняться в состоянии анабиоза и не оказывать негативного влияния на сырье при постоянной его влажности не более 10 %.

Высокое содержание полисахаридов в ШКП позволяет их использовать в качестве перспективного сырья для биотехнологической переработки с целью получения ферментных гидролизатов. Выбор ферментных препаратов обусловлен качественной и количественной характеристикой полисахаридов сырья. В качестве ферментного препарата использовали пектофетидин Г20х (полигалактуроназная активность - 410 ед/г; эндоглюконазная активность - 115 ед/г).

Основными факторами, оказывающими влияние на процесс ферментативного гидролиза являются: гидромодуль, концентрация фермента, степень измельчения сырья, его гранулометрический состав, продолжительность реакции.

Установлено, что процесс превращения растительного сырья ферментной системой пектофетидином Г20х имеет четко выраженную двухстадийность, причем начальная стадия (первые 12 ч ферментив-



ного гидролиза) характеризуется наибольшей скоростью образования восстанавливающих сахаров (рис. 1.).

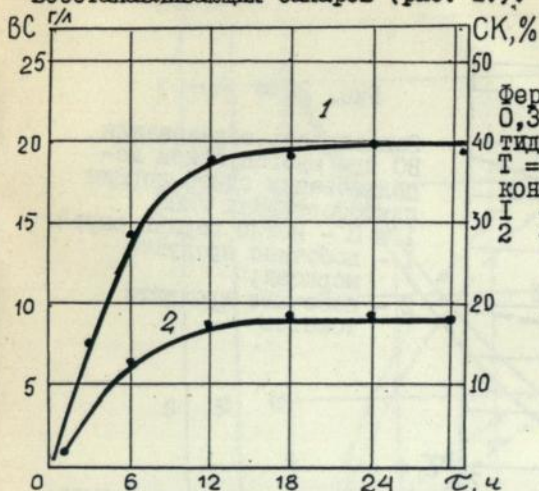


Рис. 1.

Ферментативное превращение сырья 0,3 % водным раствором пектофелтидина Г20х : [S] = 50 г/л, T = 30°C, pH = 4,3; СК - степень конверсии полисахаридов сырья, %;

1 - побочные продукты моркови;  
2 - побочные продукты томатов

При этом происходит почти полная конверсия пектиновых веществ, гемицеллюлоз и доступной части целлюлозы, в то время как дальнейшее превращение целлюлозы и других полисахаридов протекает значительно медленнее.

Результаты исследований показали, что оптимальными условиями ферментативного гидролиза ШКП являются: гидромодуль 18...19; массовая концентрация вносимого фермента 0,63...0,4 %; pH = 4,2...4,3; продолжительность 30...32 ч, при размере частиц от 2 до 4 мм.

Главная проблема ферментативной переработки лигноцеллюлозных материалов, тормозящая реализацию промышленного получения сахаров - высокий расход ферментных препаратов.

Одно из возможных решений этой проблемы - многократное использование одной порции фермента. Полученные данные (рис. 2) свидетельствуют о том, что ферментный раствор почти с равной эффективностью можно использовать два раза. При ферментативном гидролизе третьей порции как побочных продуктов моркови, так и томатов, скорость образования сахаров значительно снижается и по сравнению с двукратным использованием, составляет всего 22-26 % для побочных продуктов моркови и 13-15 % - томатов.

Изучение целлюлазной и пектиназной активности ферментных растворов до и после кратковременной обработки ШКП подтвердило возможность их регенерации.

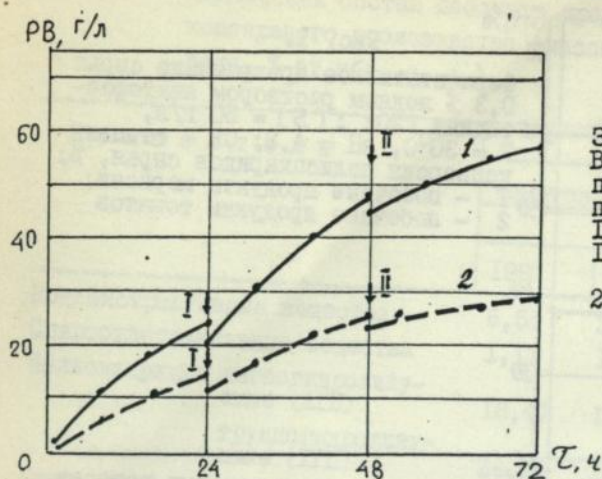


Рис. 2.

Зависимость образования ВС при многократном использовании одной порции пектофетидина Г20Х  
 I и II - новые порции сырья  
 I - побочные продукты моркови;  
 2 - побочные продукты томатов

В главе 4 "Разработка технологии биосинтеза лизина на ферментализатах ШПКП" приведены результаты изучения антагонистических свойств микроорганизмов воздуха потенциальных контаминантов процесса биосинтеза лизина бревибактериями. Показано, что микробиологический процесс необходимо вести в асептических условиях при тщательном изолировании культуры бревибактерий от микрофлоры внешней среды при промышленном биосинтезе лизина.

Проведено научное обоснование состава питательных сред на основе ферментализатов ШПКП при биосинтезе лизина микроорганизмами *Brevibacterium Sp.22*. Показано, что на гидролизатах ШПКП, используемых в качестве источника углеродного питания низкомолекулярные углеводы, наблюдается более интенсивное накопление биомассы и лизина по сравнению с контрольной средой, содержащей мелассу. Выход лизина составил при этом 14,4 мг/мл (РВ = 4,5 - 6,0 %).

Исследовано влияние биостимуляторов на ростовую активность бревибактерий, треонина, метионина, биотина, кукурузного экстракта, гидролизата кормовых дрожжей. Максимальный выход лизина в лабораторных условиях культивирования бревибактерий составил 15,5...17,0 мг/мл с применением в качестве ростовых веществ гидролизата кормовых дрожжей (рис. 3).

Результаты исследований показали, что замена кукурузного экстракта гидролизатом кормовых дрожжей (3 %) приводит к увеличению как биомассы, так и лизина. Выход лизина при этом составил для

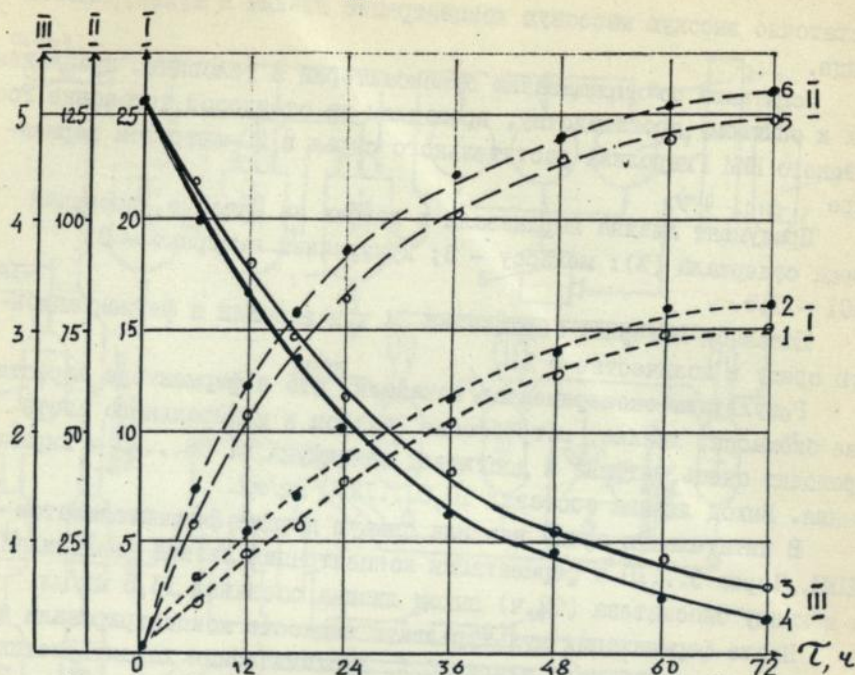


Рис. 3. Динамика изменения состава культуральной жидкости в процессе развития *Brevibacterium sp.* 22 на средах с ферментативными гидролизатами ШПКП  
 I - лизин (1, 2) мг/мл;  
 II - оптическая плотность клеточной суспензии (0,6,5 разведение);  
 III - РВ (3, 4), с массовой концентрацией, %; продолжительность культивирования - 72 ч; рН среды 7,0.  
 1, 3, 5 - ФГШПТ; 2, 4, 6 - ФГШПМ

ФГШПТ - 15,5 мг/мл, а для ФГШПМ - 17,0 мг/мл.

После окончания ферментации бревибактерий культуральная жидкость содержит 12 % сухих веществ, в том числе 2 % лизина; 1,7 % бактериальной биомассы; 0,65 % остаточных сахаров. Содержание сухих веществ после удаления избыточной влаги составило 37 %, а лизина - 7,5 %.

Таким образом, приведенные результаты показывают, что ферментативные гидролизаты ШПКП могут быть использованы не только для частичной замены мелассы, но и в качестве полноценного питательного субстрата при культивировании бревибактерий, обеспечивающего

достаточно высокую массовую концентрацию лизина в культуральной среде.

Испытания по выращиванию бревибактерий в условиях, приближенных к опытному производству, проводили на стендовой установке Российского НИИ Гидролиза растительного сырья в 20-литровом ферментере (рис. 4).

Продуцент лизина выращивали в колбах на качалке, посевная среда содержала (%): мелассу - 3; кукурузный экстракт - 3; NaCl - 1,5.

Посевной материал выращивали 24 ч и вносили в ферментационную среду в количестве 5 %.

Результаты экспериментов показали, что в ферментере нарастающие биомассы, лизина, потребление сахаров и минерального азота проходит очень активно и достигает максимума за 36...40 ч выращивания. Выход лизина составил 10,0...12,0 мг/мл.

В питательную среду вносили свежую порцию ферментолизатов ШКП. Через 9...10 ч ферментации концентрация лизина увеличилась, а к концу биосинтеза (72 ч) выход лизина составил 15,5 мг/мл.

После ферментации культуральную жидкость концентрировали и сушили до массовой доли влаги 10 %. Биохимическая характеристика концентрата кормового лизина приведена в табл. 2.

Таблица 2

Биохимическая характеристика концентрата кормового лизина (% к а.с.в.)

| Показатели           | Концентрат, полученный на гидролизатах |       |
|----------------------|--|-------|
|                      | ФГИПТ                                  | ФГИПМ |
| Лизин                | 15,2                                   | 17,3  |
| Протеин              | 33,7                                   | 42,5  |
| Углеводы             | 14,7                                   | 12,4  |
| Липиды               | 1,4                                    | 1,3   |
| Минеральные вещества | 27,4                                   | 28,1  |
| Витамины (мкг/г)     |  |       |
| тиамин               | 7,7                                    | 8,9   |
| рибофлавин           | 94,2                                   | 140,8 |
| пантотеновая кислота | 48,4                                   | 58,7  |
| пиридоксин           | 289,4                                  | 325,0 |
| никотиновая кислота  | 8,2                                    | 9,4   |

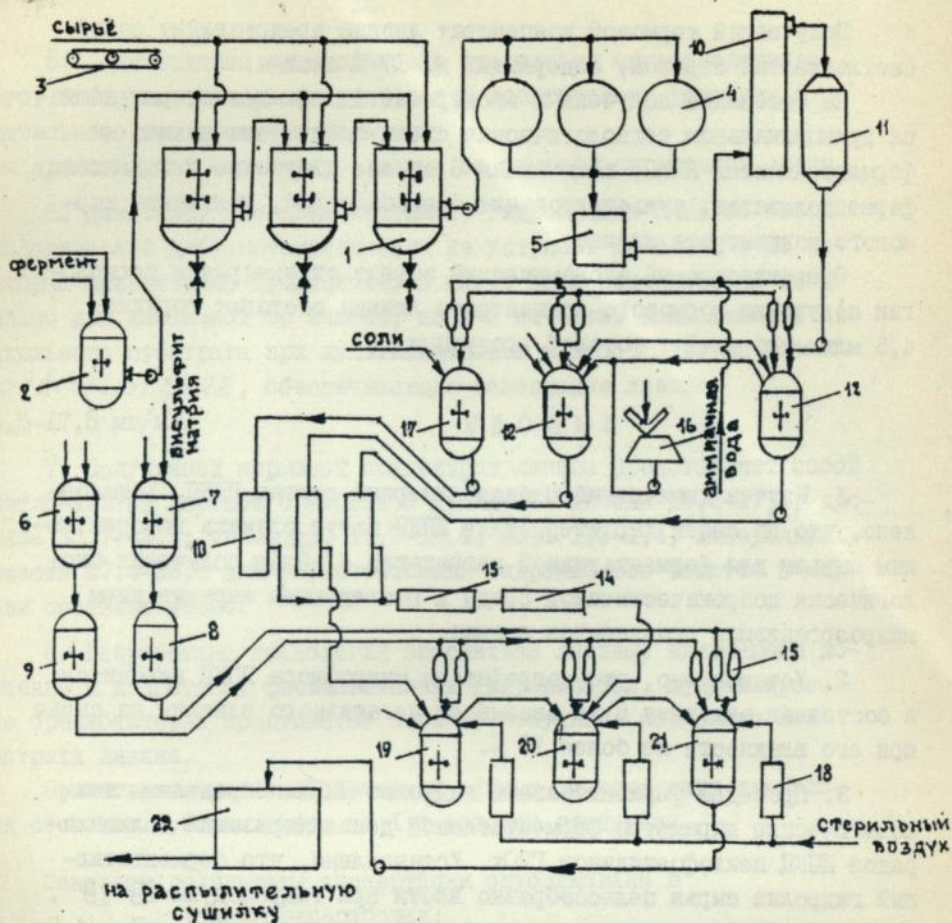


Рис. 4 Принципиальная схема производства кормового концентрата лизина на ферментолизатах ППКП  
 1, 6, 7, 12, 17, 21 - реакторы; 2, 5, 9, 11, 22 - сборники;  
 3 - транспортер; 4 - центрифуги; 10 - стерилизационная колонна; 13, 14 - теплообменники; 15 - мерник; 16 - весы;  
 18 - воздушный фильтр; 19 - посевной ферментер; 20 - производственный ферментер

Полученный кормовой концентрат лизина представляет собой светло-желтый порошок, содержащий до 17 % лизина.

На основании полученных экспериментальных данных разработана принципиальная технологическая схема биосинтеза лизина на ферментализатах ШПКП, включающая 3 этапа: получение и подготовку ферментализатов, культивирование бревибактерий, получение кормового концентрата лизина.

Ориентировочный экономический эффект от внедрения технологии получения кормового концентрата лизина составит порядка 4,5 млн. руб на 1 т готовой продукции.

## В В В О Д Ы

1. Изучен химический и биополимерный состав ШПКП. Установлено, что по своей характеристике ШПКП могут служить перспективным сырьем для ферментативной деградации с целью получения биологически доброкачественной среды и последующим выращиванием микроорганизмов продуцентов лизина.

2. Установлено, что сопродитная микрофлора ШПКП находится в состоянии анабиозу и не оказывает негативного влияния на сырье при его влажности не более 10 %.

3. Проведен ферментативный гидролиз ШПКП. Определены технологические параметры ферментативной деполимеризации полисахаридов ШПКП пектофетидином Г20х. Установлено, что ферментативный гидролиз сырья целесообразно вести при гидромодуле 18-19, массовой концентрации вносимого фермента  $[E] = 0,4 \%$ ,  $pH = 4,3$ ; в течение 32 ч и размере частиц сырья 2-4 мм.

Разработана математическая модель ферментативного гидролиза ШПКП.

4. Доказана возможность многократного использования одной порции ферментного препарата. Показано, что ферментный раствор почти с равной эффективностью можно использовать два раза. При ферментативном гидролизе третьей порции, скорость образования сахаров значительно снижается и по сравнению с двухкратным использованием, составляет всего 22-26 % для побочных продуктов моркови и 13-15 % - томатов.

5. Подтверждена необходимость проведения микробиологического, биотехнологического процесса в асептических условиях и тщательного изолирования культуры при промышленном биосинтезе лизина от микрофлоры внешней среды.

6. Доказано, что ферментативные гидролизаты ШКІ по своей биологической доброкачественности не уступают мелассе, а по некоторым показателям превосходят и могут быть использованы не только для частичной ее замены, но и в качестве полноценного питательного субстрата при культивировании микроорганизмов *Brevibacterium Sp22*, обеспечивающие накопление лизина 15,5-17,5 мг/мл.

7. Полученный кормовой концентрат лизина представляет собой светло-желтый порошок с массовой долей, %: лизина 15,2-17,3; протеина 33,7-42,5; углеводов 14,7-12,4; жира 1,3-1,4, минеральных веществ 27,4-28,1 для ферментативных гидролизатов томатов и моркови соответственно.

8. Разработана технология биосинтеза лизина, включающая получение и подготовку ферментативных гидролизатов, культивирование бревибактерий продуцентов лизина, получение кормового концентрата лизина.

Ориентировочный экономический эффект от внедрения технологии составит 4,5 млн. крб. на 1 т готовой продукции.

Основные результаты диссертации опубликованы в следующих работах:

1. Лат Сук Тункара, Соколовская А.С. Экономические и экологические аспекты разработки вторичных продуктов производства консервов // Тез. докл. 52-й юбилейной науч. конф. ОТИП. - Одесса, 1992. - С. 66.

2. Лат Сук Тункара, Величко Т.А. Получение ферментативных гидролизатов вторичного сырья консервного производства // Тез. докл. 53-й науч. конф. ОТИП. - Одесса, - 1993. - С. 87.

3. Лат Сук Тункара, Кириленко О.А. Микрофлора вторичной сировины консервного производства // Тез. доп. МІжнародної наук.-техн. конф. "Розробка та впровадження нових технологій і облад-

нання у харчову та переробну галузі АПК". - Київ, 1993. - С. 230-231.

4. Лат Сук Тункара, Капрельянц Л.В., Величко Т.А. Комплексная утилизация отходов консервного производства путем их биоконверсии // Тез. докл. 54-й науч. конф. ОГАПТ. - Одесса, 1994, ч. Ш, - С. 7.

5. Кормовой концентрат лизина из побочных продуктов консервного производства / О.А.Кириленко, Л.В.Капрельянц, Т.А.Величко, Лат Сук Тункара. - Одесса, 1994, С. 1-2. - Инф. Л/ОЦНТИ № 223-94.

#### Анотація

Л.С.Тункара."Розробка технології біосинтезу лізину на основі продуктів консервного виробництва". Дисертація на здобуття вченого ступеня кандидата технічних наук за спеціальністю 03.00.23 - "Біотехнологія". Одеська державна академія харчових технологій. Одеса, 1995.

Захищаються 5 наукових праць, які вміщують результати досліджень біосинтезу лізину на основі нових поживних середовищ. Задача була вирішена на основі ферментативної біоконверсії полімерів вторинної рослинної сировини. В роботі приведені результати розробки біотехнології одержання кормового концентрата лізину.

Ключеві слова: біополімери, ферменти, біосинтез, лізін, поживне середовище.

#### Summary

Lat souck Tounkara: "Elaboration the technology of lysine biosynthesis on the base of cannery secondary products." Candidate of technical science thesis in the speciality 03 . 00 . 23 - biotechnology. Odessa state academy of food technologies. Odessa, 1995.

5 scientific papers wich contain the results of the study biosynthesis of lysine on the base of new nutrient medium are presented for consideration. The task was solve on basis of bio conversion secondary products polymers. The work contains the results of biotechnological receipt fodder concentrate of lysine.

Key words: biopolymers, enzymes, biosynthesis, lysine, nutrient medium.

ЛНБ ім. В. Стефаники  
АН України

44.7912



Ab 35.082

447912

AB 32.089

**AB 32.089**

СЕРИЯ А