

УДК 623.19.47

Тур А.В., Епишкина Ю.М., Баурин Д.В., Шакир И.В., Панфилов В.И.

ПОЛНЫЙ ФАКТОРНЫЙ ЭКСПЕРИМЕНТ КОМПЛЕКСНОГО ГИДРОЛИЗА ДЕПРОТЕИНИЗИРОВАННОГО ПОДСОЛНЕЧНОГО ШРОТА

Тур Александра Владимировна, студентка 4 курса факультета биотехнологии и промышленной экологии, * e-mail: tur.alexandra96@gmail.com

Епишкина Юлия Михайловна, студентка 2 курса факультета биотехнологии и промышленной экологии,

Баурин Дмитрий Витальевич к.т.н., м.н.с. кафедры биотехнологии,

Шакир Ирина Васильевна, к.т.н., доцент кафедры биотехнологии,

Панфилов Виктор Иванович, д.т.н., профессор, заведующий кафедрой биотехнологии,

Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева, Москва, Россия,

125480, Москва, ул. Героев Панфиловцев, д. 20

*Изучено влияние температуры, кислотности среды и времени проведения кислотного гидролиза на выход редуцирующих веществ, прирост биомассы, содержание сырого протеина в биомассе после культивирования дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* на комплексных гидролизатах. Проведена математическая обработка результатов полного факторного эксперимента, полученное линейное уравнение регрессии адекватно эксперименту.*

Ключевые слова: биологическая конверсия, переработка отходов растительного сырья, депротеинизированный шрот подсолнечника, кислотный гидролиз, ферментативный гидролиз, оптимизация условий эксперимента

FACTORIAL EXPERIMENT FOR OPTIMIZATION OF DEPROTEINIZED SUNFLOWER MEAL COMPLEX HYDROLYSIS

Tur A.V.*, Epishkina Y.M., Baurin D.V., Shakir I.V., Panfilov V.I.

D.I. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, Russia.

* e-mail: tur.alexandra96@gmail.com

*The influence of temperature, acidity and the duration of acid hydrolysis on the yield of reducing substances, the biomass, the content of crude protein in biomass after cultivation of yeast *Saccharomyces cerevisiae* on complex hydrolyzates was studied. Mathematical processing of experimental results was performed. The analysis made it possible to conclude that the linear regression equation is adequate to the experiment.*

Key words: plant raw material, bioconversion, deproteinized sunflower meal, acid hydrolysis, enzymatic hydrolysis, optimization of experiment conditions

Предварительная обработка сырья является одной из стадий биотехнологического процесса и может иметь ключевое значение при интенсификации всего производственного цикла. В данной работе в качестве субстрата для культивирования дрожжей и получения продуктов метаболизма было использовано вторичное сырье, следовательно, возрастает значение этапа предварительной обработки сырья. На примере использования жировых отходов мясоперерабатывающей промышленности [1], отходов переработки кофейных зерен [2], сои [3], пивной дробины [4] показано, что различные способы предварительной обработки сырья позволяют в значительной степени повысить эффективность ферментации, а также эффективность образования продукта. В данной работе определяли условия предварительного кислотного гидролиза депротеинизированного шрота подсолнечника (ДПШ) и проанализировали эффективность культивирования на полученных гидролизатах. ДПШ - ценное лигниноцеллюлозное вторичное сырьё, содержащее от 12,5-19,0% сырого протеина и 39-45% сырой клетчатки и практически не пригоден для использования в кормах в нативном виде [5]. Основной проблемой переработки ДПШ является разрушение полисахаридов (целлюлоза, гемицеллюлоза), лигнина с высоким выходом

редуцирующих веществ и побочным образованием антипитательных веществ для дальнейшего получения микробной биомассы. Для разрушения сложных углеводов проводят последовательно гидролиз - сначала кислотный, затем ферментативный. Исследования, доказывающие целесообразность данного метода были проведены на кафедре биотехнологии РХТУ им. Д.И. Менделеева ранее [6]. В результате проведения гидролиза с использованием минеральных кислот образуются как необходимые для генерации культуры штамма *Saccharomyces cerevisiae* моносахариды, так и фурфурол, оксиметилфурфурол, которые являются побочными продуктами гидролиза [7]. Фурфурол является ингибитором роста клеток культуры штамма *Saccharomyces cerevisiae*. Однако существует предположение, что использование инокулятов с высоким содержанием клеток помогает бороться с наличием фурфурола в кислотных гидролизатах. Данное предположение основано на факте переработки (конверсии) фурфурола клетками культуры дрожжей [8]. Для проведения кислотного гидролиза в основном используется серная кислота, так как она является одной из самых выгодных с экономической точки зрения и эффективной с позиции разложения полисахаридов. Фосфорная кислота является менее агрессивной по сравнению с

серной, а значит и концентрация ингибиторов роста микроорганизмов в гидролизатах будет меньше [9]. Было сделано предположение о возможности использования фосфорной и серной кислоты для проведения кислотного гидролиза, что после нейтрализации гидролизатов гидроксидом калия позволило исключить гидрофосафат и дигидрофосфат калия из питательной среды Ридера. Ферментативный гидролиз является более энергетически выгодным и происходит в более мягких условиях по сравнению с кислотным, что приводит к меньшему образованию антипитательных веществ. Ферментативный гидролиз целесообразно проводить полиферментными препаратами, произведённых на основе грибов рода *Trichoderma*, *Geotrichum*, *Aspergillus* [10].

Для проведения двухэтапной обработки на первом этапе гидролиз проводили растворами серной кислоты в автоклаве ВК-75 значение гидромодуля 9; рН, температуру и продолжительность обработки устанавливали в соответствии с планом эксперимента. Необходимое значение рН устанавливали с помощью раствора концентрированной серной кислоты и фосфорной кислоты. Ферментативный гидролиз полученных гидролизатов осуществляли препаратом «*Acclerace 1500*» (Genecor, Финляндия) при температуре 50°C, рН 5,5 и при постоянном перемешивании 500 об./мин.

Для оценки ростовых свойств гидролизатов использована культура дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* из коллекции кафедры биотехнологии РХТУ им. Д.И. Менделеева. Предварительно рН гидролизатов доводили до $5,5 \pm 0,1$ с помощью раствора гидроксида натрия и калия, после чего инокулировали суточной культурой дрожжей. Накопление биомассы определяли на 48 час роста путем прямого подсчета количества клеток в камере Горяева.

Содержание сырого протеина определяли по методу Кьельдаля путем минерализации высушенных образцов биомассы в установке *Keltrun* с последующей перегонкой с использованием реактива Конвея.

Статистическую обработку данных осуществляли в программе MS Excel. Планирование и обработку экспериментов по плану первого порядка проводили в соответствии [11]. Для определения значимости коэффициентов регрессии дополнительно проводили 4 параллельных измерения в центре плана, на основании которых определяли дисперсию воспроизводимости по формуле (1):

$$S_{\text{воспр}}^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (\bar{Y}_i - Y_i)^2}{m-1}, \quad (1)$$

где m – число повторных экспериментов.

Далее определяли ошибку j -го коэффициента уравнения при количестве опытов N . Значимость каждого коэффициента определяли с учетом

табличного значения коэффициента Стьюдента по формуле (2):

$$t_j = \frac{|b_j|}{s_{b_j}} > t_{1-p}(f), \quad (2)$$

$$\text{где } s_{b_j} = \frac{S_{\text{воспр}}}{\sqrt{N}}$$

Адекватность полученной модели оценивали с помощью критерия Фишера по формуле (3):

$$F = \frac{s_{\text{ост}}^2}{s_{\text{воспр}}^2}, \quad (2)$$

$$\text{где } s_{\text{ост}}^2 = \frac{\sum_{i=1}^N (Y_i - \hat{Y}_i)^2}{N-l}$$

Определён выход редуцирующих веществ (Y_1) г/л, прирост биомассы (Y_2) кл/мл, содержание сырого протеина в биомассе (Y_3) % в зависимости от условий проведения кислотного гидролиза ДПШ с последующим проведением ферментативного гидролиза и культивирования *S. cerevisiae*. В ходе кислотного гидролиза варьировалось 3 фактора: x_1 – рН гидролиза, x_2 – время проведения гидролиза, x_3 – температура процесса. Факторы и уровни их варьирования приведены в табл.1.

Таблица 1. Факторы и уровни их варьирования

	Факторы	Уровни варьирования		
		-1	0	+1
рН	x_1	2	2,5	3
Продолжительность, час	x_2	0,5	1	1,5
t , °C	x_3	120	126	132

По результатам эксперимента была проведена математическая обработка экспериментальных данных методом полного факторного эксперимента. Были получены следующие уравнения регрессии (4,5,6):

$$Y_1 = 7,35 - 2,04x_1 + 0,32x_2 + 1,73x_3 + 0,4x_1x_2 - 0,69x_1x_3 + 0,3x_2x_3, \quad (4)$$

$$Y_2 = 176875000 - 101125000x_2 + 76375000x_2x_3, \quad (5)$$

$$Y_3 = 23,93 + 4,03x_1 - 3,98x_3 - 4,5x_1x_3, \quad (6)$$

Для проверки адекватности полученных уравнений рассчитали концентрацию редуцирующих веществ, прирост биомассы и содержание сырого протеина по соответствующим уравнениям и на основании полученных данных, определив значение критерия Фишера, заключили, что уравнения регрессии адекватны эксперименту.

На основании полученных уравнений установлено, что на выход редуцирующих веществ оказывают наибольшее влияние значение рН кислотного гидролиза, время проведения гидролиза,

а также совместное взаимодействие этих факторов. При чем приближение к максимальному значению выхода редуцирующих веществ происходит при минимальном значении рН и максимальном значении температуры. На выход биомассы наибольшее влияние оказали время гидролиза, а также совместное взаимодействие факторов времени и температуры. Приближение к максимальному значению выхода биомассы достигалось при минимальном значении продолжительности гидролиза. На содержание сырого протеина оказывали максимальное влияние факторы кислотности и температуры гидролиза, а также совместное действие данных факторов. Максимальный выход сырого протеина достигался при максимальном значении рН и минимальном значении температуры проведения гидролиза.

Гидролизаты, полученные из депротеинизированного подсолнечного шрота, прошедшие обработку в более жестких условиях, отличались более высоким выходом редуцирующих веществ, однако по результатам культивирования выход клеток не превышал $1,0 \cdot 10^7$ кл/мл. По результатам культивирования максимальное количество клеток - $4,1 \cdot 10^8$ кл/мл было достигнуто при культивировании *Saccharomyces cerevisiae* на гидролизатах, полученных в ходе обработки ДПШ при рН 2,0, в течение 0,5 часа, при температуре 120°C. Максимальная концентрация сырого протеина в РУБК - 35% была получена на гидролизатах, в ходе предварительной обработки ДПШ в следующих условиях: рН 2,5, в течение 0,5 часа, при температуре 120°C.

По результатам работы была проведена оценка трех факторов рН гидролиза, время проведения гидролиза, температура процесса на следующие параметры: выход редуцирующих веществ, прирост биомассы, содержание сырого протеина в биомассе. На основании полученных данных подобраны условия для проведения эксперимента второго порядка, с целью подбора оптимальных условий гидролиза депротеинизированного шрота для его использования в качестве компонента питательной среды для культивирования микроорганизмов и получения кормового белкового продукта.

Предварительная обработка вторичных продуктов производства концентратов белка подсолнечника, включающая стадию кислотного и ферментативного гидролиза с последующей биологической конверсией в белковую кормовую добавку, может быть положена в основу комплексной переработки семян подсолнечника.

Список литературы

1. Суясов Н.А., Панфилов В.И., Кареткин Б.А., Васильев А.В., Шакир И.В. Использование ультразвуковой предобработки питательной среды для глубинного гетерофазного культивирования дрожжей // Биотехнология. – 2007. – № 2. – С. 52–56.
2. Башашкина Е.В., Суясов Н.А., Шакир И.В., Панфилов В.И. Биоконверсия отходов производства растворимого кофе в продукты кормового назначения // Экология и промышленность России. – 2011. – № 1. – С. 18–19
3. Смирнова В.Д., Киселева Р.Ю., Шакир И.В., Панфилов В.И. Биотехнологический путь переработки отходов производства соевого белка // Экология и промышленность России. – 2010. – № 5. – С. 14–17.
4. Васильев А.В., Панфилов В.И., Шакир И.В., Афанасьев А.В., Цыганков М.А. Кислотный и ферментативный гидролиз отходов пивоваренной промышленности // Химическая технология. – 2007. – Т. 8. – № 1. – С. 17–21.
5. Баурин Д.В., Катаева Т.С. Оптимизация Условий Кислотного Гидролиза Депротеинизированного Шрота // Успехи В Химии И Химической Технологии: Сб. Науч. Тр. 2013. № 8 (148) (27). С. 115–120.
6. Makarova A.S. Green chemistry for the optimum technology of biological conversion of vegetable waste // Sustainable Production and Consumption. 2017. (10). P. 66–73.
7. Скиба Е.А. Методика определения биологической доброкачественности гидролизатов из целлюлозосодержащего сырья с помощью штамма *Saccharomyces cerevisiae* ВКПМ У-1693 // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. 2016. № 1 (16).
8. Taherzadeh M.J. Conversion of furfural in aerobic and anaerobic batch fermentation of glucose by *Saccharomyces cerevisiae* // Journal of bioscience and bioengineering. 1999. № 2 (87). P. 169–174.
9. Nantapipat J., Luengnaruemitchai A., Wongkasemjit S. A comparison of dilute sulfuric and phosphoric acid pretreatments in biofuel production from corncobs World Academy of Science, Engineering and Technology (WASET), 2013.с. 604.
10. Клёсов А. Г. Ферментативный гидролиз целлюлозы // Биоорганическая химия. 1981. № 10 (7).
11. Кареткин Б. А. и др. Факторный эксперимент для оптимизации условий предварительной обработки питательной среды // Фундаментальные исследования. – 2014. – №. 11-1.