

Выводы

Использование алгоритма уменьшает степень субъективности при выборе стратегии закупочной логистики, что в целом положительно сказывается на экономических показателях предприятия.

Алгоритм позволяет контролировать процедуры выбора поставщика, что снижает вероятность коррупции.

При использовании алгоритма на основе анализа иерархий рейтинги поставщиков получаются на основе «прозрачных» данных, что существенно отличает предложенный метод от методов принятия логистических решений с помощью моделей типа «черного ящика».

Литература

1. Мешалкин В.П. Экспертные системы в химической технологии. – М.: Химия, 1995. – 368с.
2. Мешалкин В.П., Дови В.Г., Марсанич А. Принципы промышленной логистики. – Москва/Генуя, «РХТУ», 2002. – 727с.
3. Мешалкин В.П., Дови В. Г., Марсанич А. Стратегия управления логистическими цепями химической продукции и устойчивое развитие. – Москва/Генуя, «РХТУ», 2003. – 531с.
4. Саати Т. Принятие решений. Метод анализа иерархий. М.: Радио и связь, 1993.
5. Лещинский Б. С. Нечеткий многокритериальный выбор объектов недвижимости // Вестник ТГУ. 2003. Вып. 269. С. 116–119.
6. Саати Т. Математические модели конфликтных ситуаций. М.: Советское радио, 1977. 302 с.
7. Пегат А. Нечеткое моделирование и управление. Пер. с англ. – М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. – 798 с.

Выбор режимных параметров при глубинном культивировании продуцента микопротеина

Неманова Е.О., к.т.н. Русинова Т.В., к.б.н. доцент Горшина Е.С., д.т.н. проф. Бирюков В.В
Университет машиностроения
8(499)267-12-06

Аннотация. В статье определен ряд режимных параметров процесса жидкофазного глубинного культивирования *Fusarium sambucinum* шт. D-104 - штамма-продуцента микопротеина. Выявлено влияние рН-статирувания в широком диапазоне рН на накопление биомассы и биосинтез белковых веществ.

Ключевые слова: микопротеин, жидкофазное глубинное культивирование, *Fusarium sambucinum*.

В ряду наиболее перспективных объектов современной биотехнологии особое место отводится мицелиальным грибным продуцентам, которые являются основой для получения широкого спектра биофармацевтических препаратов, пищевых добавок и продуктов здорового питания. Одним из таких продуктов является микопротеин (пищевая белковая биомасса мицелиальных грибов, получаемая методом жидкофазного глубинного культивирования). Наиболее перспективным штаммом-продуцентом для создания производства микопротеина является нетоксичный и непатогенный штамм *Fusarium sambucinum* D-104, обладающий высоким содержанием белка.

Важное значение для синтеза белковых веществ и накопления биомассы штаммом-продуцентом имеет выбор режимных параметров культивирования. В связи с этим целью данной работы было изучение влияния таких параметров как температура, рН, аэрация и перемешивание на синтез белковых веществ и накопление биомассы штаммом *Fusarium sambucinum* D-104 в условиях жидкофазного глубинного культивирования.

Материалы и методы

В работе использовали штамм *Fusarium sambucinum* Fuck.var. *ossiculum* (Berk. et Curt.) Bilai шт. D-104, депонированный в коллекции ВКПМ под номером F-1161 (заявка на патент РФ № 2012138568).

Изучение влияния режимных параметров проводили в глубинных условиях в аппарате BioFlo 110 (New Brunswick Scientific, США) геометрическим объемом 1,3 л, с двухъярусной турбинной мешалкой открытого типа диаметром 0,055 м на питательной среде следующего состава (г·л⁻¹): крахмал пшеничный – 30,0; кукурузный экстракт – 10; NH₄NO₃ – 3,0; KН₂PO₄ – 1,2. Крахмал подвергали предварительному гидролизу ферментным препаратом Termamyl SC DS (Novozymes) в количестве 0,002 мл·л⁻¹. Количество вносимого посевного материала составило 0,2% на АСМ. Время культивирования составило 24 ч, что соответствовало экспоненциальной фазе роста.

Влияние рН-статирования изучали при температуре 27±0,5 °С, перемешивании 700 об·мин⁻¹, аэрации 1л·л⁻¹·мин⁻¹.

Влияние температуры культивирования изучали в режиме рН-статирования 4,0±0,2, перемешивании 700 об·мин⁻¹, аэрации 1 л·л⁻¹·мин⁻¹.

Влияние различных факторов на рост штамма-продуцента оценивали по накоплению биомассы и содержанию в биомассе сырого протеина.

Накопление биомассы определяли весовым способом в пересчете на абсолютно сухую массу (АСМ).

Массовую долю сырого протеина в биомассе определяли по методу Кьельдаля по ГОСТ 28178-89.

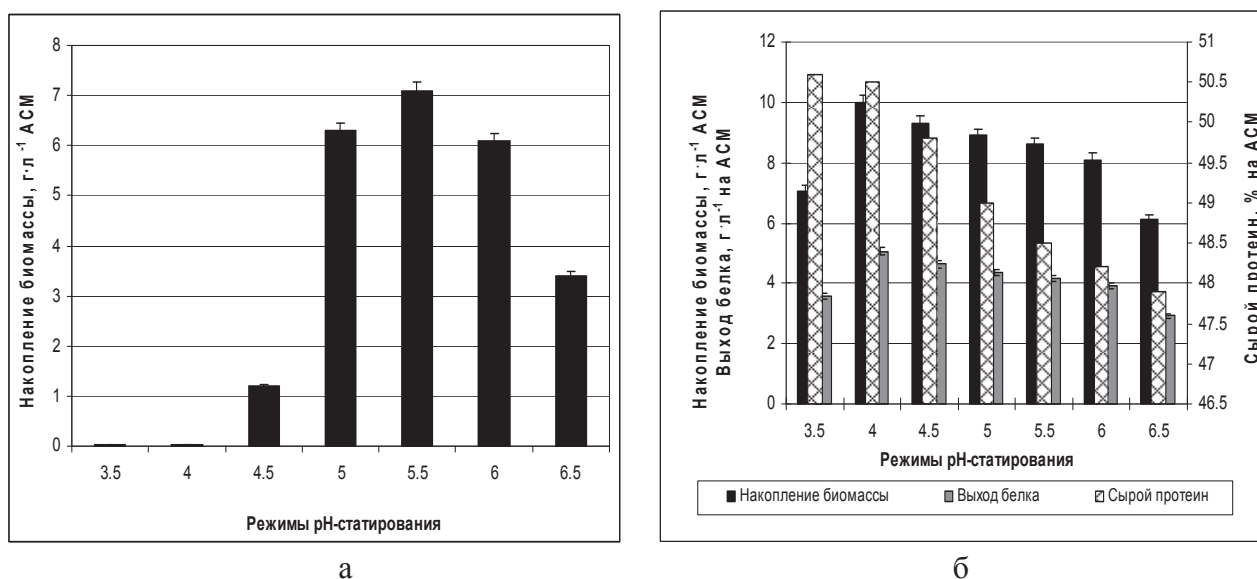


Рисунок 1. (а)– Влияние режимов рН-статирования на рост *Fusarium sambucinum* шт. D-104 в глубинной культуре на среде с мелассой, (б) – влияние режимов рН-статирования на рост и накопление белковых веществ *Fusarium sambucinum* шт. D-104 в глубинной культуре на среде с гидролизированным крахмалом

Однофакторная оптимизация режимных параметров

Влияние режимов рН-статирования

Известно, что значение рН среды существенно влияет на проницаемость клеточной оболочки микроорганизмов, и, как следствие, на усвоение ими питательных веществ. Известно также, что большинство грибных штаммов развиваются при рН 4,5-6,0 [1], а оптимум значения рН для близкородственных штаммов вида *Fusarium sambucinum* на среде с мелассой лежит в диапазоне от 5,5 до 6,0 [2, 3]. В связи с этим особый интерес представляло изучение влияния рН-статирования на рост и накопление белковых веществ *Fusarium sam-*

biscinum шт. D-104 на средах с мелассой и крахмалом в качестве основного источника углерода. Результаты эксперимента представлены на рисунке 1.

Согласно полученным данным, наиболее благоприятным в условиях глубинного культивирования на среде с мелассой для данного штамма является значение pH $5,5 \pm 0,2$ (рисунок 1а), что соответствует результатам для близкородственных штаммов.

На среде с гидролизированным крахмалом наиболее активно рост культуры происходит при режимах pH-статирования 4,0, 4,5, 5,0 (рисунок 1б). Однако содержание сырого протеина в биомассе с увеличением pH от 4,0 до 5,0 имеет тенденцию к снижению, что подтверждается также морфолого-цитологическим состоянием культуры, которое существенно меняется в пределах указанного диапазона.

Поскольку основным углеводом мелассы является сахароза, а мономером крахмала – глюкоза, существенная разница в оптимальных режимах pH-статирования на средах с мелассой и крахмалом, вероятно, может быть обусловлена различными ферментными комплексами, участвующими в усвоении данных источников углеродного питания штаммом-продуцентом. Дальнейшие эксперименты по определению режимных параметров процесса вели при значении pH 4,0.

Влияние интенсивности перемешивания

Одним из значимых факторов, влияющих на скорость роста штамма-продуцента, является концентрация растворенного кислорода в среде. Наиболее существенный вклад в обеспечение культуры растворенным кислородом вносит перемешивание, однако мицелиальная структура продуцента накладывает определенные ограничения, связанные с возможностью травмирования мицелия движущимися частями перемешивающего устройства. В связи с этим актуальной задачей было определение диапазона оптимальных значений интенсивности перемешивания. Результаты эксперимента представлены на рисунке 2.

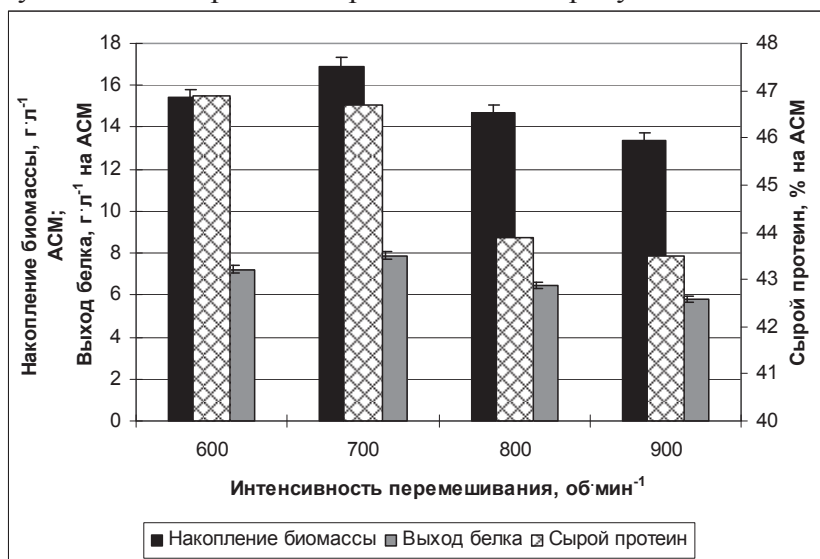


Рисунок 2. Влияние интенсивности перемешивания на рост *Fusarium sambucinum* шт. D-104 в глубинной культуре на среде с крахмалом

Согласно полученным данным наиболее интенсивно рост культуры происходит при перемешивании около 700 об·мин⁻¹, что соответствует линейной скорости перемешивающего устройства, равной 2м·сек⁻¹. Дальнейшее увеличение интенсивности перемешивания приводит к снижению накопления биомассы продуцента, а также к активному спорообразованию. Таким образом, определен диапазон линейной скорости вращения перемешивающего устройства для дальнейшей оптимизации параметров культивирования.

Влияние температуры

Существенное влияние на рост штамма-продуцента и, в частности, на синтез белковых

веществ оказывает температура культивирования. Исследуемый диапазон был выбран с учетом того, что оптимальным для близкородственного штамма на среде с мелассой является значение температуры $27\pm 1^\circ\text{C}$. Влияние различных температурных режимов оценивали на 24ч роста штамма, что соответствует середине фазы экспоненциального роста культуры. Результаты эксперимента представлены на рисунке 3.

Согласно приведенным результатам, наибольшее накопление биомассы ($10,1 \text{ г л}^{-1}$ АСМ) и выход сырого протеина ($4,9 \text{ г л}^{-1}$ на АСМ) отмечены при температуре 30°C . Содержание сырого протеина при этом составило 49,8% на АСМ. Однако морфолого-цитологическое состояние культуры было заметно хуже, чем при более низких температурных режимах.

Более предпочтительное морфологическое состояние имеет культура, полученная при режимах 26 и 28°C . Накопление биомассы при данных температурных режимах достигло 7,5 и $8,3 \text{ г л}^{-1}$ АСМ, а выход сырого протеина составил 4,0 и $4,3 \text{ г л}^{-1}$ на АСМ соответственно (сырой протеин 53 и 52,2% на АСМ).

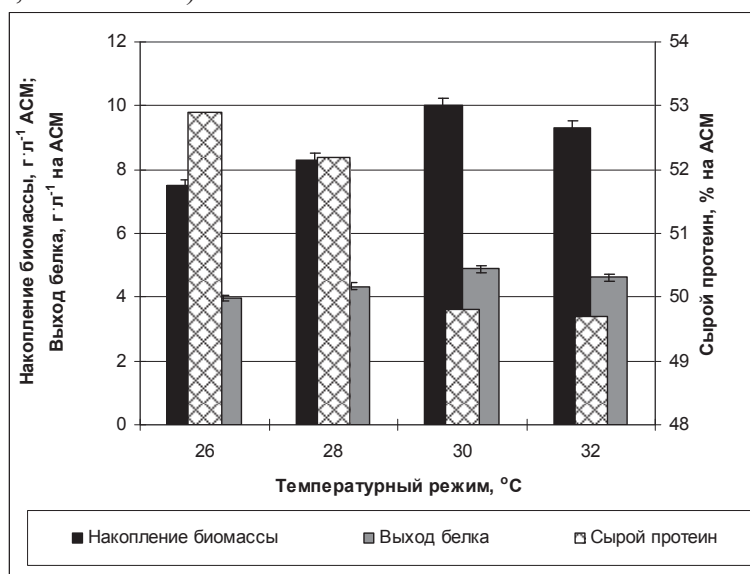


Рисунок 3. Влияние температуры на рост *Fusarium sambucinum* шт. D-104 в глубинной культуре на среде с крахмалом

Таким образом, анализ экспериментальных данных показал, что в диапазоне температур 30 – 32°C культура имеет высокую продуктивность, но быстро стареет, что приводит к снижению содержания сырого протеина в биомассе и, соответственно, к ухудшению качества получаемого продукта. Поэтому предпочтительным является температурный диапазон 26– 28°C .

Многофакторная оптимизация режимных параметров методом математического планирования эксперимента

Поскольку перемешивание, аэрация, а также температура процесса влияют на скорость насыщения культуральной среды растворенным кислородом, а, следовательно, и на скорость роста штамма-продуцента и накопление им белковых веществ, наиболее целесообразным является комплексная оптимизация данных параметров процесса культивирования продуцента. При этом наиболее интересным является сравнительная оценка результатов процесса оптимизации по двум критериям – накоплению биомассы и выходу сырого протеина.

Оптимизация процесса культивирования осуществлялась путем аддитивно-решетчатого описания процесса с использованием ортогональных латинских прямоугольников [4]. Схема планирования эксперимента строилась в натуральных величинах для 3 факторов на 4 уровнях (таблица 1).

Схема планирования экспериментов для определения аддитивно-решетчатого описания для 3 факторов на 4 уровнях

№п/п	Наименование факторов (параметров культивирования)		
	Температура, °С	Аэрация, л·л ⁻¹ ·мин ⁻¹	Перемешивание, об·мин ⁻¹
1	24	0,8	600
2	28	0,8	700
3	30	0,8	750
4	26	0,8	650
5	24	1,2	700
6	28	1,2	600
7	30	1,2	650
8	26	1,2	750
9	24	1,5	750
10	28	1,5	650
11	30	1,5	600
12	26	1,5	700
13	24	1	650
14	28	1	750
15	30	1	700
16	26	1	600

Результаты аддитивно-решетчатого описания процесса приведены в таблице 2.

Таблица 2

Определение эффектов аддитивно решетчатого описания

№п/п	Наименование фактора	Значения уровней факторов	Эффекты аддитивно-решетчатого описания при различных критериях оптимизации	
			b_{ik} (критерий оптимизации – накопление биомассы)	b_{jk} (критерий оптимизации – выход сырого протеина)
1	Температура, °С	24	-1,98	-0,94
		26	-0,19	-0,12
		28	+1,31	+0,64
		30	+0,85	+0,42
2	Аэрация, л·л ⁻¹ ·мин ⁻¹	0,8	+0,21	+0,21
		1	-1,27	-0,66
		1,2	-0,02	-0,07
		1,5	+1,08	+0,52
3	Перемешивание, об·мин ⁻¹	600	-0,35	-0,06
		650	-0,33	-0,19
		700	+0,2	+0,11
		750	+0,48	+0,14

Доверительный интервал для оценки значимости эффектов определяли согласно [4] по соотношению:

$$\varepsilon = t \sqrt{\frac{\sigma^2}{N\gamma}}, \quad (1)$$

где: $N = 16$ – общее число вариантов режимов в матрице,

$\gamma = 2$ – число повторений в каждом варианте,

$t = 2,12$ – критерий Стьюдента при $f = 16$,

$f = N(\gamma - 1)$ – число степеней свободы;

σ^2 – дисперсия воспроизводимости.

Так доверительный интервал ε_1 (критерий оптимизации – накопления биомассы) составил 0,071, ε_2 (критерий оптимизации – выход сырого протеина) составил 0,048.

Значимость эффектов определяли путем их сравнения с соответствующим доверительным интервалом, при этом значимым является фактор, абсолютная величина эффекта которого превышает доверительный интервал.

Согласно расчетным данным, в изученном диапазоне режимных параметров значимыми являются эффекты таких уровней факторов, как температура 28°C, аэрация 1,5 л^л⁻¹·мин⁻¹, перемешивание 750 об·мин⁻¹. Поскольку эффекты фактора перемешивания (в условиях оптимизации по выходу сырого протеина) при 700 и 750 об·мин⁻¹ имеют близкие значения (0,11 и 0,14), с целью получения высокобелкового продукта перемешивание целесообразно осуществлять при 700 об·мин⁻¹. При этом уровни таких факторов как температура и аэрация, обеспечивающие наибольший выход сырого протеина и биомассы в условиях глубинном культивировании штамма-продуцента в аппаратах данного типа, совпадают.

Следует отметить, что результаты комплексной оптимизации режимных параметров культивирования не противоречат результатам однофакторной оптимизации. Так, в заданном диапазоне параметров подтвержден оптимальный температурный режим процесса – 28 °C, уточнен оптимальный режим перемешивания – 700-750 об·мин⁻¹ (при проведении однофакторной оптимизации - 700 об·мин⁻¹), выявлен оптимальный режим аэрации.

Изменение профиля режимного параметра во времени

С целью достижения высокой продуктивности штамма и получения высокобелкового продукта был проведен эксперимент со сменой температурных режимов.

Температурный режим процесса культивирования поддерживали от начала цикла до точки переключения на уровне 30°C, далее температуру снижали и поддерживали на уровне 24, 26 и 28°C до конца цикла. В контрольном эксперименте температуру поддерживали на уровне 30°C в течение всего процесса культивирования. В качестве точки переключения температурного режима было принято время культивирования 12ч, что по предварительным экспериментальным данным соответствовало середине экспоненциальной фазы роста культуры. Результаты эксперимента представлены на рисунке 4.

Согласно полученным данным, наибольшая продуктивность была достигнута при снижении температуры с 30 до 28°C через 12ч культивирования и составила 11,5 г·л⁻¹·сут⁻¹ АСМ (выход сырого протеина 5,9 г·л⁻¹ на АСМ). Несколько меньшее значение продуктивности было достигнуто при снижении температуры до 26 и 24 °C (выход сырого протеина 4,9 и 5,3 г·л⁻¹ на АСМ соответственно). Поддержание температуры культивирования на уровне 30°C в течение всего процесса культивирования позволило обеспечить лишь 8,1 г·л⁻¹·сут⁻¹ АСМ (выход сырого протеина составил 3,5 г·л⁻¹ на АСМ).

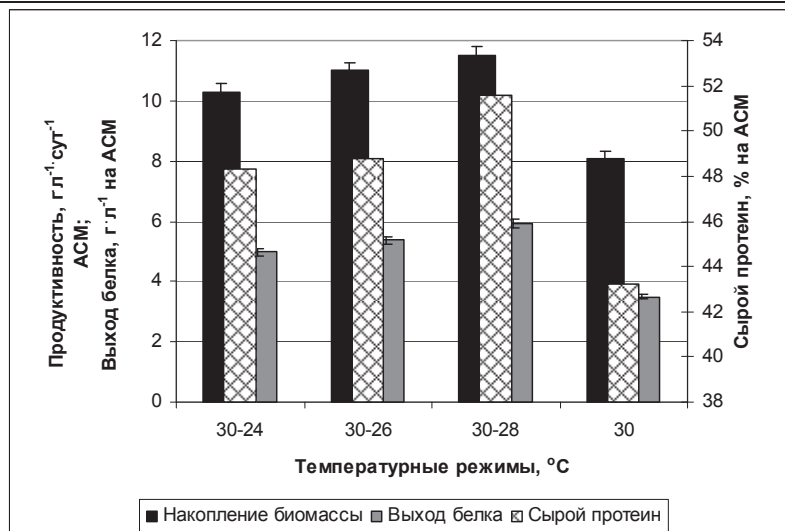


Рисунок 4. Влияние смены температурного режима на рост *Fusarium sambucinum* шт. D-104 в глубинной культуре на среде с крахмалом

Так, методом математического планирования эксперимента определены оптимальные значения режимных параметров культивирования штамма-продуцента микопротеина, а именно температура – 28°C, перемешивание – 700-750 об·мин⁻¹, аэрация - 1,5 л·л⁻¹·мин⁻¹. Показано, что результаты комплексной оптимизации режимных параметров культивирования не противоречат результатам однофакторной оптимизации.

Выявлен оптимальный режим рН-статирования при культивировании продуцента на крахмалосодержащих средах (рН 4,0).

Установлено, что применение ступенчатого температурного режима способствует повышению продуктивности штамма по биомассе и сырому протеину.

Таким образом, показана возможность направленного биосинтеза белковых веществ *Fusarium sambucinum* D-104 путем варьирования технологических параметров с целью получения пищевой белковой биомассы высокого качества.

Литература

1. Дудка И.А. Методы экспериментальной микологии: справочник/ И.А. Дудка, С.П. Вассер, И.А. Элланская и др. – Изд-во «Наукова думка», 1982. –550с.
2. Патент РФ2092179, 1997.
3. Патент РФ2040932, 1995.
4. Бирюков В.В. Основы промышленной биотехнологии/ -М.: КолосС, Химия, 2004, –295с.