

Литература

1. Парамонов Е.А., Зубов Д.В. Применение компьютерной обработки изображения для повышения точности анализа методом тонкослойной хроматографии // Инженерная физика. – 2008 №4 – с.53–58.

Выявление трофических потребностей *Fusarium sambucinum* для синтеза белковых веществ в условиях жидкофазного глубинного культивирования

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

Аннотация. В статье определены источники углерода (глюкоза, мальтоза) и азота (NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), наиболее эффективно обеспечивающие синтез белковых веществ штаммом-продуцентом в условиях жидкофазного глубинного культивирования. Выбрано основное сырье для разработки технологии получения высокобелковой биомассы на основе *Fusarium sambucinum* шт. D-104.

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

Одними из наиболее востребованных объектов современной пищевой биотехнологии являются грибные штаммы продуценты. Сочетание технологических преимуществ, широкого спектра синтезируемых метаболитов, а также отсутствия токсичности делает возможным получение целого ряда различных биотехнологических продуктов на их основе. Одним из таких продуктов является *микопротеин* (пищевая биомасса мицелиальных грибов, полученная методом жидкофазного глубинного культивирования) на основе *Fusarium sambucinum* шт. D-104. Высокая пищевая ценность микопротеина и ряд фармакологических свойств позволяют отнести этот продукт к разряду продуктов здорового питания.

Основным сдерживающим фактором в разработке промышленной технологии получения микопротеина на основе *Fusarium sambucinum* шт. D-104 является отсутствие научных основ направленного биосинтеза высокобелковой биомассы сложным эукариотическим организмом.

Принципиальное значение для синтеза белковых веществ и накопления биомассы штаммом-продуцентом имеет характер источников углеродного и азотного питания. В связи с этим целью данной работы являлось изучение влияния различных источников углерода и азота на синтез белковых веществ и накопление биомассы *F. sambucinum* шт. 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) [1].

При расчете состава сред в экспериментах по изучению утилизации различных источников углерода и азота использовали эквивалентные по углероду количества сахаров и эквивалентные по азоту количества азотистых соединений в соотношении С : N = 8 : 1 [2].

Влияние источника углерода на рост и накопление биомассы и белковых веществ в глубинных условиях изучали в конических колбах V=250 мл с объемом среды 100 мл следующего состава (г/л): NH_4NO_3 – 3,0; KH_2PO_4 – 1,2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,01; тиамин – 100γ; pH = 5,6 – 5,8. В качестве источников углерода в экспериментах сравнивали глюкозу, мальтозу, фруктозу, сахарозу, ксилозу, галактозу, раффинозу, лактозу. Влияние источников

углерода на рост штамма-продуцента оценивали на 40ч эксперимента, что соответствовало началу стационарной фазы роста культуры.

Влияние источника азота на рост и накопление биомассы и белковых веществ в глубинных условиях изучали в конических колбах $V=250$ мл с объемом среды 100 мл следующего состава (г/л): глюкоза – 20,0; KH_2PO_4 – 1,2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,2; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,01; тиамин – 100γ; $\text{pH} = 5,6 - 5,8$. В качестве источников азота в эксперименте сравнивали KNO_3 , NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, NH_4Cl , кукурузный экстракт. При расчете количества источников азота учитывали как нитратную, так и аммонийную формы.

Количество посевного материала составляло 10 % по объему. Культивирование проводили при температуре 28°C на круговой качалке (170 об/мин).

Влияние основного углеродного субстрата на рост штамма-продуцента в глубинных условиях изучали в конических колбах $V=250$ мл с объемом среды 100 мл. Для крахмалсодержащих субстратов состав среды (г/л): углеродный субстрат – 20,0; KH_2PO_4 – 1,2; NH_4NO_3 – 3,0; кукурузный экстракт – 10; $\text{pH} = 5,6 - 5,8$. Для среды с мелассой (г/л): меласса свекловичная – 50 (2% по РВ); KH_2PO_4 – 1,2; NH_4NO_3 – 3,0; $\text{pH} = 5,6 - 5,8$. Количество посевного материала составляло 10 % по объему. Культивирование проводили при температуре 28°C на круговой качалке (170 об/мин).

Накопление биомассы определяли весовым способом в пересчете на абсолютно сухую массу (АСМ). Последнюю определяли после высушивания образцов в стеклянных бюксах до постоянного веса при 105°C .

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

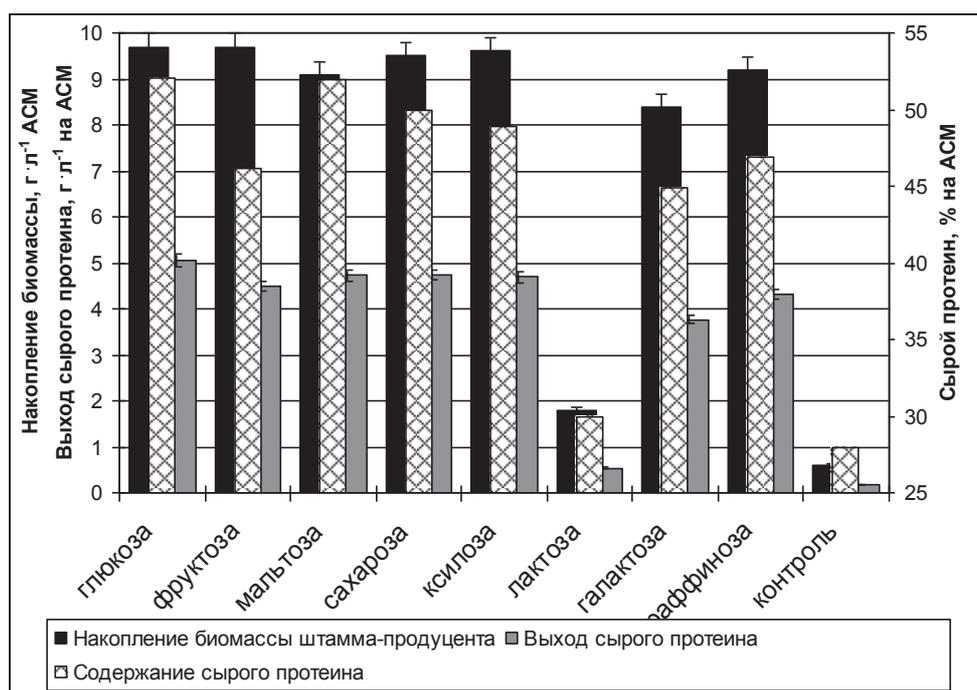


Рисунок 1. Влияние источника углерода на рост и накопление белковых веществ *Fusarium sambucinum* шт. D-104

Влияние источника углерода

Мицелиальные грибные штаммы-продуценты способны утилизировать различные источники углеродного питания [2], в том числе и олиго- и полисахариды. Опыт по изучению зависимости накопления биомассы и белковых веществ штаммом был проведен с использованием широкого спектра источников углерода, моделирующих основные виды сырья.

Согласно полученным данным (см. рисунок 1), наиболее интенсивно рост штамма-

продуцента происходит на среде с глюкозой, фруктозой, ксилозой, сахарозой. Менее перспективными в этом отношении являются раффиноза, мальтоза, галактоза, лактоза.

Характер синтеза белковых веществ штаммом несколько отличался от накопления биомассы. Наибольшее содержание сырого протеина было отмечено на среде с глюкозой (52,1% на АСМ), сахарозой (49,9% на АСМ), ксилозой (48,9% на АСМ) и мальтозой (51,9% на АСМ). Содержание сырого протеина на среде с фруктозой, обеспечившей высокое накопление биомассы, напротив, составило 48,3% на АСМ.

Таблица 1.

**Влияние источника углерода на рост и накопление белковых веществ
Fusarium sambucinum шт. D-104**

Углеродный субстрат	Накопление биомассы, г·л ⁻¹ АСМ	Содержание сырого протеина, % на АСМ
Глюкоза	9,7 ± 0,24	52,1 ± 1,3
Фруктоза	9,7 ± 0,24	46,2 ± 1,1
Мальтоза	9,1 ± 0,23	51,9 ± 1,3
Сахароза	9,5 ± 0,24	49,9 ± 1,2
Ксилоза	9,6 ± 0,24	48,9 ± 1,2
Лактоза	1,8 ± 0,05	29,9 ± 0,7
Галактоза	8,4 ± 0,21	44,9 ± 1,1
Раффиноза	9,2 ± 0,23	46,9 ± 1,1
Контроль	0,6 ± 0,01	28,0 ± 0,7

Таким образом, для обеспечения накопления высокобелковой биомассы штаммом-продуцентом предпочтительно использовать среды, содержащие в качестве основного углевода глюкозу и/или мальтозу. Использование сырья с сахарозой в качестве основного источника углерода возможно, но не позволяет в максимальной степени реализовать возможности штамма. Очевидно, что меласса, содержащая сахарозу, должна быть замена. Из промышленного сырья, содержащего глюкозу и мальтозу, можно рекомендовать как наиболее доступное и дешевое крахмалосодержащее сырье, в том числе различные виды крахмалов и муки.

Выбор основного сырья

С целью замены неперспективного для производства пищевого продукта сырья – мелассы, рекомендованной по старой технологии, провели изучение влияния различных крахмалосодержащих субстратов на рост штамма-продуцента. Эффективность субстратов оценивали по накоплению биомассы на 24 ч эксперимента.

Согласно полученным данным, штамм-продуцент активно утилизирует все изученные виды крахмалосодержащего сырья, при этом наиболее перспективными для данного продуцента являются мука кукурузная, мука тритикале и крахмал пшеничный. Экспериментально установлено, что продуктивность штамма на крахмалосодержащем сырье (9,5 – 10 г·л⁻¹·сут⁻¹) превышает данный показатель на среде с мелассой (8 г·л⁻¹·сут⁻¹).

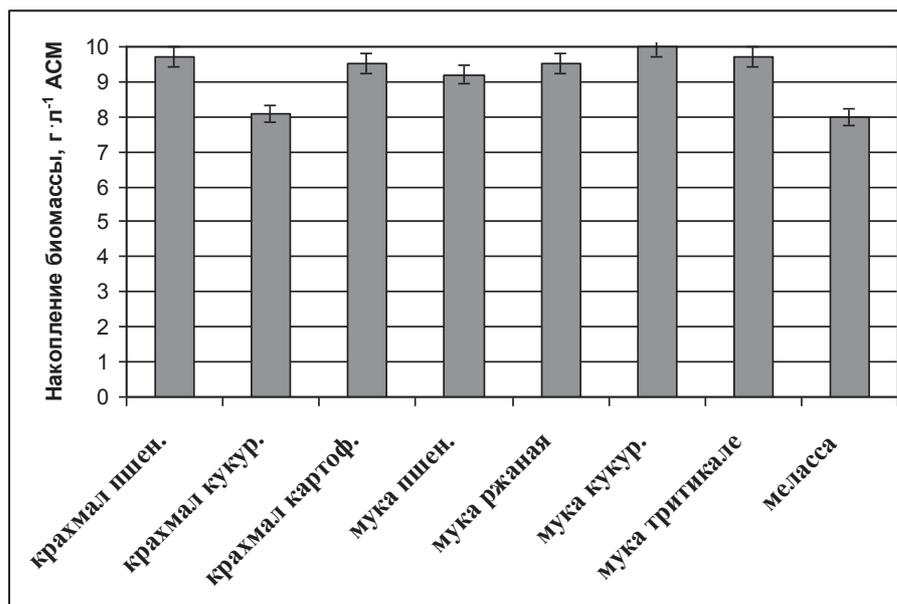


Рисунок 2. Влияние различных углеродных субстратов на рост *Fusarium sambucinum* шт. D-104 в глубинной культуре

Влияние источника азота

Считается, что значительная часть грибных штаммов-продуцентов не способна утилизировать нитратный азот [3]. Предварительным этапом нашего исследования являлось установление возможности штамма-продуцента использовать нитратный азот в качестве единственного источника азота. С целью исключения влияния других форм азота на рост штамма-продуцента в глубинной культуре посевной материал для проведения эксперимента получали путем трехкратного пересева культуры на синтетическую агаризованную питательную среду, содержащую в качестве единственного источника азота KNO_3 , с дальнейшим пересевом на жидкую питательную среду, содержащую также в качестве единственного источника азота KNO_3 .

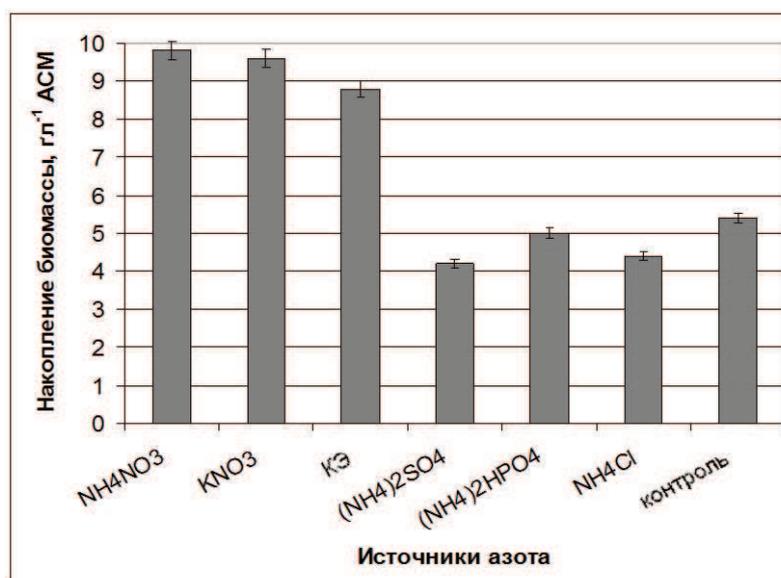


Рисунок 3. Влияние источника азота на рост *Fusarium sambucinum* шт. D-104

В результате проведения эксперимента было установлено, что культура активно усваивает как аммонийную, так и нитратную формы азота (см. рисунок 3).

Для ряда штаммов мицелиальных грибов для накопления биомассы наиболее предпочтительными являются органические источники азота [4, 5, 6]. В случае *Fusarium sambucinum* шт. D-104 нами показано, что для накопления биомассы органические формы азота не являются более предпочтительными. Наиболее эффективно рост культуры происходит на средах с NH_4NO_3 , KNO_3 и кукурузным экстрактом.

Отмечено также, что использование в качестве единственного источника азота всех аммонийных солей, за исключением NH_4NO_3 , приводит к закислению питательной среды (до значения pH 2,2-3,0) в процессе их утилизации и препятствует росту штамма.

Поскольку синтетическая среда не обладает собственной буферной емкостью, применение данных минеральных солей в качестве источников азота возможно только в условиях pH-статирования.

Следующая серия экспериментов была проведена в режиме pH-статирования 4,0. Результаты представлены на рисунке 4.

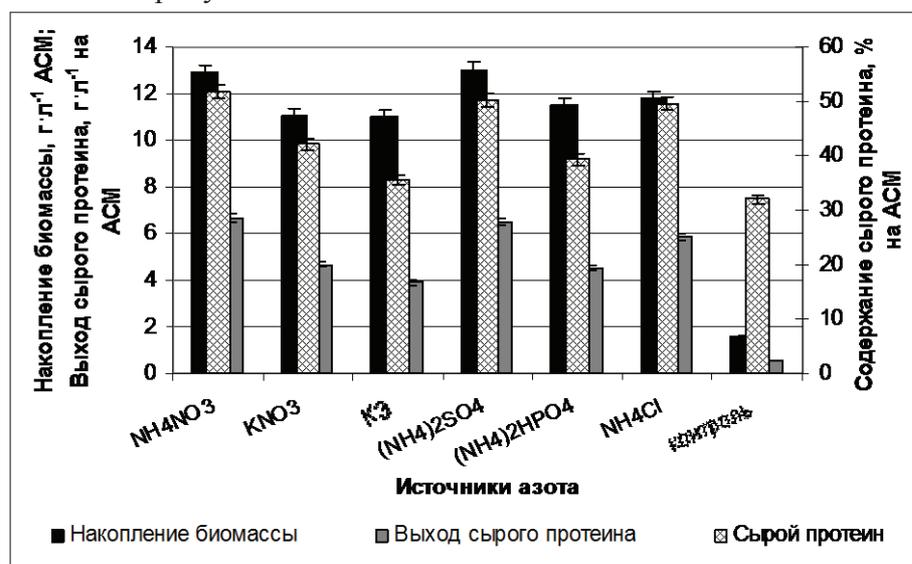


Рисунок 4. Влияние источника азота на рост *Fusarium sambucinum* шт. D-104 в режиме pH-статирования 4,0

Согласно полученным данным (см. рисунок 4), наличие режима pH-статирования, исключающее возможность закисления ферментационной среды, во всех изученных вариантах способствует активному росту культуры. Наиболее активно рост культуры происходит на средах с NH_4NO_3 (12,9 г·л⁻¹ АСМ) и $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (13,0 г·л⁻¹ АСМ).

Таким образом, в результате экспериментальных исследований установлено, что для синтеза белковых веществ *Fusarium sambucinum* шт. D-104 в условиях жидкофазного глубинного культивирования наиболее предпочтительными в качестве источников углерода являются глюкоза и мальтоза, в качестве источников азота – NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Литература

1. Патент Российская Федерация, С12 N1/14, С12 P21/00, С12 R1:645. Штамм *Fusarium sambucinum* – продуцент грибной белковой биомассы/ Горшина Е.С., Неманова Е.О., Русинова Т.В., Бирюков В.В.; заявитель и патентообладатель Университет машиностроения. – Заявка 2012138568, заявл. 10.09.2012.
2. Морозова Г.Р., Высоцкий В.Г., Сафонова Н.В., Мамаева Е.М. Промышленное получение мицелия высших грибов.– М.: ОНТИТЭИ Микробиопром, 1978.– 56 с.
3. Бухало А.С. Высшие съедобные базидиомицеты в чистой культуре – Киев: Наукова думка, 1988. – 144с.

4. Petre M. Biotechnology of mushroom pellets producing by controlled submerged fermentation/ M. Petre, A. Teodorescu, E. Tultca, C. Bejan, A. Andronescu//Romanian Biotechnological Letters. - 2010. – V. 15. -№ 2. – P. 50 – 56
5. Joo JH. Optimization of submerged culture conditions for exopolysaccharide production in *Sarcodon aspratus* (Berk) S.Ito TG-3/ J.H. Joo, J.M. Lim, H.O. Kim, S.W. Kim, H.J. Hwang, J.W. Choi and J.W. Yun // World Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2004. –Volume 20. –pp.767-773.
6. Malinowska E. Improved simultaneous production of mycelial biomass and polysaccharides by submerged culture of *Hericium erinaceum*: optimization using a central composite rotatable design (CCRD) / E. Malinowska, W. Krzyckowski, G. Lapienis, F. Herold // J Ind Microbiol Biotechnol. –2009. –Volume 36. – pp. 1513-1527.

Анализ надежности оборудования для переработки отходов производства и потребления композиционных слоистых упаковочных материалов

к.т.н. Гонопольский А.А.
Университет машиностроения
gonopol85@mail.ru

Аннотация. В статье проанализированы вероятностные характеристики отказов оборудования для переработки отходов многослойной упаковки, созданного по государственному контракту №14.527.12.0023 «Разработка комплексной опытно-промышленной технологии рециклинга отходов производства и потребления композиционных слоистых упаковочных материалов». На основании результатов подконтрольной эксплуатации опытно-промышленной технологической линии и расчетов распределений плотности вероятности отказов, определено наиболее надежное оборудование и показаны возможные меры организационного характера (корректировке графика ППР) по снижению количества отказов.

Ключевые слова: надёжность технологического оборудования, технология рециклинга отходов, многослойная упаковка.

Надежность оборудования является основой экологической безопасности производства, поскольку в случае аварии возникает вероятность загрязнения окружающей среды вредными компонентами. Для предприятий по переработке отходов это актуально еще и потому, что в случае длительной остановки линии (цеха, завода) практически всегда встает вопрос о том, где тогда перерабатывать и утилизировать отходы, поскольку прекратить их образование невозможно. Поэтому отсутствие жизнеспособной системы сбора, переработки и утилизации отходов может привести к серьезному ухудшению экологической обстановки в городе. А для того, чтобы такая система работала необходимо учитывать надежность характеристики используемого оборудования, поскольку именно они определяют работоспособность каждого предприятия и системы в целом.

Помимо возможного негативного воздействия на окружающую среду при возникновении отказов нельзя не учитывать и экономические потери: затраты на ремонт и замену деталей, недополученная прибыль и т. д.

Технологическая схемы комплексного технологического процесса рециклинга отходов производства и потребления композиционных слоистых алюминированных упаковочных материалов представлена на рисунке 1.