

К РАЗРАБОТКЕ ТЕХНОЛОГИИ И АППАРАТУРНОГО ОФОРМЛЕНИЯ ПРОИЗВОДСТВА СУБСТРАТА ИЗ ЦЕЛЛЮЛОЗОСОДЕРЖАЩЕГО СЫРЬЯ

В. Н. Долгунин, А. В. Слепых, В. А. Пронин

Кафедра «Технологии и оборудование пищевых и химических производств»,
a.slepix@yandex.ru; ФГБОУ ВО «ТГТУ», г. Тамбов, Россия

Ключевые слова: барабанный аппарат; субстрат; твердофазная биоконверсия; целлюлозосодержащее сырье.

Аннотация: В целях разработки технологии твердофазной биоконверсии целлюлозосодержащего сырья с использованием культуры гриба *Trichoderma viride* проведено исследование процесса культивирования в статическом и динамическом режимах организации процесса ферментирования. Предложен барабанный аппарат для организации процесса биоконверсии в динамическом режиме при «мягком» механическом воздействии на ферментативную среду. Установлено, что организация процесса в динамическом режиме обеспечивает более высокую интенсивность ферментирования с получением наиболее активной культуры при высокой однородности ее распределения в ферментативной среде.

Предприятия, связанные с производством макро- и микроскопических грибов, предназначенных для использования в промышленности, медицине, сельском хозяйстве и в качестве продовольствия, испытывают дефицит в качественных твердофазных органических субстратах для культивирования грибов методом твердофазного ферментирования. Например, серьезным препятствием на пути развития предприятий по производству макро- и микроскопических грибов продовольственного назначения в России является отсутствие доступного качественного и не дорогого отечественного субстрата [1]. Использование покупного импортного субстрата приводит к снижению рентабельности производства в три раза. Основной причиной наблюдаемого дефицита отечественного субстрата является недостаточно развитая технологическая база для организации процессов твердофазного ферментирования.

Вместе с тем в различных отраслях промышленности (пищевой, деревоперерабатывающей, перерабатывающей, растениеводстве и др.) и сельском хозяйстве скапливается большое количество органических целлюлозосодержащих отходов, которые являются потенциальными источниками корма, богатого питательными веществами и аминокислотами. До настоящего времени значительная часть такого рода отходов утилизируется экономически нецелесообразными и экологически вредными способами, такими как сжигание, сброс на свалки и т.д.

Такая ситуация имеет место, несмотря на то что органические отходы промышленного или сельскохозяйственного происхождения, в общем случае, представляют собой смеси, богатые сахарами, белками, жирами, целлюлозой и гемицеллюлозой, лигнином и неорганическими солями, концентрации которых варьируются в широком диапазоне [2]:

- водорастворимые соединения (сахара, аминокислоты и др.) – 2 – 30 %;
- соединения, растворимые в эфире и спирте (жиры, масла, воски) – 1 – 15 %;
- белок – 5 – 40 %;
- гемицеллюлоза – 10 – 30 %;
- целлюлоза – 15 – 60 %;
- лигнин – 5 – 30 %;
- зола – 5 – 25 %.

К основными причинами, препятствующими полномасштабной переработке углеводосодержащего сырья на основе целлюлозы в целях получения белковых продуктов традиционными биотехнологическими методами (объемного глубинного культивирования в жидкой фазе), относятся низкая рентабельность и чрезвычайно значимый негативный экологический эффект соответствующих производств. В первую очередь это является следствием низкой технологической и технико-экономической эффективности технологического узла подготовки углеводосодержащего сырья методом кислотного гидролиза (низкий выход целевого продукта, высокие энергозатраты, большое количество трудно утилизируемых отходов) [1, 2].

Анализ показывает, что большая часть перечисленных проблем может быть решена путем внедрения технологии твердофазной биоконверсии целлюлозосодержащего сырья [3, 4]. Твердофазная ферментация (ТФФ) имеет ряд преимуществ перед глубокой ферментацией:

- низкое содержание влаги уменьшает возможности контаминации бактериями и дрожжами;
- условия культивирования подобны естественной среде обитания для грибов, которые составляют основную группу микроорганизмов, используемых для ТФФ;
- более высокий уровень аэрации, особенно необходим в процессах с интенсивным окислительным метаболизмом;
- инокуляция вместе со спорами облегчает однородное рассеивание в среде;
- твердые субстраты обычно дают все питательные вещества, необходимые для роста колонии;
- обогащенные субстраты позволяют использовать более простые и экономичные конструкции биореакторов;
- малые энергозатраты;
- снижена потребность в специальных растворителях в силу высокой концентрации биопродукта;
- более высокая производительность для большинства продуктов.

Указанные преимущества свидетельствуют об актуальности исследований, направленных на разработку технологий и аппаратного оформления производств кормового продукта из отходов деревоперерабатывающего производства методом твердофазной биоконверсии. В связи с этим особую значимость приобретает поиск таких продуцентов ферментов, которые, с одной стороны, обладают высокой кормовой ценностью, а с другой – имеют высокую биокаталитическую активность при биоконверсии целлюлозосодержащего сырья.

Таким образом, одним из важнейших этапов при разработке технологии твердофазной биоконверсии целлюлозосодержащего сырья является выбор продуцента белка. Анализ литературных источников [1, 3, 4] позволяет сделать вывод о том, что в качестве эффективных продуцентов белка, способных использовать в качестве субстрата клетчатку, молочную сыворотку, мелассу, сок растений, лигнин, целлюлозосодержащие отходы деревообрабатывающей и пищевой промышленности, могут быть использованы высшие и низшие грибы. Следует отметить, что по содержанию незаменимых аминокислот белки грибного мицелия сходны с белками сои – они богаты лизином, имеют высокую биологическую усвояемость

и ценность. Такие грибы технологичны, нетребовательны к субстрату, устойчивы к экологическому стрессу [1].

В связи с бурным развитием биокаталитических процессов возрастает интерес к микроскопическим грибам рода *Trichoderma*, которые используют для получения биологически активных веществ, средств защиты растений и в качестве активного деструктора растительных полисахаридов. Микромицет рода *Trichoderma* является активным продуцентом целлюлолитического фермента и способен к глубокой деструкции до мономерных форм как клеточных стенок растений, так и трудно расщепляемых растительных полисахаридов: целлюлозы, гемицеллюлоз, пектина. При этом важно отметить, что как биодеструктор лигноцеллюлозных материалов штамм *Trichoderma viride* проявляет высокую целлюлозную активность на широком спектре питательных сред [4]. Кроме того, следует указать, что в настоящее время активному исследованию подвергаются фенолоксидазы микромицета в связи со значительной ролью данных ферментов в биодегидратации лигнина.

На основе анализа литературно-патентного обзора в качестве базового технического решения принята технология биоконверсии целлюлозосодержащего сырья в целях получения соломобелкового корма [5]. Этапы технологии получения белкового корма включают подготовку сырья и питательной среды, засев микробной культуры, твердофазную ферментацию в статическом режиме и сушку [5]. Выбор обусловлен тем, что техническое решение базируется на использовании культуры гриба *Trichoderma viride*, способной к высокой целлюлозной активности, и отличается высокой технологической надежностью. Исследование, выполненное в рамках настоящей работы, имеет своей целью поиск путей повышения интенсивности процесса ферментативного гидролиза за счет его организации в динамическом режиме выращивания культуры. С учетом регионального акцента в качестве основного источника целлюлозы взяты древесные отходы лиственных пород.

В предложенной технологии в целях интенсификации процесса твердофазного ферментолиза путем повышения активности метаболизма мицелиальных грибов в питательную среду добавляют пшеничные отруби, как источник водорастворимых витаминов группы В и микроэлементов, и солодовый экстракт, как источник моносахаров, минеральных веществ и аминокислот. В качестве ферментного биопрепарата для ферментолиза целлюлозы используют целлюлолитические ферменты, вырабатываемые культурой гриба *Trichoderma viride*.

Таким образом, твердофазный субстрат приготавливают из древесных опилок, пшеничных отрубей и солодового экстракта, присутствующих в смеси в соотношении 3:2:2,5 соответственно. Приготовление субстрата осуществляют следующим образом. Опилки или другие древесные отходы при необходимости предварительно измельчают до размера частиц 1...3 мм и смешивают с пшеничными отрубями. Полученную смесь стерилизуют, высушивают горячим воздухом при температуре 120...130 °С и смешивают с солодовым экстрактом, содержащим 14 % сухих веществ. При необходимости субстрат охлаждают до 30 °С путем аэрирования стерильным воздухом.

В подготовленный таким образом субстрат из расчета 10 % массы его компонентов вводят посевную культуру в виде водной суспензии спор мицелиальных грибов с концентрацией последних 28,5 %. В соответствии с регламентом базовой технологии полученную ферментативную среду перемешивают в течение 5 ч, затем в течение 91 ч среду подвергают аэрированию влажным воздухом при непрерывном перемешивании в режиме «мягкого» механического воздействия. В итоге общая продолжительность процесса ферментации должна составить 4 суток.

В соответствии с предлагаемой технологией ферментирование протекает в кислой среде (рН 4,5 – 6,5) при температуре 28...30 °С, влажности субстрата 60 – 75 %, постоянной объемной аэрации и непрерывном перемешивании. Ферментированную среду подвергают сушке при температуре, не превышающей 60 °С, для сохранения активности витаминов и ферментов. Получаемый после сушки продукт направляют на фасовку.

Предлагаемая технология предполагает интенсификацию процесса твердофазного ферментолиза за счет его осуществления в динамическом режиме в условиях объемного аэрирования и реализацию технологических процессов при широком использовании унифицированного оборудования. Использование унифицированного оборудования позволяет исключить непроизводительные затраты времени на выполнение загрузочно-разгрузочных операций и снизить капитальные затраты на организацию производства. В качестве основной единицы унифицированного оборудования предложено использование аппарата с вращающимся барабаном [6, 7]. Внутри барабана установлены устройства, обеспечивающие использование аппарата в качестве смесителя, стерилизатора, ферментатора и сушилки. С учетом высокой устойчивости выбранного штамма к контаминации, полученную смесь стерилизуют при высушивании горячим воздухом при температуре 130 °С в режиме интенсивного перемешивания.

Поскольку мицелий штамма *Trichoderma viride* чрезвычайно чувствителен к механическому воздействию, то для обновления поверхности контакта фаз при проведении процесса ферментолиза в динамическом режиме взаимное перемещение элементов ферментативной среды организуют в режиме ее «мягкого» естественного обрушения на откосах, формируемых в рабочем объеме аппарата.

В целях апробации предлагаемой технологии и оценки ее эффективности разработана экспериментальная установка, представляющая собой фрагмент барабанного аппарата многофункционального назначения (рис. 1). Экспериментальная установка состоит из барабана 1, закрепленного консольно на валу 4, связанном с мотор-редуктором 3 с помощью жесткой муфты. Подшипниковые опоры вала и мотор-редуктор установлены на станине 2. В барабан встроена аэрирующая насадка 5, которую удерживает в статичном состоянии кронштейн 8, прикрепленный к станине. Аэрирующая насадка связана трубопроводом с вентилятором для подачи аэрирующего воздуха. На трубопроводе установлены стерилизующий фильтр 7 и увлажнитель воздуха 6.

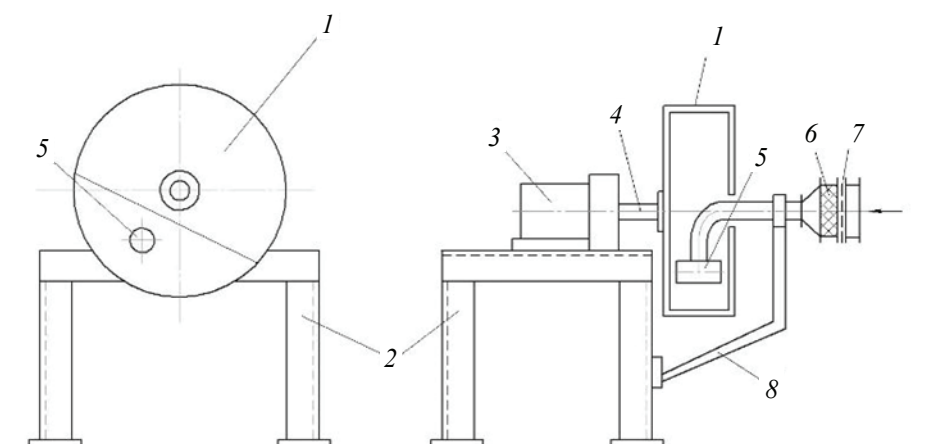


Рис. 1. Схема экспериментальной установки для подготовки субстрата целлюлозосодержащего сырья и его биокаталитического гидролиза

В данном исследовании оценка эффективности предложенного технологического решения выполнена путем сравнения кинетики процесса ферментирования при его организации в соответствии с предложенным и базовым (соответственно динамическое и статическое ферментирование) вариантами технологии. Процесс подготовки субстрата в обоих вариантах технологии идентичен, отличались только условия культивирования, которые характеризуются следующими параметрами:

– для культивирования в статическом режиме (без перемешивания в неподвижном слое толщиной 35 мм): температура 28...30 °С, рН 4,5 – 6,5, влажность 60 – 75 % при поверхностной аэрации;

– для культивирования в динамическом режиме (при перемешивании в режиме «мягкого» механического воздействия в аппарате с вращающимся барабаном): температура 28...30 °С, рН 4,5 – 6,5, влажность 60 – 75 % при объемной аэрации.

В ходе эксперимента проводилось измерение массы ферментативной среды и визуальная оценка ее состояния в зависимости от времени для двух вариантов организации процесса. Таким образом, на первом этапе исследования проведена сравнительная оценка динамики относительного прироста массы ферментативной среды в процессах динамического и статического культивирования, а также визуальный анализ состояния ферментируемой среды в аспекте развития плодовых тел микроскопического гриба в указанных условиях культивирования.

В результате исследования установлено, что общее время ферментирования (с учетом периода ввода посевной культуры) для обоих вариантов технологии целесообразно ограничить 72 ч, что на 24 ч меньше, чем регламентируется базовой технологией [5]. Очевидно, это объясняется более благоприятными для жизнедеятельности микроорганизмов условиями культивирования. Визуальный анализ состояния ферментативной среды по истечении третьих суток протекания процесса (рис. 2) позволяет сделать следующие выводы:

– в условиях статического ферментирования в периферийных зонах рабочего объема ферментативной среды внешние признаки биоконверсии отсутствуют, наблюдается относительно небольшой объем плодовых тел в остальной части ферментативной среды, и на поверхности плодовых тел начинают образовываться споры (см. рис. 2, а);



а)



б)

Рис. 2. Типовые фрагменты ферментативной среды по истечении трех суток для статического (а) и динамического (б) режимов ферментирования

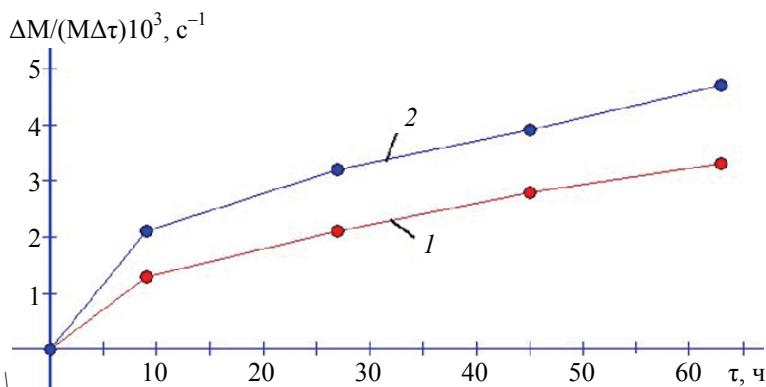


Рис. 3. Изменение относительной скорости прироста массы ферментативной среды в процессе статического (1) и динамического (2) ферментирования

– в режиме динамического ферментирования процесс протекает в отсутствие спорообразования с увеличением числа плодовых тел при их однородном распределении в объеме ферментативной среды (см. рис. 2, б).

Результаты исследования динамики изменения массы ферментативной среды в процессе культивирования представлены на рис. 3 в виде зависимости относительной скорости прироста массы от времени τ . Результаты свидетельствуют о существенно более интенсивном увеличении массы ферментативной среды в режиме динамического ферментирования. Этот результат можно рассматривать как косвенное подтверждение целесообразности организации процесса ферментации целлюлозосодержащего сырья с использованием культуры гриба *Trichoderma viride* в динамическом режиме в условиях «мягкого» механического воздействия.

Полученные результаты позволяют сделать вывод о том, что благодаря правильно подобранному составу питательной среды и поддержанию благоприятных условий культивирования выбранного микроорганизма в динамическом режиме организации процесса время его протекания существенно снизилось по сравнению с базовым вариантом технологии. При наличии перемешивания во время культивирования в режиме «мягкого» механического воздействия снижается спорообразование и более интенсивно увеличивается биомасса готового продукта, вследствие активного аэрирования и равномерного распределения всех компонентов питательной среды и микроорганизмов в рабочем объеме.

Результаты исследования динамики процесса твердофазной биоконверсии полисахаридов целлюлозосодержащего сырья будут представлены в следующей статье.

Список литературы

1. Рекида, Ю. О. Биотехнологическая переработка зерновых злаков на кормовую белок с помощью грибов рода *Trichoderma Harzianum* / Ю. О. Рекида // Молодой ученый. – 2017. – № 23 (157). – С. 23 – 27.
2. Емцев, В. Т. Микробиология : учебник для вузов / В. Т. Емцев, Е. Н. Мишустин. – 5-е изд., перераб. и доп. – М. : Дрофа, 2005. – 445 с.
3. Кулишов, Б. А. Применение технологии твердофазной ферментации в производстве биопродуктов / Б. А. Кулишов, Ле Ань Туан // Вестн. Казанского технологического ун-та. – 2014. – Т. 17, № 23. – С. 258 – 261.
4. Гнеушева, И. А. Биологическая активность грибов рода *Trichoderma* и их промышленное применение / И. А. Гнеушева, Н. Е. Павловская, И. В. Яковлева // Вестн. Орловского гос. аграрного ун-та. – 2010. – № 3 (24). – С. 36 – 39.

5. Пат. 27416 Республика Казахстан, МПК А21К 1/00. Способ получения соломобелкового корма / Э. Ж.Сауран, Д. Т. Мирталипов, Г. Ж. Ташимбетов ; заявитель и патентообладатель Товарищество с ограниченной ответственностью «Региональный технопарк в Южно-казахстанской области». – № 2012/1308.1; заявл. 12.12.2012 ; опубл. 15.10.2013, Бюл. № 10. – 3 с.

6. Dolginun, V. N. Processing of Nonuniform Granular Materials in Operation Segregated Flows / V. N. Dolginun, O. O. Ivanov, A. A. Ukolov // Вестн. Тамб. гос. техн. ун-та. – 2008. – Т. 14, № 2. – С. 321 – 327.

7. Organization of Mixing Process of Granular Materials with Portion Dosage of Some Components / V. N. Dolginun [et al.] // Вестн. Тамб. гос. техн. ун-та. – 2012. – Т. 18, № 1. – С. 108 – 114.

To the Development of Technology and Hardware Design Production of a Substrate from Cellulose-Containing Raw Materials

V. N. Dolginun, A. V. Slepikh, V. A. Pronin

*Department of Technologies and Equipment of Food and Chemical Industries,
a.slepikh@yandex.ru; TSTU, Tambov, Russia*

Keywords: drum apparatus; substrate; solid-phase bioconversion; cellulose-containing raw materials.

Abstract: In order to develop the technology of solid-phase bioconversion of cellulose-containing raw materials using the culture of the *Trichoderma viride* fungus, a study was made of the cultivation process in the static and dynamic modes of organizing the fermentation process. A drum apparatus is proposed for organizing the bioconversion process in dynamic mode with a “soft” mechanical effect on the enzymatic medium. It is established that the organization of the process in a dynamic mode provides a higher fermentation intensity with obtaining the most active culture with a high uniformity of its distribution in the enzymatic medium.

References

1. Rekida Yu.O. [Biotechnological processing of cereals into fodder protein using mushrooms of the genus *Trichoderma Harzianum*], *Molodoy uchenyy* [Young scientist], 2017, no. 23 (157), pp. 23-27. (In Russ.)

2. Yemtsev V.T., Mishustin Ye.N. *Mikrobiologiya: uchebnyk dlya vuzov* [Microbiology: a textbook for high schools], Moscow: Drofa, 2005, 445 p. (In Russ.)

3. Kulishov B.A., Tuan Le An' *Primeneniye tekhnologii tverdogaznoy fermentatsii v proizvodstve bioproduktov* [Application of solid-phase fermentation technology in the production of biological products], NEb.: Kiberleninka, 2014, 456 p. (In Russ.)

3. Kulishov B.A., Tuan Le An' [Application of solid-state fermentation technology in the production of organic products], *Vestnik Kazanskogo tekhnologicheskogo universiteta* [Bulletin of Kazan Technological University], 2014, vol. 17, no. 23, pp. 258-261. (In Russ.)

4. Gneusheva I.A., Pavlovskaya N.Ye., Yakovleva I.V. [Biological activity of fungi of the genus *Trichoderma* and their industrial application], *Vestnik Orlovskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta* [Bulletin of the Oryol State Agrarian University], 2010, no. 3 (24), pp. 36-39. (In Russ.)

5. Sauran E.Zh., Mirtalipov D.T., Tashimbetov G.Zh. *Sposob polucheniya solomobelkovogo korma* [A method of producing straw and protein feed], Republic of Kazakhstan, 2013, Pat. 27416. (In Russ.)

6. Dolginun V.N., Ivanov O.O., Ukolov A.A. Processing of Nonuniform Granular Materials in Operation Segregated Flows, *Transactions of the Tambov State Technical University*, 2008, vol. 14, no. 2, pp. 321-327. (In Eng., abstract in Russ.)

7. Dolginun V.N., Ivanov O.O., Ukolov A.A., Pronin V.A., Ryabova E.A., Larionova E.P. Organization of Mixing Process of Granular Materials with Portion Dosage of Some Components, *Transactions of the Tambov State Technical University*, 2012, vol. 18, no. 1, pp. 108-114. (In Eng., abstract in Russ.)

Über die Entwicklung von Technologie und Hardware Design bei der Herstellung eines Substrats aus zellstoffhaltigen Rohstoffen

Zusammenfassung: Um die Technologie der Festphasen-Biokonversion von zellstoffhaltigen Rohstoffen unter Verwendung der Kultur des Pilzes *Trichoderma viride* zu entwickeln, wurde der Kultivierungsprozess in den statischen und dynamischen Organisationsweisen des Fermentationsprozesses untersucht. Es ist eine Trommervorrichtung vorgeschlagen, um den Biokonversionsprozess im dynamischen Modus mit einer "weichen" mechanischen Wirkung auf das enzymatische Medium zu organisieren. Es ist festgestellt, dass die Organisation des Prozesses in einem dynamischen Modus eine höhere Fermentationsintensität bei Erhalt der aktivsten Kultur mit einer hohen Gleichmäßigkeit ihrer Verteilung im enzymatischen Medium bietet.

Sur l'élaboration de la technologie et de la conception matérielle de la production d'un substrat à partir de matières premières contenant de la cellulose

Résumé: Afin d'élaborer la technologie de la bioconversion en phase solide des matières premières contenant de la cellulose avec l'utilisation de la culture de champignon *Trichoderma viride*, est réalisée une étude du processus de cultivation dans les modes statiques et dynamiques de l'organisation du processus de la fermentation. Est proposé un appareil à tambour pour organiser le processus de la bioconversion en mode dynamique avec un effet mécanique "doux" sur le milieu enzymatique. Il est établi que l'organisation du processus en mode dynamique assure une intensité de fermentation plus élevée pour produire la culture la plus active avec une grande uniformité de sa distribution dans le milieu enzymatique.

Авторы: *Долгунин Виктор Николаевич* – доктор технических наук, профессор кафедры «Технологии и оборудование пищевых и химических производств»; *Слепых Анастасия Вячеславовна* – магистрант; *Пронин Василий Александрович* – кандидат технических наук, доцент кафедры «Технологии и оборудование пищевых и химических производств», ФГБОУ ВО «ТГТУ», г. Тамбов, Россия.

Рецензент: *Гатапова Наталья Цибиковна* – доктор технических наук, профессор, заведующий кафедрой «Технологические процессы, аппараты и технологическая безопасность», ФГБОУ ВО «ТГТУ», г. Тамбов, Россия.
