



УКРАЇНА

(19) UA (11) 34968 (13) A

(51) 6 C12N1/22, C12D13/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВІНАХІДВидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ ГІДРОЛІЗАТІВ ПИВНОЇ ДРОБИНИ

(21) 99074272

(22) 23.07.1999

(24) 15.03.2001

(46) 15.03.2001, Бюл. № 2, 2001 р.

(72) Даниляк Микола Іллєч, Янчевський Віктор Казимирович, Трутнева Ірина Анатоліївна, Михайлова Оксана Борисівна

(73) УКРАЇНСЬКИЙ НАУКОВО-ДОСЛІДНИЙ ІНСТИТУТ СПИРТУ І БІОТЕХНОЛОГІЇ ПРОДОВОЛЬЧИХ ПРОДУКТІВ ЛУКРДІСПИРТБЮПРОД, ІНСТИТУТ БОТАНІКИ ІМ. М. Г. ХОЛОДНОГО НАН УКРАЇНИ

(57) Спосіб одержання гідролізатів пивної дробини, який передбачає відмивання, сушіння, роздільнення пивної дробини, проведення подальшого гідролізу до максимального одержання в реакційній суміші вмісту глюкози, який відрізняється тим, що пивну дробину піддають безпосередньо ферментативному гідролізу при рН 4,5 - 5,0 і температурі 45 - 48°C протягом 48-50 годин, композицією целюлаз і оксидаз культур дейтеро- і базидіоміцетів - целовіридину Г 3х (*Trichoderma viride*) та прізутину Г 10х (*Coniophora hirsutus* (Fr.) Quel., ИБК-069) у співвідношенні 3:1 - 7:1 і в кількості 1,0 - 1,6% від маси сухих речовин пивної дробини.

Винахід відноситься до харчової, мікробіологічної та гідролітичної промисловості і може бути використаний у біотехнологічних процесах гідролізу полісахаридів рослинної сировини шляхом додавання до неї ферментної композиції целюлаз і оксидаз культур дейтеро- і базидіоміцетів.

Відомі способи гідролізу полісахаридів рослинної сировини до водорозчинних цукрів з використанням ферментних систем, які продукуються нищими грибами та бактеріями при безпосередньому рості таких продуцентів на поживному середовищі, яке містить целюлозний субстрат [Mandels M., Andreotti R.E. Problems and challenges in the cellulose to cellulase fermentation. - Process Biochem., 1978; Спосіб ферментативного гідролізу целлюлози Заявка Франції № 2309637, МКИ² С 13 К 1/02, публ. 31.12.76, № 53, - Изобретения за рубежом, 1977, № 1; Биохимический способ деградации лигноцеллюлозы. Заявка Великобритании № 1560021, МКИ² С 12 N 1/22, публ. 30.01.80; Ферментативный способ получения белков из отходов пивоваренного производства Заявка ФРГ № 2629298, МКИ² С 12 D 13/06, публ. 8.09.77, № 36, - Изобретения в СССР и за рубежом, 1978, №1; Спосіб расщепления лигноцеллюлозы. Заявка Франции №2368537, МКИ² С 12 D 13/00, публ. 23.06.78, № 25, - Изобретения в СССР и за рубежом, 1978, №11; Спосіб сбраживания целлюлозы. Патент США № 4266033, МКИ³ С 12 N 1/22, публ. 5.05.81, № 1, - Изобретения в СССР и за рубежом, 1982, № 1; Спосіб превращения цел-

люлозного субстрата в глюкозу при помощи *Microspora hispora*, штамм Rutgers R&W, PCT, международная заявка № 85/011065, МКИ³ С 12 P 19/14, 19/02, 7/10, 1/02; С 12 N9/42, 1/14, 1/06, D 21 C 1/00; С 12 R 1/645, публ. 14.03.85, № 7, - Изобретения стран мира, № 10, 1985]

Використання культур мікроорганізмів як продуцентів целюлозолітичних ферментів виключає технологічні стадії виділення, концентрації та очистки ферментного препарату. Такі прийоми мають значні недоліки, зокрема для накопичення біомаси мікроорганізмів та біосинтезу достатньої кількості целюлаз потрібний тривалий термін технологічного процесу. Для цих мікроорганізмів властиві сезонні коливання динаміки росту та продуктування гідролітичних ферментних систем, які вимагають стартового запасу розчинних цукрів, джерел азоту, а також вітамінів. В такому технологічному процесі значна частина цукрів, отриманих при гідролізі, споживається мікроорганізмами. Отримані при гідролізі розчинні цукри, навіть після відокремлення непрогідролізованого субстрату, містять ряд небажаних метаболітів, що призводить до значної дорожнечі процесу за рахунок організації додаткових етапів технології очистки продуктів гідролізу.

Описано ряд інших способів гідролізу рослинних целюлозомістких відходів основного виробництва харчових продуктів. Вони засновані на використанні препаратів целюлаз, які в значній кількості продукуються аскоміцетами роду *Tricho-*

(19) UA (11) 34968 (13) A

derma [Способ осахаривания лигноцеллюлозных материалов предварительной обработкой амином Заявка Франции № 2518573, МКИ³ С 12 Р 9/24, публ 24 06 83, № 25 Изобретения в СССР и за рубежом, 1983, №11, Способ осахаривания растительных волокон Заявка Японии № 57-21316, МКИ² С 12 Р 19/14, 39/00, С 12 Р 1/785, 1/885, публ 05 03 80, № 55-27686 Изобретения в СССР и за рубежом, 1982, № 11, Ферментативное осахаривание целлюлозы Патент США № 3642580, МКИ1 С 12 D 13/04, публ 2 15 72 - Изобретения за рубежом, 1972, № 5] Оцукрювання бактеріальними препаратами целюлаз [Способ гидролиза целлюлозного субстрата Заявка Франции № 2509749, МКИ С 12 Р 1 9/02, 19/12, С 12 Р 1/01, 1/38, 1/645, публ 21 01 83, № 3 Изобретения в СССР и за рубежом, 1983, № 6, Sinner M, Tagameswaran N, Dietrichs H H Enzymatische Hydrolyse der Zellwand-Abhängigkeit von Xylan-, Mannan- und Lignin-entfernung - "Papier", (BRD), 1978, 32, №12]

Відомі також способи гідролізу рослинних субстратів фільтратами культуральної рідини базидіальних грибів [А с СССР 648605, М Кл С 12 N 9/14 Способ гидролиза растительного сырья /Я-ровенко В Л, Даниляк Н И, Мельничук Г Г, Колеснева Г В Заявл 12 10 1977 № 2532925, опубл 25 02 1979, БИ №7]

З метою інтенсифікації процесу гідролізу та в зв'язку з тим, що більшість препаратів целюлаз за своїм компонентним складом і активностями ферментних компонентів не є достатньо збалансованими для ведення процесу гідролізу до розчинних цукрів, застосовують способи гідролізу з використанням комплексних препаратів, які містять комплекси гідролаз двох або декількох продуцентів [А с СССР 9490002, М Кл С 13 К 1/02 Способ получения сахара из целлюлозосодержащего сырья / Березин И В, Калунянц К А, Рабинович М Л, Клесов А А и др - Заявл 03 05 1980 № 2899311, опубл 23 10 1982]

Використання ферментних препаратів при гідролізі полісахаридів рослинної сировини в широких промислових масштабах призводить до збільшення собівартості продукту, тому предметом постійного наукового пошуку залишаються технологічні прийоми, які передбачають паралельно-послідовне використання ферментерів, а також виділення спеціальними буферними розчинами ферментів, які адсорбуються на поверхні нерозчинних продуктів гідролізу, для їх повторного використання [Ферментативный способ гидролиза целлюлозы и содержащих целлюлозу материалов Экон патент ГДР № 212534, МКИ³ С 12 Р 19/00, публ 15 08 84, № 33 Изобретения стран мира, 1985, № 1] Всі ці технологічні прийоми вбачають головну мету - зменшення витрат ферментного препарату на одиницю гідролізуючого субстрату

В цих технологічних рішеннях основним фактором, який знижує ефективність гідролітичних процесів, є інгібування основних ферментів целюлазного комплексу кінцевими продуктами гідролізу - целобіозою та глюкозою

Існує також ряд технологічних рішень, які дозволяють отримувати найбільш високий вихід кінцевого продукту, зокрема ступеневе здійснення процесу гідролізу, видалення з реакційної суміші

водорозчинних цукрів [Способ осахаривания целлюлозы Заявка Японии № 61-9039, МКИ⁴ С 12 Р 19/14, заявл 20 05 83 - Изобретения стран мира, 1986, №11]

Вішукано спосіб найбільш повного використання білків, які містять зерно ячменю [Способ получения не содержащих балластных веществ и богатых белками фракций из пивной дробины Заявка ЕС № 0050330, МКИ С 12 F 3/06, А 21 D 2/26, А 23 J 1/00, А 23 L 1/16, публ 28 04 82, № 17 -Изобретения в СССР и за рубежом, 1983, № 7] При цьому пивну дробину сушать в пульсуючому потоці горячого повітря, яку ділять на грубі шматки зернової оболонки та тонкі білкові частки

З метою пошуку найбільш ефективних способів використання вуглеводів злакових культур відомі роботи з використанням комплексного ферментного препарату з широкою субстратною специфічністю - ксилотриканфостидину П 10х і амилосубтиліну Г 20х [А с СССР 1267780, МКИ³ С 12 N 9/00 Комплексный ферментный препарат для получения пивного суслу из несоложенного сырья Орещенко А В, Калунянц К А, Колчева Р А, Месхи Р Г Заявл 13 07 1982, № 3422521, опубл 12 12 1984] З цією ж метою запропоновано використовувати целоконінгін П 10х для гідролізу некрох-малистих вуглеводів зерна після дії амілаз [Г В Пологицина, А П Рухлядева, Э Д Паукова Влияние целлюлолитических ферментов на осахаривание углеводов зерна // Ферм-ная и спирт пром-сть 1986, № 6, с 30-31] Для більш повного використання полісахаридів некрохмального вмісту запропоновано також використовувати композиції амполітичних та пектолітичних ферментних систем в три стадії [А с СССР 985025, МКИ³ С 12 К 1/06 Способ производства гидролизатов крахмалосодержащего сырья / Восханян Р А, Бачурин П Я, Устинников Б А, Мазур Н С опубл 1982]

Поряд з пошуком ефективних способів ферментативного гідролізу за рахунок застосування високопродуктивних ферментних препаратів та їх композицій, пошуком високотехнологічних прийомів самого процесу гідролізу, відомі також інженерні рішення використання технологічних субстратів та застосування їх попередньої хімічної обробки

Найбільш близьким до заявленого технічного рішення є гідроліз пивної дробини целюлазними препаратами [С В Толстова, К А Калунянц, А И Садова, Г М Лисюк Гидролиз пивной дробины целлюлазными препаратами // Ферм-ная и спирт пром-сть, 1984 № 7 с 16-17] (прототип)

За цим способом, з метою інтенсифікації гідролітичних процесів, для попередньої обробки вуглеводів субстрату піддають кислотному гідролізу, для чого використовують розчин сірчаної кислоти в співвідношенні - 25 г пивної дробини вологістю 78% та 40 мл 1% розчину сірчаної кислоти Для наступного ферментативного гідролізу пивної дробини використовують ферментні препарати целюлаз з різних продуцентів *Trichoderma viride* - целовіридин, *Aspergillus foetidus* - пектофетидин та ксилотриканфостидин Таке застосування композиційних ферментних препаратів для гідролізу пивної дробини, хоча і дозволило підвищити ступінь гідролізу, до вмісту відновлюючих цукрів 13,5-

14,7 г/л, але вміст глюкози в гідролізатах по відношенню до загальної кількості відновних цукрів складає незначну величину - 4,8-5,5 г/л, при 10% витратах препаратів

Зазначений спосіб гідролізу пивної дробини, що передбачає кислотний гідроліз, тобто попередню хімічну обробку сірчаною кислотою, не дозволяє забезпечити широкомасштабне впровадження цього способу в промисловості через те, що

- застосування композиції ферментних препаратів целюлаз в кількості 10% визначає економічну невідповідність процесу в реальних умовах,

- використання сірчаної кислоти для попередньої обробки пивної дробини, призводить до забруднення гідролізату продуктами неупорядкованого гідролізу, а саме, альдегідами, кислотами та сірчистим ангідридом,

- практичне здійснення попередньої хімічної обробки пивної дробини, тобто кислотного гідролізу викликає необхідність встановлення в технологічному циклі обладнання з нержавіючої сталі, яке дороге коштує

В основу нашого винаходу поставлено задачу удосконалення способу одержання гідролізатів пивної дробини, направлено на підвищення його продуктивності шляхом використання композиції целюлаз і оксидаз культур дейтеро- і базидіомицетів

Технічний результат, який виникає від реалізації винаходу, полягає в сполученні в одному процесі ферментативного гідролізу та окислення, що сприяє суттєвому підвищенню продуктивності способу, а саме, значному підвищенню вмісту відновних цукрів в цільовому продукті

Споживчі властивості, які пов'язані з технічним результатом, полягають в підвищенні кількості мономерів в продуктах гідролізу, що надає можливість принципово нового використання гідролізатів пивної дробини в виробництві продуктів дієтичного харчування, лікарських препаратів, кондитерських виробів, в хлібопекарстві, дозволяє використовувати пивну дробину у принципово новому призначенні, як джерело для отримання цукристої сировини, з високим вмістом глюкози

Досягається технічний результат тим, що в способі одержання гідролізатів пивної дробини який передбачає відмивання сушіння, роздрібнення пивної дробини проведення подальшого гідролізу до максимального одержання в реакційній суміші вмісту глюкози і заключається в тому, що пивну дробину піддають безпосередньо ферментативному гідролізу при pH 4,5-5,0 і температурі 45-48°C протягом 45-50 годин, композицією целюлаз і оксидаз культур дейтеро- і базидіомицетів - целовіридину Г 3х (*Trichoderma vinde*) та прзутину Г 10х (*Coriolus hirsutus* (Fr) Quel, ІБК - 069) у співвідношенні 3:1 - 7:1 в кількості 1,0-1,6% від маси сухих речовин пивної дробини

Наукове обґрунтування запропонованого способу полягає в тому що вищі базидіомицети в процесі культивування утворюють систему целюлаз, зокрема енд-1,4-β-D-ендоглюкозидази, ендоглюканази, β-глюкозидази, а також окисно-відновні ферменти фенолоксидази лакази, пероксидази, целобіозоксидази, ферменти, які розщеплюють вуглерод-вуглеродні зв'язки в протоновому боковому ланцюгу лігніну Целобіозоксидаза і це-

ло-біохіноноксиредуктаза відносяться до так званих "флавінових" ферментів, для яких характерні переходи від окисленої до відновної форми

Крім того, процес деполімеризації целюлази ферментними системами вищих базидіомицетів, спряжений з циклом конверсії лігніну та його мономерів, де глюкозооксидаза, яка перетворює глюкозу в глюколактон, генерує H₂O₂, і активує при цьому процеси деструкції лігніну та його мономерів В результаті утворення в реакційній суміші H₂O₂, процес гідролізу целюлози може здійснюватися також і неферментативним шляхом, де H₂O₂ відновлюється двувалентним залізом з утворенням -ОН



При цьому перекис водню в присутності двувалентного заліза утворює високоактивні радикали, які здійснюють окисну деградацію вуглеводів та викликають послідовне окислення глюкозидних одиниць біля атомів C₆, C₂ і C₃ до альдегідів з наступним переутворенням альдегідних груп в карбоксильні Внаслідок цього відбувається розрив глюкпіранозних кілець

Вищі базидіомицети в процесі культивування накопичують моно- та дикарбонові кислоти, внаслідок чого безпосередньо окисно впливають на целюлазні ланцюги, викликаючи також суттєву неферментативну модифікацію лігноцелюлозних субстратів [Даниляк Н.І., Семичаевский В.Д., Дудченко Л.Г., Трутнева І.А. Ферментные системы высших базидиомицетов - Киев Наук думка, 1989 -280 с.]

Саме використання для ферментативного гідролізу пивної дробини суміші ферментних препаратів, що продукують дейтеро- та базидіомицети у запропонованому співвідношенні дозволяє підвищити вихід відновних цукрів, в першу чергу, глюкози за рахунок здійснення процесів сполучення ферментативного гідролізу та окислення, в яких чинником мультиферментної композиції виступає система целюлаз і оксидаз дейтеро- та базидіомицетів

Запропоноване співвідношення ферментних препаратів одержано експериментальним шляхом і є оптимальним за максимальним вмістом відновних цукрів (див. приклад №1)

Заявлений спосіб здійснюють таким чином, тобто, пивну дробину відмивають від залишків водорозчинних цукрів та крохмалю, висушують до вологості 7,0-9,0% а потім піддають подрібненню до розмірів 0,4-1,0 мм Гідролітичний процес здійснюють при pH 4,5-5,0 та температурі 45-48°C протягом 48 - 50 годин, періодично перемішуючи реакційну суміш

Для ферментативного гідролізу полісахаридів, які містить пивна дробина, використовують ферментні препарати промисловий препарат целовіридин Г 3х - продуцент *Trichoderma vinde* і одержаний в лабораторних умовах прзутин Г 10х - продуцент *Coriolus hirsutus* (Fr) Quel, ІБК- 069 Гідроліз полісахаридів здійснюють сумішшю цих препаратів при співвідношенні 3:1 - 7:1 в кількості 1,0 -1,6% від маси сухих речовин пивної дробини

Спосіб ілюструється прикладами його конкретного використання

Приклад №1.

З метою пошуку оптимального співвідношення застосованих ферментних препаратів, при ст-

воренні композиції гідролаз на основі двох препаратів - целовірдину Г 3х та гірзутину Г 10х, для отримання максимальної кількості відновних цукрів, з найбільшим вмістом глюкози, використовували композицію обох препаратів, в кількості 1,6%,

від ваги сухих речовин пивної дробини, в співвідношенні 0,2% целовірдину Г 3х та 1,4% гірзутину Г 10х, при подальшому збільшенні кількості целовірдину, в композиційному препараті до 0,4; 0,6; 0,8; 1,2; і 1,4% від ваги сухих речовин субстрата.

Таблиця 1

Склад препарату, целовірдин Г 3х + гірзутин Г 10х	Відновні цукри, г/л	Глюкоза, г/л	Глюкоза, % від суми відновних цукрів	Співвідношення целовірдин Г 3х : гірзутин Г 10 х
0,2% + 1,4%	13,54	5,57	41,13	1 : 7
0,4% + 1,2%	14,76	4,67	41,64	1 : 3
0,6% + 1,0%	15,74	5,84	37,10	1 : 1,7
0,8% + 0,8%	16,62	5,93	35,68	1 : 1
1,2% + 0,4%	21,08	7,42	32,20	3 : 1
1,4% + 0,2%	23,21	7,32	31,54	7 : 1

Як ми бачимо з таблиці 1, максимальна кількість розчинних відновних цукрів - 21 - 23 г/л досягається при створенні композиції целовірдину Г 3х та гірзутину Г 10х в співвідношенні 3:1-7:1. В цих умовах гідролітичного процесу вміст глюкози в

гідролізатах складає 31,5 - 32,2% від загальної кількості розчинних відновних цукрів.

Показники заявленого способу, що підтверджують досягнення технічного результату в порівнянні зі способом-прототипом, наведені в табл. № 2.

Таблиця 2

Технологічні показники способу	Заявлений спосіб	Спосіб-прототип
Використовують ферментні препарати	Суміш целовірдину Г 3х та гірзутину Г 10х	Целовірдин Г 3х
Відновні цукри, г/л, в тому числі глюкоза, г/л	21,08-23,21 7,32 - 7,432	13,5- 14,7 4,8 -5,5
Кислотний гідроліз	Не здійснюють	Здійснюють

Крім того, перевагами заявленого способу є те що:

- полісахариди пивної дробини не підлягають попередньому кислотному гідролізу, що викликає забруднення продуктів гідролізу та істотне збільшення витрат на придбання технологічного

устаткування, за рахунок необхідності виготовлення його з нержавіючої сталі;

- витрати препарату в запропонованому нами способі в 6,3 - 7,1 раза менше, ніж це пропонується за прототипом, що також дозволяє знизити собівартість готового продукту.

Тираж 50 екз.

Відкрите акціонерне товариство «Патент»

Україна, 88000, м. Ужгород, вул. Гагаріна, 101

(03122) 3 - 72 - 89 (03122) 2 - 57 - 03