

М.М. Драгунова, В.П. Брехова

**МЕТОД ПЕРЕРАБОТКИ ВТОРИЧНОГО
КОЛЛАГЕНСОДЕРЖАЩЕГО СЫРЬЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДРОЖЖЕЙ
CLAVISPORA LUSITANIAE Y3723**

Описаны исследования по изучению влияния субстрата на рост *Clavispora lusitaniae* Y3723, подобраны оптимальная питательная среда и условия культивирования. Измерена удельная коллагеназная активность при выращивании культуры и исследована ее изменчивость в зависимости от добавления в культуральную жидкость различных солей. Подведены итоги оптимизации условий проведения ферментативного гидролиза вторичного коллагенсодержащего сырья.

Коллаген, вторичное сырье, переработка, продуцент коллагеназы, фермент, белок, культивирование, коллагеназная активность, биоконверсия.

Введение

Современное производство мясной продукции сопровождается большим количеством белоксодержащих отходов (кости, шкура, внутренности, сухожилия и т.д.), составляющих от 30 до 70 % от массы исходного сырья.

Нерациональное использование данных отходов приводит к потере крайне важных белков животного происхождения, которые могут использоваться в пищевых, кормовых и других целях. Помимо этого ведет к загрязнению окружающей среды.

Потенциальным источником коллагена является мясоперерабатывающая промышленность, в которой при переработке сельскохозяйственных животных скапливается до 16 % соединительной ткани [1].

Коллаген является фибриллярным белком, составляющим основу соединительной ткани организма и обеспечивающим её прочность и эластичность. Коллаген обнаружен у многоклеточных животных, отсутствует у растений, бактерий, вирусов, простейших и грибов. Это основной компонент соединительной ткани и самый распространённый протеин у млекопитающих. В тканях животных его содержание превышает 65 % [5].

Белоксодержащие отходы являются источником коллагена и продуктов его гидролиза, которые находят широкое применение в различных отраслях промышленности.

Существующие традиционные технологии переработки коллагенсодержащего сырья не являются эффективными и рациональными. При физических и химических способах переработки могут образовываться различные токсические вещества, а также потеря белка до 75 %. В связи с этим необходимы новые пути переработки и рационального использования вторичного сырья.

Один из реальных и эффективных подходов в решении поставленной задачи – это создание технологии переработки вторичного коллагенсодержащего сырья ферментативным способом с применением микроорганизмов.

Ферментативные методы переработки белоксодержащего сырья позволяют сохранять все незаме-

нимые аминокислоты. Использование готовых ферментных препаратов в промышленных масштабах может быть дорогостоящим и затратным, поэтому необходим поиск решений переработки коллагенсодержащего сырья с наименьшими затратами на производство. Снизить затраты на процесс переработки коллагенового сырья возможно с помощью внесения живой культуры микроорганизмов для переработки [6].

Метод биоконверсии заключается в культивировании штаммов продуцентом необходимого фермента непосредственно на перерабатываемом сырье. Благодаря такому способу культивирования происходит дальнейшее наиболее эффективное разложение субстрата. При использовании данного метода надо подобрать оптимальный продуцент и условия для его культивирования, для увеличения скорости и эффективности биоконверсии [3].

Учитывая требования к штамму и его функциональной эффективности, нами был выбран штамм продуцент коллагеназы *Clavispora lusitaniae* Y3723. Выбор данного штамма обусловлен простотой и низкой стоимостью питательных сред для его культивирования, обладает высокой продуктивностью коллагеназы, короткими сроками культивирования и высоким выходом фермента [8].

Учитывая актуальность проблемы, целью настоящей работы явилось определение оптимального состава питательной среды для обеспечения высокого выхода биомассы *Clavispora lusitaniae* Y3723, определение наиболее подходящей температуры культивирования, а также периода, в течение которого происходит накопление биомассы быстрее всего, определение влияния химических добавок на удельную ферментную активность. Для достижения цели поставлены следующие задачи: определить химический состав коллагенсодержащего сырья, установить влияние питательных сред на удельную активность коллагеназы, изучить влияние внешних условий на рост и продуктивность дрожжей-продуцентов и оптимизировать установленные параметры.

Объект и методы исследования

В качестве объекта исследования использовали вторичное сырье мясоперерабатывающей промышленности (коллагенсодержащее сырье убоя свиней породы «Ландрас»), полученное при первичной переработке свиной туши в условиях ЗАО «Кемеровский мясокомбинат» (Кемеровская область).

В работе использовались питательные среды: среда Чапека, мясопептонный агар и среда Луря – Бергани. В каждую из питательных сред было добавлено предварительно очищенное, обезжиренное и измельченное вторичное коллагенсодержащее сырье в концентрации 50 г/л. Для исследования влияния химических компонентов в качестве субстрата на увеличение удельной коллагеназной активности осуществлено культивирование дрожжей *Clavispora lusitanae* Y 3723 на питательном бульоне с добавлением таких солей, как NaCl, K₂HPO₄, CaCO₃. Концентрация солей выбрана согласно литературным данным NaCl – 0,25 %, K₂HPO₄ – 0,1 %, CaCO₃ – 0,3 % [6]. Коллагеназную активность определяли модификационным методом, суть которого заключается в определении оптической плотности при 340 нм и определении количества расщепленного белка (мкг/см³) культуральной жидкости за 1 час гидролиза.

При выполнении работы использовали общепринятые, стандартные и оригинальные методы исследования. Учет и подготовку результатов проводили методами статистического и регрессивного анализа.

Отбор и подготовку проб к анализу проводили по ГОСТ Р 51447-99 «Мясо и мясные продукты. Методы отбора проб» и ГОСТ Р 51448-99 «Мясо и мясные продукты. Методы подготовки проб для микробиологических исследований». Физико-химические показатели определяли по стандартным методикам по ГОСТ Р 51479-99 [2, 4].

Определение общего азота/белка проводили с помощью анализатора белка RAPID N ELEMENTAR. Принцип метода заключается в определении азота за счет сжигания анализируемого вещества известной массы в условиях высокой температуры (около 900 °С) камеры в присутствии кислорода, что приводит к высвобождению углекислого газа, воды и азота, массовая доля которого детектируется прибором. Содержание общего белка рассчитывали умножением общего азота на пересчитанный коэффициент для белков, составляющий 6,25.

Определение коллагена проводили в условиях нагревания пробы при температуре 42–44 °С в течение 2 часов с последующей обработкой ацетоновым раствором тетрахлорпарахинона в присутствии 1,4-диоксана и образующийся окрашенный раствор фотометрировали при длине волны 547 нм [7].

Результаты и их обсуждение

По химическому составу шкура свинья богата следующими витаминами и минералами: витаминами группы В, Е, Н, РР, микроэлементами (железо, цинк, йод, олово, никель, фтор, хром, медь), макроэлементами (кальций, магний, натрий, калий, фосфор, хлор, сера). В значительных количествах в

состав входят белки, жиры, углеводы и вода. Основную массу сухого вещества шкуры составляют белки (коллаген, эластин, ретикулин). Аминокислотный состав шкуры свиной характеризуется высоким содержанием глицина и аланина (соответственно 33–35 % и 10–15 % от суммы аминокислот).

В ходе проведенных исследований было установлено общее содержание белка, массовая доля которого составила 73,00 %. Результаты по содержанию белка и общего азота в исследуемом образце представлены в табл. 1. Спектр теплопроводности азота – на рис. 1.

Таблица 1

Содержание белка и азота в исследуемом образце

Образец	Общее содержание белка, %	Содержание коллагена, %	Белковые вещества неколлагеновой природы	Общее содержание азота, %
Шкура свинья	73,00±2,19	70,40±2,11	2,60±0,78	11,68±0,35

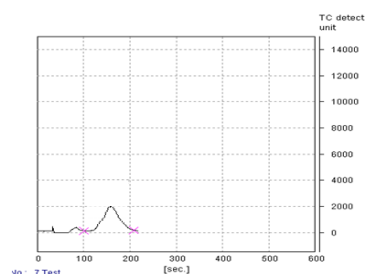


Рис. 1. Спектр теплопроводности азота

Дальнейшие исследования были направлены на изучение влияния внешних условий на рост и продуктивность дрожжей-продуцентов, а также установлена наиболее рациональная среда и температура для прироста биомассы. Результаты исследований представлены в табл. 2.

Таблица 2

Накопление биомассы в процессе культивирования *Clavispora lusitanae* Y 3723 при различной температуре

Температура, °С	Количество микроорганизмов, ×10 ³ КОЕ/г				
	Сутки				
	1-е	3-и	5-е	7-е	9-е
Среда Луря – Бергани					
20,00	98	105	120	132	136
25,00	196	390	440	574	576
30,00	18	22	80	100	105
МПБ					
20,00	106	120	144	156	156
25,00	214	590	640	676	678
30,00	20	80	100	105	108
Среда Чапека					
20,00	78	100	110	130	140
25,00	101	232	246	265	266
30,00	10	32	38	40	40

Продуцент *Clavispora lusitaniae* Y3723 выращивали в течение 9 суток на питательных средах с последующим определением белка в биомассе. В ходе исследований проводили подсчет числа выросших в чашках колоний и определяли концентрацию дрожжей в 1 г биомассы. Установлено, что максимальное накопление биомассы *Clavispora lusitaniae* Y3723 происходит на 7-е сутки на всех трёх питательных средах. Динамика накопления биомассы происходит в течение первых 3 суток, затем скорость роста значительно замедляется. На 9-е сутки наблюдается значительное замедление накопления биомассы на всех трёх питательных средах. При этом оптимальная температура культивирования составила $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ при выращивании на каждой из сред.

Из табл. 2 видно, что при повышении температуры процент коллагеназы становится малоактивным. Наибольший прирост биомассы происходит при 25°C на мясопептонном агаре.

В ходе исследований определяли содержание общего белка в течение 9 суток при 25°C . Содержание белка рассчитывали произведением общего азота на пересчетный коэффициент для белков живых организмов, составляющий 6,25. Данные представлены в табл. 3.

Таблица 3

Накопление белка
в биомассе в процессе культивирования
Clavispora lusitaniae Y3723 при температуре 25°C

Массовая доля белка, %				
Сутки				
1-е	3-и	5-е	7-е	9-е
Среда Лурия – Бергани				
2,06±0,08	20,00±0,60	24,00±0,72	30,00±0,90	31,00±0,93
Мясопептонный агар				
5,40±0,16	56,00±1,68	70,00±2,10	76,00±0,22	76,00±0,23
Среда Чапека				
5,80±1,74	22,00±0,66	26,00±0,78	30,00±0,90	31,00±0,93

На основании проведенных исследований было установлено, что на мясопептонном агаре происходит максимальное накопление белка по сравнению с другими питательными средами. Массовая доля белка на 7-е сутки составила около 76 %.

После определения оптимальных условий для выращивания *Clavispora lusitaniae* Y3723 дополнительно проведены исследования по оптимизации параметров, влияющих на активность коллагеназы.

Существует много факторов, оказывающих влияние на скорость ферментативной реакции. Для того чтобы определить наилучшие условия биотрансформации коллагеносодержащего сырья в аминокислоты, необходимо подобрать такие компоненты для питательной среды, которые увеличивали бы удельную активность коллагеназы.

При проведении исследований было изучено изменение удельной активности коллагеназы в течение 7 суток в зависимости от добавления солей. По окончании культивирования культуральную

жидкость отделяли от культуры дрожжей с помощью центрифугирования. Значения удельной коллагеназной активности измеряли на 1, 3, 5, 7 и 9-е сутки. Результаты исследований представлены в табл. 4.

Таблица 4

Изменение удельной активности коллагеназы
в процессе культивирования *Clavispora lusitaniae* Y3723

Удельная активность коллагеназы, ед/мг белка				
Сутки				
1-е	3-и	5-е	7-е	9-е
NaCl				
3,20±0,09	10,80±0,32	12,6±0,37	13,10±0,39	13,20±0,40
KН ₂ PO ₄				
2,50±0,08	11,00±0,33	13,10±0,39	14,40±0,44	14,40±0,44
CaCO ₃				
2,40±0,07	11,70±0,35	12,80±0,38	13,20±0,40	13,50±0,41

Результаты исследований показали, что наибольшая удельная коллагеназная активность была достигнута на 7-е сутки при добавлении соли KН₂PO₄ в питательную среду и составила 14,4 ед/мг.

При определении удельной активности коллагеназы определяли титруемую кислотность культуральной жидкости. Полученные результаты представлены на рис. 2.

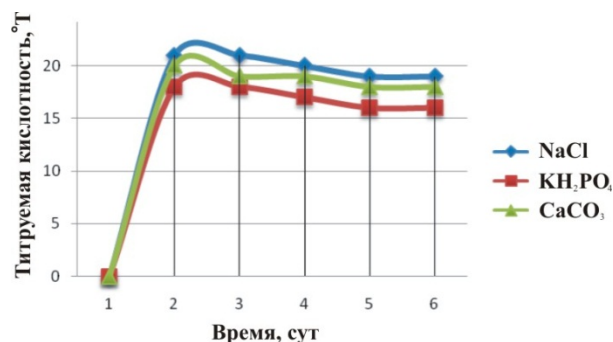


Рис. 2. Изменение титруемой кислотности
в процессе культивирования
Clavispora lusitaniae Y3723 на МПБ при 25°C

Результаты проведенных исследований показали, что в течение 7 суток титруемая кислотность снизилась с 18 до 16 °Т, что свидетельствует о снижении количества кислот в культуральной жидкости к концу инкубации. В то же самое время удельная коллагеназная активность сильно увеличилась за трое суток и незначительно увеличивалась до конца культивирования. Отсюда следует, что концентрация коллагеназы возрастала в связи высокой динамикой накопления биомассы в течение трех суток.

Выводы

На основании проведенных исследований доказано, что оптимальным временем культивирования *Clavispora lusitaniae* Y3723 составляет 7 суток при выращивании при температуре 25°C на МПБ с добавлением 0,1 %-ной соли KН₂PO₄. Добавляя соль, повышается коллагеназная активность. Оптимальность выращивания дрожжей в течение 7 суток обусловлена временем накопления биомассы *Clavispora*

lusitaniae Y3723, за которое в культуральной жидкости коллагеназа достигает активности, достаточной для эффективной биоконверсии коллагенсодержащего сырья.

Подбор оптимальных параметров культивирования позволит эффективно использовать штамм *Clavispora lusitaniae* Y3723 и увеличить выход за-

менимых и незаменимых аминокислот при переработке коллагенсодержащего сырья как источника коллагена. Применение данного способа переработки коллагенсодержащего сырья поможет рационально избавиться от отходов на мясоперерабатывающих предприятиях.

Список литературы

1. Антипова, Л.В. Использование коллагенсодержащего сырья мясной промышленности / Л.В. Антипова, И.А. Глотова. – СПб.: ГИОРД, 2006. – 384 с.
2. Антипова, Л.В. Методы исследования мяса и мясных продуктов / Л.В. Антипова, И.А. Глотова, И.А. Рогов. – М.: Колос, 2001. – 376 с.
3. Ферментативный гидролиз кератинсодержащего сырья для получения белковых гидролизатов / Н.Л. Еремеев, И.В. Николаев, И.Д. Керученко и др. // Прикладная биохимия и микробиология. – 2009. – № 6. – С. 717–724.
4. Журавская, Н.К. Исследование и контроль качества мяса и мясопродуктов / Н.К. Журавская, Л.Т. Алехина, Л.М. Отрященко. – М.: Агропромиздат, 1985. – 296 с.
5. Марри, Р. Биохимия человека: пер. с англ. в 2 т. / Р. Марри, Д. Греннер, П. Мейес, В. Родуэлл. – Т. 2. – М.: Мир, 1993. – 415 с.
6. Полетаев, А.Ю. Разработка технологии переработки кератинсодержащего сырья с использованием *Streptomyces Ornatus* S-1220: дис. ... канд. техн. наук / Полетаев А.Ю. – Кемерово, 2011. – С. 41–67.
7. Шорманов, В.К. Фотометрическое определение коллагена / В.К. Шорманов, Г.Г. Булатников // Журнал аналит. химии. – 2006. – Т. 61, № 4. – С. 351–355.
8. The D1/D2 domain of the large-subunit rDNA of the yeast species *Clavispora lusitaniae* is unusually polymorphic / M.A. Lachance, H.M. Daniel, W. Meyer et al. // FEMS Yeast Res. – 2003. – Vol. 4. – P. 253–258.

ФГБОУ ВПО «Кемеровский технологический институт пищевой промышленности»,
650056, Россия, г. Кемерово, б-р Строителей, 47.
Тел/факс: (3842) 73-40-40,
e-mail: office@kemtipp.ru

SUMMARY

M.M. Dragunova, V.P. Brehova

METHOD OF SECONDARY COLLAGEN – CONTAINING RAW MATERIAL PROCESSING USING *CLAVISPORA LUSITANIAE* Y3723 YEAST

The article deals with a research on the influence of the substrate on the growth of *Clavispora lusitaniae* Y3723. The optimum culture medium and culture conditions are found. Specific collagenase activity is measured during culture growing and its variability depending on the addition of various salts into the culture fluid has been investigated. Summed up are the results of optimization of conditions necessary for fermentative hydrolysis of secondary collagen-containing raw materials.

Collagen, secondary raw materials, processing, collagenase producer, enzyme, protein, cultivation, collagenase activity, bioconversion.

Kemerovo Institute of Food Science and Technology,
47, Boulevard Stroiteley, Kemerovo, 650056, Russia.
Phone/fax: +7(3842) 73-40-40,
e-mail: office@kemtipp.ru

Дата поступления: 16.01.2014

