

АНАЛИЗ ВЛИЯНИЯ УСЛОВИЙ РАСПЫЛИТЕЛЬНОЙ СУШКИ НА СОХРАННОСТЬ АНТИОКСИДАНТНЫХ СВОЙСТВ БИОМАССЫ *RHODOTORULA RUBRA*

М. Г. Гордиенко, А. А. Войновский, О. П. Червякова, Н. А. Суясов

Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева

Поступила в редакцию 02.11.2011 г.

Аннотация. В работе представлены исследования распылительной сушки биосуспензии *Rhodotorula Rubra* с целью получения сухого дисперсного продукта, обогащенного каротиноидами. Экспериментальные исследования проводились на установке распылительной сушки Mini Spray Dryer B-290, ВУСНІ в соответствии с ортогональным планом второго порядка. Проведен регрессионный анализ, найдены оптимальные параметры и даны рекомендации по проведению процесса сушки.

Ключевые слова: распылительная сушка, каротиноиды, *Rhodotorula Rubra*, оптимизация, антиоксидантная активность.

Abstract. The article deals with the investigation of spray drying of *Rhodotorula Rubra* biosuspension to produce dry powders enriched by carotenoids. The yeast biosuspension was spray dried by using Mini Spray Dryer B-290, ВУСНІ. The regression analysis was carried out and the optimal drying conditions were found.

Key words: spray drying, carotenoids, *Rhodotorula Rubra*, optimization, antioxidant activity.

ВВЕДЕНИЕ

Каротиноидные пигменты – обширная группа соединений, обладающих высокой биологической активностью. Исследования последних лет установили самостоятельные функции каротиноидов. Помимо провитаминового действия, каротиноиды являются мощными антиоксидантами, обеспечивающими в организме прерывание цепных свободнорадикальных реакций, защиту макромолекул и биомембран клеток от повреждений; способствуют повышению резистентности организма к различным патогенным воздействиям. Они повышают способность организма противодействовать радиационному облучению, образованию злокачественных опухолей понижают риск возникновения сердечнососудистых и желудочно-кишечных заболеваний.

Поскольку дрожжи способны синтезировать широкий спектр каротиноидов, а также обладают способностью в процессе ферментации накапливать достаточное количество биомассы эта группа эукариотических микроорганизмов может занять прочные позиции в современной биотехнологии.

После микробиологического синтеза возникает вопрос дальнейшего сохранения получаемых продуктов, который может быть решен путем высушивания очищенной биомассы. Наиболее популярным методом обезвоживания является полочная сублимационная сушка под вакуумом – периодический процесс, характеризующийся большими временными и эксплуатационными затратами. Альтернативными технологиями являются сушка в псевдооживленном слое и распылительная сушка. В данной работе проводились исследования распылительной сушки биосу-

спензии дрожжей *Rhodotorula Rubra* с целью получения порошков, обогащенных каротиноидами.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Микробиологический синтез биомассы дрожжей проводился на кафедре биотехнологий РХТУ им. Д.И. Менделеева. Интенсификация каротиногенеза пигментных дрожжей проводилась путем воздействия агентами окислительного стресса, а именно перекисью водорода. В качестве культуры был выбран штамм *Rhodotorula Rubra*. Для данного штамма дрожжей характерен биосинтез таких каротиноидов, как β -каротин, торулин и торулародин, причем основную долю пигмента составляет торулародин. Перекись водорода вносили в периодическую культуру на 24-й час культивирования, что соответствует экспоненциальной фазе роста, в диапазоне концентраций от 1.0 до 10.0 г/л. Агент окислительного стресса оказывает стимулирующий эффект на биосинтетические свойства дрожжей (увеличивается накопление биомассы и выход каротиноидов) в диапазоне концентраций от 4.0 до 6.0 г/л [1-2]. Полученная биомасса перед распылительной сушкой концентрировалась до остаточного влагосодержания 83-85 %.

Исследования распылительной сушки биомассы *Rhodotorula Rubra* проводились в Международном учебно-научном центре трансфера фармацевтических и биотехнологий при РХТУ им. Д.И. Менделеева на установке распылительной сушки Mini Spray Dryer B-290, ВÜСНІ. Схема установки представлена на рисунке 1.

При распылительной сушке жидкая биомасса подается с помощью перистальтического насоса на вход в пневматическую форсунку 4, на выходе из которой она разбивается на мелкие капли потоком сжатого воздуха, подаваемого компрессором 5. Попадая в сушильную камеру 6 капли смешиваются с потоком предварительно нагретого электрокалорифером 2 сушильного агента, движущегося сонаправлено. В результате тепло- и массообмена происходит испарение влаги и

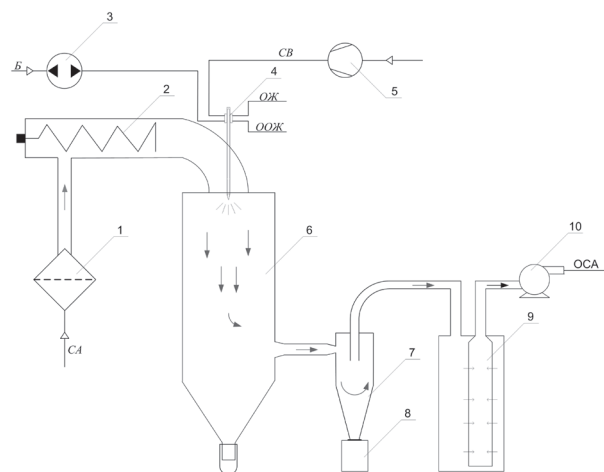


Рисунок 1. Схема установки распылительной сушки Mini Spray Dryer B-290, ВÜСНІ: 1 – фильтр очистки входящего воздуха; 2 – электрокалорифер; 3 – встроенный перистальтический насос; 4 – пневматическая форсунка с охлаждающим контуром; 5 – компрессор; 6 – распылительная камера; 7 – циклон; 8 – ёмкость для сбора продукта; 9 – Рукавный выходной фильтр; 10 – воздушный насос; СВ – сжатый воздух; ООЖ – отработанная охлаждающая жидкость; ОЖ – охлаждающая жидкость; ОСА – отработанный сушильный агент; Б – биосуспензия

образуется сухой порошок, который отделяется от теплоносителя в циклоне 7 и сыпается в емкость 8.

В работах [3-4] показано, что при распылительной сушке объектов микробиологического синтеза, функции отклика хорошо описываются нелинейными полиномами. В данной работе был использован ортогональный план второго порядка, который позволяет варьировать факторы эксперимента на пяти уровнях, путем введения опытов в центре плана и в “звездных” точках. За основу был выбран полный факторный эксперимент для четырех факторов (ядро плана включает $n_{\text{я}}=2^4=16$ экспериментов), количество опытов в центре плана было взято $n_0=3$, а в звездных точках $n_{\text{ст}}=2 \cdot 4=8$. Звездное плечо было определено исходя из количества факторов и числа опытов в центре плана $\alpha^2=2 \cdot 39$. В качестве варьируемых параметров были выбраны X_1 – температура сушильного агента (варьировалось от 130 до 210 °С),

X_2 – расход сушильного агента (от 27 до 35 м³/ч), X_3 – расход сжатого воздуха (от 428 до 1068 л/ч), X_4 – расход высушиваемой биосуспензии (от 0.35 до 0.78 кг/ч). В сводной таблице 1 представлен выбранный план в безразмерном масштабе.

В качестве выходных характеристик, определяющих качество сухого продукта, были взяты удельная антиоксидантная активность (АА, %) и остаточное влагосодержание (ОВ, %). Дополнительно были определены такие параметры как средневзвешенный диаметр частиц (\bar{d} , мкм) и индекс полидисперсности (ИП). Методики аналитических исследований приведены ниже. Результаты аналитических исследований представлены в таблице 1.

Методика определения антиоксидантной активности.

Для определения антиоксидантной активности необходимо экстрагировать исследуемое вещество из бактериальных клеток. В ходе экспериментов высушенная биомасса перетиралась с добавлением в качестве экс-

трагентов органических растворителей - ацетона. Надосадочная жидкость отделялась и смешивалась с 5 мл петролейного эфира (вторичная экстракция). В результате образовывалась двухфазная система, содержащая в более легкой фазе раствор каротиноидов в петролейном эфире, а в тяжелой – раствор ацетона и воды. Для дальнейших исследований отбиралась легкая фаза.

Удельная антиоксидантная активность определялась по способности химических соединений ингибировать реакцию аутоокисления адреналина в щелочной среде в присутствии исследуемых препаратов относительно контрольной пробы [5]. Скорость реакции оценивали спектрофотометрически, по величине оптической плотности накапливающегося продукта аутоокисления адреналина, имеющего поглощение при длине волны 347 нм, образующегося в отсутствии и присутствии исследуемых препаратов. Для проведения реакции аутоокисления 100 мкл 0.1 % раствора адреналина гидрохлорида смешивали с 2 мл 0.2 М карбонатного буфера (рН=10.65) и 10 мкл

Таблица 1.

Сводная таблица параметров проведения распылительной сушки биосуспензии и полученных результатов

№	X_1	X_2	X_3	X_4	АА, %	ОВ, %	\bar{d} , мкм	ИП
1	+1	+1	+1	+1	7.7	2.3	3.9	3.5
2	-1	-1	+1	+1	19.7	3.8	5.1	5.1
3	+1	-1	-1	+1	40.3	3.7	13.9	9.3
4	-1	+1	-1	+1	17.9	3.1	7.3	8.9
5	+1	-1	+1	-1	29.5	3.4	9.5	6.6
6	-1	+1	+1	-1	43.1	3.6	8.2	6.2
7	+1	+1	-1	-1	57.0	2.6	8.2	8.8
8	-1	-1	-1	-1	53.8	3.6	13.5	8.9
9	+1	-1	+1	+1	51.9	2.9	6.3	5.7
10	-1	+1	+1	+1	11.6	3.0	5.1	4.5
11	+1	+1	-1	+1	53.2	2.2	6.7	9.9
12	-1	-1	-1	+1	21.6	3.2	8.9	6.6
13	+1	+1	+1	-1	29.4	2.8	9.0	7.2
14	-1	-1	+1	-1	35.9	2.6	8.1	6.3
15	+1	-1	-1	-1	48.5	2.1	12.3	8.6
16	-1	+1	-1	-1	16.8	1.7	4.4	3.8
17	0	0	0	0	17.5	1.6	6.0	4.9
18	0	0	0	0	10.3	1.8	4.9	4.0
19	0	0	0	0	8.7	1.9	8.0	6.1
20	1.546	0	0	0	9.9	1.6	4.1	4.7
21	-1.546	0	0	0	0	3.0	6.8	7.2
22	0	1.546	0	0	15.0	2.0	4.2	4.4
23	0	-1.546	0	0	7.2	1.6	5.4	4.8
24	0	0	1.546	0	10.4	3.0	4.2	4.8
25	0	0	-1.546	0	27.3	4.1	5.3	4.2
26	0	0	0	1.546	39.5	2.8	9.8	6.2
27	0	0	0	-1.546	0	2.3	5.4	6.0

петролейного эфира. Анализируемую пробу перемешивали, помещали в спектрофотометр и измеряли величину оптической плотности в течение 3 минут (контрольная проба). Далее проводили реакцию аутоокисления адреналина в присутствии экстрагированных антиоксидантов. В этом случае вместо 10 мкл петролейного эфира в пробу добавляли 10 мкл отобранной легкой фракции.

С помощью программных средств полученные кривые накопления продуктов аутоокисления были обработаны с целью определения антиоксидантной активности сухого образца и исходной биомассы. Удельную АА находили как процентное отношение этих двух величин.

Методика определения остаточного влагосодержания

Для определения остаточного влагосодержания исследуемый образец помещался в бюкс. Измерение веса бюкса с порошком осуществлялось с помощью аналитических весов с точностью до третьего знака после запятой. После взвешивания досушка образца проводилась в течении 6 часов при температуре 100 °С, после чего образец охлаждали в эксикаторе и взвешивали. Расчет остаточного влагосодержания производили по формуле:

$$ОВ = \frac{(m_0 - m_k)}{m_0}, \quad (1)$$

где m_0 – масса исходного образца, m_k – масса образца после досушки.

Методика определения средневзвешенного диаметра и индекса полидисперсности

Для определения средневзвешенного диаметра и индекса полидисперсности были предварительно проведены микроскопические исследования при помощи оптического микроскопа Micros MC 100 (ТХР), Австрия, снабженного насадкой с видеокамерой, позволяющей передавать и сохранять фотографии на компьютере. Определение размеров частиц по фотографиям, полученным при заданном увеличении, проводили при помощи свободно распространяемого программного обеспечения UTHSCSA ImageTool v.2.00. Калибровку производили по изображению камеры Горяева, снятой при том же увеличении.

Статистическую обработку осуществляли в Excel 2007, на основе данных о размере 100 частиц каждого образца. Средневзвешенный диаметр рассчитывался по следующей формуле:

$$\bar{d} = \frac{\sum_{i=1}^m \bar{d}_i \cdot n_i}{N}, \quad (2)$$

где M – число фракций, \bar{d}_i – средний диаметр частиц во фракции в i -ой фракции, n_i – число частиц в i -ой фракции, N – число анализируемых частиц.

Индекс полидисперсности сыпучих материалов характеризует однородность гранулометрического состава и представляет собой среднеквадратичное отклонение размера гранул от эквивалентного диаметра.

$$ИП = \sqrt{\frac{k \cdot \sigma^2}{k-1}} = \sqrt{\left(\frac{1}{k-1}\right) \cdot \sum_{i=1}^k (d_i - d_s)^2}, \quad (3)$$

где σ^2 – дисперсия; d_i – i -й элемент выборки; d_s – среднее арифметическое выборки; k – объем выборки.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В соответствии с полученными данными был проведен регрессионный анализ. Коэффициенты уравнения регрессии находились не зависимо друг от друга по формуле (4), а дисперсии коэффициентов по формуле (5).

Дисперсия воспроизводимости оценивалась по результатам трех опытов, поставленных в центре плана по формуле (6).

$$b_j = \frac{\sum_{i=1}^n x_{ji} \cdot y_i}{\sum_{i=1}^n x_{ji}^2}, \quad (4)$$

$$S_{b_j}^2 = \frac{S_{\text{восп}}^2}{\sum_{i=1}^n x_{ji}^2}, \quad (5)$$

$$S_{\text{восп}}^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}{n-1}, \quad (6)$$

Уравнение регрессии второго порядка в общем виде представлено формуле 7. Значимость эффектов факторов проверялась по критерию Стьюдента по формуле 8.

$$\hat{y} = b_0' + \sum_{j=1}^k b_{1j} x_j + \sum_{i,u=1}^k b_{2iu} x_i x_u + \sum_{i=1}^k b_{3i} (x_i^2 - \bar{x}_i^2), \quad (7)$$

$$t_j = \frac{|b_j|}{s_{b_j}}, \quad (8)$$

где b_j – эффект фактора, S_{b_j} - ошибка j-го эффекта.

Поскольку при расчете по матрице планирования требуется преобразование столбцов для квадратичных эффектов, то для того чтобы перейти к обычной форме уравнения регрессии второго порядка, определяют b_0 по формуле 9 и оценивают с дисперсией по формуле 10.

$$b_0 = b'_0 - b_{11} \bar{x}_1^2 - \dots - b_{kk} \bar{x}_k^2, \quad (9)$$

$$s_{b_0}^2 = s_{b_0}^2 + (\bar{x}_1^2) \cdot s_{b_{11}}^2 + \dots + (\bar{x}_k^2) \cdot s_{b_{kk}}^2, \quad (10)$$

Адекватность уравнений проверялась по критерию Фишера.

В результате проведенного регрессионного анализа были получены следующие регрессионные уравнения:

Зависимость удельной антиоксидантной активности от факторов:

$$Y_1 = 6.9420 \cdot X_1 - 5.1199 \cdot X_3 - 5.0469 \cdot X_1 \cdot X_3 + 7.6722 \cdot X_2^2 + 10.9338 \cdot X_3^2 + 9.3490 \cdot X_4^2 \quad (11)$$

Зависимость остаточного влагосодержания от факторов:

$$Y_2 = 0.0181 - 0.0023 \cdot X_1 - 0.0017 \cdot X_2 + 0.0070 \cdot X_3^2 + 0.0028 \cdot X_4^2 \quad (12)$$

Зависимость индекса полидисперсности от факторов:

$$Y_3 = 8.7323 + 4.041 \cdot X_3 + 2.953 \cdot X_3 \cdot X_4 + 2.772 \cdot X_1^2 + 2.996 \cdot X_4^2 \quad (13)$$

Зависимость средневзвешенного диаметра от факторов:

$$Y_4 = 0.945 - 0.177 \cdot X_1 - 0.072 \cdot X_2 + 0.08 \cdot X_2 \cdot X_3 - 0.074 \cdot X_2 \cdot X_4 - 0.106 \cdot X_2^2 + 0.157 \cdot X_3^2 \quad (14)$$

На рисунках 2-5 представлены поверхности отклика для АА, ОВ, средневзвешенного диаметра и ИП соответственно, построенные от расходов сжатого воздуха (X_2) и высушиваемой биомассы (X_4), так как эти два параметра сильно влияют на отклик. Как уже отмечалось ранее, основными качественными характеристиками продукта являются удельная АА и ОВ. Из рисунков 2-3 видно, что полученные поверхности отклика имеют

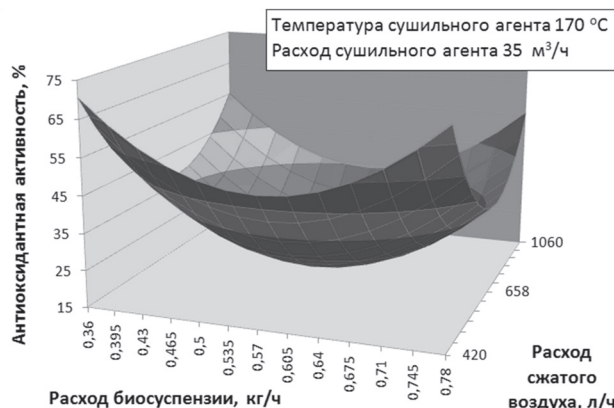


Рис. 2. Влияние расходов сжатого воздуха и биосуспензии на удельную антиоксидантную активность продукта

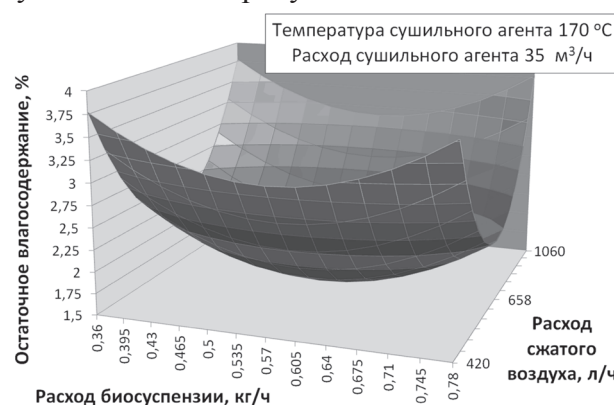


Рис. 3. Влияние расходов сжатого воздуха и биосуспензии на остаточное влагосодержание

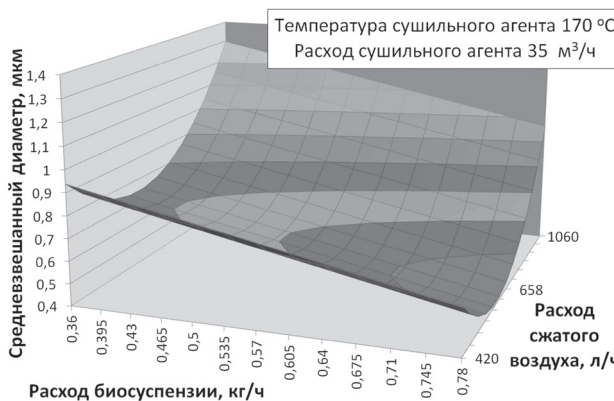


Рис. 4. Влияние расходов сжатого воздуха и биосуспензии на средневзвешенный диаметр частиц

экстремумы. Кроме того, высокие значения АА соответствуют большим значениям остаточного влагосодержания. Зависимости средневзвешенного диаметра и ИП имеют более сложный характер.

При сушке биосуспензии сохранение антиоксидантной активности и низкое остаточное

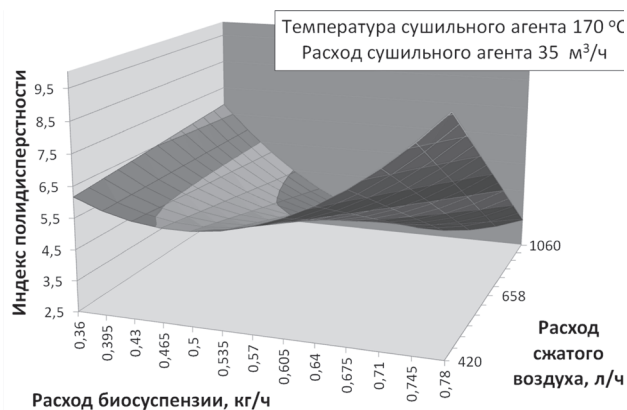


Рис. 5. Влияние расходов сжатого воздуха и биосуспензии на индекс полидисперсности

влажностное содержание являются первостепенными задачами, поскольку обеспечивают качество и сохранность продуктов. Используя полученные уравнения регрессии, были найдены оптимальные условия. Было установлено, что оптимальное значение удельной АА (максимум) получается при следующих значениях: $X_1=1.546$ (210 °C), $X_2=-1.546$ (27 м³/ч), $X_3=-1.546$ (428 л/ч), $X_4=-1.546$ (0.35 кг/ч).

Оптимальное значение остаточной влажности (минимум) достигается тогда, когда факторы принимают следующие значения: $X_1=1.546$ (210 °C), $X_2=1.546$ (35 м³/ч), $X_3=0$ (658 л/ч), $X_4=0$ (0.57 кг/ч).

Так как координаты локальных оптимумов не совпадают, была применена свертка многокритериальной задачи методом утопической точки. Для построения функции желательности проводилась нормализация значений всех критериев следующим образом:

$$f_j^{норм}(x_i) = \frac{f_j(x_i)}{f_j^*}, \quad j = 1, 2, \dots, q, i = 1, 2, \dots, k, \quad (15)$$

Координаты утопической точки в пространстве векторных оценок определялись по следующим формулам:

$$F^* = (f_1^*, f_2^*, \dots, f_q^*), \text{ где } f_j^* = \text{opt } f_j(x_i), j = 1, 2, \dots, q \quad (16)$$

После этого для каждой экспериментальной точки (для каждого опыта) рассчитывалось расстояние до утопической точки в пространстве векторных оценок по формуле:

$$d = \sqrt{(f_1^* - f_1^{норм}(x_i))^2 + (f_2^* - f_2^{норм}(x_i))^2 + \dots + (f_q^* - f_q^{норм}(x_i))^2} \quad (17)$$

Таким образом, задача сводится к однокритериальной, единственным критерием которой является расстояние до утопической точки. Для полученной функции желательности был проведен регрессионный анализ и определены координаты оптимума (точка компромисса):

$$X_1=1.546 \text{ (210 °C)}, X_2=1.546 \text{ (35 м³/ч)}, X_3=-1.546 \text{ (428 л/ч)}, X_4=0.4 \text{ (0.626 кг/ч)}.$$

Для проверки полученных данных были проведены дополнительные эксперименты, условия и результаты которых, представлены в таблице 2.

Из представленных в таблице 2 данных, видно, что наилучшие значения удельной АА достигаются при условиях локального оптимума для данной характеристики. Поскольку остаточное влажностное содержание во всех трех дополнительных экспериментах не превышает 3 % (для биологически активных веществ допустимое ОВ до 5 %), а максимальное значение удельной АА в данном случае отличается на 14 %, то именно эти условия: температура сушильного агента 210 °C, расход сушильного агента 27 м³/ч, расход сжатого воздуха 428 л/ч,

Таблица 2.

Сводная таблица оптимальных параметров проведения распылительной сушки биомассы и полученных результатов

Тип оптимума	Параметры	Результаты	
		АА, %	ω , %
Локальный (критерий – антиоксидантная активность)	$X_1=1.546$ $X_3=-1.546$ $X_2=-1.546$ $X_4=-1.546$	57.5	2.6
Локальный (критерий – остаточное влажностное содержание)	$X_1=1.546$ $X_3=0$ $X_2=1.546$ $X_4=0$	20.5	1.9
Точка компромисса	$X_1=1.546$ $X_3=-1.546$ $X_2=1.546$ $X_4=0.4$	43.4	2.1

расход высушиваемой биосуспензии 0.35 кг/ч, могут быть рекомендованы для распылительной сушки биосуспензии, содержащей обогащенные каратиноидами дрожжи *Rh. Rubra*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе был исследован процесс получения сухой биомассы дрожжей *Rh. Rubra*, как источника каратиноидов. Экспериментально показано, что распылительная сушка дрожжей позволяет получать сухой материал с частично сохранившимися антиоксидантными свойствами. Проведенный регрессионный анализ полученных данных позволил выявить ключевые факторы, влияющие на качественные характеристики продукта и найти оптимальные условия проведения процесса распылительной сушки биомассы *Rh. Rubra* в аппарате Mini Spray Dryer, ВУСНІ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Червякова О.П. Изучение каротиногенеза дрожжами *Rhodotorula rubra* / О.П. Червякова, Н.А. Суясов, И.В. Шакир // Материалы Пятого Московского международного конгресса: «Биотехнология: состояние

и перспективы развития». М.: ЗАО «Экспобиохим-технологии», РХТУ им. Д.И. Менделеева. — 2009. — С. 396-397.

2. Червякова О.П. Получение микробной биомассы, обогащенной каротиноидами. / О.П. Червякова // Успехи в химии и химической технологии: сб. науч. тр. Том XXIV, № 11 (116). — М.: РХТУ им. Д.И. Менделеева, 2010. — с. 51-53.

3. Luna-Solano G. Optimization of brewer's yeast spray drying process / G. Luna-Solano [et al.] // Journal of Food Engineering. — 2005. — 68. — P. 9-18.

4. Ahi M. Optimization of Leavening Activity of Baker's Yeast During the Spray-Drying Process / M. Ahi, M.S. Hatamipour, A. Goodarzi // Drying Technology. — 2010. — 28. — P. 490-494.

5. Пат. 2144674 Российская Федерация, МПК7 G 01 N 33/52, G 01 N 33/68. Способ определения антиоксидантной активности супероксиддисмутазы химических соединений / Сирота Т. В.; заявитель и патентообладатель Сирота Т.В. — № 99103192/14; заявл. 24.02.1999; опубл. 20.01.2000.

Гордиенко Мария Геннадьевна — старший преподаватель кафедры КХТП Российского химико-технологического университета им. Д.И. Менделеева; e-mail: chemcom@muctr.ru, gordienko_mariya@mail.ru

Войновский Александр Александрович — аспирант кафедры КХТП Российского химико-технологического университета им. Д.И. Менделеева; e-mail: a.a.voynovskiy@gmail.com

Червякова Ольга Петровна — аспирант кафедры биотехнологии Российского химико-технологического университета им. Д.И. Менделеева; e-mail: chemcom@muctr.ru

Суясов Николай Александрович — доцент кафедры биотехнологии Российского химико-технологического университета им. Д.И. Менделеева; e-mail: nik_suyasov@mail.ru

Gordienko Mariya G. — professor assistance of Cybernetic Department, Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, e-mail: chemcom@muctr.ru, gordienko_mariya@mail.ru

Voynovskiy Alexander A. — PhD student of Cybernetic Department, Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, e-mail: chemcom@muctr.ru, a.a.voynovskiy@gmail.com

Chervyakova Olga P. — PhD student of Biotechnology Department, Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, e-mail: chemcom@muctr.ru

Suyasov Nikolay A. — Associate Professor of Biotechnology Department, Mendeleev University of Chemical Technology of Russia; e-mail: nik_suyasov@mail.ru