

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
РОССИЙСКИЙ ХИМИКО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ Д. И. МЕНДЕЛЕЕВА

УСПЕХИ
В ХИМИИ И ХИМИЧЕСКОЙ
ТЕХНОЛОГИИ

Том XXXII

№ 12

Москва
2018

УДК 66.01-52

ББК 24. 35

У78

Рецензент:

Российский химико-технологический университет
имени Д. И. Менделеева

Успехи в химии и химической технологии: сб. науч. тр. Том XXXII,
У78 № 12 (208). – М.: РХТУ им. Д. И. Менделеева, 2018. – 88 с.

В сборник вошли статьи по актуальным вопросам в области теоретической и экспериментальной химии.

Материалы сборника представлены для широкого обсуждения на XIV Международном конгрессе молодых ученых по химии и химической технологии «УССТ-2018», XXXII Международной конференции молодых ученых по химии и химической технологии «МКХТ-2018», ряде международных и российских конференций, симпозиумов и конкурсов, а также на интернет-сайтах.

Сборник представляет интерес для научно-технических работников, преподавателей, аспирантов и студентов химико-технологических вузов.

УДК 66.01-52

ББК 24. 35

ISSN 1506-2017

© Российский химико-технологический
университет им. Д. И. Менделеева, 2018

УДК 615.012.6

Васина Д.В., Мучкинова С.Д., Чернова К.С., Калёнов С.В., Баурина М.М.

ПОЛУЧЕНИЕ РНК ИЗ ОСАДОЧНЫХ (НИЗОВЫХ) ДРОЖЖЕЙ ПИВОВАРЕННОГО ПРОИЗВОДСТВА

Васина Дарья Валерьевна, студентка 4 курса факультета биотехнологии и промышленной экологии, e-mail: baurinamm@mail.ru;

Мучкинова Санда Давидовна, студентка 4 курса факультета биотехнологии и промышленной экологии;

Чернова Ксения Сергеевна, студентка 4 курса факультета биотехнологии и промышленной экологии;

Калёнов Сергей Владимирович, к.т.н, доцент кафедры биотехнологии;

Баурина Марина Михайдовна, к.х.н, доцент кафедры биотехнологии;

Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия
125480, Москва, ул. Героев Панфиловцев, д. 20.

*В настоящей работе предложен источник получения рибонуклеиновой кислоты - вторичное сырьё осадочные (низовые) дрожжи пивоваренных производств. Были проведены сравнительные исследования по определению потенциала РНК низовых дрожжей и при культивировании в биореакторе. Содержание РНК в образцах низовых дрожжей не превышало 2,6%. Подобраны условия для роста дрожжей *Saccharomyces carlsbergensis*: при культивировании дрожжей в биореакторе содержание рибонуклеиновой кислоты – свыше 8%.*

Ключевые слова: нуклеинат натрия, рибонуклеиновая кислота, низовые дрожжи, вторичное сырьё, пивоварение

OBTAINING RNA FROM A BOTTOM YEAST OF BREWERY PRODUCTION

Vasina D.V., Muchkinova S.D., Chernova K.S., Kalenov S.V., Baurina M.M.

D. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, Russia

*In the present work, this paper, we propose a source for the production of ribonucleic acid, the secondary raw material of the sedimentary (bottom) yeast of breweries. Comparative studies were carried out to determine the potential of bottom yeast RNA and that during cultivation in a bioreactor. The RNA content in the samples of the bottom yeast did not exceed 2.6%. The conditions for the growth of yeast *Saccharomyces carlsbergensis* were selected: when yeast is cultivated in the bioreactor, the content of ribonucleic acid is more than 8%.*

Keywords: sodium nucleate, ribonucleic acid, bottom yeasts, brewing secondary raw materials

Анализ литературных источников и патентных материалов за последнее десятилетие показывает перспективность разработки технологий по переработке побочных продуктов пищевых производств. В мировой практике, например, в таких странах, как Германия, США, Франция, Великобритания и Япония, активно ведутся разработки по рациональному использованию сырья, а также безотходных технологий переработки вторичных ресурсов. Разработка технологий рационального использования побочных продуктов пищевых производств является важнейшей задачей развития современного промышленного биотехнологического производства, например, в такой отрасли пищевой промышленности, как пивоварение. В последнее время большое количество побочных материальных ресурсов таких производств создает неблагоприятную обстановку и в экологическом отношении. Основными побочными продуктами наряду с пивной дробинкой, бардой и солодовыми ростками являются остаточные пивные дрожжи [1,2]. Однако, основными факторами, препятствующими широкому использованию отработанных деактивированных пивных дрожжей, являются их небольшой срок хранения, создающий ряд проблем при реализации, и наличие нуклеиновых кислот.

Осадок пивных (низовых) дрожжей пивоваренного производства содержит набор

ценных биологически активных веществ - белков, аминокислот, углеводов, витаминов, пищевых волокон, микроэлементов. Клетки дрожжей содержат 8-12 мас. % суммарных нуклеиновых кислот, из которых на РНК приходится 90%. Дрожжевая РНК может рассматриваться как перспективное сырьё для получения ряда медицинских препаратов: нуклеозидов и их аналогов [3].

Дрожжи, применяемые в пивоварении, относятся к классу *Ascomycetes*, порядку *Endomycetales*, семейству *Saccharomycetaceae*, роду *Saccharomyces*, видам *Saccharomyces cerevisiae* и *Saccharomyces carlsbergensis* [4]. При низкой температуре и анаэробных условиях размножение дрожжей замедляется, но вырастают они крупными с большим запасом резервных веществ и высокой бродильной активностью. Эти дрожжи хорошо бродят при низких температурах и используются для приготовления стандартного и сортового пива. Образцы дрожжей, используемые в работе, были получены от Завода Московской Пивоваренной Компании (Мытищи, Россия) с мощностью производства пива 510 гектолитров в месяц. Побочные продукты пивоваренной промышленности, а именно остаточные пивные дрожжи являются значимыми ресурсами.

При низовом брожении используют дрожжи *Saccharomyces carlsbergensis* и *Saccharomyces*

ivarum. Дрожжи *Saccharomyces carlsbergensis* являются факультативными анаэробами, относятся к дрожжам низового брожения пивного сула, сбраживание происходит при температуре 6-8°C. Процесс сбраживания идет не интенсивно и дрожжи оседают на дно ферментера, при этом образуется плотный осадок. Низовые дрожжи – истощенные, так как процесс проходит в анаэробных условиях и при низких температурах. В большинстве случаев низовые дрожжи способны сбраживать спирт в бедных сахарами бражках при низких температурах, склонны к агглютинации. По окончании брожения, как правило, образуют плотный осадок с пониженной физиологической активностью и большим количеством мертвых клеток дрожжей.

Содержание нуклеиновых кислот в образцах определяли методом Спирина. В образце низовых дрожжей содержание РНК не превышало 2,6%.

Для изучения влияния физиологического состояния дрожжей на содержание РНК в дрожжевых клетках была выделена чистая культура методом Коха (Рис. 1). На агаризованной питательной среде колонии дрожжей имеют желтовато-белый цвет, круглую форму, выпуклый профиль, гладкий край, однородную структуру.

Изучение морфологии микроорганизмов методом микроскопии выявило, что формы клеток пивных дрожжей лимонopodobные, круглые или овальные, клетки достигают размеров 5-10 × 5-13 мкм (Рис. 2).



Рис. 1. Получение чистой культуры методом Коха

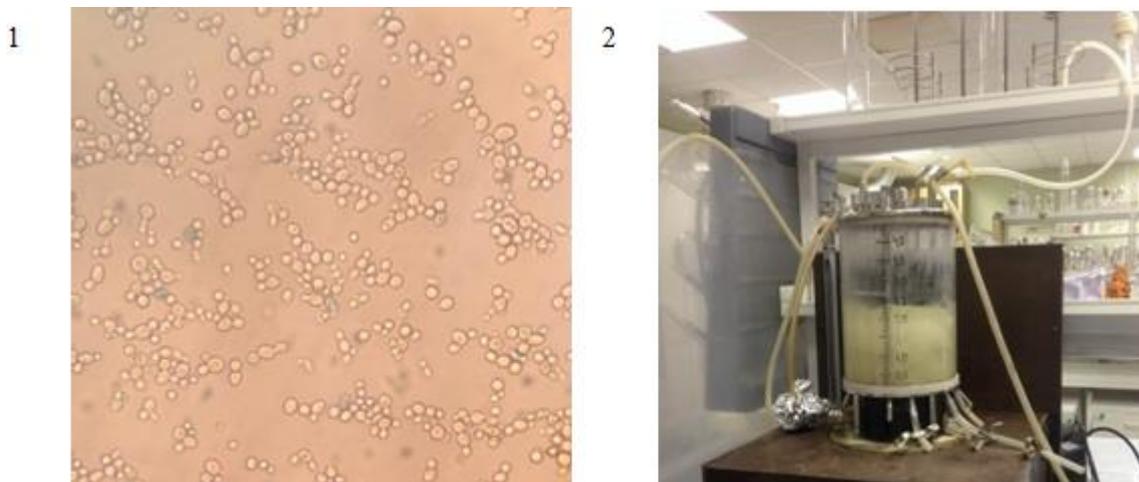


Рис. 2. 1 - Форма клеток дрожжей лимонopodobная, клетки достигают 20-25 мкм; 2 – Культивирование в биореакторе

Выращивание дрожжей проводили в колбах на шейкере и лабораторном ферментере из стекла емкостью 5 литров с заполнением 70% в режиме глубинного культивирования с контролем pH, pO_2 , при температуре 28-30°C. Состав среды для культивирования дрожжей *S. carlsbergensis*, г/л: $(NH_4)_2SO_4$ – 5,0; KH_2PO_4 – 1,0; KCl – 0,15; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,2 г/л; $CaCl_2$ – 0,05 г/л; дрожжевой экстракт – 0,5; сахароза – 30,0; вода – водопроводная, а значение pH 5,8. При закислении среды в ходе ферментации подтитровку вели 4М раствором NaOH.

В процессе культивирования проводился отбор проб каждые 2 часа, измеряли оптическую

плотность, проводился подсчет клеток в камере Горяева и контролировали величину pH. Показания оптической плотности снимались с помощью спектофотометра при длине волны $\lambda=540$ (длина оптического пути 3 мм). Количество сахара в ферментёре определялось методом Бертрана.

Были проведены сравнительные исследования по определению потенциала РНК низовых дрожжей и при культивировании в биореакторе. Определены условия, обеспечивающие наибольшее количество РНК в биомассе дрожжей. Извлечение нуклеиновых кислот из микробной биомассы осуществлялось щелочной экстракцией. Экстракция проводится 0,2М или 0,4М раствором NaOH при 90°C в течении

45-60 минут при перемешивании. При этом в раствор экстрагируется 90% РНК в виде белково-нуклеинового комплекса.

Содержание нуклеиновых кислот в образцах определяли методом Спирина. В образце при культивировании дрожжей в биореакторе содержание РНК – свыше 8%.

Суммарная РНК дрожжей представляет собой гетерогенный полирибонуклеотид, включающий

основную и минорную фракции с константой седиментации 3S и 4S, молекулярной массой 18 850 и 43 200 Да, соответственно.

РНК, полученная из дрожжей *Saccharomyces carlsbergensis*, содержала не менее 75% суммарных нуклеотидов в пересчете на воздушно-сухое вещество; о чистоте препарата судили по спектру поглощения и соотношению $A_{260/230}$ и $A_{260/280}$ (Рис. 3).

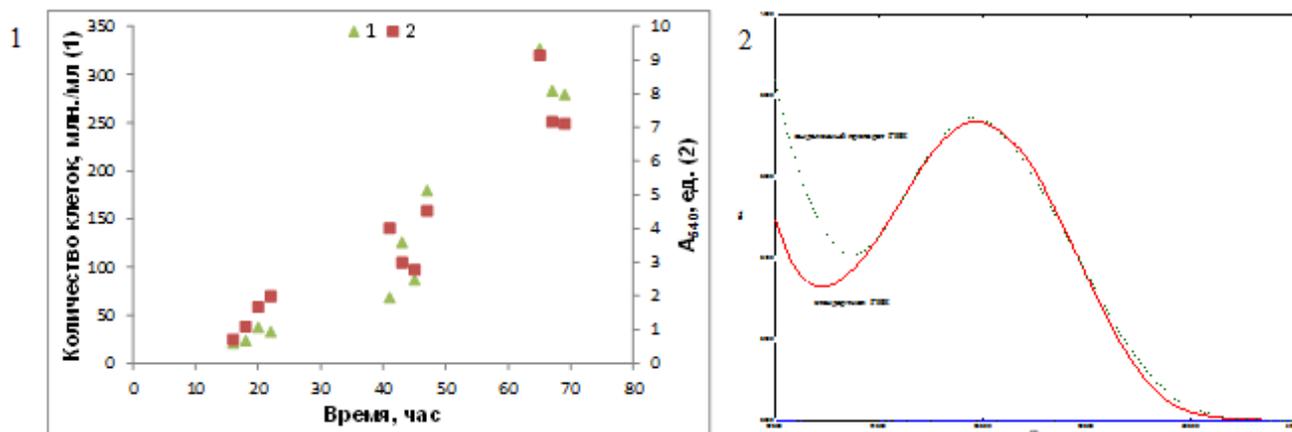


Рис. 3. 1 – Культивирование дрожжей в биореакторе; 2 - Спектр образцов полученного препарата РНК

В России производство продукции микробного происхождения допускается по согласованию с Институтом питания РАМН, если источник его известен (хлебопекарские или пивные дрожжи). Полученные полинуклеотиды являются смесью компонентов нуклеиновых кислот разных молекулярных масс, которые в основном рассматриваются как сырье для синтеза медицинских препаратов и пищевкусных добавок [5].

Препараты РНК были исследованы на токсичность по смертности и изменению плодовитости дафний в соответствии с ФР.1.39.2001.00283. Результаты биотестирования образцов показали отсутствие острого токсического действия.

Список литературы

1. Банницына Т. Е., Туан Л. А., Канарский А. В. Применение дрожжей и продуктов их переработки в пищевой промышленности // Вестник Воронежского государственного аграрного университета. – 2015. – № 4 (47). – С. 176–183.

2. Куцакова В.Е., Фролов С.В., Т.В. Шкотова, Чичина Т.В. Технология переработки остаточных

пивных дрожжей на пищевые и кормовые нужды // Хранение и переработка сельхоз сырья. – Москва, 2014. – № 6. – С. 35–37.

3. Земсков В. М., Лидак М. Ю., Земсков А. М., Микстайс У. Я. Низкомолекулярная РНК – получение, гидролиз и применение в медицине – Зинатне, Рига, 1985. – 191 с.

4. Walther A., Hesselbart A., Wendland J. Genome sequence of *Saccharomyces carlsbergensis*, the world's first pure culture lager yeast // *G3: Genes, Genomes, Genetics*. – 2014. – Т. 4. – №. 5. – С. 783-793. [doi: 10.1534/g3.113.010090](https://doi.org/10.1534/g3.113.010090)

5. Шабанова М.Е., Якубович Л.М., Баурина М.М. Изучение защитного действия препарата энкад // Материалы XXV Российского национального конгресса «Человек и лекарство», М. – 2018. – С. 330-331.

6. Шабанова М.Е., Баурина М.М., Никоноров С.И. Повышение адаптационных возможностей при применении иммуномодулятора - препарата энкад // Материалы VI Международной научно-практической конференции «Фармацевтические и медицинские биотехнологии», М. – 2014. – С.212-213.