

ОBTAINING MICROBIAL BIOMASS OF YEAST AND BACTERIA ON DIFFERENT TYPES OF SECONDARY CARBOHYDRATE-CONTAINING RAW MATERIALS

Fursova N.A., Sokolova E.N., Kuksova E.V., Volkova G.S., Serba E.M.;
e-mail: pekardgroj@yandex.ru

The paper presents the experimental data on developing the biotechnological method of producing the microbial biomass on the basis of the selected symbiosis of *Saccharomyces cerevisiae* Y-3439 or *Saccharomyces cerevisiae* YD-53 highly active baker's yeast strains and the consortium of lactic acid bacteria *L. plantarum* 578/26, *L. acidophilus* 1660, *Enterococcus faecium* WCM 2240. The strains were selected according to their high specific growth rate. Microbial biomass with a protein content of 59.5% was obtained. It was noted that the biomass grown on the leachate of candied wheat wort and whey hydrolysate surpasses the one grown on molasses in physical and chemical parameters.

Keywords: *microbial biomass, baker's yeast, lactic acid bacteria, propionic acid bacteria, microbial consortium, cultivation parameters*

УДК 663.15
DOI: 10.18334/9785912924002.145-151

НОВЫЕ ШТАММЫ – ПРОДУЦЕНТЫ ВЫСОКОЭФЕКТИВНЫХ КОМПЛЕКСОВ ФЕРМЕНТОВ ДЛЯ ГИДРОЛИЗА РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ В СПИРТОВОМ ПРОИЗВОДСТВЕ

Цурикова Н.В.¹, канд. техн. наук, зав. лабораторией биотехнологии новых продуцентов гидролитических ферментов,
Костылева Е.В.¹, канд. техн. наук, в.н.с.,
Серба А.С.¹, канд. техн. наук, в.н.с.,
Великорейская И.А.¹, канд. техн. наук, н.с.,
Нефедова Л.И.¹, вед. инженер-технолог,
Веселкина Т.Н.¹, вед. инженер-технолог,
Рожкова А.М.², канд. хим. наук, в.н.с.,
Синицын А.П.^{2,3}, д-р хим. наук, проф., зав. лаб.;
e-mail: nina.tsurikova@gmail.com

¹ ВНИИПБТ – филиал ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии», Москва 111033, Россия
² ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, 119071, Россия
³ МГУ им. М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва 119991, Россия

С применением методов классической микробиологии и геной инженерии создан ряд штаммов – продуцентов ферментов для различных отраслей АПК. В статье приведены основные сведения о новых мутантных и рекомбинантных штаммах и полученных на их основе высокоактивных ферментных препаратах, перспективных для использования в спиртовой отрасли с целью интенсификации процесса брожения, улучшения реологических свойств сусла и повышения эффективности обработки растительного сырья.

Ключевые слова: ферментные препараты, α-амилаза, глюкоамилаза, ксиланаза, эндоглюканаза, полигалактуроназа, протеаза, индуцированный мутант, рекомбинантные штаммы.

Современные технологии производства спирта и некоторых спиртных напитков включают применение ферментных препаратов (ФП),

которые обеспечивают эффективную конверсию основных полисахаридов растительного сырья в сбраживаемые сахара, повышение выхода спирта, интенсификацию процесса брожения и рациональное использование сырьевых ресурсов.

В настоящее время на российском рынке ассортимент отечественных ФП ограничен главным образом из-за отсутствия высокоактивных штаммов-продуцентов, необходимых для организации рентабельного промышленного производства [1].

Таблица 1

Характеристика ФП, полученных на основе новых штаммов и предназначенных для применения в спиртовом производстве

Продуцент	ФП	Целевые ферменты	Применение в спиртовой отрасли
<i>Aspergillus awamori</i> 1000 У (ВКМ F 3765)	Глюкава-морин	Глюкоамилаза, сопутствующие карбогидразы	Повышение выхода и улучшение качества спирта
<i>Aspergillus awamori</i> ХУ-15 (ВКМ F 4278 D)	Глюкаваморин Ксил	Глюкоамилаза, ксиланаза, сопутствующие карбогидразы	Улучшение реологических свойств сусла; повышение выхода спирта
<i>Trichoderma reesei</i> K4 (ВКМ F-4789D)	Ксилорин К4	Ксиланаза, эндоглюканаза, полигалактуроназа, сопутствующие карбогидразы	Увеличение выхода сока и улучшение его качества при получении спиртованных соков из ягод
<i>Penicillium canescens</i> RN3-11-7-7 (ВКМ F-4643D)	ПЕП-ЛАП (Агропрот)	Кислая грибая протеаза – пенициллопепсин, лейцинаминопептидаза, ксиланаза, β-глюконаза	Интенсификация дрожжегенерации, улучшение реологических свойств сусла, повышение выхода спирта
<i>Penicillium vegetulosum</i> В1 EX13	Агроксил Премиум	эндоглюканаза, ксиланаза Е (устойчивая к ингибиторам элазовых), сопутствующие карбогидразы	Повышение выхода спирта, снижение содержания остаточного крахмала в бражке
<i>Bacillus licheniformis</i> -60	Протолит-терм	Щелочная протеаза	Снятие белкового налета с оборудования, интенсификация брожения
<i>Bacillus subtilis</i> -96	ФП-96	Нейтральная и щелочная протеазы	

В лаборатории биотехнологии новых продуцентов гидролитических ферментов ВНИИПБТ совместно с МГУ им. М.В. Ломоносова, ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» и ИБФМ РАН создана коллекция промышленных штаммов – продуцентов высокоэффективных комплексов ферментов гидролитического действия для различных отраслей АПК, в том числе для производства спирта (табл. 1).

В исследованиях по получению штаммов применялись методы классической микробиологии и геной инженерии. Так, сочетание различных видов индуцированного мутагенеза позволило разработать универсальную схему, включающую дробный УФ-мутагенез и последующее гамма-облучение выделенных мутантных вариантов на кобальтовом источнике.

С использованием разработанной схемы был получен штамм *Aspergillus awamori* 1000 У (ВКМ F 3765) – высокоактивный продуцент глюкоамилазы. По сравнению с исходным штаммом активность глюкоамилазы *A. awamori* 1000 У была увеличена более чем в 3–4 раза [2]. ФП Глюкаваморин, получаемый на основе *A. awamori* 1000 У, успешно применяется на стадии осахаривания сусла. Преимуществом препарата является не только высокий уровень глюкоамилазы, но и наличие сопутствующих ферментов – α-амилазы и комплекса карбогидраз, способных гидролизовать некрахмальные полисахариды (НПС) зернового сырья, что способствует повышению выхода спирта и улучшению его качества.

Высокоактивный ФП Глюкаваморин, полученный в условиях производства АО «Агрофермент», прошел промышленную апробацию в спиртовой промышленности – на заводе ООО «Абсолют» (июнь 2021 г.)

Глюкаваморин часто применяют совместно с препаратом мезофильной α-амилазы Амилосубтилин, получаемым на основе промышленного бактериального штамма *Bacillus subtilis*-82, селекционированного в лаборатории.

Значимый научный и практический результат был получен при использовании разработанных методов для изменения соотношения основных компонентов в ферментном комплексе промышленного продуцента целлюлаз и гемицеллюлаз *Trichoderma reesei* ВСМ 18.2/КК с целью повышения эффективности гидролиза НКП растительного сырья. В результате комбинирования последовательных этапов УФ- и гамма-мутагенеза *T. reesei* активность ключевых гидролаз –

эндонуклеазы и ксиланазы, была увеличена в 5 и 9 раз соответственно. При этом в карбогидразном комплексе нового штамма *T. reesei Co-44* существенно снизилась доля целлюбогидролаз, практически не оказывающих влияния на интенсивность гидролиза основных НКП [3]. Оптимизация условий культивирования нового продуцента позволила более чем в 5 раз увеличить продукцию полигалактуроназы, катализирующей гидролиз пектина, при сохранении высокого уровня биосинтеза и сбалансированном соотношении эндонуклеазы и ксиланазы. Полученный в результате комплексный ФП *Ксилоризин К4*, обладающий ксиланазной, эндонуклеазной и пектиназной активностью, показал высокую эффективность при обработке ягод клюквы и брусники в производстве спиртованных соков в сравнении с импортными препаратами [4, 5].

Индукцированный мутанезис применялся также для повышения продуктивности бактериальных штаммов: *Bacillus licheniformis-60* – продуцента сериновой протеазы, и *B. subtilis-96* – продуцента нейтральной и сериновой протеаз. ФП бактериальных протеаз применяют в спиртовой отрасли для улучшения технологических показателей в спиртовании белковых отложений на внутренней поверхности оборудования и повышения содержания аминного азота, что способствует увеличению бродильной активности дрожжей и ускорению процессов брожения.

Методы геной инженерии позволяют получить ФП, обладающие новыми свойствами и уникальным составом. Так, в результате котрансформации штамма *A. amaroji* 6804-19 *niaD* плазмидой *pRGA-XylARCA*, содержащей ген ксиланазы из *Penicillium canescens*, с плазмидой *pSTA10*, несущей селективный маркер, был создан рекомбинантный штамм *A. amaroji* Ху1 Т-15 (ВКМФ-4278D) – продуцент глюкоамилазы и ксиланазы [6]. Применение ФП *Глюкаваморин Ксил*, полученного из культуральной жидкости *A. amaroji* Ху1 Т-15, в спиртовом производстве на стадии осахаривания обеспечивает снижение вязкости сусла, в том числе с высоким содержанием ржи, повышает выход спирта, позволяет использовать ФП гемицеллюлазного и целлюлазного действия, дает возможность приготовления сусла с высоким содержанием сухих веществ [7].

На основе штамма *Penicillium canescens* RN3-11-7 *niaD*, обладающего собственной гемицеллюлолитической активностью, получен ряд продуцентов, синтезирующих рибные эндо- и экзопептидазы

для повышения эффективности переработки белоксодержащего растительного сырья. Новый рекомбинантный штамм *P. canescens* ВКМ F-4643D, синтезирующий помимо собственных гемицеллюлаз, кислотную протеазу пенициллонепсин и лейцинаминопептидазу, оказался наиболее перспективным для спиртовой отрасли.

Полученный на его основе комплексный ФП ПЕП-ЛАП-Л успешно прошел испытания в исследованиях по интенсификации спиртового брожения. Обработка пшеничного сусла ФП ПЕП-ЛАП, как на стадии осахаривания, так и на стадии брожения, позволила существенно интенсифицировать процесс дрожжегенерации, получить более густо-бело выброженную бражку и увеличить выход спирта. Присутствие ксиланазы обеспечило дополнительное улучшение реологических свойств сусла [8].

Технология производства комплексных ФП на основе *P. canescens* ВКМ F-4643D успешно масштабирована в условиях завода ООО «Агрофермент».

Уникальный ферментный комплекс был получен в результате котрансформации штамма-реципиента *Penicillium vetiviscosum* 537 (*niaD*-) плазмидами *pSVN1-EG2* и *pSVN1-XylE*, несущими гены *egl2* и *xylE* кодирующими, соответственно, гомологичную *EG2* и *КсилЕ* *P. canescens*. Важным свойством *EG2* и *КсилЕ* является высокая стабильность при температурах от 50 до 80°C, кроме того, *КсилЕ* устойчива к действию белковых ингибиторов злаков [9].

Из культуральной жидкости нового высокоактивного рекомбинантного штамма *P. vetiviscosum* EX13 – продуцента ферментного комплекса с преобладанием *EG2* и *КсилЕ*, в условиях ООО «Агрофермент» производится препарат Апроксил Премиум, успешно заменяющий ФП Вискоферм (Novozymes) при приготовлении ржаных замесов в спиртовом производстве.

Таким образом, полученные штаммы позволяют получать ферментные препараты, значительно превосходящие по гидролитической способности импортные аналоги, и могут успешно использоваться в рамках стратегии импортозамещения.

Исследования проведены за счет средств субсидии на выполнение государственного задания (Тема № 0529-2019-0066).

Литература

1. Толкачев, А.А. Ферменты промышленного назначения – обзор рынка ферментных препаратов и перспективы его развития / А.А. Толкачев, Д.А. Черенков, О.С. Корнеева, П.Г. Пономарев // Вестник ВГУИТ. – 2017. – Т. 79. – № 4. – С. 197–203. DOI:10.20914/2310-1202-2017-4-197-203
2. Костылева, Е.В. Разработка схем индуцированного мутагенеза для повышения продуктивности штаммов рода *Aspergillus* – продуцентов амилазных ферментов / Е.В. Костылева, А.С. Серeda, И.А. Великорещкая, Э.И. Буцаева, Т.Н. Веселкина, Л.И. Нефедова, Н.В. Цурикова, Н.С. Лобанов, А.П. Синицын // Микробиология. – 2017. – Т. 86. – № 4. – С. 483–493.
3. Kostyleva, E. V. The Change in the Composition of Trichoderma reesei Carbohydrases Complex as a Result of Gamma Mutagenesis / E. V. Kostyleva, A. S. Sereda, D. O. Osipov, I. A. Velikoretskaya, N. V. Tsurikova // Microbiol Insights. – 2019. – 12. DOI: 10.1177/1178636119848368.
4. Айсина, А.М. Эффективность применения комплексного ферментного препарата Ксилоризин К4 при получении соков из брусники / А.М. Айсина, Е.В. Костылева, А.С. Серeda, И.А. Великорещкая, Н.В. Цурикова Н.В. // Пищевая промышленность. – 2020. – № 11. – С. 8–11. – DOI 10.24411/0235-2486-2020-10118.
5. Серeda, А.С. Обработка сырья для получения спиртованных соков клюквы с применением нового ферментного препарата «Ксилоризин К4» / А.С. Серeda, Е.В. Костылева, Н.В. Цурикова, И.А. Великорещкая, А.М. Айсина // Перспективные технологии и методы контроля в производстве спирта и спиртных напитков. / Под ред. И.М. Абрамовой, Е.М. Сербы. – Москва: Издательский дом «БИБЛИО-ГЛОБУС», 2019. – С. 158–164. DOI 10.18334/9785907063549.158-164
6. Рожкова, А.М. Создание системы экспрессии гетерологичных генов на основе штамма гриба *Aspergillus awamori*. / А.М. Рожкова, А.С. Серeda, Н.В. Цурикова, Л.В. Ринарева, А.К. Нуртаева, М.В. Семенова, Е.А. Рубцова, И.Н. Зоров, О.А. Синицына, А.П. Синицын // Прикладная биохимия и микробиология. – 2011. – Т. 47. – № 3. – С. 1–9.
7. Серeda, А. С. Получение рекомбинантных штаммов *Aspergillus awamori* – продуцентов ферментов для эффективной конверсии полисахаридов зернового сырья при производстве спирта / автореферат диссертации на соискание ученой степени канд. техн. наук. – Москва, 2011. – 26 с.
8. Великорещкая, И.А. Создание новых комплексных ферментных препаратов грибных протеаз на основе штамма *Penicillium simplicissimum* для эффективной конверсии белоксодержащего растительного сырья / автореферат диссертации на соискание ученой степени канд. техн. наук. – Москва, 2019. – 26 с.
9. Шайков, И.А. Создание ферментных препаратов нового поколения на основе мицелиального гриба *Penicillium vettricinosum* для применения в кормопроизводстве, автореферат диссертации на соискание ученой степени канд. хим. наук. – Москва, 2018. – 24 с.

NEW STRAINS – PRODUCERS OF HIGHLY EFFECTIVE ENZYME COMPLEXES FOR HYDROLYSIS OF PLANT RAW MATERIALS IN ALCOHOL PRODUCTION

Tsurikova N.V., Kostyleva E.V., Sereda A.S., Velikoretskaya I.A., Nefedova L.I., Veselkina T.N.¹, Rozhkova A.M.², Sinitsyn A.P.^{2,3}; e-mail: nina.tsurikova@gmail.com

¹ All-Russian Research Institute of Food Biotechnology – a branch of FRC of food, biotechnology, and food safety, Moscow, Russian Federation

² Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

³ Chemical Faculty, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Using the methods of classical microbiology and genetic engineering, a number of strains have been created – producers of enzymes for various branches of the agro-industrial complex. The article provides information about new mutant and recombinant strains and highly active enzyme preparations obtained on their basis, which are promising for use in the alcohol industry in order to intensify the fermentation process, improve the rheological properties of the wort and increase the efficiency of processing plant raw materials.

Keywords: enzyme preparations, *α*-amylase, glucosylase, xylanase, endoglucanase, polygalacturonase, protease, induced mutagenesis, recombinant strains.