

Разработка продуцента комплексного ферментного препарата для переработки крахмалсодержащих отходов с фильтр-прессов при производстве хлебопекарных дрожжей

Сергей С. Перкин	¹	s.s.perkin@ya.ru	 0000-0002-3505-2383
Галина П. Шуваева	¹	gpshuv@mail.ru	 0000-0002-4294-8209
Екатерина М. Мотина	¹	emotina18@mail.ru	 0000-0002-3433-2754
Дмитрий А. Черенков	¹	d.cherenkov@mail.ru	 0000-0002-8564-8919
Светлана Ф. Яковлева	¹	svetlana.yakovleva.68@mail.ru	 0000-0003-3686-9966
Ольга С. Корнеева	¹	korneeva-olgas@ya.ru	 0000-0002-2863-0771

¹ Воронежский государственный университет инженерных технологий, пр-т Революции, 19, г. Воронеж, 394036, Россия

Аннотация. Недостаточное использование передовых технологий с более эффективной переработкой сырья приводит к большому количеству производственных отходов при производстве хлебопекарных прессованных дрожжей. К отходам производства дрожжевой промышленности относятся: осадок после осветления мелассы (шлам), обездрожженная бражка, промывные воды и дрожжи в виде отхода на фильтр-прессах. Выход дрожжей в виде отхода на фильтр-прессах, которые могут использоваться на кормовые цели, составляет порядка 1,5 % к массе получаемых дрожжей, а основной компонент отходов – крахмал. Для его переработки авторами проведен скрининг микроорганизмов – продуцентов и выбран генетически компетентный штамм, способный к синтезу целевых ферментов (глюкоамилазы, α -амилазы, пуллулазы) – *Rhizopus tritici* t1 (Rh. oryzae t1) с активностью, энзимов, соответственно, 100,0; 8,4 и 20,0 ФЕ/мл. Разработаны условия жидкофазного культивирования продуцента, обеспечивающие максимальный биосинтез целевых ферментов и получение комплексного ферментного препарата для переработки крахмалсодержащих отходов с фильтр-прессов при производстве хлебопекарных дрожжей. Отмечено, что лучшим источником углерода для продуцента *Rhizopus tritici* t1 являются крахмал, декстрин и мальтоза. Рациональный состав среды, обеспечивающий максимальные величины синтезируемых ферментов, включает, %: крахмал – 6,0, азотнокислый калий – 0,8, кукурузный экстракт – 0,85. Активности ферментов – глюкоамилазы, альфа-амилазы и пуллулазы – увеличились к 96-120 часам культивирования, соответственно, на (%): 18,0; 19,0 и 50,0.

Ключевые слова: ферментный препарат, дрожжи, глюкоамилаза, α -амилаза, пуллулаза

Development of complex enzyme preparation producer for processing starch-containing waste from pressure-type filters in the production of baker's yeast

Sergey S. Perkin	¹	s.s.perkin@ya.ru	 0000-0002-3505-2383
Galina P. Shuvaeva	¹	gpshuv@mail.ru	 0000-0002-4294-8209
Ekaterina M. Motina	¹	emotina18@mail.ru	 0000-0002-3433-2754
Dmitry A. Cherenkov	¹	d.cherenkov@mail.ru	 0000-0002-8564-8919
Svetlana F. Yakovleva	¹	svetlana.yakovleva.68@mail.ru	 0000-0003-3686-9966
Olga S. Korneeva	¹	korneeva-olgas@ya.ru	 0000-0002-2863-0771

¹ Voronezh State University of Engineering Technologies, Revolution Av., 19 Voronezh, 394036, Russia

Abstract. Lack of use of innovation technology with more efficient raw material processing leads to a large amount of industrial waste while producing bakery compressed yeast. Waste from the production of the yeast industry includes: setting after clarification of molasses (residuum), de-yeast wort, scourage and yeast in the form of waste on pressure-type filters. Yeast crop as waste on pressure-type filters that can be used for feed purposes is about 1,5% by weight of the produced yeast, and the main component of the waste is starch. For its processing the authors screened microorganisms-producers and selected a genetically competent stock culture capable of synthesizing target enzymes (glucoamylase, α -amylase, pullulanase) – *Rhizopus tritici* t1 (Rh. Oryzae t1) with activity of enzymes 100,0; 8,4 and 20,0 fU/ml, respectively. There have been conditions developed for the liquid-phase cultivation of the producer, that provide the maximum biosynthesis of target enzymes and the production of a complex enzyme preparation for processing starch-containing waste from pressure-type filters in the production of baker's yeast. It was noted that starch, dextrin and maltose are the best carbon sources for the producer of *Rhizopus tritici* t1. The rational composition of the medium, providing the maximum values of the synthesized enzymes, includes, %: starch – 6,0, potassium nitrate – 0,8, corn-steep extract – 0,85. Activity of enzymes – glucoamylase, alpha-amylase and pullulanase - increased in 96-120 hours of cultivation by 18,0%; 19,0% and 50,0%, respectively.

Keywords: enzyme preparation, yeast, glucoamylase, alpha-amylase, pullulanase

Для цитирования

Перкин С.С., Шуваева Г.П., Мотина Е.М., Черенков Д.А., Яковлева С.Ф., Корнеева О.С. Разработка продуцента комплексного ферментного препарата для переработки крахмалсодержащих отходов с фильтр-прессов при производстве хлебопекарных дрожжей // Вестник ВГУИТ. 2021. Т. 83. № 3. С. 106–114. doi:10.20914/2310-1202-2021-3-106-114

For citation

Perkin S.S., Shuvaeva G.P., Motina E.M., Cherenkov D.A., Yakovleva S.F., Korneeva O.S. Development of complex enzyme preparation producer for processing starch-containing waste from pressure-type filters in the production of baker's yeast. *Vestnik VGUIT* [Proceedings of VSUET]. 2021. vol. 83. no. 3. pp. 106–114. (in Russian). doi:10.20914/2310-1202-2021-3-106-114

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License

Введение

Современное отечественное производство хлебопекарных дрожжей обеспечивает потребности российского рынка на 90%.

Несмотря на технологические модернизации, которые провели большинство российских заводов, техническое состояние отрасли остается на относительно невысоком уровне [1]. Ввиду недостаточного финансирования, практически не используются передовые технологии, связанные с энергосбережением, с более эффективным использованием сырья, и, прежде всего, с рациональным использованием производственных отходов. Рост цен на основное сырьё, тепловые и энергетические, транспортные ресурсы, делает невозможным сокращение себестоимости продукта для дрожжевых заводов, отнимая, тем самым, у предприятия возможность увеличить прибыль, обеспечить техническую модернизацию и социальное развитие.

К отходам производства дрожжевой промышленности относятся: осадок после осветления мелассы (шлам), обездрожженная бражка, промывные воды и дрожжи в виде отхода на фильтр-прессах.

Выход дрожжей в виде отхода на фильтр-прессах, которые могут использоваться на кормовые цели, составляет порядка 1,5% к массе получаемых дрожжей. Химический состав крахмалсодержащего отхода на фильтр-прессах достаточно разнообразен (таблица 1).

Таблица 1.
Химический состав крахмалсодержащего отхода

Table 1.
Chemical composition of starch-containing waste

Вещество Material	Содержание, % Content, %
Жиры Fat	0,34
Белки Protein	6,90
Углеводы (крахмал) Carbohydrates (starch)	83,10
Вода Water	6,52
Зола Ash	3,14

Как видно из данных, приведенных в таблице 1, основной компонент отходов – крахмал. Крахмал – главный резервный полисахарид растений. Как известно, его полисахаридная фракция состоит из 2-х компонентов: амилозы и амилопектина. Амилоза легко растворяется в теплой воде, образуя истинные растворы, которые неустойчивы и способны к самопроизвольному выпадению в осадок в виде кристаллов. Молекулярная масса колеблется в пределах 50–150 тыс. Каждая молекула содержит от 300 до 500 остатков молекулы глюкозы (рисунок 1).

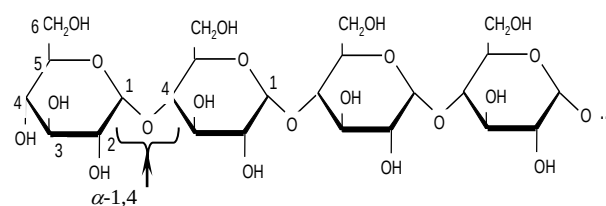


Рисунок 1. Структурная формула молекулы амилозы
Figure 1. Structural formula of amylose molecule

Амилопектин (рисунок 2) в отличие от амилозы трудно растворим в горячей воде. В раствор он переходит при температуре 120 °С, образуя стойкие, но вязкие растворы. Молекулярная масса колеблется в пределах от 100 000 до 1 000 000.

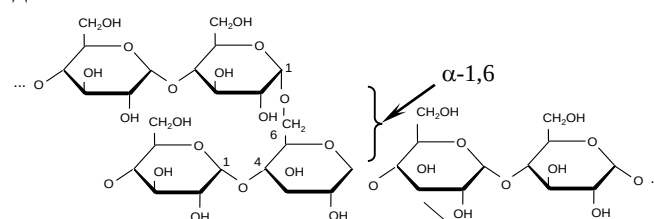


Рисунок 2. Структурная формула молекулы амилопектина
Figure 2. Structural formula of amylopectin molecule

В пищевой промышленности и природе крахмал подвергают интенсивным ферментативным превращениям. Основной реакцией при этом превращении является гидролиз крахмала амилазами. Продуктами этих ферментов могут быть растения, животные и бактерии. Амилазы в растениях содержатся в семенах хлебных культур, у животных – в слюне и поджелудочной железе. Их синтезируют многие бактерии рода *Bacillus*, микровицеты родов *Aspergillus*, *Rhizopus*. Активные амилазы содержатся в солоде. По способу действия амилазы делятся на α -амилазу, β -амилазу, глюкоамилазу, пуллулазу.

α -Амилаза – декстринирующий фермент, превращающий молекулу крахмала в ее осколки. Она интенсивно разжижает крахмальный клейстер, действуя на глубинные α -1,4 – гликозидные связи без определенного порядка. При этом образуются декстрины и небольшое количество мальтозы.

β -Амилаза – осахаривающий фермент, гидролизует в крахмале каждую вторую α -1,4 – гликозидную связь, начиная с нередуцирующего конца полисахаридной цепи. Продуктами реакции являются мальтоза и небольшое количество высокомолекулярных декстринов, называемых β -амило-декстринами.

Глюкоамилаза в отличие от α - и β -амилаз расщепляет в молекуле крахмала α -1,4- и α -1,6 – гликозидные связи, осуществляя полный гидролиз крахмала до глюкозы. α -Амилаза и β -амилаза гидролизуют крахмал на 95%, 5% – остаточные конечные декстрины, которые содержат все α -1,6 – гликозидные связи.

Большинство разновидностей крахмала, важных в промышленном отношении, содержит 80% амилопектина, который лишь частично расщепляется в ходе ферментативного гидролиза. Под действием α -амилаз из него образуются производные декстринов, которые далее уже гидролизироваться не могут. Так как по точкам ветвления гидролиз под действием глюкоамилазы идет медленно, используют α -1,6 – гликозидазы, из них в промышленном масштабе – пуллулазу.

Пуллулаза (пуллулан-6-глюкано-гидролаза, К.Ф. 3.2.1.41) гидролизует α -1,6 – гликозидные связи в пуллулане, гликогене, амилопектине и предельных декстринах, образующихся при действии на амилопектин α - и β -амилаз. Гидролиз происходит по эндо-типу, основной продукт расщепления пуллулана – мальтотриоза. При добавлении её в комплексе с α - и β -амилазами крахмал полностью гидролизует.

Все ферменты имеют различные физико-химические свойства. α -Амилаза неустойчива к активной кислотности среды, но термоустойчива; β -амилаза кислотоустойчива, но термолabile; глюкоамилаза обладает высокой термической и кислотной устойчивостью. Пуллулаза отличается высокой термостабильностью: после нагревания при 100° С в течение 10 мин остается около 80% активности.

Существенное влияние на гидролиз крахмала оказывает концентрация H – ионов.

В связи с вышеизложенным, цель настоящего исследования состояла в разработке генетически компетентного штамма, способного к синтезу целевых ферментов для гидролиза крахмалсодержащих отходов с фильтр-прессов при дрожжевом производстве.

Материалы и методы

Основным объектом исследований служила чистая культура *Rhizopus tritici* t1 (*Rh. oryzae* t1), депонированная в коллекцию чистых культур кафедры биохимии и биотехнологии ВГУИТ (Воронеж).

Лиофилизированная культура *Rhizopus tritici* t1 хранилась в запаянных ампулах при температуре 4 – 5 °С.

Оживление лиофилизированной культуры продуцента проводилось согласно МУ 2.1.4.1057–01 [2]: оттянутый конец ампулы с лиофилизированной культурой нагревают над пламенем горелки. Влажным концом стерильного ватного тампона прикоснуться к нагретой части, в результате чего появляются трещины. Конец ампулы накрывается трехслойной марлевой салфеткой, смоченной этиловым спиртом с массовой долей 70%, хорошо отжатой и обламывается пинцетом.

После вскрытия ампула остается накрытой той же салфеткой в течение 1 – 2 мин. Затем салфетка осторожно снимается и вместе с остатками стекла погружается в дезраствор. В ампулу вносится $\approx$ 0,5 мл питательного бульона для регидратации. Содержимое ампулы перемешивается, переносится стерильной пастеровской пипеткой или шприцем в центр застывшей среды, равномерно распределяя в чашке (предварительно сусло-агар с массовой долей 2% расплавляли на водяной бане, охлаждали до 48 – 50 °С и разливали в чашки Петри, чтобы дно чашки было покрыто полностью).

После засева чашки переворачивали вверх дном и инкубировали в течение 4 – 6 суток в термостате при температуре (35 $\pm$ 1) °С. Выросшие колонии просматривали сначала невооруженным глазом, затем под микроскопом. Колонию извлекали стерильной петлей и переносили в заранее подготовленную чашку Петри с сусло-агаром (СА), распределяя культуру зигзагообразными штрихами по всей поверхности чашки. По истечении 4–6 суток дрожжи переносили на скосы с сусло-агаром.

В исследованиях использовали чистую культуру микромицета, выделенную методом Коха [3].

Глубинное культивирование продуцентов проводили в качалочных колбах емкостью 750 см³, содержащих по 200 см³ питательной среды, в течение 120 ч при температуре 34 – 36 °С.

Для выращивания использовали модифицированную питательную среду (г/л): глюкоза – 2; дрожжевой экстракт – 1; СаСО₃ – 0,4; MgSO₄ – 0,1; КН₂ РО₄ – 0,2; мочевины – 0,1; соевая мука – 0,5; крахмал – 6,0; вода – остальное.

Среды стерилизовали в течение 40 минут при 0,8 МПа, охлаждали до 30 °С и засевали водной суспензией продуцента.

Влияние компонентов углеводного и азотного питания на биосинтез ферментов исследовали на питательной среде при замене источников углерода и азота испытуемым веществом в таком количестве, чтобы их содержание во всех опытах было одинаковым (0,1% по азоту).

Различные значения величины pH среды устанавливали добавлением 1 моль HCl или NaOH.

Состав питательной среды и условия культивирования варьировали в зависимости от задач и условий эксперимента. Состав рациональной питательной среды был уточнен с помощью методов математического планирования эксперимента.

Активности глюкоамилазы, α -амилазы, пуллулазы определяли общепринятыми методами [4].

Микроскопирование культур проводили с помощью светового микроскопа МБИ-3.

Величину pH определяли на потенциометре pH – 150 МА.

Эксперименты проводились в трех повторностях; погрешность измерений опытов не превышала установленную стандартом или используемой методикой. При необходимости, в экспериментах присутствовали контрольные опыты. Достоверность результатов исследований определяли с использованием метода вариационной статистики. Обсуждались достоверные результаты с различиями по уровню значимости $q \leq 0,05$. Графическая обработка данных производилась в программе Microsoft Excel 2007.

Результаты и обсуждение

Для переработки крахмалсодержащего сырья был подобран штамм-продуцент, обладающий способностью к синтезу гликозидаз, наиболее полно гидролизующих крахмал: глюкоамилазы, α -амилазы и пуллулазы.

Исходя из анализа научных и научно-технических источников литературы, с этой целью перспективно использовать мицелиальные грибы. Микромицеты имеют большой потенциал в области микробного синтеза, проявляя способность трансформировать различные природные полимеры под действием синтезируемых ими ферментов. В отличие от других микроорганизмов они содержат значительно меньше

нуклеиновых кислот, пуринов, обладают широким набором ферментов, гидролизующих полисахариды до мономеров. Биологическая переработка органических отходов с использованием ферментов, синтезируемых мицелиальными грибами, является перспективным подходом к преобразованию питательных веществ в биопродукты.

В эксперименте исследовали чистые культуры, хранящиеся в музее чистых культур кафедры биохимии и биотехнологии ВГУИТ, и полученные из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов ФГУП ГосНИИ Генетики.

Проведен скрининг 23 штаммов микромицетов различных таксономических групп. Лиофилизированные культуры оживляли и выделяли моноколонию (ЧК). Выделение ЧК грибов проводили чашечным методом на твердых агаризованных средах с использованием метода серийных разведений [3]. Посев на чашки Петри производили из суспензий с разведением $10 - 10^3$. Чашки с посевами инкубировали в термостате при температуре $34 - 36^\circ\text{C}$, так как этот температурный режим способствует выделению представителей группы термотолерантных микромицетов, применение которых в биотехнологиях имеет несомненное преимущество.

Микроорганизмы выращивали глубинным способом, используя среду Чапека, г: $\text{NaNO}_3 - 3$, $\text{KH}_2\text{PO}_4 - 1$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0,5$, $\text{KCl} - 0,5$, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} - 0,01$, сахароза – 30, дистиллированная вода – 1000 мл. Большинство ферментов являются экстрацеллюлярными продуктами и выделяются в окружающую клетки жидкую среду, при этом обычно в мицелии трехсуточной культуры остается не более 10 – 15% ферментов. Исходя из этого, активности синтезируемых ферментов определяли в фильтрате культуральной жидкости после отделения биомассы. Результаты скрининга представлены в таблице 2.

Таблица 2.

Биосинтез ферментов – гликозидаз микромицетами

Table 2.

Biosynthesis of enzymes – glycosidases by micromycetes

Название продуцента Name of the producer	Активность, ед/см ³ Activity, u/cm ³		
	глюкоамилазы glucoamylases	α -амилазы α -amylases	глюкоамилазы glucoamylases
1	2	3	4
<i>Aspergillus niger</i> F-2092	55,0	4,5	18,0
<i>Aspergillus niger</i> F-1119	18,4	1,5	19,0
<i>Aspergillus niger</i> F-2259	27,2	1,8	16,0
<i>Aspergillus awamori</i> F-808	118,2	5,2	10,0
<i>Aspergillus awamori</i> F-2250	120,2	9,4	12,0
<i>Aspergillus awamori</i> ВУД Т-2	110,0	4,5	16,0

1	2	3	4
<i>Rhizopus oryzae</i> F-495	35,2	4,8	9,0
<i>Rhizopus oryzae</i> F-497	30,0	4,1	6,0
<i>Rhizopus oryzae</i> F-596	5,4	0,5	10,0
<i>Rhizopus oryzae</i> F-593	15,0	1,8	7,0
<i>Rhizopus oryzae</i> F-605	10,3	1,2	6,0
<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>chinensis</i> F-1361	30,2	4,5	3,0
<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>chinensis</i> F-1062	50,4	6,9	8,0
<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>chinensis</i> F-1218	45,0	5,4	4,0
<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>chinensis</i> F-595	25,2	1,4	3,0
<i>Rhizopus microsporus</i> var. <i>chinensis</i> F-610	107,0	4,6	5,0
<i>Rhizopus oryzae</i> F-1217	62,2	9,4	17,0
<i>Rhizopus tritici</i> t1 (Rh. <i>oryzae</i> t1)	100,0	8,4	20,0
<i>Trichoderma harzianum</i> BKM F-4099D	95,2	5,7	5,0
<i>Trichoderma harzianum</i> 18 ВИЗР	39,0	4,0	3,0
<i>Trichoderma reesei</i>	25,7	2,1	8,6
<i>Rhizopus stolonifer</i>	59,8	5,9	6,0
<i>Rhizopus nigricans</i>	62,9	3,7	5,0
<i>Rhizopus pygmaeus</i> p1	110,0	6,3	4,6

Биосинтез гликозидаз может быть репрессирован или индуцирован различными аминокислотами. Влияние аминокислот на биосинтез ферментов *Rh. oryzae* t1 исследовалось на среде Чапека, куда вносилась аминокислота в количестве 0,2% по азоту. На фоне этой среды активность пуллуланызы была максимальной при внесении в среду Глю, Асп, γ -Ами, Лиз, Орн, Вал, Ала. При внесении в среду Тир, Нор активность фермента была в 6–9 раз ниже, чем в контроле.

Внесение Глю в среду в момент засева и в первые часы культивирования стимулирует синтез фермента, внесение ее после 24–36 часов культивирования (в период активного синтеза пуллуланызы) не дает эффекта. При отсутствии Глю в первые часы роста микроорганизма сдвигает максимум накопления фермента к 60 часам. Количество биомассы не зависит от времени внесения Глю. На фоне среды с компонентным составом, %: крахмал – 6,0, ББК – 1,0, KCl – 0,6, $MgSO_4$ – 0,05, $(NH_4)_2 HPO_4$ – 0,7 в качестве источников аминного азота использовались различные аминокислоты (0,2% по азоту). Активный синтез наблюдался в среде с Про, Глю. Количество биомассы снижалось вдвое. Это указывает на отсутствие корреляции между ростом и биосинтетической активностью.

На среде с Тре и Асп, продуцент синтезирует пуллуланызу с низкой активностью, при этом активно развивается и накапливается максимум биомассы. На максимальную активность пуллуланызы оказывает влияние вносимая в среду доза аминокислоты, так, для Глю – 0,005–0,010%, Орн – 0,005%.

Анализируя изменения аминокислотного пула штамма в сравнении с этим показателем при росте на варианте среды без внесения аминокислот, можно отметить общую закономерность: повышение содержания в клетках Глю, Ами, Ала, Лиз, Сер, Тре, Цис. Кроме того, в их мицелии обнаруживаются гидрофобные аминокислоты: Вал, Изо, Лей, Три, Фен.

Влияние вносимых в питательную среду углеводов на биосинтез пуллуланызы распределяется в следующий убывающий ряд: крахмал – декстрин – мальтоза – сахароза – маннит – рафиноза – лактоза – рамноза – фруктоза – сорбит – арабиноза – инозит – глюкоза – галактоза – дульцит. Следует отметить, что глюкоза репрессировала синтез пуллуланызы на 70%. Катаболическая репрессия пуллуланызы наблюдается на средах с арабинозой, инозитом, галактозой и дульцитом.

Одна из задач, которую следовало решить в рамках достижения поставленной цели, была разработка условий культивирования продуцента, наиболее приближенным к оптимальным.

Оптимизацию условий культивирования проводили в три этапа.

1. Были выбраны управляемые факторы, существенно влияющие на синтез пуллуланызы. Применительно к грибам в качестве таких факторов чаще всего используются: продолжительность выращивания, влажность и состав питательной среды, температура выращивания. В литературе отсутствуют количественные оценки влияния указанных факторов на биосинтез фермента при глубинном культивировании продуцента *Rhizopus tritici* t1 (Rh. *oryzae* t1), поэтому было проведено последовательное

определение частных оптимумов по каждому значимому фактору, поочередно варьируя отдельный фактор на фоне постоянства остальных.

В эксперименте установлено, что максимальный биосинтез ферментов, в том числе пуллулаказы, наблюдался при выращивании в продуцента течение 96–120 часов при температуре $(35 \pm 1)^\circ\text{C}$.

В качестве основных факторов, влияющих на рост микромицета, были выбраны: концентрация крахмала, % (x_1), концентрация азотнокислого калия, % (x_2), концентрация кукурузного экстракта, % (x_3). Критериями оценки влияния различных факторов на процесс биосинтеза амилаз служили активности глюкоамилазы и пуллулаказы. Для исследования применяли полный факторный эксперимент с использованием центрального композиционного рототабельного униформпланирования.

В результате обработки данных получены уравнения регрессии, адекватно описывающие процесс биосинтеза амилаз:

$$y_1 = 120,6 + 3,65x_1 + 2,75x_2 - 1,72x_3 - 2,8x_1^2 - 1,9x_2^2 - 1,9x_3^2$$

$$y_2 = 6,6 - 0,59x_1 + 1,95x_2 - 0,18x_3 - 0,41x_1x_2 - 0,89x_1^2 - 0,19x_2^2 - 0,29x_3^2$$

Определение оптимальных составов питательной среды проводили методом “Ридж-анализ”. При наложении оптимальных составов питательных сред при биосинтезе амилаз, рациональной средой является, %:

- крахмал – 6,0,
- азотнокислый калий – 0,8,
- кукурузный экстракт – 0,85.

При таких значениях параметров активность амилаз достигала максимальных величин.

Динамика роста микроорганизма и биосинтеза им ферментов представлена на рисунках 3–6.

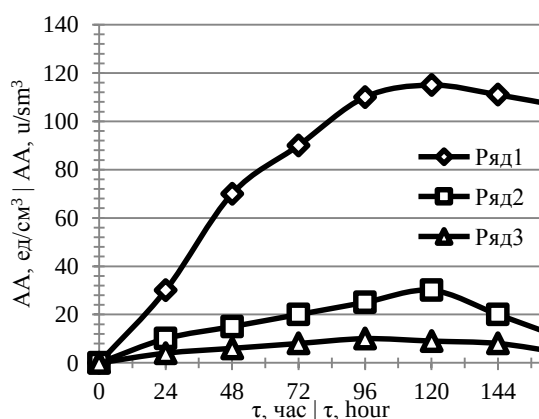


Рисунок 3. Влияние времени культивирования на биосинтез ферментов (1 – глюкоамилаза, 2 – α-амилаза, 3 – пуллулаза)

Figure 3. Cultivation time effect on biosynthesis of enzymes (1 – glucoamylase, 2 – α-amylase, 3 – pullulanase)

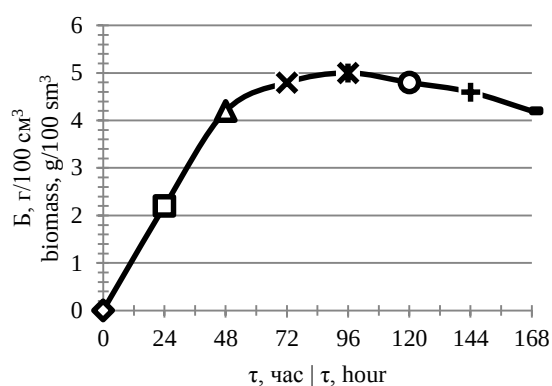


Рисунок 4. Динамика накопления биомассы в зависимости от времени культивирования

Figure 4. Dynamics of biomass amplification in dependence to cultivation time

Из рисунка 4 видно, что при культивировании продуцента на оптимизированной питательной среде активность глюкоамилазы; альфа-амилазы и пуллулаказы увеличилась, соответственно, на (%): 18,0; 19,0 и 50,0.

Из рисунка 5 следует, что развитие микроорганизма характеризуется непродолжительной лаг-фазой (до 24 часов), затем наступает экспоненциальная фаза роста, в которой интенсивно потребляются питательные вещества среды и увеличивается биомасса продуцента. К 96 часам рост прекращается, максимально снижается содержание редуцирующих веществ в среде.

Активный синтез ферментов заканчивается к 96 – 120 часам культивирования.

Характер кривой роста соответствовал изменению активной кислотности (рН) культуральной жидкости (рисунок 5) и изменению количества редуцирующих веществ питательной среды в зависимости от времени культивирования (рисунок 6).

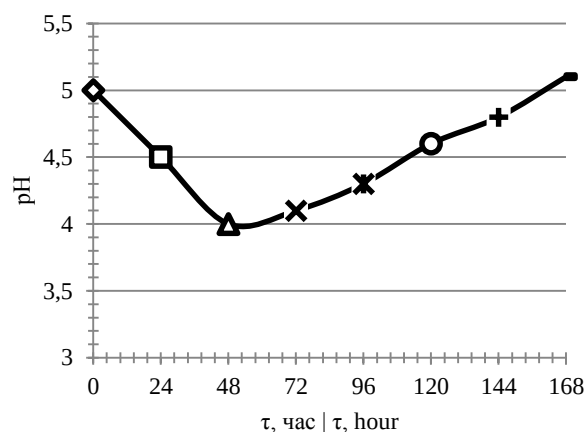


Рисунок 5. Изменение pH культурной жидкости в зависимости от времени культивирования

Figure 5. pH culture liquid change in dependence to cultivation time

Максимальный рост и накопление биомассы продуцентом наблюдается к 48 – 96 часам культивирования. Биосинтез целевых ферментов – к 96–120 часам.

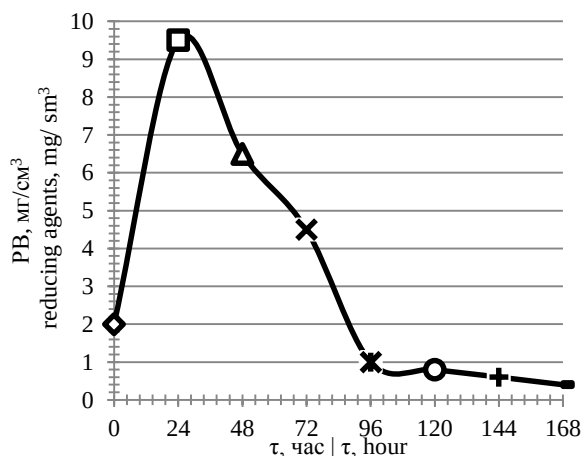


Рисунок 6. Изменение количества редуцирующих веществ питательной среды в зависимости от времени культивирования

Figure 6. Amount change of reducing agents in the medium in dependence to cultivation time

Закключение

1. На основании анализа научной и научно-технической литературы по разрабатываемой проблеме и результатам собственных исследований проведен скрининг микроорганизмов – продуцентов и выбран генетически компетентный штамм, способный к синтезу целевых ферментов – *Rhizopus tritici* t1 (*Rh. oryzae* t1) с нативной активностью синтезируемых ферментов,

(ФЕ/мл): глюкоамилазы, α-амилазы и пуллулаказы, соответственно, 100,0; 8,4 и 20,0.

2. Разработаны условия жидкофазного культивирования продуцента, обеспечивающие максимальный биосинтез целевых ферментов и получение комплексного ферментного препарата для переработки крахмалсодержащих отходов с фильтр-прессов при производстве хлебопекарных дрожжей:

– анализируя изменения аминокислотного пула при росте штамма, установлено влияние вносимых в питательную среду углеводов на биосинтез пуллулаказы. Отмечено, что к лучшим источникам углерода можно отнести крахмал, декстрин и мальтозу. Глюкоза репрессировала синтез пуллулаказы на 70%. Катаболическая репрессия пуллулаказы наблюдалась на средах с арабинозой, инозитом, галактозой и дульцитом;

– рациональным составом среды, обеспечивающим максимальные величины синтезируемых ферментов, является, %, крахмал – 6,0, азотно-кислый калий – 0,8, кукурузный экстракт – 0,85. Активности ферментов – глюкоамилазы; альфа-амилазы и пуллулаказы – увеличились, соответственно, на (%): 18,0; 19,0 и 50,0;

– изучение динамики роста микромицета на разработанной среде, включая анализ изменения pH и содержания редуцирующих веществ в культуральной жидкости, показало, что максимальный рост и накопление биомассы продуцентом наблюдается к 48 – 96 часам культивирования, биосинтез целевых ферментов – к 96–120 часам.

Литература

- 1 Гаврилова А.Ю. Исследование параметров культивирования сухих хлебопекарных дрожжей из отходов сахарного производства свекловичной мелассы // Актуальные вопросы современной науки. 2017. С. 138-143.
- 2 Римарева Л.В., Серба Е.М., Соколова Е.Н., Борщева Ю.А. и др. Ферментные препараты и биокаталитические процессы в пищевой промышленности // Вопросы питания. 2017. Т. 86. № 5.
- 3 Банницына Т.Е., Канарский А.В., Щербаков А.В., Чеботарь В.К. и др. Дрожжи в современной биотехнологии // Вестник Международной академии холода. 2016. № 1.
- 4 Хатко З.Н., Стойкина А.А. Хлебопекарные дрожжи: характеристика и способы их активации // Новые технологии. 2016. № 2.
- 5 Панкина И.А., Черникова Д.А. Хлебопекарные дрожжи: характеристика и изучение их физико-химических показателей // Проблемы конкурентоспособности потребительских товаров и продуктов питания. 2019. С. 241-244.
- 6 Джахонгирова Г.З., Саидходжаева М.А., Махмудова Д.Х., Касимова М.А. Ресурсосберегающий способ производства хлебопекарных дрожжей на основе рисовой муки // Universum: технические науки. 2018. № 3 (48).
- 7 Ребезов М.Б., Карпова Г.В., Зайнутдинов Р.Р. Анализ технологических моделей производства дрожжей // Вестник Южно-Уральского государственного университета. Серия: Пищевые и биотехнологии. 2014. Т. 2. № 2.
- 8 Крикунова Л.Н., Дубинина Е.В. Исследование белкового комплекса возвратных отходов хлебопекарного производства // Технология и товароведение инновационных пищевых продуктов. 2018. № 6. С. 63-66.
- 9 Луговая Н.П., Требухин И.В. Утилизация отходов дрожжевого производства // Научно-технический прогресс в сельскохозяйственном производстве. 2014. С. 193-196.
- 10 Волкова А.В., Александрова Е.Г. Биоконверсия биотинсодержащего растительного сырья в технологии производства дрожжей // Современные технологии: актуальные вопросы, достижения и инновации. 2020. С. 38-41.
- 11 Benabda O., Kasmi M., Kachouri F., Hamdi M. Valorization of the powdered bread waste hydrolysate as growth medium for baker yeast // Food and Bioproducts Processing. 2018. V. 109. P. 1-8. doi: 10.1016/j.fbp.2018.02.007

- 12 Kefale A., Redi M., Asfaw A. Potential of bioethanol production and optimization test from agricultural waste: the case of wet coffee processing waste (pulp) // Int J Renew Energy Res. 2012. V. 2. №. 3. P. 446-450.
- 13 Haque M.A., Kachrimanidou V., Koutinas A., Lin C.S.K. Valorization of bakery waste for biocolorant and enzyme production by *Monascus purpureus* // Journal of biotechnology. 2016. V. 231. P. 55-64. doi: 10.1016/j.jbiotec.2016.05.003
- 14 Pleissner D., Lau K.Y., Schneider R., Venus J. et al. Fatty acid feedstock preparation and lactic acid production as integrated processes in mixed restaurant food and bakery wastes treatment // Food Research International. 2015. V. 73. P. 52-61. doi: 10.1016/j.foodres.2014.11.048
- 15 Oprea O.B., Gaceu L. Application of multiple criteria decision making (mcdm) in bakery industry. Study case: wastes and by-products // Bulletin of the Transilvania University of Brasov. Forestry, Wood Industry, Agricultural Food Engineering. Series II. 2016. V. 9. №. 1. P. 89.
- 16 Akmirza I., Turker M., Alp K. Characterization and treatment of yeast production process emissions in a biofilter // Feb-fresenius environmental bulletin. 2018. P. 7099.
- 17 Türker M. Yeast biotechnology: Diversity and applications // Proceedings of 27th VH Yeast Conference. 2014. P. 1-26.
- 18 El-Zaher F.H.A., El-Din M.S., Fadel M. Perspectives for appropriating distilled yeast to be reused in bakery // International Journal of Academic Research. 2012. V. 4. №. 4. P. 11-16.
- 19 Roşan C.A., Bei M.F. Evaluation of the fermentative potential of some bakery yeasts // Analele Universităţii din Oradea, Fascicula: Ecotoxicologie, Zootehnie şi Tehnologii de Industrie Alimentară. 2018. V. 17. №. A. P. 65-68.
- 20 Pleissner D., Lam W.C., Han W., Lau K.Y. et al. Fermentative polyhydroxybutyrate production from a novel feedstock derived from bakery waste // BioMed research international. 2014. doi: 10.1155/2014/819474

References

- 1 Gavrilova A.Yu. Investigation of the parameters of cultivation of dry baker's yeast from wastes of sugar production of beet molasses. Actual problems of modern science. 2017. pp. 138-143. (in Russian).
- 2 Rimareva L.V., Serba E.M., Sokolova E.N., Borshcheva Yu.A. et al. Enzyme preparations and biocatalytic processes in the food industry. Questions of nutrition. 2017. vol. 86. no. 5. (in Russian).
- 3 Bannitsyna T.E., Kanarskiy A.V., Shcherbakov A.V., Chebotar V.K. et al. Yeast in modern biotechnology. Bulletin of the International Academy of Cold. 2016. no. 1. (in Russian).
- 4 Hatko Z.N., Stoykina A.A. Bakery yeast: characteristics and methods of their activation. New technologies. 2016. no. 2. (in Russian).
- 5 Pankina I.A., Chernikova D.A. Bakery yeast: characteristics and study of their physical and chemical indicators. Problems of the competitiveness of consumer goods and food products. 2019. pp. 241-244. (in Russian).
- 6 Jakhongirova G.Z., Saidkhodzhaeva M.A., Makhmudova D.Kh., Kasimova M.A. Resource-saving method for the production of baker's yeast based on rice flour. Universum: technical sciences. 2018. no. 3 (48). (in Russian).
- 7 Rebezov M.B., Karpova G.V., Zainutdinov R.R. Analysis of technological models of yeast production. Bulletin of the South Ural State University. Series: Food and Biotechnology. 2014. vol. 2. no. 2. (in Russian).
- 8 Krikunova L.N., Dubinina E.V. Research of the protein complex of returnable wastes of bakery production. Technology and commodity science of innovative food products. 2018. no. 6. pp. 63-66. (in Russian).
- 9 Lugovaya N.P., Trebukhin I.V. Utilization of yeast production waste. Scientific and technical progress in agricultural production. 2014. pp. 193-196. (in Russian).
- 10 Volkova A.V., Alexandrova E.G. Bioconversion of biotin-containing plant raw materials in yeast production technology. Modern technologies: topical issues, achievements and innovations. 2020. pp. 38-41. (in Russian).
- 11 Benabda O., Kasmi M., Kachouri F., Hamdi M. Valorization of the powdered bread waste hydrolysate as growth medium for baker yeast. Food and Bioproducts Processing. 2018. vol. 109. pp. 1-8. doi: 10.1016/j.fbp.2018.02.007
- 12 Kefale A., Redi M., Asfaw A. Potential of bioethanol production and optimization test from agricultural waste: the case of wet coffee processing waste (pulp). Int J Renew Energy Res. 2012. vol. 2. no. 3. pp. 446-450.
- 13 Haque M.A., Kachrimanidou V., Koutinas A., Lin C.S.K. Valorization of bakery waste for biocolorant and enzyme production by *Monascus purpureus*. Journal of biotechnology. 2016. vol. 231. pp. 55-64. doi: 10.1016/j.jbiotec.2016.05.003
- 14 Pleissner D., Lau K.Y., Schneider R., Venus J. et al. Fatty acid feedstock preparation and lactic acid production as integrated processes in mixed restaurant food and bakery wastes treatment. Food Research International. 2015. vol. 73. pp. 52-61. doi: 10.1016/j.foodres.2014.11.048
- 15 Oprea O.B., Gaceu L. Application of multiple criteria decision making (mcdm) in bakery industry. Study case: wastes and by-products. Bulletin of the Transilvania University of Brasov. Forestry, Wood Industry, Agricultural Food Engineering. Series II. 2016. vol. 9. no. 1. pp. 89.
- 16 Akmirza I., Turker M., Alp K. Characterization and treatment of yeast production process emissions in a biofilter. Feb-fresenius environmental bulletin. 2018. pp. 7099.
- 17 Türker M. Yeast biotechnology: Diversity and applications. Proceedings of 27th VH Yeast Conference. 2014. pp. 1-26.
- 18 El-Zaher F.H.A., El-Din M.S., Fadel M. Perspectives for appropriating distilled yeast to be reused in bakery. International Journal of Academic Research. 2012. vol. 4. no. 4. pp. 11-16.
- 19 Roşan C.A., Bei M.F. Evaluation of the fermentative potential of some bakery yeasts. Analele Universităţii din Oradea, Fascicula: Ecotoxicologie, Zootehnie şi Tehnologii de Industrie Alimentară. 2018. vol. 17. no. A. pp. 65-68.
- 20 Pleissner D., Lam W.C., Han W., Lau K.Y. et al. Fermentative polyhydroxybutyrate production from a novel feedstock derived from bakery waste. BioMed research international. 2014. doi: 10.1155/2014/819474

Сведения об авторах

Сергей С. Перкин аспирант, кафедра биохимии и биотехнологии, Воронежский государственный университет инженерных технологий, пр-т Революции, 19, г. Воронеж, 394036, Россия, s.s.perkin@ya.ru

 <https://orcid.org/0000-0002-3505-2383>

Галина П. Шуваева к.б.н., доцент, кафедра биохимии и биотехнологии, Воронежский государственный университет инженерных технологий, пр-т Революции, 19, г. Воронеж, 394036, Россия, gpshuv@mail.ru

 <https://orcid.org/0000-0002-4294-8209>

Екатерина М. Мотина к.т.н., доцент, кафедра биохимии и биотехнологии, Воронежский государственный университет инженерных технологий, пр-т Революции, 19, г. Воронеж, 394036, Россия, emotina18@mail.ru

 <https://orcid.org/0000-0002-3433-2754>

Дмитрий А. Черенков д.б.н., профессор, кафедра биохимии и биотехнологии, Воронежский государственный университет инженерных технологий, пр-т Революции, 19, г. Воронеж, 394036, Россия, d.cherenkov@mail.ru

 <https://orcid.org/0000-0002-8564-8919>

Светлана Ф. Яковлева к.т.н., доцент, кафедра биохимии и биотехнологии, Воронежский государственный университет инженерных технологий, пр-т Революции, 19, г. Воронеж, 394036, Россия, svetlana.yakovleva.68@mail.ru

 <https://orcid.org/0000-0003-3686-9966>

Ольга С. Корнеева д.б.н., профессор, кафедра биохимии и биотехнологии, Воронежский государственный университет инженерных технологий, пр-т Революции, 19, г. Воронеж, 394036, Россия, korneeva-olgas@ya.ru

 <https://orcid.org/0000-0002-2863-0771>

Вклад авторов

Все авторы в равной степени принимали участие в написании рукописи и несут ответственность за плагиат

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Information about authors

Sergey S. Perkin graduate student, biochemistry and biotechnology department, Voronezh State University of Engineering Technologies, Revolution Av., 19 Voronezh, 394036, Russia, s.s.perkin@ya.ru

 <https://orcid.org/0000-0002-3505-2383>

Galina P. Shuvaeva Cand. Sci. (Bio.), associate professor, biochemistry and biotechnology department, Voronezh State University of Engineering Technologies, Revolution Av., 19 Voronezh, 394036, Russia, gpshuv@mail.ru

 <https://orcid.org/0000-0002-4294-8209>

Ekaterina M. Motina Cand. Sci. (Engin.), associate professor, Biochemistry and Biotechnology Department, Voronezh State University of Engineering Technologies, Revolution Av., 19 Voronezh, 394036, Russia, emotina18@mail.ru

 <https://orcid.org/0000-0002-3433-2754>

Dmitry A. Cherenkov Dr. Sci. (Bio.), professor, biochemistry and biotechnology department, Voronezh State University of Engineering Technologies, Revolution Av., 19 Voronezh, 394036, Russia, d.cherenkov@mail.ru

 <https://orcid.org/0000-0002-8564-8919>

Svetlana F. Yakovleva Cand. Sci. (Engin.), associate professor, biochemistry and biotechnology department, Voronezh State University of Engineering Technologies, Revolution Av., 19 Voronezh, 394036, Russia, svetlana.yakovleva.68@mail.ru

 <https://orcid.org/0000-0003-3686-9966>

Olga S. Korneeva Dr. Sci. (Bio.), professor, biochemistry and biotechnology department, Voronezh State University of Engineering Technologies, Revolution Av., 19, Voronezh, 394036, Russia, korneeva-olgas@ya.ru

 <https://orcid.org/0000-0002-2863-0771>

Contribution

All authors are equally involved in the writing of the manuscript and are responsible for plagiarism

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Поступила 20/07/2021	После редакции 09/08/2021	Принята в печать 30/08/2021
Received 20/07/2021	Accepted in revised 09/08/2021	Accepted 30/08/2021