

Твердофазная ферментация целлюлозосодержащего сырья с использованием дрожжей

Каночкина Мария Сергеевна

ФГБОУ ВО «Московский государственный университет
пищевых производств»

Адрес: 125080, г. Москва, Волоколамское шоссе, д. 11

Общество с ограниченной ответственностью «Микробные нутриенты
иммунокорректоры» научный руководитель биотехнологических проектов

Адрес: 125438, г. Москва, 2-й Лихачевский пер, 2а, офис 47

E-mail: kanoch@yandex.ru

Борисенко Евгений Георгиевич

ФГБОУ ВО «Московский государственный университет
пищевых производств»

Адрес: 125080, город Москва, Волоколамское шоссе, д. 11

E-mail: Beginna1939@gmail.com

Крючкова Елизавета Романовна

ФГБОУ ВО «Московский государственный университет
пищевых производств»

Адрес: 125080, г. Москва, Волоколамское шоссе, д. 11

E-mail: kruchkovaer@gmail.com

Бакаева Карина Витальевна

ФГБОУ ВО «Московский государственный университет
пищевых производств»

Адрес: 125080, г. Москва, Волоколамское шоссе, д. 11

E-mail: k.bakaeva1999@gmail.com

Савельева Анна Сергеевна

ФГБОУ ВО «Московский государственный университет
пищевых производств»

Адрес: 125080, г. Москва, Волоколамское шоссе, д. 11

E-mail: Anna.savelev@yandex.ru

В работе представлен прототип технологии твердофазного культивирования, который позволяет получать продукты, содержащие высокий уровень дрожжевой биомассы. В этой связи полученные продукты могут обладать функциональными свойствами. В качестве субстратов использовались петрушка и сенная мука, относящиеся к легко возобновляемому типу сырья. В ходе исследования была показана возможность роста на указанных субстратах различных штаммов дрожжей: производственных, музейных и выделенных из самого сырья. В качестве контроля использовали широко известный пробиотический штамм дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* (препарат «Энтерол»). Наибольший прирост биомассы дрожжей наблюдали на петрушке, максимальный результат получен с использованием штамма *Meuzozyma (Pichia) guilliermondii* Я1 – 3,4* дрожжевых клеток в 1 г субстрата. В случае с сенной мукой – максимум при росте штамма *Meuzozyma (Pichia) guilliermondii* N2, выделенного непосредственно из субстрата, – 0,7* дрожжевых клеток в 1 г субстрата. Контрольный штамм дрожжей показал средние результаты – 0,8* дрожжевых клеток в 1 г субстрата. Полученные данные могут свидетельствовать о целесообразности использования разрабатываемого прототипа технологии твердофазной ферментации, в том числе для культивирования промышленных штаммов дрожжей, и ценности петрушки, как субстрата для нее.

Ключевые слова: целлюлозосодержащее сырье, пищевая биотехнология, дрожжи, *Saccharomyces boulardii*, *Pichia*, твердофазная биоконверсия, нутриенты, микробный белок

Введение

Основной проблемой пищевого рациона современного общества является нехватка белка. Белки выступают в качестве структурных единиц, участвующих в строении клетки. Их недостаток ведет к снижению иммунитета и делает человека уязвимым по отношению к вирусам. Необходимое количество потребляемого белка зависит от пола, возраста и массы тела, а также региона проживания людей. При этом значимыми показателями являются качество белка, определяемое наличием в нем полного набора незаменимых аминокислот, их соотношением, и его усвояемость¹. В растительных белках, как правило, имеется дефицит одной или нескольких незаменимых аминокислот, а производство белков животного происхождения, характеризующихся высокой усвояемостью и близостью по составу к эталонному белку, высокозатратно.

За последние 10 лет производство растительного и животного белка значительно возросло, однако дефицит всё равно сохраняется (Омарова & Омаров, 2016). Вышеуказанные факторы способствуют разработке иных способов его получения, например, с помощью микробной биоконверсии целлюлозосодержащего сырья.

Моделирование процесса переработки целлюлозосодержащего растительного сырья микроорганизмами – перспективное направление для получения продуктов с наибольшей пищевой ценностью и функциональными свойствами. При

этом микробный белок может служить альтернативой растительному и особенно животному белку, так как не уступает ему по аминокислотному составу.

Теоретическое обоснование

Промышленная ферментация разделена на 2 способа: глубинный и твердофазный. Невысокий выход целевого продукта, содержащего биомассу клеток, существенные энергозатраты и большое количество трудно утилизируемых отходов препятствуют нормальному протеканию глубинного культивирования. Однако в подавляющем большинстве работ (Серба и др., 2018; Поляков & Погоржельская, 2017; Серба, 2015; Римарева, 2012) используется глубинное культивирование.

Для решения указанных проблем возможно использовать более эффективный способ биоконверсии – твердофазный. Рентабельность твердофазного культивирования (Долгуниев и др., 2019; Кулешов и др., 2015; Каночкина, 2011; Текутьева и др., 2018; Смирнов и др., 2009) основывается на:

- уменьшении влажности субстрата для культивирования, что исключает возможность контаминации целевого продукта;
- поддержании естественных условий для культивирования;
- постоянном доступе кислорода во время культивирования;

Таблица 1

Аминокислотный состав белков (Волова & Барашков, 2010)

Аминокислота, % от сухого вещества клетки	Дрожжи	Водоросли	Казеин (стандарт)
Валин	6,38	5,41	5,72
Лизин	7,02	5,98	7,33
Изолейцин	4,47	3,55	4,10
Метионин	2,63	2,16	2,47
Триптофан	1,40	1,58	1,32
Треонин	5,29	4,88	4,22
Фенилаланин	4,42	4,41	4,62
Лейцин	8,60	8,91	9,39
Содержание незаменимых аминокислот от общего белка, %	40,21	36,88	39,17

¹ МР 2.3.1.0253-21. (2021). Нормы физиологических потребностей в энергии и пищевых веществах для различных групп населения Российской Федерации. <https://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/402716140/>

- использовании экономически выгодных субстратов;
- снижении энергозатрат;
- увеличении выхода целевого продукта.²

Одновременно существуют и особенности твердофазного культивирования, в основном, сложность обеспечения доступа кислорода воздуха в массу увлажненного субстрата, что существенно ограничивает высоту его слоя и производительность применяемых для биоконверсии конструкций ферментеров. Однако данная проблема находит технологическое решение в настоящее время в связи с внедрением в практику нового оборудования и различных технологических схем.

Активно разрабатываются возможности внедрения твердофазного культивирования, как одного из элементов большой технологической цепочки, содержащей несколько жидкофазных ферментеров разного объема (Текутьева и др., 2018). Авторами предложена принципиальная схема технологического комплекса производства кормового белка с целью увеличения масштаба производства кормов и белковых концентратов при условии снижения их себестоимости за счет снижения энергетических и тепловых затрат на ферментацию в 7 раз.

Получение инновационных биопрепаратов пищевого и кормового назначения, содержащих комплекс биологически ценных веществ, является одним из основных направлений использования вторичных сырьевых ресурсов агропромышленного комплекса. При этом в качестве субстратов возможно использовать часто употребляемые в рацион продукты, обогащая их продуктами метаболизма дрожжей.

Таким образом, указанные выше преимущества технологии твердофазного культивирования обосновывают поставленные нами цели научно-исследовательских разработок:

Разработка прототипа технологии твердофазного культивирования дрожжей на целлюлозосодержащем сырье. Подбор вновь выделенных штаммов-продуцентов биологически активных веществ и контрольных штаммов для ферментации, способных наращивать биомассу на перспективном целлюлозосодержащем сырье кормового и пищевого значения.

Целлюлозосодержащее сырье (далее – ЦСС) перспективно для использования в качестве питательных

сред для микроорганизмов, поскольку относится к возобновляемому типу сырья. Это серьезное преимущество в пищевой, кормовой и фармацевтической промышленности. Основные компоненты ЦСС: целлюлоза, гемицеллюлозы и лигнин (Макарова & Будаева, 2016; Борисенко и др., 2012).

Целлюлоза – опорный полисахарид, образованный остатками D-глюкозы, связанными β -1,4-гликозидными связями. Полисахаридные цепи соединяются водородными связями, образуя микрофибриллы, которые группируются в фибриллы и формируют волокна целлюлозы. Такая структура позволяет целлюлозе быть устойчивой по отношению к растворителям и, частично, к гидролитическому распаду ферментами (Хоанг, 2018). Например, для её гидролиза требуются высокие температуры порядка 200 °C (Григорьева & Харина, 2016).

Гемицеллюлозы – гетерогенные полисахариды, представляющие собой короткие разветвленные полимеры, построенные из остатков пентоз (ксилозы и арабинозы) и некоторых гексоз (глюкозы, галактозы и маннозы). Отличительной особенностью гемицеллюлозы по сравнению с целлюлозой является её способность набухать в воде, при этом не растворяясь в ней. Гемицеллюлозы также подвержены гидролизу, но при менее высоких температурах. Кроме того, для гемицеллюлоз характерен неравномерный гидролиз, так как в их состав входят быстро и медленно гидролизующиеся фракции (Григорьева & Харина, 2016).

Лигнин – сложное полимерное вещество, представляющее собой полифенол переменного состава. Он окружает волокна гемицеллюлозы, образуя защитный барьер, который предотвращает разрушение клеточных стенок растения микроорганизмами (Чекушина, 2013). Когда целлюлоза попадает в желудок, она сильно разбухает и вызывает ощущение сытости. Поскольку пищевые волокна не усваиваются в желудке, то сразу переходят в кишечник и являются хорошим стимулятором для роста облигатной микрофлоры. Кроме этого, целлюлоза выводит лишний холестерин и сахар.

В настоящей работе в качестве ЦСС кормового назначения для твердофазной ферментации нами была рассмотрена сенная мука, в качестве ЦСС пищевого назначения – петрушка обыкновенная. Выбор обусловлен несколькими факторами. Сенная мука по пищевой ценности приближена к зерновым кормам, а по содержанию минеральных веществ и

² Борисенко, Е. Г., & Каночкина, М. С. (2012). Патент РФ 2502795. Способ получения сухого полимикробного продукта для использования в пищевой промышленности. Россия. https://yandex.ru/patents/doc/RU2502795C2_20131227

витаминов превосходит их. Питательность сена зависит от ботанического состава растений, сроков и методов уборки, а также продолжительности сушки (Горин, 2011; Сариев и др., 2019). Петрушка обыкновенная (*Petroselinum crispum*) – многолетнее растение из семейства зонтичных. Это пищевое растение, полезные свойства которого были известны ещё с древности. Её используют в лечебных целях, как противовоспалительное и мочегонное средство, а также при болезнях желудочно-кишечного тракта. Её польза обусловлена богатым химическим составом (Кароматов & Кулдошева, 2018). В настоящей работе показана возможность накопления микробной биомассы методом твердофазной ферментации на негидролизованном целлюлозосодержащем сырье: петрушке и сенной муке.

Материалы и методы исследования

Научно-исследовательская работа проводилась на базе кафедры «Биотехнология и технология продуктов биоорганического синтеза» ФГБОУ ВО «МГУПП».

Материалы

Субстраты. В качестве целлюлозосодержащего сырья были использованы: сенная мука и из-

мельченная петрушка. Оба субстрата являются непосредственными источниками питания: сенная мука – для животных и петрушка – для человека. Химический состав сырья представлен в Таблицах 2 и 3.

Штаммы. В качестве продуцентов для твердофазного культивирования целлюлозосодержащего сырья использовали:

- штамм дрожжей *Meyerozyma (Pichia) guilliermondii* Я1 из коллекции кафедры «Биотехнология и технология продуктов биоорганического синтеза» ФГБОУ ВО «МГУПП»;
- штамм дрожжей *Candida friedricchi*, выделенный из молочнокислого продукта Айран (ООО «ФУД МИЛК») – использовался нами как контрольный производственный штамм;
- штаммы дрожжей, вновь выделенные непосредственно из самого сырья (сенная мука, петрушка), в том числе *Meyerozyma (Pichia) guilliermondii* N2, отнесенный к данному виду методом ПЦР анализа;
- производственный штамм дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* (препарат «Энтерол»), обладающий пробиотическими свойствами (Kaźmierczak-Siedlecka et al., 2020) – использовался нами как контрольный производственный штамм.

Таблица 2
Химический состав сена лугового³

Содержание веществ на 100 г								
Сухого в-ва, %	Сырого протеина, %	Сырого жира, %	Сырой золы, %	Сырой клетчатки, %	Са, %	Р, %	Каротина, мг	Безазотистые экстрактивные вещества, %
80,4	6,8	2,1	6,7	28,1	0,8	0,2	12	36,0

Таблица 3
Химический состав *Petroselinum crispum*⁴

Содержание веществ на 100 г								
Белки, %	Жиры, %	Ненасыщенные жирные кислоты, %	Углеводы, %	Зола, %	Пищевые волокна, %	Массовая доля монодисахаридов, %	Органические кислоты, %	Крахмал, %
3,7	0,4	0,1	7,6	1,1	2,1	6,4	0,1	1,2
Содержание микро- и макроэлементов на 100 г								
К, мг	Са, мг	Si, мг	Mg, мг	Na, мг	S, мг	Р, мг	Cl, мг	Zn, мг
800	245	15	85	34	29,7	95	160	1,07

³ ГОСТ Р 55452-2013. (2014). *Сено и сенаж. Технические условия*. М.: Стандартинформ.

⁴ Скурихин, И. М., & Тутельян, В. А. (2002). *Химический состав российских пищевых продуктов: Справочник*. М.: ДеЛи принт.

Методы и процедура исследования

Приготовление субстрата. Сенную муку готовят из молодой травы в период бутонизации. Измельченную траву высушивают при температуре 30–40 °С в сушилках до уровня влажности не более 15%. Трава высушивается за счет конвекции теплого воздуха. При таком приготовлении сеной муки потери питательных веществ минимальны.

Подготовка сырья для исследования проходила следующим образом: растения сушили при комнатной температуре в течение 3–4-х суток, затем измельчали в бытовой кофемолке Bosch до размера частиц не более 5 мм, насыпали по 5 г в стеклянные чашки Петри и стерилизовали в соответствии с общепринятыми нормами методов и условий стерилизации, используемых при получении стерильных средств, в том числе лекарственных⁵, в автоклаве при температуре 120 °С в течение 30-ти минут.

Засев субстрата. Для работы применялась подготовленная сеновая мука и петрушка в количестве 5 грамм на чашку Петри. Приготовление субстрата вели, как описано выше. После автоклавирования чашки Петри с сырьем охлаждали до комнатной температуры и засевали суспензиями штаммов дрожжей, посевная доза – 1* КОЕ/г субстрата. Засев проводили равномерно по всей площади субстрата, активно перемешивали.

Выделение чистых культур дрожжей из субстратов. Для выделения чистых культур дрожжей брали навеску измельченной сушеной петрушки и сеной муки, смешивали со стерильной водой. Из полученной суспензии проводили отбор пробы петлей и высевали на чашку Петри с заранее подготовленной средой. В качестве питательной среды для чашек Петри использовалась среда №2 ГРМ (Сабура), производства ФГУН «ГНЦ ПМБ» Роспотребнадзора. После засева чашки термостатировали в течение 3-х суток до появления гладких белых колоний на поверхности среды. Для подтверждения полученные культуры микроскопировали и идентифицировали. Идентификацию дрожжей проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР-анализа).

Культивирование. Ферментацию проводили в чашках Петри в растительной камере твердофазным способом с доступом воздуха при оптимальной температуре роста дрожжей 30 °С в течение 2-х су-

ток. Влажность субстрата (измельченная петрушка или сено) при культивировании составляла 60%. Влажность измеряли до засева культурой микроорганизмов на приборе Чижовой. Посевная доза – 1* КОЕ/г субстрата.

Подсчет клеток. Продуктивность твердофазного культивирования исследовали методом прямого подсчета клеток в камере Горяева⁶. Подсчет осуществляли через 0, 24 и 48 часов после начала ферментации. Эксперимент проводился трижды.

Анализ данных

Статистическую обработку результатов исследований и математический анализ экспериментальных данных проводили путем определения среднего значения искомой величины из 3-х повторностей, среднеквадратичного отклонения и доверительного интервала при помощи программного пакета Microsoft Excel.

Результаты и их обсуждение

Работы по получению биопродуктов твердофазными методами ведутся преимущественно с использованием мицелиальных грибов, в том числе *Aspergillus oryzae*, подробно процесс рассмотрен в научно-исследовательской работе (Серба и др., 2017).

По данным исследований (Борисенко и др., 2019; Utama et al., 2019; Ordoñez-Araque et al., 2020) наиболее перспективными для роста на вторичном сырье агропромышленного комплекса, в том числе целлюлозосодержащем, в условиях твердофазного культивирования являются дрожжеподобные грибы рода *Pichia*. Штаммы дрожжей, вновь выделенные нами непосредственно из самого сырья (сеновая мука, петрушка), в том числе *Meyerozyma (Pichia) guilliermondii* N2, отнесены методом ПЦР как раз к указанному роду. Это подтверждает целесообразность их использования в качестве продуцентов микробной биомассы при разработке прототипа технологии твердофазной биоконверсии ЦСС. Кроме того, в работе (Самбук и др., 2019) была дана характеристика перспектив дрожжевых культур, продуцирующих киллер-токсины, и обосновано их широкое применение в пищевой промышленности, в агро- и аквакультурах как биопротективный агент, а также в медицине. Одним из представителей, продуцирующих кил-

⁵ ОФС.1.1.0016.15. Общие фармакопейные статьи. Стерилизация. <https://pharmacopoeia.ru/ofs-1-1-0016-15-sterilizatsiya/>

⁶ Красникова, Л. В., & Гунькова, П. И. (2016). *Общая и пищевая микробиология: Учебное пособие* (ч. 1). СПб.: Университет ИТМО.

лер-токсины является род *Pichia*, включая виды *Pichia anomala*, *Pichia guilliermondii*, что также подтверждает наш выбор продуцентов для технологических решений.

На Рисунке 1 отчетливо виден прирост биомассы дрожжей *Meyerozyma guilliermondii* N2 через 48 часов культивирования – 0,7* дрожжевых клеток в 1 г субстрата практически на два порядка. Другие штаммы дрожжей, включая контрольные, используемые в исследовании, также показали хороший прирост биомассы, что говорит об относительной универсальности разрабатываемой технологии. Разница между максимальным значением по приросту биомассы у дрожжей *Meyerozyma guilliermondii* N2 и наименьшим значением у штамма *Meyerozyma guilliermondii* Я1 составляет порядка 60%. Эти результаты могут лечь в основу разработки прототипа технологии твердофазной биоконверсии на сенной муке.

В процессе культивирования микроорганизмы выделяют в ферментационную среду продукты своей жизнедеятельности, количественный и качественный их состав зависит, в том числе, от состава среды. При этом твердые субстраты обычно дают все питательные вещества, необходимые для роста аэробных микроорганизмов, таким образом, позволяя использовать более простые, экономически выгодные составы ферментационных сред и повышая выход биомассы. Таким образом гетерогенные среды скорее всего могут быть более эф-

фективными для использования в процессе роста и накопления биомассы дрожжами.

Наше предположение подтверждают отдельные исследования (Омельченко и др. 2017; Серба и др., 2018), которые отмечают стимулирующую роль гетерофазности среды для процесса глубинного культивирования на рост и накопление биомассы микроорганизмами. Ферментационная среда, предложенная авторами, многокомпонентная и также содержит целлюлозосодержащий компонент – пшеничные отруби. В качестве продуцентов для исследований использовали штаммы каротиноидных дрожжей рода *Rhodospordium*, дрожжеподобных грибов рода *Candida*, дрожжей рода *Saccharomyces*.

Широкоизвестный производственный штамм дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* из препарата «Энтерол», относящийся к вышеуказанному роду и обладающий пробиотическими свойствами, был использован нами как один из контрольных.

Для ферментации с целью получения биопрепаратов пищевого назначения, в качестве сырья использовали петрушку, Рисунок 2. Нами отмечен общий прирост биомассы дрожжей, в большей степени *Meyerozyma (Pichia) guilliermondii* Я1, через 48 часов ферментации – 3, 4* дрожжевых клеток в 1 г субстрата. При этом необходимо отметить существенное накопление биомассы в целом всеми штаммами по сравнению с результатами твердофазного куль-

Твердофазное культивирование на сенной муке

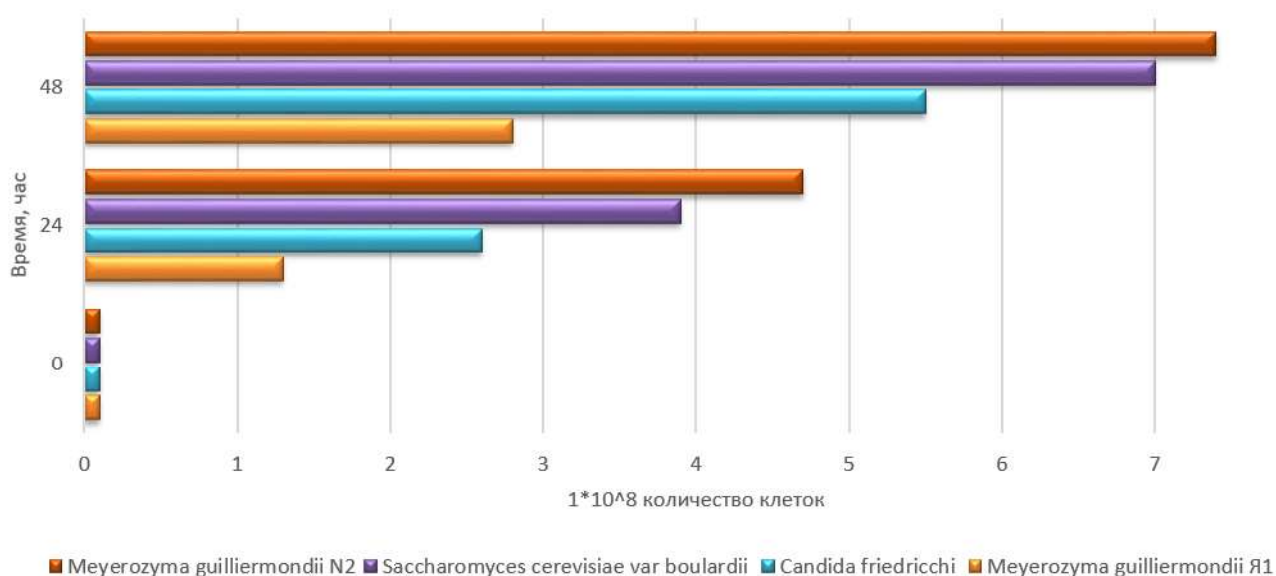


Рисунок 1.



Рисунок 2.

тивирования на сенной муке. Это может быть вызвано богатым химическим составом субстрата. Содержащиеся в петрушке белки, моно- и дисахариды, а также макро- и микроэлементы способствуют росту и развитию микробных культур без добавления обогатителей: неорганических солей или других всевозможных промышленных отходов.

Контрольные штаммы – пробиотический штамм дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* и промышленный штамм дрожжей, выделенный из продукта Айран компании ООО «ФУД МИЛК» – также показали прирост биомассы на твердофазном субстрате: для *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* прирост биомассы через 48 часов составил 0,8* дрожжевых клеток в 1 г субстрата, для штамма дрожжей из Айрана – 1,1* дрожжевых клеток в 1 г петрушки. Это в 3 раза меньше, чем прирост биомассы при использовании штамма *Meyerozyma (Pichia) guilliermondii* Я1. Следует отметить, что для биологически активных добавок с содержанием дрожжевых клеток более в 1 г субстрата уже показаны лечено-профилактические эффекты^{7,8}.

Таким образом отмечен высокий экспоненциальный рост биомассы у штамма *Meyerozyma*

(*Pichia*) *guilliermondii* Я1 на 2-е сутки культивирования – прирост биомассы в 4 раза, – в то время как прирост биомассы других используемых нами штаммов был в 2 раза. Предполагаем, что такая высокая продуктивность связана именно со штаммовыми характеристиками и требует дальнейшего исследования в расширенных экспериментах.

Выводы

Использование дрожжей для твердофазной ферментации целлюлозосодержащего сырья перспективно, поскольку позволяет получать высокий выход биомассы штаммов дрожжей.

Несмотря на неприхотливость и доступность таких растений, как петрушка и составляющие сена, твердофазные субстраты, получаемые из них, имеют в составе необходимые питательные вещества и способны обеспечивать рост, развитие микроорганизмов без дополнительных добавок.

Для получения биопрепаратов кормового назначения целесообразно использовать в качестве субстратов сенную муку – в связи с объемами этого

⁷ Кулемин, Л. М., & Чичерин, И. Ю. (2002). Патент РФ 2206330. Средство, обладающее иммуномодулирующей, энтеросорбционной, антитоксической и противовоспалительной активностью и способ его получения. Россия. https://yandex.ru/patents/doc/RU2206330C1_20030620

⁸ Борисенко, Е. Г., Борисенко, Н. А., Пименов, Е. В., & Юрченко, А. В. (1998). Патент РФ 2102903. Способ производства лечебно-профилактической добавки. Россия. <http://allpatents.ru/patent/2102903.html>

субстрата и традициями кормления животных на территории России, для пищевого назначения – петрушку, основываясь на богатом химическом составе и лечебно-профилактических свойствах растения. При это для каждого субстрата подобран штамм дрожжей, показавший максимальные значения по сравнению с другими используемыми: для сенной муки – *Meyerozyma guilliermondii* N2, для петрушки – *Meyerozyma (Pichia) guilliermondii* Я1.

Разрабатываемый прототип технологии может быть универсален для различных видов дрожжей, в том числе промышленных штаммов, и использоваться при восстановлении крупнотоннажного производства микробных нутриентов для животных и человека.

Благодарности

Авторы выражают подлинную благодарность за помощь в проведении исследований, организационную и методическую поддержку кафедре «Биотехнология и технология продуктов биоорганического синтеза» ФГБОУ ВО «МГУПП» и научно-исследовательской организации Обществу с ограниченной ответственностью «Микробные нутриенты иммунокорректоры».

Литература

- Борисенко, Е. Г., Горин, К. В., Борисенко, Е. А., Нгуен, Ч. З., Чан, В. Т., Каночкина, М. С., & Гулимова, Л. А. (2012). Новые горизонты производства функциональных нутриентов. *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю. А. Овчинникова*, 8(4), 58-60.
- Борисенко, Е. Г., Мадзу, О. Б., Пироговская, Е. К., Маслова, Т. А., & Азанова, А. А. (2019). Производство дрожжевых продуктов широкого профиля. *Процессы и аппараты пищевых производств*, 1, 3-9.
- Волова, Т. Г., & Барашков, В. А. (2010). Характеристика белков, синтезируемых водородоксилирующими микроорганизмами. *Прикладная биохимия и микробиология*, 46(6), 469-482.
- Горин, К. В. (2011). *Разработка технологий микробных полуфабрикатов для напитков на базе агропромышленного сырья* [Кандидатская диссертация, Московский государственный университет пищевых производств]. М., Россия.
- Григорьева, О. Н., & Харина, М. В. (2016). Кинетика реакции кислотного гидролиза целлюлозы и гемицеллюлоз. *Вестник технологического университета*, 19(11), 182-184.
- Долгунин, В. Н., Слепых, А. В., & Пронин, В. А. (2019). К разработке технологии и аппаратного оформления производства субстрата из целлюлозосодержащего сырья. *Вестник Тамбовского государственного технического университета*, 25(4), 595-602. <https://doi.org/10.17277/vestnik.2019.04.pp.595-602>
- Каночкина, М. С. (2011). Выживаемость дрожжей в твердофазных культурах. *Пищевая промышленность*, 6, 54-55.
- Кароматов, И. Д., & Кулдошева, Д. Р. (2018). Петрушка огородная - как лечебное и профилактическое средство. *Биология и интегративная медицина*, 4, 211-223.
- Кулишов, Б. А., Туан, Л. А., & Канарский, А. В. (2015). Утилизация отходов переработки растительного сырья в биореакторах для твердофазной ферментации. *Вестник Казанского технологического университета*, 18(3), 286-290.
- Макарова, Е. И., & Будаева, В. В. (2016). Биоконверсия непищевого целлюлозосодержащего сырья. *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*, 6(3), 26-35.
- Омарова, К. М., & Омаров, М. С. (2016). Биотехнология получения микробного белка на комплексном растительном сырье. *Grand Altai Research and Education*, 2, 65-69.
- Омельченко, Е. С., Аверина, Ю. А., Меньшиков, В. В., & Субчева, Е. Н. (2017). Исследование фильтрационных свойств суспензий, полученных глубинным гетерофазным культивированием дрожжей *Candida tropicalis* СК-4 на растительных субстратах для получения растительного углеводно-белкового корма. *Химия и химическая технология*, 15, 86-88.
- Поляков, В. А., & Погоржельская, Н. С. (2017). Инновационное развитие пищевой биотехнологии. *Индустрия питания*, 4, 6-14.
- Римарева, Л. В. (2012). Эффективная для животноводства белково-аминокислотная добавка, полученная на основе микробной биомассы. *Ветеринария и кормление*, 6, 47-48.
- Самбук, Е. В., Музаев, Д. М., Румянцев, А. М., & Падкина, М. В. (2019). Киллер-токсины дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*: Синтез, механизмы действия и практическое использование. *Экологическая генетика*, 17(3), 59-73. <http://doi.org/10.17816/ecogen17359-73>
- Сариев, А. Х., Чербакова, Н. Н., Дербенев, К. В., & Федина, Е. В. (2019). Химический состав растений, произрастающих в зоне влияния промышленных предприятий. *Вестник Красноярского государственного аграрного университета*, 5, 68-73.
- Серба, Е. М. (2015). Научно-практические аспекты получения БАД на основе конверсии вторичных биоресурсов. *Хранение и переработка сельхозсырья*, 2, 44-50.

- Серба, Е. М., Молчалина, П. Ю., Римарева, Л. В., Оверченко, М. А., Игнатова, Н. И., Борщева, Ю. А., & Соколова, Е. Н. (2017). Ферментированный соус на основе микробной биомассы. *Пищевая промышленность*, 9, 28-30.
- Серба, Е. М., Соколова, Е. Н., Фурсова, Н. А., Волкова, Г. С., Борщева, Ю. А., Кубатова, Е. И., & Куксова, Е. В. (2018). Получение биологически активных добавок на основе обогащенной дрожжевой биомассы. *Хранение и переработка сельхозсырья*, 2, 74-77.
- Смирнов, К. А., Алашкевич, Ю. Д., & Решетова, Н. С. (2009). Особенности твердофазной ферментации. *Химия растительного сырья*, 3, 161-164.
- Текутьева, Л. А., Сон, О. М., Подволоцкая, А. Б., & Скуртол, И. А. (2018). Технологический комплекс производства кормовых белковых концентратов. *Вестник науки и образования*, 12, 7-11.
- Хоанг, К. К. (2018). *Превращения биомассы соломы пшеницы при термообработке в среде ионной жидкости на основе 3-метилимидазола* [Кандидатская диссертация, Сибирский государственный университет науки и технологий имени академика М. Ф. Решетнева]. Красноярск, Россия.
- Чекушина, А. В. (2013). *Целлюлолитические ферментные препараты на основе грибов Trichoderma, Penicillium и Myceliophthora с увеличенной гидролитической активностью* [Кандидатская диссертация, Институт биохимии имени А. Н. Баха РАН]. М., Россия.
- Alonso, D. M., Wettstein, S. G., & Dumesic, J. A. (2012). Bimetallic catalysts for upgrading of biomass to fuels and chemicals. *Chemical Society Reviews*, 41(24), 8075-8098. <https://doi.org/10.1039/c2cs35188a>
- Kaźmierczak-Siedlecka, K., Ruszkowski, J., Fic, M., Folwarski, M., & Makarewicz, W. (2020). *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745: A non-bacterial microorganism used as probiotic agent in supporting treatment of selected diseases. *Current Microbiology*, 77(9), 1987-1996. <http://doi.org/10.1007/s00284-020-02053-9>
- Ordoñez-Araque, R. H., Landines-Vera E. F., Urresto-Villegas, J. C., & Caicedo-Jaramillo, C. F. (2020). Microorganisms during cocoa fermentation: systematic review. *Foods and Raw Materials*, 8(1), 155-161. <http://doi.org/10.21603/2308-4057-2020-1-155-162>
- Utama, G. L., Lestari, W. D., Kayaputri, I. L., & Balia, R. L. (2019) Indigenous yeast with cellulose-degrading activity in napa cabbage (*Brassica pekinensis* L.) waste: Characterisation and species identification. *Foods and Raw Materials*, 7(2), 321-327. <http://doi.org/10.21603/2308-4057-2019-2-321-328>

The Yeast Solid-Phase Fermentation of Cellulose-Containing Raw Materials

Marya S. Kanochkina

Moscow State University of Food Production
11 Volokolamskoe highway, Moscow, 125080, Russian Federation
Limited liability company «Microbial nutrients immunocorrectors»
2nd Likhachevsky lane, 2A, office 47, Moscow, 125438, Russian Federation
E-mail: kanoch@yandex.ru

Evgenye G. Borisenko

Moscow State University of Food Production
11 Volokolamskoe highway, Moscow, 125080, Russian Federation
E-mail: Beginna1939@gmail.com

Elizabeth R. Kruchkova

Moscow State University of Food Production
11 Volokolamskoe highway, Moscow, 125080, Russian Federation
E-mail: kruchkovaer@gmail.com

Karina V. Bakaeva

Moscow State University of Food Production
11 Volokolamskoe highway, Moscow, 125080, Russian Federation
E-mail: k.bakaeva1999@gmail.com

Anna S. Savelyeva

Moscow State University of Food Production,
11 Volokolamskoe highway, Moscow, 125080, Russian Federation
E-mail: Anna.savelev@yandex.ru

We present a prototype of the solid-phase cultivation technology, which allows us to get products containing a high level of yeast biomass. In this regard, the resulting products may have functional properties. Parsley and hay flour, which are easily renewable raw materials, were used as substrates. In the course of the study, the possibility of growth of various yeast strains on these substrates was shown: industrial, museum, and isolated from the raw materials. The well-known probiotic yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* (Enterol) was used as a control. The greatest increase in yeast biomass was observed on parsley, the maximum result was obtained using the strain *Meyerozyma (Pichia) guilliermondii* Ya1 – 3,4*yeast cells in 1 g of the substrate. In the case of hay flour, the maximum growth of the *Meyerozyma (Pichia) guilliermondii* N2 strain isolated directly from the substrate is 0.7* yeast cells per 1 g of the substrate. The control yeast strain showed average results – 0,8*yeast cells in 1 g of the substrate. It should be noted that for biologically active additives with a yeast cell content of more than 1 g of the substrate, treatment and preventive effects have already been shown. The obtained data may indicate the feasibility of using the developed prototype of solid-phase bioconversion technology, including for the cultivation of industrial yeast strains, and the value of parsley as a substrate for it.

Keywords: cellulose-containing raw materials, food biotechnology, yeast, *Saccharomyces boulardii*, *Pichia*, solid-phase bioconversion, nutrients, microbial protein

References

Borisenko, E. G., Gorin, K. V., Borisenko, E. A.,
Nguen, Ch. Z., Chan, V. T., Kanochkina, M. S., &
Gulimova, L. A. (2012). Novye gorizonty proizvod-

stva funktsional'nykh nutrientov [New horizons
in the production of functional nutrients]. *Vestnik
biotekhnologii i fiziko-khimicheskoi biologii imeni
Yu. A. Ovchinnikova* [Yu. A. Ovchinnikov Bulletin of
Biotechnology and Physico-Chemical Biology], 8(4),
58-60.

- Borisenko, E. G., Madzu, O. B., Pirogovskaya, E. K., Maslova, T. A., & Azanova, A. A. (2019). Proizvodstvo drozhzhevykh produktov shirokogo profilya [Production of yeast products of a wide range]. *Protsessy i apparaty pishchevykh proizvodstv* [Processes and Apparatuses of Food Production], 1, 3-9.
- Volova, T. G., & Barashkov, V. A. (2010). Kharakteristika belkov, sinteziruemykh vodorodokislyayushchimi mikroorganizmami [Characterization of proteins synthesized by hydrogen-oxidizing microorganisms]. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya* [Applied Biochemistry and Microbiology], 46(6), 469-482.
- Gorin, K. V. (2011). *Razrabotka tekhnologii mikrobnnykh polufabrikatov dlya napitkov na baze agropromyshlennogo syr'ya* [Development of technologies for microbial semi-finished products for drinks based on agro-industrial raw materials] [Candidate Dissertation, Moskovskii gosudarstvennyi universitet pishchevykh proizvodstv]. Moscow, Russia.
- Grigor'eva, O. N., & Kharina, M. V. (2016). Kinetika reaktsii kislotnogo gidroliza tsellyulozy i gemitsellyuloz [Kinetics of the Acid Hydrolysis of Cellulose and Hemicelluloses]. *Vestnik tekhnologicheskogo universiteta* [Bulletin of the Technological University], 19(11), 182-184.
- Dolgunin, V. N., Slepikh, A. V., & Pronin, V. A. (2019). K razrabotke tekhnologii i apparaturnogo oformleniya proizvodstva substrata iz tsellyulozoderzhashchego syr'ya [On the development of technology and instrumentation for the production of a substrate from cellulose-containing raw materials]. *Vestnik Tambovskogo gosudarstvennogo tekhnicheskogo universiteta* [Bulletin of the Tambov State Technical University], 25(4), 595-602. <https://doi.org/10.17277/vestnik.2019.04.pp.595-602>
- Kanochkina, M. S. (2011). Vyzhivaemost' drozhzhei v tverdogaznykh kul'turakh [Survival of yeast in solid phase cultures]. *Pishchevaya promyshlennost'* [Food Industry], 6, 54-55.
- Karomatov, I. D., & Kuldosheva, D. R. (2018). Petrushka ogorodnaya - kak lechebnoe i profilakticheskoe sredstvo [Garden parsley - as a therapeutic and prophylactic agent]. *Biologiya i integrativnaya meditsina* [Biology and Integrative Medicine], 4, 211-223.
- Kulishov, B. A., Tuan, L. A., & Kanarskii, A. V. (2015). Utilizatsiya otkhodov pererabotki rastitel'nogo syr'ya v bioreaktorakh dlya tverdogaznoi fermentatsii [Utilization of Waste Processing of Vegetable Raw Materials in Bioreactors for Solid-Phase Fermentation]. *Vestnik Kazanskogo tekhnologicheskogo universiteta* [Bulletin of Kazan Technological University], 18(3), 286-290.
- Makarova, E. I., & Budaeva, V. V. (2016). Biokonversiya nepishchevogo tsellyulozoderzhashchego syr'ya [Bioconversion of non-food cellulose-containing raw materials]. *Izvestiya vuzov. Prikladnaya khimiya i biotekhnologiya* [News of Higher Educational Institutions. Applied Chemistry and Biotechnology], 6(3), 26-35.
- Omarova, K. M., & Omarov, M. S. (2016). Biotekhnologiya polucheniya mikrobnogo belka na kompleksnom rastitel'nom syr'e [Biotechnology for obtaining microbial protein on complex plant raw materials]. *Grand Altai Research and Education* [Grand Altai Research and Education], 2, 65-69.
- Omel'chenko, E. S., Averina, Yu. A., Men'shikov, V. V., & Subcheva, E. N. (2017). Issledovanie fil'tratsionnykh svoystv suspenzii, poluchennykh glubinnym geterofaznym kul'tivirovaniem drozhzhei *Candida tropicalis* SK-4 na rastitel'nykh substratakh dlya polucheniya rastitel'nogo uglevodno-belkovogo korma [Investigation of the filtration properties of suspensions obtained by deep heterophase cultivation of yeast *Candida tropicalis* CK-4 on plant substrates to obtain vegetable carbohydrate-protein feed]. *Khimiya i khimicheskaya tekhnologiya* [Chemistry and Chemical Technology], 15, 86-88.
- Polyakov, V. A., & Pogorzhel'skaya, N. S. (2017). Innovatsionnoe razvitie pishchevoi biotekhnologii [Innovative development of food biotechnology]. *Industriya pitaniya* [Food Industry], 4, 6-14.
- Rimareva, L. V. (2012). Effektivnaya dlya zhivotnovodstva belkovo-aminokislotnaya dobavka, poluchennaya na osnove mikrobnoi biomassy [Effective for livestock protein-amino acid supplement derived from microbial biomass]. *Veterinariya i kormlenie* [Veterinary and Feeding], 6, 47-48.
- Sambuk, E. V., Muzaev, D. M., Rumyantsev, A. M., & Padkina, M. V. (2019). Killer-toksiny drozhzhei *Saccharomyces cerevisiae*: Sintez, mekhanizmy deistviya i prakticheskoe ispol'zovanie [Killer toxins of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: Synthesis, mechanisms of action and practical use]. *Ekologicheskaya genetika* [Environmental Genetics], 17(3), 59-73. <http://doi.org/10.17816/ecogen17359-73>
- Sariev, A. Kh., Cherbakova, N. N., Derbenev, K. V., & Fedina, E. V. (2019). Khimicheskii sostav rastenii, proizrastayushchikh v zone vliyaniya promyshlennykh predpriyatii [The chemical composition of plants growing in the zone of influence of industrial enterprises]. *Vestnik Krasnoyarskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta* [Bulletin of the Krasnoyarsk State Agrarian University], 5, 68-73.
- Serba, E. M. (2015). Nauchno-prakticheskie aspekty polucheniya BAD na osnove konversii vtorichnykh bioresursov [Scientific and practical aspects of obtaining dietary supplements based on the conversion of secondary biological resources]. *Khranenie*

- i pererabotka sel'khozsyrya* [Storage and Processing of Farm Products], 2, 44-50.
- Serba, E. M., Molchalina, P. Yu., Rimareva, L. V., Overchenko, M. A., Ignatova, N. I., Borshcheva, Yu. A., & Sokolova, E. N. (2017). Fermentirovannyi sous na osnove mikrobnai biomassy [Fermented sauce based on microbial biomass]. *Pishcheyaya promyshlennost'* [Food Industry], 9, 28-30.
- Serba, E. M., Sokolova, E. N., Fursova, N. A., Volkova, G. S., Borshcheva, Yu. A., Kubatova, E. I., & Kuksova, E. V. (2018). Poluchenie biologicheskii aktivnykh dobavok na osnove obogashchennoi drozhzhevoi biomassy [Obtaining biologically active additives based on enriched yeast biomass]. *Khranenie i pererabotka sel'khozsyrya* [Storage and Processing of Farm Products], 2, 74-77.
- Smirnov, K. A., Alashkevich, Yu. D., & Reshetova, N. S. (2009). Osobennosti tverdogaznoi fermentatsii [Features of solid phase fermentation]. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya* [Chemistry of plant raw materials], 3, 161-164.
- Tekut'eva, L. A., Son, O. M., Podvolotskaya, A. B., & Skurtol, I. A. (2018). Tekhnologicheskii kompleks proizvodstva kormovykh belkovykh kontsentrats [Technological complex for the production of feed protein concentrates]. *Vestnik nauki i obrazovaniya* [Bulletin of Science and Education], 12, 7-11.
- Khoang, K. K. (2018). *Prevrashcheniya biomassy solomy pshenitsy pri termoobrabotke v srede ionnoi zhidkosti na osnove 3-metilimidazola* [Transformations of wheat straw biomass during heat treatment in an ionic liquid medium based on 3-methylimidazole] [Candidate Dissertation, Sibirskii gosudarstvennyi universitet nauki i tekhnologii imeni akademika M. F. Reshetneva]. Krasnoyarsk, Russia.
- Chekushina, A. V. (2013). *Tsellyuloliticheskie fermentnye preparaty na osnove gribov Trichoderma, Penicilliumi Myceliophthora s uvelichennoi gidroliticheskoi aktivnost'yu* [Cellulolytic enzyme preparations based on fungi Trichoderma, Penicillium and Myceliophthora with increased hydrolytic activity] [Candidate Dissertation, Institut biokhimii imeni A. N. Bakha RAN]. Moscow, Russia.
- Alonso, D. M., Wettstein, S. G., & Dumesic, J. A. (2012). Bimetallic catalysts for upgrading of biomass to fuels and chemicals. *Chemical Society Reviews*, 41(24), 8075-8098. <https://doi.org/10.1039/c2cs35188a>
- Kaźmierczak-Siedlecka, K., Ruszkowski, J., Fic, M., Folwarski, M., & Makarewicz, W. (2020). Saccharomyces boulardii CNCM I-745: A non-bacterial microorganism used as probiotic agent in supporting treatment of selected diseases. *Current Microbiology*, 77(9), 1987-1996. <http://doi.org/10.1007/s00284-020-02053-9>
- Ordoñez-Araque, R. H., Landines-Vera E. F., Urresto-Villegas, J. C., & Caicedo-Jaramillo, C. F. (2020). Microorganisms during cocoa fermentation: systematic review. *Foods and Raw Materials*, 8(1), 155-161. <http://doi.org/10.21603/2308-4057-2020-1-155-162>
- Utama, G. L., Lestari, W. D., Kayaputri, I. L., & Balia, R. L. (2019). Indigenous yeast with cellulose-degrading activity in napa cabbage (Brassica pekinensis L.) waste: Characterisation and species identification. *Foods and Raw Materials*, 7(2), 321-327. <http://doi.org/10.21603/2308-4057-2019-2-321-328>