

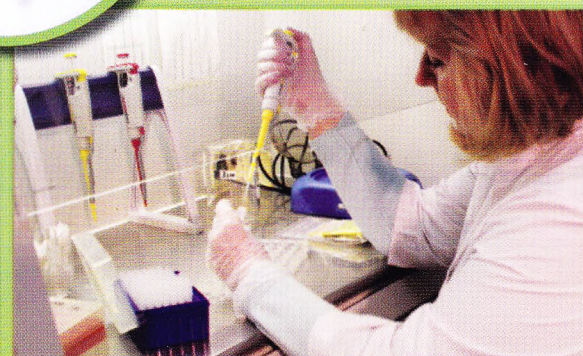
# ПИЩЕВАЯ ПРОМЫШЛЕННОСТЬ

ISSN 0235-2486

FOOD PROCESSING INDUSTRY

4.2019

## БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ в производстве продуктов питания и кормов



их качественных показателей: отчет о НИР (заключение)/ Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по продовольствию, руководитель темы Т.М. Тананайко. – Минск, 2015. – 186 с. № ГР 20141583.

## REFERENCES

1. *Oganesjanc, L.A.* Sravnitel'naja karakteristika sposobov poluchenija susla dlja proizvodstva zernovyh distilljatov / L.A. Oganesjanc [i dr.] // Pivo i napitki. – 2014. – №3. – S. 44–47.

2. *Oganesjanc, L.A.* Tehniko-jekonomicheskoe obosnovanie vybora syr'ja dlja proizvodstva zernovyh distilljatov / L.A. Oganesjanc [i dr.] // Pivo i napitki. – 2014. №2. – S. 10–13.

3. *Oganesjanc, L.A.* Vlijanie vida syr'ja na process sbrazhivaniya susla dlja proizvodstva zernovyh distilljatov / L.A. Oganesjanc, L.N. Krikunova, V.A. Peschanskaja, // Pivo i napitki. – 2014. – №4. – 22–25.

4 *Tehnologicheskaja instrukcija po proizvodstvu zernovyh distilljatov: TI BY 190239501.15.110–2015 / T.M. Tananajko:*

utv. Nauchno-prakticheskim centrom NAN Belarusi po prodovol'stviju 09.11.2015. Vved. 09.11.2015. – Minsk, 2015. – 24 s.

5. *Issledovanie biotehnologicheskikh processov proizvodstva zernovyh distilljatov iz razlichnyh vidov syr'ja i ustanovlenie ih kachestvennyh pokazatelej: otchet o NIR (zakljuchenie) / Nauchno-prakticheskij centr Nacional'noj akademii nauk Belarusi po prodovol'stviju, rukovoditel' temy T.M. Tananajko.* – Minsk, 2015. – 186 s. № GR 20141583.

## Авторы

*Тананайко Татьяна Михайловна, канд. техн. наук,* Белорусский государственный технологический университет, 220006, Республика Беларусь, г. Минск, ул. Свердлова, д. 13а  
*Пушкар Александр Александрович, канд. техн. наук,* Соловей Вадим Иванович  
Научно-практический центр Национальной академии наук Беларуси по продовольствию, 220037, Республика Беларусь, г. Минск, ул. Козлова, д. 29

## Authors

*Tananaiko Tatiana Mikhailovna, Candidate of Technical Sciences* Belarusian State Technological University, 13a, Sverdlov str., Minsk, Republic of Belarus, 220006  
*Pushkar Alexander Alexandrovich, Candidate of Technical Sciences,* Solovei Vadim Ivanovich  
Scientific and Practical Center for Foodstuffs of the National Academy of Sciences of Belarus, 29, Kozlov str., Minsk, Republic of Belarus, Minsk, 220037

УДК 577.2: 606

DOI: 10.24411/0235-2486-2019-10054

## Сравнительная характеристика свойств рекомбинантной фитазы 5.1 *Pantoea* sp. 3, полученной в различных экспрессионных системах

**Д.С. Трошагина**, аспирант; **М.Р. Шарипова**, д-р биол. наук, профессор Казанский (Приволжский) федеральный университет

## Реферат

Проводили сравнение свойств рекомбинантной фитазы AgpP *Pantoea* sp. 3.5.1, полученной на основе экспрессионной системы *E.coli* (AgpP-E), *Yarrowia lipolytica* (AgpP-Y) и *Pichia pastoris* (AgpP-P). Фитазы обладали pH-оптимумом и pH-стабильностью при кислых значениях pH. Температурный оптимум AgpP-Y, AgpP-P и AgpP-E составил 45 °С, 50 °С и 60 °С соответственно. Фитаза AgpP-P обладала высокой термостабильностью (до 70 °С). Активность фитаз ингибировалась ионами Fe<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> и Cu<sup>2+</sup> и активировалась Ca<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> и Mg<sup>2+</sup>.

## Ключевые слова

гетерологичная экспрессия, кормовые добавки, фитаза

## Цитирование

Трошагина Д.С., Шарипова М.Р. (2019) Сравнительная характеристика свойств рекомбинантной фитазы 5.1 *Pantoea* sp. 3, полученной в различных экспрессионных системах // Пищевая промышленность. 2019. № 4. С. 108–110.

## Comparative characteristics of the properties of recombinant phytase 5.1 *Pantoea* sp. 3, obtained in various expression systems

**D.S. Troshagina**, graduate student; **M.R. Sharipova**, Doctor of Biological Sciences, Professor Kazan (Volga region) Federal University

## Abstract

A comparative characteristic of the properties of recombinant phytase AgpP *Pantoea* sp. 3.5.1, obtained on the basis of bacterial *E. coli* (AgpP-E) and yeast *Yarrowia lipolytica* (AgpP-Y) and *Pichia pastoris* (AgpP-P) expression systems, was carried out. Phytases possessed pH-optimimum and pH-stability at acidic pH values. The temperature optimum of AgpP-Y, AgpP-P and AgpP-E was 45 °C, 50 °C and 60 °C, respectively. Phytase AgpP-P had a high thermostability (up to 70 °C). Phytase activity was inhibited by Fe<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> and Cu<sup>2+</sup> and activated by Ca<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup>.

## Key words

phytase, heterologous expression, feed additives

## Citation

Troshagina D.S., Sharipova M.R. (2019) Comparative characteristics of the properties of recombinant phytase 5.1 *Pantoea* sp. 3, obtained in various expression systems // Food processing industry = Pisshevaya promyshlennost. 2019. № 4. P. 108–110.

Проблема недостатка усвояемого фосфора в питании животных является актуальной и обусловлена тем, что в кормовом зерне большая его часть находится в неусвояемой форме фитатов. Микробные ферменты фитазы способны расщеплять фитаты и могут быть использованы в качестве кормовых добавок. Использование ферментов в промышленности подразумевает масштабирование процессов их синтеза. С этой целью необходимо создание эффективных систем экспрессии микробных фитаз.

**Цель работы** – сравнительная характеристика свойств рекомбинантной фитазы *Pantoea sp.* 3.5.1, полученной в бактериальной *E. coli* и дрожжевых *Yarrowia lipolytica* и *Pichia pastoris* системах экспрессии. В работе использовались препараты фитаз AgpP-E, AgpP-Y и AgpP-P, полученных нами на основе рекомбинантных штаммов *E. coli* BL 21 plysS pET28a/agpP [1], *Y. lipolytica* pINA1296/agpP [2] и *P. pastoris* pPINK/agpP [3] соответственно.

Определяли pH-оптимум активности фитаз и установили, что фитазы AgpP-Y и AgpP-P обладали более высокой активностью при кислых значениях pH, чем фитаза AgpP-E, и сохраняли активность при щелочном pH, тогда как AgpP-E полностью ингибировалась при pH выше 5.0 (рис. 1 а). При определении pH-стабильности ферментов установили, что фитазы AgpP-P и AgpP-E сохраняли более 80 % своей активности при кислых значениях pH, однако при щелочном pH активность ферментов ингибировалась; фитаза AgpP-Y была полностью стабильна при pH 3.0–6.0 и сохраняла свою активность при щелочном pH (рис. 1 б). Это дает возможность использовать данные ферменты в качестве кормовых добавок, поскольку они не будут инактивированы, проходя через отделы пищеварительного тракта животных, имеющих различные значения pH.

Изучали влияние температуры на активность и стабильность рекомбинантных

свойств фитазы appA, экспрессированной в *E. coli* и *P. pastoris*, Roy с соавторами также показали повышение термостабильности последней, что вероятно, связано с гликозилированием белков дрожжами [4].

Важным компонентом полноценного питания животных являются микроэлементы. Однако показано, что ионы металлов могут оказывать влияние на активность фитаз [5]. Установили: ионы  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$  в концентрации 1 мМ повышали активность фитаз, ионы  $\text{Co}^{2+}$  не оказывали влияния, ионы  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  и  $\text{Zn}^{2+}$  ингибировали их активность (рис. 2).

Таким образом, мы изучили и сравнили свойства рекомбинантных фитаз, полученных на основе различных систем экспрессии. Дальнейшие исследования рекомбинантных ферментов позволят в полной мере оценить потенциал их использования в качестве кормовых добавок.

Работа выполнена в рамках государственной программы повышения конкурентоспособности Казанского (Приволжского) федерального университета среди ведущих мировых научно-образовательных центров и поддержана грантом РФФИ № 16-16-04062.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Suleimanova, A.D. Novel glucose-1-phosphatase with high phytase activity and unusual metal ion activation from soil bacterium *Pantoea sp.* strain 3.5.1 / A.D. Suleimanova [et al.] // Applied and Environmental Microbiology. – 2015. – V. 81 (19). – P. 6790–6799.
2. Troshagina, D.S. Construction of integration vectors for secreted expression of bacterial phytase in *Yarrowia lipolytica* / D.S. Troshagina [et. al.] // Helix J. – 2017. – V. 8 (1). – P. 2289–2294.
3. Troshagina, D.S. Cloning of phytase genes from *Pantoea sp.* 3.5.1 and *Bacillus ginsengihumii* M2.11 in *Pichia pastoris* / D.S. Troshagina [et. al.] // BioNanoSci. – 2018. – doi: 10.1007/s12668-018-0563-y.
4. Pal Roy, M. Cloning and expression of phytase AppA gene from *Shigella sp.* CD2 in *Pichia pastoris* and comparison of properties with recombinant enzyme expressed in *E. coli* / M. Pal Roy [et. al.] // Public Library of Science One. – 2016. – V. 11 (1). – P. e0145745.
5. Tran, T. Thermostability alkaline phytase from *Bacillus sp.* MD2: Effect of divalent metals on activity and stability / T. Tran [et al.] // Journal of Inorganic Biochemistry. – 2011. – V. 105. – P. 1000–1007.

#### REFERENCES

1. Suleimanova, A.D. Novel glucose-1-phosphatase with high phytase activity and unusual metal ion activation from soil bacterium *Pantoea sp.* strain 3.5.1 / A.D. Suleimanova, A. Beinhauer, L.R. Valeeva, I.B. Chastukhina,

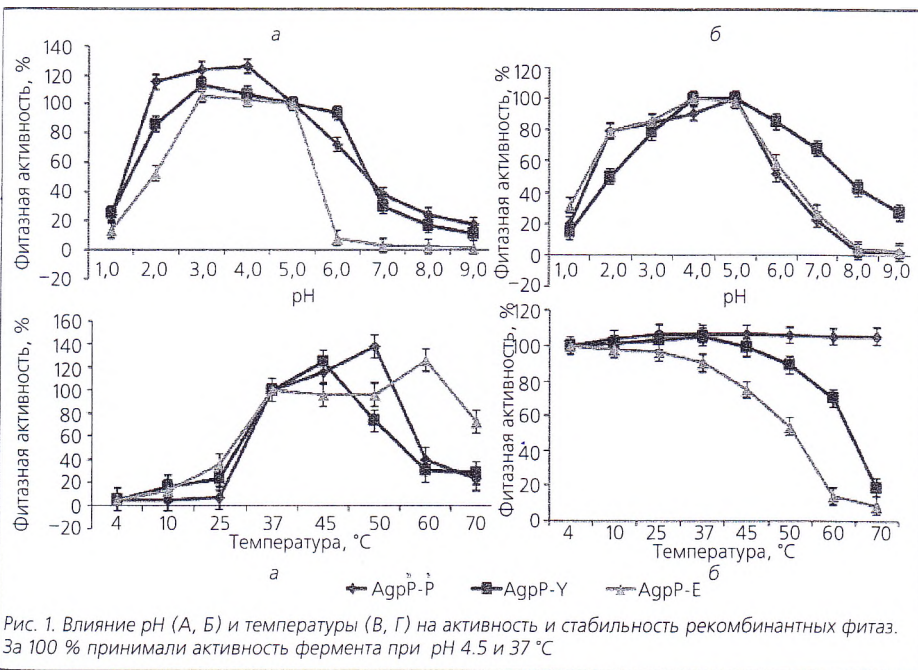


Рис. 1. Влияние pH (А, Б) и температуры (В, Г) на активность и стабильность рекомбинантных фитаз. За 100 % принимали активность фермента при pH 4.5 и 37 °С

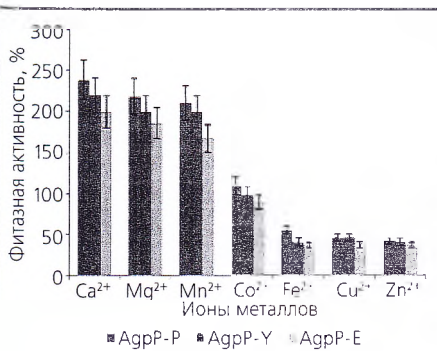


Рис. 2. Влияние ионов металлов на активность рекомбинантных фитаз. За 100 % принимали активность фермента в отсутствие ионов металлов

фитаз. Установлено, что фитазы AgpP-P, AgpP-Y и AgpP-E проявляли максимум активности при температуре 50 °С, 45 °С и 60 °С соответственно (рис. 1в). Показано, что фитаза AgpP-P обладала повышенной термостабильностью и сохраняла 100% своей активности в течение 1 ч при температуре от 4 °С до 70 °С; фитазы AgpP-Y и AgpP-E сохраняли более 60% активности в диапазоне температур от 4 °С до 60 °С и от 4 °С до 45 °С соответственно (рис. 1г). Таким образом, экспрессия фитаз в дрожжах позволила увеличить их термостабильность, что является важным фактором в производстве пищевых добавок, которые изготавливают при высоких температурах. При срав-

N.P. Balaban, E.V. Shakirov, R. Greiner, M.R. Sharipova // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2015. – V. 81 (19). – P. 6790–6799.

2. Troshagina, D.S. Construction of integration vectors for secreted expression of bacterial phytase in *Yarrowia lipolytica* / D.S. Troshagina, A.E. Smirnova, C. Madzak, A.D. Suleimanova // *Helix J.* – 2017. – V. 8 (1). – P. 2289–2294.

3. Troshagina, D.S. Cloning of phytase genes from *Pantoea* sp. 3.5.1 and *Bacillus ginsengihumi* M2.11 in *Pichia pastoris* / D.S. Troshagina, [et. al.] // *Bio Nano Sci.* – 2018. – doi: 10.1007/s12668-018-0563-y.

4. Pal Roy, M. Cloning and expression of phytase AppA gene from *Shigella* sp. CD2 in *Pichia pastoris* and comparison of properties

with recombinant enzyme expressed in *E. coli* / M. Pal Roy, [et. al.] // *PLoS One.* – 2016. – V. 11 (1). – P. e0145745.

5. Tran, T. Thermostability alkaline phytase from *Bacillus* sp. MD2: Effect of divalent metals on activity and stability / T. Tran, [et. al.] // *J. Inorg Biochem.* – 2011. – V. 105. – P. 1000–1007.

**Авторы**

Трошагина Дарья Сергеевна, аспирант  
Шарипова Маргарита Рашидовна, д-р биол. наук, профессор  
Казанский (Приволжский) федеральный университет,  
420008, г. Казань, ул. Кремлевская, д. 18,  
public.mail@kpfu.ru

**Authors**

Troshagina Daria Sergeevna, graduate student,  
Sharipova Margarita Rashidovna, Doctor of Biological Sciences, Professor  
Kazan (Volga region) Federal University,  
18, Kremlevskaya str., Kazan, 420008,  
public.mail@kpfu.ru

УДК 663.52

DOI: 10.24411/0235-2486-2019-10055

## О микробиологической чистоте и безопасности продуктов спиртового производства

М.В. Туршатов, канд. техн. наук; В.А. Кривченко, канд. техн. наук; А.О. Соловьев; И.М. Абрамова, д-р техн. наук  
ВНИИ пищевой биотехнологии – филиал ФИЦ питания, биотехнологии и безопасности пищи, Москва

**Реферат**

Развитие посторонней микрофлоры в спиртовом производстве приводит к значительным технологическим потерям. Для борьбы с микрофлорой широко применяются антибиотики. Ведутся исследования по контролю антибиотиков в продуктах переработки барды. Разрабатываются альтернативные способы обеспечения микробиологической чистоты.

**Ключевые слова**

антибиотики, микробиологическая чистота, посторонняя микрофлора, производство, послеспиртовая барда, спиртовое

**Цитирование**

Туршатов М.В., Кривченко В.А., Соловьев А.О., Абрамова И.М. (2019) О микробиологической чистоте и безопасности продуктов спиртового производства // Пищевая промышленность. 2019. № 4. С. 110–111.

## To a question about microbiological purity and safety of distillery plant products

M.V. Turshatov, Candidate of Technical Sciences; V.A. Krivchenko, Candidate of Technical Sciences; A.O. Solovyov; I.M. Abramova, Doctor of Technical Sciences

All-Russian Scientific-Research Institute of Food Biotechnology – Branch of the Federal Research Center for Nutrition, Biotechnology and Food Safety, Moscow

**Abstract**

Foreign microflora growing in alcohol production leads to considerable technology losses. Antibiotics are widely applied to fight against microflora. Researches on control of antibiotics in products of grain stillage processing are conducted. Developed alternative ways of ensuring microbiological purity.

**Key words**

foreign microflora, antibiotics, alcohol production, grain stillage, microbiological purity

**Citation**

Turshatov M.V., Krivchenko V.A., Solovyev A.O., Abramova I.M. (2019) To a question about microbiological purity and safety of distillery plant products // Food processing industry = Pisshevaya promyshlennost. 2019. № 4. P. 110–111.

В спиртовом производстве приоритетными являются условия, обеспечивающие максимальный выход спирта. К ним относятся мероприятия, направленные на сокращение технологических потерь при переработке сырья. Наиболее значимые из них имеют место в процессе спиртового брожения из-за развития посторонней микрофлоры. Индикатором

этого процесса является нарастание показателя титруемой кислотности. Установлено, что увеличение кислотности на 0,2 ОД снижает содержание спирта в зрелой бражке на 0,1 % об. [1]. Причины появления и развития посторонней микрофлоры достаточно много: зерно, вода при недостаточной очистке, режимы водно-тепловой обработки, конструкция оборудования,

наличие застойных зон, режимы мойки, дезинфекции и стерилизации, длительность межстерилизационного периода и т. д. Поиск дополнительных, более эффективных способов и средств, обеспечивающих микробиологическую чистоту процессов, продолжается. В последние годы для этой цели стали применять антибиотики. Как показывает практика, они