

## ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОЦЕССА ПОЛУЧЕНИЯ ФУМАРОВОЙ КИСЛОТЫ ПОД ДЕЙСТВИЕМ КЛЕТОК МИЦЕЛИАЛЬНОГО ГРИБА *RHIZOPUS ORYZAE*

Ефременко Е.Н.<sup>1,2,3</sup>, Сенько О.В.<sup>1,2,3</sup>, Маслова О.В.<sup>1,2</sup>, Степанов Н.А.<sup>1,2,3</sup>, Лягин И.В.<sup>1,2,3</sup>, Илушка И.В.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимии имени А.Н. Баха, РАН, Москва, e-mail: elena\_efremenko@list.ru;

<sup>2</sup>Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва;

<sup>3</sup>Институт биохимической физики имени Н.М. Эмануэля, РАН, Москва;

<sup>4</sup>ООО «Краснодарский биоцентр», Абинск

---

В работе представлены данные скрининга мицелиальных грибов рода *Rhizopus*, имеющихся в распоряжении российских коллекций микроорганизмов, по способности конвертировать различные моносахара (глюкозу, ксилозу, арабинозу, фруктозу) в фумаровую кислоту. Скрининг продуцентов проводился с учетом максимально накапливаемой концентрации фумаровой кислоты в культуральной среде и продуктивности процесса. Подобраны оптимальные условия проведения процесса накопления фумаровой кислоты под действием отобранного штамма *Rhizopus oryzae* F-1032, такие как концентрация субстрата (100 г/л) и биомассы продуцента (300 г/л) в питательной среде, требуемая продолжительность процесса (48 ч). Исследована кинетика процесса накопления фумаровой кислоты под действием клеток гриба *Rhizopus oryzae* F-1032 в питательных средах на основе глюкозы, фруктозы и из смеси (3:1). Рассчитаны некоторые характеристики процесса получения фумаровой кислоты под действием клеток мицелиальных грибов.

Ключевые слова: фумаровая кислота, мицелиальные грибы, *Rhizopus oryzae*.

## INVESTIGATION OF THE PROCESS OF FUMARIC ACID PRODUCTION USING FILAMENTOUS FUNGI *RHIZOPUS ORYZAE*

Efremenko E.N.<sup>1,2,3</sup>, Senko O.V.<sup>1,2,3</sup>, Lyagin I.V.<sup>1,2,3</sup>, Maslova O.V.<sup>1,2</sup>, Stepanov N.A.<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>A.N. Bach Institute of Biochemistry, RAS, Moscow, e-mail: elena\_efremenko@list.ru;

<sup>2</sup>Lomonosov Moscow State University, Moscow;

<sup>3</sup>Institute of Biochemical Physics, RAS, Moscow;

<sup>4</sup>ООО «Krasnodarskiyi biocenter», Abinsk

---

The results of screening made between strains of filamentous fungi presenting in the Russian collections of microorganisms on their ability to convert various monosaccharides (glucose, xylose, arabinose, fructose) to fumaric acid were performed in this work. This screening was conducted taking into account the maximum values of accumulating concentrations of fumaric acid in the cultural media and the productivity of conversion process. Substrate (100 g/L) and biomass (300 g wet weight/L) concentrations as well as necessary process duration (48 h) were revealed as optimal conditions for realization of process of fumaric acid accumulation under the action of selected strain *Rhizopus oryzae* F-1032. The kinetics of fumaric acid accumulation by fungus cells *Rhizopus oryzae* F-1032 was investigated in the nutritional media containing glucose or fructose or their mixture (ratio 3:1). The most important characteristics of the process of fumaric acid production catalyzed by filamentous fungi were calculated and presented in the work.

Keywords: fumaric acid, filamentous fungi, *Rhizopus oryzae*.

В настоящее время актуально получение таких коммерчески значимых продуктов, как органические кислоты, востребованные в процессах получения биodeградируемых пластиков [1].

Так, биodeградируемые материалы на основе молочной кислоты нашли применение в производстве пищевой упаковки одноразового пользования, медицине (получение шовных материалов) и др. [8]. Полимеры на основе фумаровой и янтарной кислот способны заменить традиционно используемые пластики, применяемые, например, для получения одноразовой

посуды, поскольку обладают необходимыми механическими и физико-химическими характеристиками и при этом подвергаются микробиологическому разложению [6].

Среди продуцентов молочной и фумаровой кислот наиболее эффективными являются клетки мицелиальных грибов рода *Rhizopus* [1, 2, 9]. Причём осуществлять секрецию фумаровой кислоты в культуральную жидкость способны только мицелиальные грибы рода *Rhizopus* [7].

При этом необходимо отметить, что мицелиальные грибы рассматриваются сегодня в качестве весьма перспективных продуцентов различных метаболитов, так как они обладают одновременно способностью к гидролитическому воздействию на субстраты, сложные по химическому составу, благодаря своим экзоферментам [1, 3–5]. Кроме того, они способны осуществлять конверсию в целевые продукты не только гексоз, но и пентоз [10].

**Целью данной работы** являлось исследование процесса получения фумаровой кислоты под действием клеток мицелиальных грибов.

#### **Материалы и методы исследования**

В работе использовались штаммы мицелиальных грибов, полученные из Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов (ВКПМ) и Всероссийской коллекции микроорганизмов (ВКМ). Штаммы не патогенны, хранятся и поддерживаются на картофельно-глюкозном агаре при температуре +5°C.

Концентрация фумаровой кислоты определялась спектрофотометрически с использованием ферментативного диагностического набора («Absam», Великобритания).

#### **Результаты исследования и их обсуждение**

Был проведен скрининг среди штаммов мицелиальных грибов, имеющих в распоряжении ВКМ и ВКПМ, по способности трансформировать различные моносахара в фумаровую кислоту (табл.1).

Таблица 1

Концентрация фумаровой кислоты (г/л), накапливающейся за 48ч в культуральной жидкости под действием свободных клеток различных штаммов мицелиальных грибов рода *Rhizopus*, и продуктивность процесса (г/(л×ч)) при использовании различных источников углерода (исходная концентрация – 50 г/л) и одинаковой исходной концентрацией спор ( $10^7$  спор/мл)

Штамм	Концентрация фумаровой кислоты, г/л					Продуктивность процесса, г/(л×ч)				
	Источник углерода:					Источник углерода:				
	Глюкоза	Фруктоза	Ксилоза	Арабиноза	Фруктоза: Глюкоза (3:1)	Глюкоза	Фруктоза	Ксилоза	Арабиноза	Фруктоза: Глюкоза (3:1)
<i>R. oryzae</i> F1032	<b>19,6±1,0</b>	<b>18,1±0,9</b>	<b>8,0±0,4</b>	<b>7,2±0,4</b>	<b>19,0±1,0</b>	<b>0,41±0,02</b>	<b>0,38±0,02</b>	<b>0,17±0,01</b>	<b>0,15±0,01</b>	<b>0,40±0,02</b>
<i>R. delemar</i> F1146	16,2±0,8	14,7±0,7	7,5±0,4	5,4±0,3	15,9±0,8	0,34±0,02	0,31±0,01	0,16±0,01	0,11±0,01	0,33±0,02
<i>R. oryzae</i> F1026	16,9±0,8	14,5±0,7	7,8±0,4	6,9±0,3	16,6±0,8	0,35±0,02	0,30±0,01	0,16±0,01	0,14±0,01	0,35±0,02
<i>R. oryzae</i> F1127	17,6±0,9	15,4±0,8	7,6±0,4	6,2±0,3	16,8±0,8	0,37±0,02	0,32±0,02	0,16±0,01	0,13±0,01	0,35±0,02
<i>R. oryzae</i> F829	17,3±0,9	16,2±0,8	7,4±0,4	6,3±0,3	17,0±0,9	0,36±0,02	0,34±0,02	0,15±0,01	0,13±0,01	0,35±0,02
<i>R. oryzae</i> F814	3,0±0,2	3,5±0,2	1,2±0,1	1,7±0,1	3,3±0,2	0,06±0,00	0,07±0,00	0,03±0,00	0,04±0,00	0,07±0,00
<i>R. oryzae</i> F841	5,4±0,3	4,7±0,2	2,6±0,1	1,8±0,1	5,3±0,3	0,11±0,01	0,10±0,00	0,05±0,00	0,04±0,00	0,11±0,01

Известно, что для получения фумаровой кислоты используется двустадийный процесс: 1 – накопление жизнеспособной грибной биомассы, продуцирующей фумаровую кислоту, на богатой питательной среде; 2 – накопление фумаровой кислоты в питательных средах, лимитированных по источнику азота и фосфора, в результате культивирования накопленной биомассы продуцента [7].

На первой стадии для накопления биомассы исследованных продуцентов использовалась богатая питательная среда на основе солода [1], позволяющая накопить максимальное количество биомассы продуцента за 24 часа (табл. 1).

Далее равное количество биомассы каждого продуцента – 300 г/л вносилось в питательные среды различного состава, содержащие стандартный набор солей [1] и по 50 г/л соответствующего источника углерода. При этом помимо различных моносахаридов с шестью и пятью атомами углерода, для проведения скрининга в качестве источника углерода также использовалась смесь фруктозы и глюкозы, взятых в соотношении 3:1.

На основании полученных результатов для дальнейших экспериментов был выбран штамм *R. oryzae* F1032, показавший максимальный результат при трансформации моносахаридов в фумаровую кислоту.

Необходимо было подобрать оптимальную исходную концентрацию углевода в питательной среде, которая, с одной стороны, позволит накопить максимальное количество фумаровой кислоты в культуральной жидкости, а с другой – будет приближена к концентрации углеводов, характерной для ферментативных гидролизатов непищевого возобновляемого сырья.

Для исследования влияния исходной концентрации субстрата на продуктивность периодического процесса получения фумаровой кислоты использовались синтетические питательные среды, содержащие необходимый набор солей и глюкозу или фруктозу, а также их смесь «фруктоза: глюкоза» = 3:1, соответственно в различной исходной концентрации в среде - от 50 до 120 г/л (рис. 1). Процесс проводился в течение 48 часов.

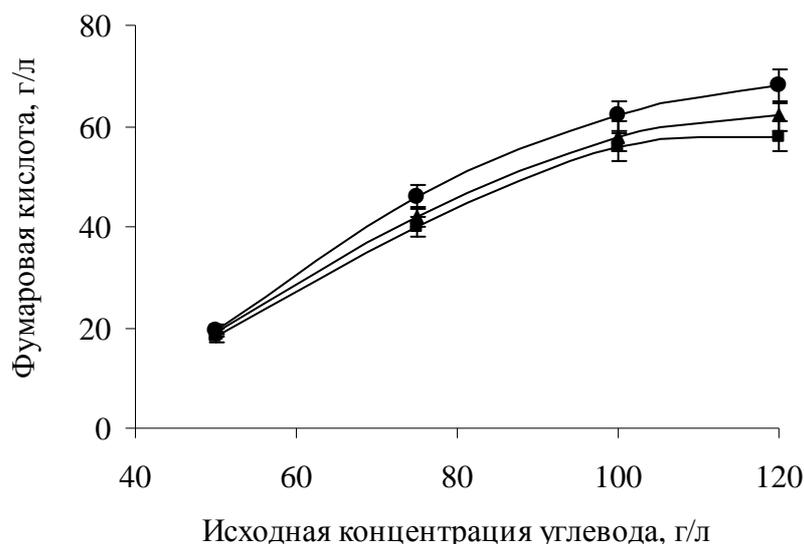


Рис. 1. Влияние исходной концентрации углеводов (● – глюкозы, ■ – фруктозы, ▲ – смеси «фруктоза: глюкоза» в соотношении 3:1) в среде на накопление фумаровой кислоты в культуральной жидкости под действием клеток мицелиального гриба *R. oryzae* F1032 (300 г/л)

Очевидно, что увеличение исходной концентрации источника углевода от 50 до 120 г/л в питательной среде приводит к увеличению конечной концентрации фумаровой кислоты в культуральной жидкости (рис. 1). Однако данная тенденция не имеет линейного характера во всём исследованном диапазоне концентраций сахаров. Максимальное накопление фумаровой кислоты наблюдается в диапазоне исходных концентраций углеводов 75–100 г/л и составляет 38÷62 %. В этом же диапазоне концентраций наблюдается минимальное снижение выхода фумаровой кислоты. Вероятно, использование концентрации источника углевода в среде ниже 75 г/л приводило к недостатку питательных веществ для клеток, а увеличение концентрации свыше 100 г/л – к ингибированию субстратом или продуктом.

Из всего вышесказанного следует вывод о том, что наиболее предпочтительным для предлагаемого биотехнологического подхода к получению фумаровой кислоты является использование сред, содержащих моносахариды в концентрации 100 г/л.

Было необходимо установить продолжительность процесса получения фумаровой кислоты. В этой связи была исследована кинетика этого процесса с использованием различных моносахаридов (рис. 2, табл. 2).

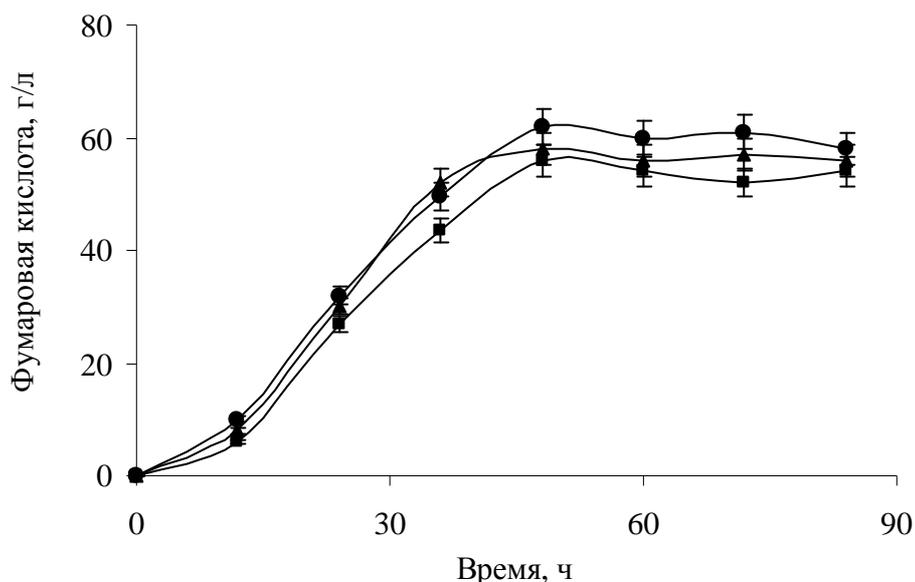


Рис. 2. Кинетика накопления фумаровой кислоты при трансформации различных углеводов (● – глюкозы, ■ – фруктозы, ▲ – смеси фруктоза: глюкоза в соотношении 3:1) под действием клеток мицелиального гриба *R. oryzae* F1032 (300 г/л)

Таблица 2

Характеристики процесса получения фумаровой кислоты под действием клеток гриба *R. oryzae* при варьировании исходной концентрации углеводов в питательной среде

Исходная концентрация углевода, г/л	Глюкоза		Фруктоза		Фруктоза: Глюкоза (3:1)	
	Выход, %	Продуктивность процесса, г/(л×ч)	Выход, %	Продуктивность процесса, г/(л×ч)	Выход, %	Продуктивность процесса, г/(л×ч)
50	60,9±3,0	0,41±0,02	56,2±2,8	0,38±0,02	59,0±3,0	0,40±0,02
75	95,2±4,8	0,96±0,05	82,8±4,1	0,83±0,04	87,0±4,3	0,88±0,04
100	96,3±4,8	1,29±0,06	87,0±4,3	1,17±0,06	90,1±4,5	1,21±0,06
120	88,0±4,4	1,42±0,07	75,1±3,8	1,21±0,06	80,2±4,0	1,29±0,06

Из полученных данных стало очевидным то, что процесс получения фумаровой кислоты из всех исследованных моносахаридов необходимо проводить в течение, как минимум, 48 часов при исходной концентрации клеток в среде 300 г/л.

Таким образом, в результате проведенных исследований можно сделать **следующие основные выводы:**

- для проведения селективного отбора продуктивного штамма-продуцента фумаровой кислоты концентрация источника углеводов должна составлять 100 г/л;

- в качестве источников углерода для проведения селективного отбора продуктивного штамма-продуцента фумаровой кислоты необходимо использовать те моносахариды и их

смеси, которые характерны для гидролизатов предполагаемого к использованию полисахаридсодержащего возобновляемого сырья;

- для проведения селективного отбора продуктивного штамма-продуцента фумаровой кислоты процесс накопления фумаровой кислоты должен проводиться в течение 48 часов при введении в среду биомассы клеток исследуемой культуры в концентрации 300 г/л;

- для получения фумаровой кислоты необходима определённая концентрация биомассы клеток, которая должна накапливаться за максимально короткий промежуток времени, поэтому необходима оценка кинетики роста, максимальный выход биомассы, понимание её продуктивности по фумаровой кислоте, а не продуктивность процесса;

- на данном этапе проведенный скрининг выявил в качестве наиболее продуктивной культуры – продуцента фумаровой кислоты штамм *R. oryzae* F1032.

*Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки РФ в рамках ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы» (уникальный идентификационный номер проекта RFMEFI60714X0050) по результатам исследований с использованием оборудования ЦКП «Прикладные биотехнологии» и УНУ «ВКМ» и «ВКПМ».*

### Список литературы

1. Сенько О. Ресурсосберегающая биотехнология получения фумаровой кислоты из возобновляемого растительного сырья / О. Сенько [и др.] // Вестник КузГТУ. – 2013. – № 1. – С. 111–113.
2. Ding Y. Production of fumaric acid by *Rhizopus oryzae*: role of carbon-nitrogen ratio / Y. Ding [et al.]. // Appl. Biochem. Biotechnol. – 2011. – Vol. 164, №2. – P. 1461–1467.
3. Efremenko E.N. Biocatalysts based on immobilized cells of microorganisms in the production of bioethanol and biobutanol / E.N. Efremenko [et al.]. // Catalysis in Industry. – 2011. – Vol. 3, № 1. – P. 41–46.
4. Efremenko E.N. Immobilized fungal biocatalysts for the production of cellulase complex hydrolyzing renewable plant feedstock / E.N. Efremenko [et al.]. // Catalysis in Industry. – 2013. – Vol.5, № 2. – P. 190–198.
5. Efremenko E.N. New biocatalyst with multiple enzymatic activities for treatment of complex food wastewater / E.N. Efremenko [et al.]. // Food Tech. Biotechnol. – 2008. – Vol. 46, № 2. – P. 208–212.
6. Goldberg I. Organic acids: old metabolites, new themes / I. Goldberg, J.S. Rokem, O. Pines // J. Chem. Tech. Biotechnol. – 2006. – Vol. 81. – P. 1601–1611.

7. Roa Engel, C.A. Fumaric acid production by fermentation / C.A. Roa Engel [et al.]. // Appl. Microbiol. Biotechnol. – 2008. – Vol.78. – P. 379–389.
8. Siracusa V. Biodegradable polymers for food packaging: a review / V. Siracusa [et al.]. // Trends Food Sci. Tech. – 2008. – Vol. 19. – P. 634–643.
9. Spiricheva O. Lactic acid production by immobilized cells of the fungus *Rhizopus oryzae* with simultaneous product extraction / O. Spiricheva [et al.]. // Theor. Found. Chem. Eng. – 2007. – Vol. 41, № 2. – P. 150–153.
10. Sues A. Ethanol production from hexoses, pentoses, and dilute-acid hydrolyzate by *Mucor indicus* / A. Sues [et al.]. // FEMS Yeast Res. – 2005. – Vol. 5. – P. 669–676.

**Рецензенты:**

Еремеев Н.Л., д.х.н., профессор, ФГОУ ВПО Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, г. Москва;

Попов В.О., д.х.н., ФГБУН Институт биохимии им. А.Н. Баха Российской академии наук, г. Москва.