

УДК 602.44

ЭФФЕКТИВНОСТЬ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ БАКТЕРИЙ *PAENIBACILLUS* НА ФЕРМЕНТОЛИЗАТАХ КЛЕТЧАТКИ РИСОВОЙ ШЕЛУХИ

© Т.З. Ха^{1*}, А.В. Канарский¹, З.А. Канарская¹, И.В. Кручина-Богданов³, А.В. Щербаков², Е.Н. Щербакова²

¹ Казанский национальный исследовательский технологический университет, ул. Толстого, 8, Казань, 420015 (Россия),
e-mail: coldwind.91@mail.ru

² ВНИИ сельскохозяйственной микробиологии, шоссе Подбельского, 3, Санкт-Петербург, 196608 (Россия)

³ ООО «Аналитика. Материалы. Технологии», ул. Новороссийская, 50, Санкт-Петербург, 194021 (Россия)

Полноценное использование вторичных ресурсов переработки растительного сырья биотехнологическими методами является экономически целесообразным и перспективным для биотехнологической отрасли. Цель данной работы – разработка технологии утилизации рисовой шелухи с получением питательной среды для культивирования бактерий *Paenibacillus*, перспективных для получения биопрепаратов сельскохозяйственного назначения, в частности, биоудобрений и кормовых добавок. Используя химический и биотехнологический методы обработки рисовой шелухи, установили, что для разделения клетчатки и минеральных веществ рисовую шелуху целесообразно обрабатывать гидроксидом натрия с концентрацией 2.5% при температуре 120 °С в течение 20 мин. Показана возможность получения простых сахаров путем ферментативной обработки клетчатки рисовой шелухи ферментным препаратом Accellerase 1500 в течение 24 ч при температуре 55 °С. В этих условиях в полученном ферментолизате содержится около 89% РВ от АСВ, а также аминокислоты и органические кислоты. Доказано, что ферментолизат клетчатки рисовой шелухи может быть использован в качестве основного субстрата для культивирования штаммов 560, 563, 567, 568, 572, 574, 17-2 бактерий *P. tucilaginosus* и 17-6 бактерий *P. salinicaeni*. Проведенным скринингом бактерий *Paenibacillus* по удельной скорости роста, времени генерации, выходу биомассы, и также по активности внеклеточных ферментов установлено, что перспективным штаммом для глубинного культивирования на питательной среде, приготовленной из ферментолизата рисовой шелухи, является штамм 560, который рекомендуется для дальнейших исследований при создании технологии биопродуктов сельскохозяйственного назначения.

Ключевые слова: рисовая шелуха, клетчатка, ферментолизат, питательная среда, *Paenibacillus*, культивирование.

Введение

В настоящее время все более актуальным становится использование вторичных ресурсов, образующихся при переработке возобновляемых сельскохозяйственных растений. Анализ научных публикаций и

Ха Тхи Зунг – аспирант, e-mail: coldwind.91@mail.ru

Канарский Альберт Владимирович – доктор технических наук, e-mail: alb46@mail.ru

Канарская Зоя Альбертовна – кандидат технических наук, e-mail: zosya_kanarskaya@mail.ru

Кручина-Богданов Игорь Вадимович – кандидат химических наук, директор, e-mail: igogo011@gmail.com

Щербаков Андрей Владимирович – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории технологии микробных препаратов, e-mail: microbe-club@inbox.ru

Щербакова Елена Николаевна – кандидат сельскохозяйственных наук, младший научный сотрудник лаборатории технологии микробных препаратов, e-mail: alonagonchar@mail.ru

патентов показывает, что вторичные ресурсы являются перспективным видом сырья для получения самых полезных продуктов для жизнедеятельности человека [1–3]. В частности, ученых и инженеров Китая, Индии, Вьетнама, Казахстана, Российской Федерации как основных производителей риса привлекает внимание шелуха, образующаяся при переработке последнего. Следует отметить, что при обработке каждый тонны риса образуется около 0.23 т рисовой шелухи, которая в природных условиях не утилизируется и создает экологические проблемы [4].

* Автор, с которым следует вести переписку.

Рисовая шелуха содержит 60–80% органических веществ, таких как целлюлоза, гемицеллюлозы (в основном, пентозаны), лигнин, незначительное количество белка, жира, витаминов и минеральных веществ, содержание которых изменяется в зависимости от географии места и агротехнических способов возделывания риса [5, 6]. В составе сухих веществ рисовой шелухи присутствуют органические кислоты: уксусная, лимонная, фумаровая, яблочная, щавелевая, янтарная, а также кислоты ароматического ряда и аминокислоты [7, 8]. В зависимости от способа выделения из рисовой шелухи можно получить около 20% аморфного кремния [9–11].

Учитывая значительное количество, а также доступность органических веществ в рисовой шелухе, представляется целесообразным использовать эти отходы в качестве сырья при производстве питательных сред для культивирования микроорганизмов в промышленных условиях. Использование данного дешевого источника углерода позволит организовать экономически эффективное производство биопрепаратов сельскохозяйственного назначения, в частности, пользующихся широким спросом в агрономической практике препаратов на основе бактерий рода *Paenibacillus* [12].

Бактерии рода *Paenibacillus* известны как ризобактерии, способствующие росту растений (PGPR – plant growth-promoting rhizobacteria). PGPR стимулируют рост сельскохозяйственных растений за счет способности к азотфиксации, солюбилизации фосфата, синтезу фитогормона ауксина и выделению сидерофоров, которые облегчают ассимиляцию железа [13–15]. Эти бактерии также обладают способностью к биосинтезу антибиотиков, которые обеспечивают защиту растений от насекомых, болезнетворных микроорганизмов, включая бактерии, грибы, нематоды и вирусы [16–18]. Таким образом, при помощи *Paenibacillus* могут быть также получены противомикробные препараты для применения в медицине и ветеринарии. Кроме этого, многие виды *Paenibacillus* способны гидролизовать высокомолекулярные углеводы и в потенциале синтезировать экзополисахариды и продуцировать целый ряд внеклеточных ферментов, включая амилазы, целлюлазы, гемицеллюлазы, липазы, пектиназы, оксигеназы, дегидрогеназы, лигнин-модифицирующие ферменты и мутаназы, которые широко применяются в производствах моющих средств, продуктов питания и кормов, текстиля, бумаги, биотоплива, а также в здравоохранении [19, 20]. Со временем *Paenibacillus* будет играть все более важную роль в повышении устойчивости сельского хозяйства и в промышленной биотехнологии.

Ранее был предложен ряд физико-химических методов переработки рисовой шелухи с получением различных целевых продуктов [21, 22]. Представляет интерес результаты исследования получения ферментоллизатов клетчатки рисовой шелухи с последующим синтезом молочные и других органических кислот микроорганизмами [23], а также получением биогаза [24]. В этой связи определение возможности получения бактериальной массы *Paenibacillus*, как продуцента продуктов метаболизма сельскохозяйственного назначения, на доступном и дешевом растительном сырье является весьма актуальным.

Цель работы – определение эффективности культивирования бактерий *Paenibacillus* на питательной среде, полученной на основе ферментолизата клетчатки рисовой шелухи.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

- 1) получение клетчатки рисовой шелухи для последующего ферментативного гидролиза с получением олигомеров клетчатки и простых сахаров;
- 2) определение условия ферментативного гидролиза клетчатки рисовой шелухи с получением олигомеров клетчатки и простых сахаров;
- 3) определение эффективности культивирования бактерий *Paenibacillus* на питательной среде, полученной на основе ферментолизата клетчатки рисовой шелухи.

Экспериментальная часть

Подготовка питательной среды. Рисовая шелуха получена при переработке риса сорта рапан белый (ООО ПФ Радуга, Краснодарский край). Состав рисовой шелухи: 11.65% (масс.) воды, 1.81% сырого белка, 0.39% сырого жира, 24.81% безазотистых экстрактивных веществ, 38.71% целлюлозы, 18.94% гемицеллюлоз, 13.17% золы, 19.40% лигнина, удельная поверхность методом БЭТ 0.3 м²/г.

Для использования клетчатки рисовой шелухи в качестве источника углерода в питательных средах при культивировании микроорганизмов рисовую шелуху обрабатывали гидроксидом натрия, клетчатку промывали и обрабатывали ферментами, получая редуцирующие вещества (РВ).

Для отделения оксида кремния от рисовой шелухи использовали растворы NaOH с концентрацией 2,5, 5 и 10%, гидромодуль обработки составил 1 : 8, температура – 120 °С, продолжительность обработки – 20 мин. Далее щелок, содержащий оксид кремния, отделялся от клетчатки отжимом с дальнейшим промыванием водопроводной водой. Промывку клетчатки водой заканчивали при достижении нейтральной реакции.

Анализ клетчатки рисовой шелухи после выделения диоксида кремния проводили по методикам: содержание целлюлозы (по Кюшнеру), содержание гемицеллюлозы (ГОСТ 9002), содержание лигнина (ГОСТ 11960), удельная площадь поверхности (метод БЭТ).

В щелоке определяли содержание редуцирующих и минеральных веществ. Концентрацию РВ после ферментативного гидролиза определяли с использованием 3,5-динитросалициловой кислоты (ДНСК-реагент) как описано в работе [25]. Минеральные вещества определяли рентгенофлуоресцентным методом. С помощью автоматической микропипетки последовательно отбирали 10 мм³ раствора образца и помещали на специальную закрепленную в кювете пленку для РФА с внешней стороны. Далее каплю высушивали с помощью теплого воздушного потока по методике, изложенной в работе [26]. После высушивания образец анализировали на рентгенофлуоресцентном спектрометре марки Clever в вакуумной среде. Параметры рентгеновской трубки с анодом из молибдена: E=45 кВ, I=200 мкА, площадь облучения – 36 мм². Время измерения каждого образца составляло 50 с. Расчет концентраций производится по методу фундаментальных параметров с учетом поправок по данным спектров эталонных образцов.

Ферментативный гидролиз клетчатки рисовой шелухи осуществляли с использованием ферментных препаратов Accellerase XY и Accellerase 1500, содержащие целлюлазы и гемицеллюлазы, получены при глубинном культивировании гриба *Trichoderma reesei* (компания Дюпон). В соответствии с рекомендациями расход ферментов Accellerase в работе составил 0,20±0,05 см³ на 1 г абсолютной сухой массы (АСМ) клетчатки (активность Accellerase XY – 20000–30000 АВХУ/г, активность Accellerase 1500 – 2200–2800 СМС/г). При обработке ферментами концентрация клетчатки рисовой шелухи в суспензии составила 4%. Следовательно, на одну часть субстрата (клетчатка рисовой шелухи) получали 25 частей ферментодизата, т.е. гидромодуль при обработке ферментами клетчатки составил 1 : 25. Ферментативный гидролиз проводили при pH 5–5,5 в ацетатном буфере, при температуре 55 °С и непрерывном перемешивании со скоростью 130 мин⁻¹ в течение 24 ч на шейкере-инкубаторе KS 4000 IC Control. Ферментолизат стандартизировали выпариванием до содержания РВ 1,0% [25].

Состав ферментолизата определяли методом газожидкостной хроматографии (ГЖХ) триметилсилильных производных [27]. Подготовка пробы: экстракт образца 50% этанолом (1 : 15 вес/объем) высушивали в вакууме при температуре 38 °С, после чего обрабатывали 1,1,1,3,3,3-гексаметилдисилазаном в смеси 1 мл пиридина и 1 мл ацетонитрила в присутствии трифторуксусной кислоты при 60 °С в течение 1 ч. Полученный раствор помещали в пробозадатчик хроматографа. Условия анализа: колонка SBP5-25 (25 м×0,25 мм×0,2 мкм); газ-носитель N₂, 20 см/с; программа температур – 1 мин при 70 °С, подъем 4 °С/мин до 320 °С, 5 мин при 320 °С; температура ввода пробы 240 °С, делитель потока 1 : 20, объем пробы 2 мкл (автоматический пробозадатчик АОС-20i); детектор пламенно-ионизационный, температура 325 °С, скорость подачи водорода – 40 мл/мин, азота – 25 мл/мин, кислорода – 250 мл/мин. Отнесение пиков осуществляли по временам удерживания после серии калибровочных анализов модельных смесей заданного состава. Расчет содержания компонентов по усредненной площади пиков проводили после калибровки по внешнему стандарту.

На основе полученного ферментолизата приготавливали твердую и жидкую питательную среду Александра. Состав питательной среды для глубинного культивирования (%): РВ – 0,5, NaCl – 0,02, K₂HPO₄ – 0,2, MgSO₄·7H₂O – 0,05, CaCO₃ – 0,01, (NH₄)₂SO₄ – 0,1, дрожжевой экстракт – 0,1 [28]. Для твердой питательной среды, используемой при скрининге роста бактерий, дополнительно вводили агар-агар – 2%.

Твердую часть клетчатки рисовой шелухи после ферментативного гидролиза высушивали до постоянной массы и далее утилизировали на производство бумаги и картона [29].

Культивирование бактерий Paenibacillus. В работе использовали 7 штаммов бактерий *P. mucilaginosus*: 560, 563, 567, 568, 572, 574, 17-2 и *P. salinicaeni* 17-6, предоставленных Ведомственной коллекцией непатогенных микроорганизмов сельскохозяйственного назначения (ФГБНУ ВНИИСХМ, Санкт-Петербург).

Скрининг роста бактерий *Paenibacillus* на полученном ферментативном гидролизате проводили на агаризованной питательной среде с корректировкой pH среды до нейтральной при помощи гидроксида кальция после стерилизации в автоклаве при 120 °С и 1 атм. Рост бактерий *Paenibacillus* оценивался по формированию штриха на поверхности агара.

Глубинное культивирование проводилось в колбах Эрленмейера на 250 мл с объемом среды 100 мл при 30 °С при непрерывном перемешивании со скоростью 200 об./мин на шейкере инкубатора ES-20 в течение 3 сут. Колбы засеивали инокулятом из расчета 5% от объема питательной среды.

Удельная скорость роста, время генерации и выход бактерий рассчитывали согласно рекомендациям в методике [30]. Водородный показатель в культуральной жидкости определяли потенциометрически на рН-метре 150 МИ. Биомассу отделяли центрифугированием на лабораторной центрифуге Eppendorf Centrifuge 5418 R при 12000 об./мин в течение 10 мин при температуре 5 °С. Биомассу бактерий определяли гравиметрическим методом после высушивания инфракрасным способом на влагомере «МХ-50».

Активность ферментов в надосадочной жидкости (супернатанте) определяли периодически по истечении 12, 24, 48 и 72 ч глубинного культивирования бактерий *Paenibacillus*. По окончании культивирования количество не усвоенных бактериями олигомеров и простых сахаров определяли по количеству образовавшихся РВ после гидролиза супернатанта концентрированной серной кислотой в соотношении 1 : 1.

Определение ферментативной активности проводили по методам, изложенным в работах [31, 32], с некоторыми изменениями. Для определения целлюлазной активности в качестве субстрата использовали суспензию 1% Na-КМЦ (1 г Na-КМЦ в 100 мл ацетатного буфера рН 6). При определении целлюлазной активности в качестве субстрата использовали раствор 0.2% целлюбиозы (0.2 г целлюбиозы в 100 мл в ацетатном буфере рН 6). Определение ксиланазной активности проводили на субстрате, содержащем 1% ксилана (1 г ксилана в 100 мл ацетатного буфера рН 6). Указанные выше ферментативные активности оценивали по количеству образования РВ [25]. Определение активности ферментов следующий: к 1.2 см³ субстрата добавляли 0.12 см³ супернатанта, инкубировали в термостате в течение 1 ч при температуре 50 °С (для целлюлазы и ксиланазы) и 30 °С (для целлюбиозы), затем добавляли 0.6 см³ ДНСК-реагент. В контрольный опыт 1.2 см³ субстрата смешивали с 0.6 см³ ДНСК-реагент и 0.12 см³ супернатанта. Пробирки с субстратом, культуральной жидкостью и ДНСК-реагентом помещали в водяную баню, жидкость доводили до кипения и выдерживали в течение 10 мин. Затем охлаждали, добавляли 6 см³ дистиллированной воды и измеряли оптическую плотность при длине волны 540 нм. За единицу активности фермента (целлюлазы, целлюбиозы и ксиланазы) принимается такое количество фермента, под действием которого в принятых условиях рН и температуры за 1 ч проходит гидролиз до моносахаров 1 г субстрата (что составляет 30% от введенного в реакцию).

Эксперименты проводили в трех повторностях и полученные результаты статистически обрабатывались с использованием стандартного пакета программы Excel и программы Prism 7.

Обсуждение результатов

При обработке рисовой шелухи растворами гидроксида натрия установлено, что с увеличением концентрации щелочи происходит растворение низкомолекулярных фракций клетчатки рисовой шелухи, в частности простых сахаров, о чем можно судить по величине РВ (рис. 1). Наименьшее извлечение РВ из клетчатки рисовой шелухи в щелок наблюдается при концентрации едкого натра 2.5%.

Исследования показали, что при обработке рисовой шелухи гидроксидом натрия концентрацией 2.5% увеличилось содержание целлюлозы до 89%, содержание гемицеллюлозы и лигнина снизилось, соответственно, до 6 и 4%. После щелочной обработки рисовой шелухи увеличилась удельная площадь поверхности с 0.3 м²/г в исходном сырье до 2.5 м²/г. Следует полагать, что указанные выше изменения физико-химических свойств клетчатки рисовой шелухи обуславливают более эффективный контакт фермента субстратом, на что указывают результаты в ранее опубликованной работе [33].

Рентгенофлуоресцентный анализ показал, что при щелочной обработке рисовой шелухи гидроксидом натрия в щелок экстрагируются минеральные вещества, состав и количество которых представлено в таблице 1. Из представленных результатов следует, что при щелочной обработке рисовой шелухи выделяется кремний в количестве 5.6 масс.%. Соответственно, как и указано во многих публикациях, рисовая шелуха может являться источником диоксида кремния. Кроме этого, в щелоке содержатся макро- и микроэлементы как P, S, K, Ca, Mn, Fe. Следует ожидать, что разделение клетчатки рисовой шелухи и кремния с макро- и микроэлементами в рассматриваемых условиях будет способствовать эффективному ферментолиту клетчатки с получением простых сахаров.

Обработка полученной клетчатки рисовой шелухи ферментными препаратами Accellerase показала, что на содержание РВ в ферментолитате влияет активность ферментов, расход ферментов, температура

и продолжительность ферментативной обработки. Установлено, что максимальное содержание РВ в ферментолизате наблюдается после 24 ч обработки клетчатки рисовой шелухи. Содержание РВ в ферментолизате при обработке клетчатки рисовой шелухи ферментным препаратом Accellerase 1500 больше, чем при обработке клетчатки рисовой шелухи ферментным препаратом Accellerase XY (рис. 2). Полученные результаты можно объяснить наличием в использованных ферментных препаратах Accellerase различных активностей. В частности, в ферментном препарате Accellerase 1500 присутствуют эндогликаназа, экзогликаназа, гемицеллюлаза, β -глюкозидаза, которые способствуют более эффективному ферментативному гидролизу клетчатки рисовой шелухи по сравнению с ферментным препаратом Accellerase XY, в котором присутствует преимущественно целлюлаза и ксиланаза.

Методом ГЖХ был определен состав ферментолизата (хроматограмма показана на рисунке 3), полученного из клетчатки рисовой шелухи (табл. 2).

В состав ферментолизата входят РВ около 89% от общего абсолютного сухого вещества (АСВ), в том числе 46% ксилозы, 34% глюкозы и 10% других сахаров. Кроме того, в составе клетчатки рисовой шелухи установлено наличие аминокислот (6%), жирных и органических кислот (~4%). Содержание различных аминокислот, включая аланин, глутаминовая кислота, гидроксипролин, изолейцин, лизин, треонин, соответствует результатам, опубликованным в работе [8].

На твердой питательной среде, приготовленной на основе полученного ферментолизата рисовой шелухи проводили скрининг роста почвенных бактерий рода *Paenibacillus*. Установлено, что все штаммы бактерий *Paenibacillus* растут на нейтральной питательной среде, полученной после корректировки гидроксидом кальция (рис. 4а). На слабокислой питательной среде (рН 5.6) наблюдался рост только одного штамма 17-6 бактерий *P. salinicaeni* (рис. 4б). Полученные результаты о влиянии рН на рост бактерий *Paenibacillus* использованы при глубинном культивировании рассматриваемых микроорганизмов на питательной среде, приготовленной из ферментолизата рисовой шелухи.

Рис. 1. Влияние концентрации едкого натра на содержание РВ в щелоках при температуре обработки 120 °С в течение 20 мин

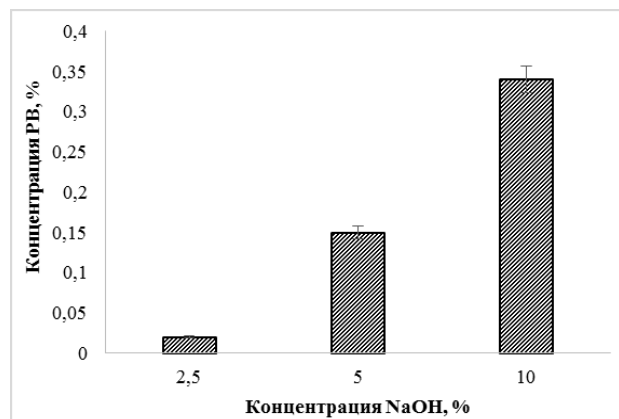
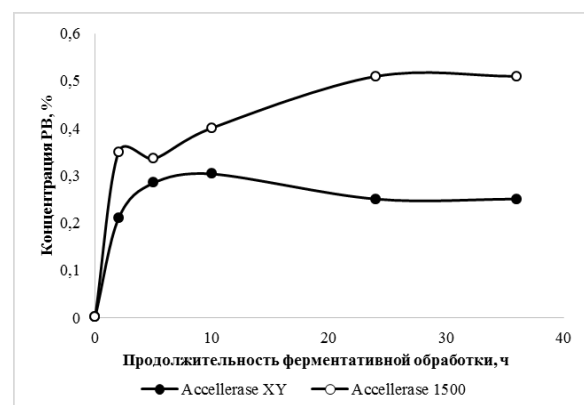


Таблица 1. Массовая доля элементов (масс.%) в щелоке при обработке рисовой шелухи 2.5% гидроксидом натрия в течение 20 мин при температуре 120 °С

Na	Si	P	S	K	Ca	Mn	Fe
1.1	5.6	0.2	0.1	0.5	0.006	0.003	0.004

Рис. 2. Влияние ферментных препаратов и продолжительности обработки клетчатки рисовой шелухи на концентрацию РВ в ферментолизате. Температура обработки 55±1 °С, рН 5.5±0.3



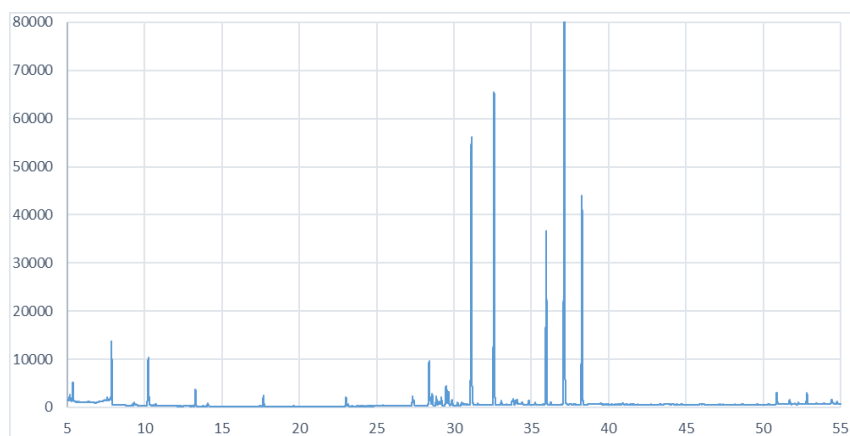
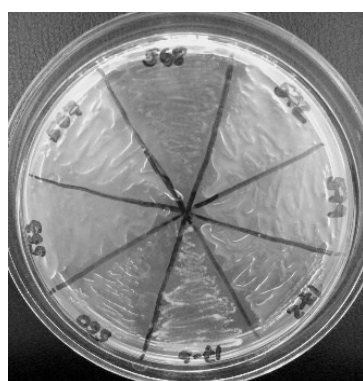


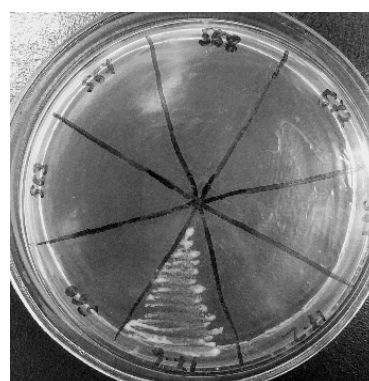
Рис. 3. Выходная кривая ГЖХ триметилсилильных производных ферментолизата рисовой шелухи (условия в тексте). Времена выхода компонентов приведены в таблице 2

Таблица 2. Химический состав полученного ферментолизата рисовой шелухи после ферментативного гидролиза по данным ГЖХ

Углеводы			Жирные кислоты		
Название (время выхода, мин)	мг/л	% от АСВ	Название (время выхода, мин)	мг/л	% от АСВ
Ксилоза (31.1/32.6)	918.58	46.58	Лауриновая (29.0)	23.53	1.17
Глюкоза (36.0/38.3)	676.52	33.57	Пальмитиновая (39.0)	3.82	0.19
Арабиноза (28.6/29.5)	76.28	3.79	Миристиновая (34.2)	2.80	0.14
Фруктоза (33.8/34/34.1)	54.80	2.72	Стеариновая (43.3)	2.04	0.10
Мальтоза (52.8/53.6)	33.90	1.68	Маргариновая (41.2)	1.96	0.10
Целлобиоза (54.5/54.7)	31.41	1.56	Арахидиновая (47.3)	1.07	0.05
Сорбоза (35.3)	4.88	0.24			
Галактоза (35.2/36.3)	3.62	0.18			
2-Деоксиглюкоза (33.4)	1.68	0.08			
Органические кислоты			Аминокислоты		
Название	мг/л	% от АСВ	Название	мг/л	% от АСВ
Молочная (10.2)	21.26	1.06	Глутаминовая кислота (27.3)	85.60	4.25
Изолимонная (34.2)	11.20	0.56	Лизин (30.9)	12.85	0.64
Винная (29.1)	2.77	0.14	Аланин (10.7)	9.38	0.47
Адипиновая (25.0)	0.98	0.05	Треонин (19.7)	3.86	0.19
Энантовая (13.8)	0.92	0.05	Оксипролин (26.3)	2.42	0.12
2-Оксоглутаровая (26.8)	0.84	0.04	Изолейцин (16.7)	0.88	0.04
Каприновая (23.4)	0.46	0.02			



а



б

Рис. 4. Скрининг роста штаммов 560, 563, 567, 568, 572, 574, 17-2 бактерий *P. mucilaginosus* и 17-6 бактерий *P. salinicaeni* на твердой питательной среде с ферментоллизатом клетчатки рисовой шелухи при температуре 30 ± 1 °C в течение 72 ч: а) pH 7.30 ± 0.03 , нейтрализация гидроксидом кальция, б) без корректировки pH 5.58 ± 0.02

Были определены кинетические параметры роста при глубинном культивировании штаммов 560, 563, 567, 568, 572, 574, 17-2 бактерий *P. mucilaginosus* и 17-6 бактерий *P. salinicaeni* на питательной среде, приготовленной на основе ферментолита рисовой шелухи, нейтрализованного гидроксидом кальция.

Как следует из представляемых результатов в таблице 3, по удельной скорости роста и время генерации наиболее эффективно протекает культивирование на питательной среде с ферментолитом рисовой шелухи штамма 560 бактерий *P. mucilaginosus*.

Следует отметить, что в начальный период культивирования бактерий *P. mucilaginosus* на питательной среде с ферментолитом рисовой шелухи происходят изменения рН культуральной жидкости в сторону более кислых значений, по-видимому, это связано с накоплением органических кислот (рис. 5). При культивировании более 6 ч штаммов 560, 567, 17-2, 17-6, 12 ч – штаммов 568, 574 и 24 ч – штаммов 563, 572 бактерий *Paenibacillus* рН среды повышается. Увеличение рН среды может быть связано с деградацией белков и аминокислот, изначально присутствующих в ферментолите клетчатки рисовой шелухи (табл. 3), в аммиак, который повышает рН среды до слабощелочной. При этом α -аминогруппа многих аминокислот переносится в α -кетоглутарат с образованием глутамата, который далее подвергается окислительному дезаминированию с образованием иона аммония [34]. Кроме этого, при аэробном дыхании микроорганизмов увеличивается концентрация анионов CO_3^{2-} в питательной среде, который может вступать в реакцию с кальцием с образованием нерастворимой соли CaCO_3 , чему также способствует увеличение рН среды [35].

Выход биомассы от РВ рассматриваемых штаммов бактерий *Paenibacillus* при культивировании на питательной среде с ферментолитом рисовой шелухи составляет от 20 до 35%. Количество усвоенных сахаров превышает начальное содержание РВ в питательной среде, которое составляло 0.5% (табл.3), что указывает на дополнительное образование РВ в питательной среде из олигосахаридов клетчатки, присутствующих в ферментолите, под действием ферментов, выделяемых бактериями *Paenibacillus*.

Тот факт, что с ростом бактерий *Paenibacillus* в питательную среду выделялись целлюлазы, целлобиазы, ксиланазы, которые способствовали ферментативному гидролизу олигомеров клетчатки рисовой шелухи в питательной среде до глюкозы и ксилозы, указывают величины активности ферментов, представленных на рисунке 6. В общем случае для внеклеточных ферментов, в том числе целлюлазы, секретируемой бактериями *Paenibacillus*, наблюдаются один или два пика активности. Для каждого штамма имеется свой пик с характерным временем инкубации (рис. 6а). При культивировании штаммов 560, 563, 567, 568, 572, 17-6 появлялся первый пик после 12 ч, и штаммов 574, 17-2 – после 24 ч культивирования, второй пик проявлял после 48 ч культивирования штаммов 560, 568, и штаммов 563, 572, 574, 17-2, 17-6 после 72 ч культивирования. Колебание наблюдаемой ферментативной активности бактерий может быть связано, помимо прочего, с синтезом бактериями внеклеточных полисахаридов, которые на другой фазе роста могут являться дополнительным источником углерода для бактерий. Как видно из графиков, представленных на рисунке 7а, максимальная активность целлюлазы проявляется после 12 ч культивирования штамма 560 (2 ед./мл) при снижении рН среды до 6.

Кроме целлюлазы, в культуральной жидкости установлено наличие ксиланазы, гидролизующей β -гликозидные связи в молекуле гетерогенного полисахарида ксилана с образованием олигосилоанов меньшей молекулярной массы вплоть до мономерного соединения – ксилозы. Максимальная активность ксиланазы наблюдалась после 48 ч и 72 ч при культивировании штаммов 560 и 563 (достигалась 7 ед./мл) при повышении рН среды около 8 (рис. 6б). Бактерии *Paenibacillus* обладали незначительной активностью целлобиазы (ниже 1 ед./мл, рис. 6в) при их культивировании на питательной среде с ферментолитом рисовой шелухи. Максимальная активность целлобиазы 0,63 ед./мл достигалась после 24 ч и 72 ч культивирования для штамма 560 и после 48 ч культивирования для штамма 17-6.

Таким образом, биосинтез внеклеточных целлюлазы и целлобиазы обычно происходит на логарифмической стадии культивирования, тогда как ксиланаза секретируется на стационарной фазе роста бактерий *Paenibacillus* (после 48 и 72 ч культивирования). При этом активность ксиланазы выше, чем активность целлюлазы и целлобиазы, что согласуется с преобладанием в субстрате ксилозы в соответствии с данными ГЖХ в таблице 2.

Таблица 3. Кинетические параметры роста бактерий *Paenibacillus* при культивировании на питательной среде с ферментативным гидролизатом рисовой шелухи после нейтрализации гидроксидом кальция при температуре 30 ± 1 °C

Штамм бактерий <i>Paenibacillus</i>	Удельная скорость роста, ч ⁻¹	Время генерации, ч	Выход биомассы, %	Усвоенные сахара бактериями <i>Paenibacillus</i> , % РВ
560	0.2081±0.0020	3.33±0.03	33.53±2.60	1.19±0.03
563	0.0850±0.0017	9.98±0.25	26.73±2.23	1.25±0.03
567	0.1398±0.0012	4.96±0.04	30.86±2.58	1.21±0.03
568	0.1244±0.0008	5.57±0.04	26.85±2.20	1.21±0.03
572	0.1017±0.0006	6.81±0.04	25.51±2.15	1.35±0.03
574	0.077±0.00003	8.99±0.03	27.12±2.20	1.21±0.03
17-2	0.1535±0.0013	4.52±0.04	23.28±2.16	1.12±0.04
17-6	0.1580±0.0015	4.39±0.04	29.97±2.83	1.19±0.03

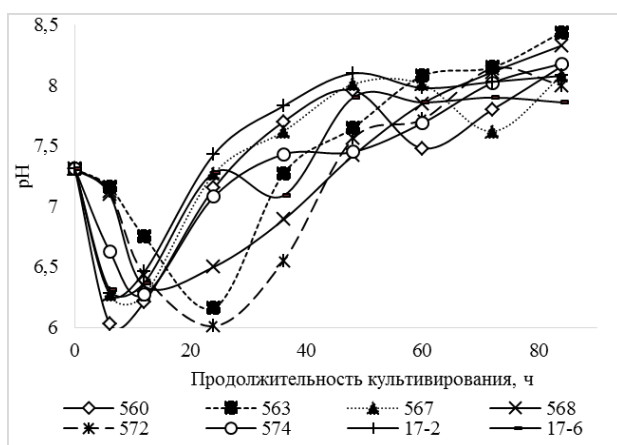
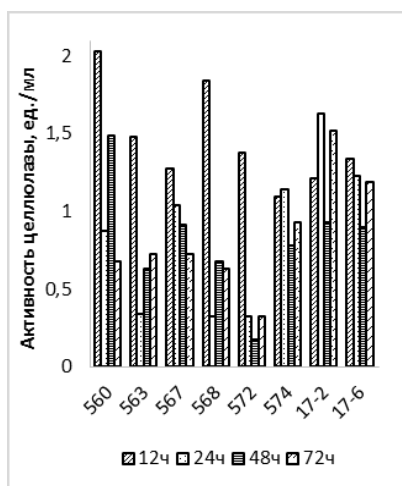
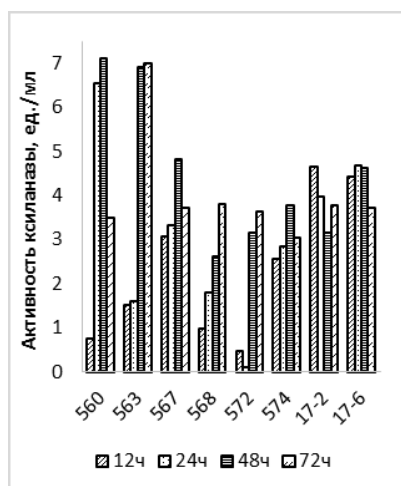


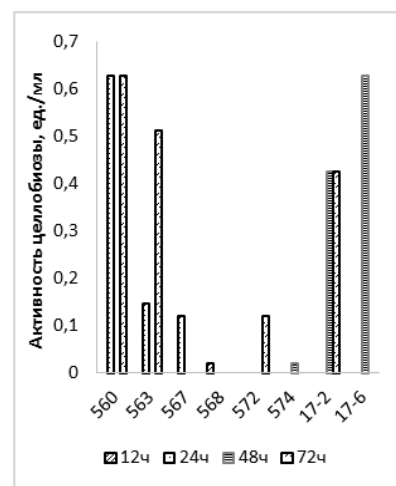
Рис. 5. Изменения pH культуральной жидкости при культивировании бактерий *Paenibacillus* на питательной среде с ферментализатом рисовой шелухи, нейтрализованной гидроксидом кальция



а



б



в

Рис. 6. Биосинтез целлюлазы (а) и ксиланазы (б) и целлобиазы (в) бактериями *Paenibacillus* при глубинном культивировании на питательной среде из ферментализата рисовой шелухи (скорость перемешивания – 200 мин^{-1} , температура – 30 ± 1 °C, ед./мл)

Выводы

1. Установлено, что для разделения клетчатки и минеральных веществ рисовую шелуху целесообразно обрабатывать гидроксидом натрия с концентрацией 2.5% при температуре 120 °C в течение 20 мин. При данных условиях обработки минимальны потери простых сахаров.

2. Показана возможность получения простых сахаров путем ферментативной обработки клетчатки рисовой шелухи ферментным препаратом Accellerase 1500 в течение 24 ч при температуре 55 °C. В этих

условиях в полученном ферментолизате содержится около 89% РВ от АСВ, а также аминокислоты и органические кислоты.

3. Доказано, что ферментолизат клетчатки рисовой шелухи может быть использован в качестве основного субстрата для культивирования штаммов 560, 563, 567, 568, 572, 574, 17-2 бактерий *P. mucilaginosus* и 17-6 бактерий *P. salinicaeni*.

4. Установлено, что в процессе культивирования рассматриваемые штаммы бактерий *Paenibacillus* проявляют целлюлазную, целлюлобиазную и ксиланазную активности, наличие которых способствует ферментативному гидролизу олигомерных соединений, присутствующих в ферментолизате, до простых сахаров.

5. Проведенным скринингом бактерий *Paenibacillus* по удельной скорости роста, времени генерации, выходу биомассы, и также по активности внеклеточных ферментов установлено, что перспективным штаммом для глубинного культивирования на питательной среде, приготовленной из ферментолизата рисовой шелухи, является штамм 560, который рекомендуется для дальнейших исследований при создании технологии биопродуктов сельскохозяйственного назначения.

Список литературы

1. Morgunov I., Kamzolova S., Lunina J. Citric acid production by *Yarrowia lipolytica* yeast on different renewable raw materials // *Fermentation*. 2018. Vol. 4. N2. P. 36.
2. Cunha L., Martarello R., Souza P.M.D., Freitas M.M.D., Barros K.V.G., Ferreira Filho E.X., Magalhães P.O. Optimization of xylanase production from *Aspergillus foetidus* in soybean residue // *Enzyme research*. 2018. Vol. 2018. 7 p.
3. Jadhav A.C., Pandit P., Gayatri T.N., Chavan P.P., Jadhav N.C. Production of green composites from various sustainable raw materials // *In Green Composites*. Springer, Singapore, 2019. Pp. 1–24.
4. Chandrasekhar S., Satyanarayana K.G., Pramada P.N., Raghavan P., Gupta T.N. Processing, properties and applications of reactive silica from rice husk // *Journal of Materials Science*. 2003. Vol. 38. N15. Pp. 3159–3168.
5. Sarangi M., Bhattacharyya S., Behera R.C. Effect of temperature on morphology and phase transformations of nanocrystalline silica obtained from rice husk // *Phase Transitions*. 2009. Vol. 82. N5. Pp. 377–386.
6. Muntohar A.S. Utilization of uncontrolled burnt rice husk ash in soil improvement // *Civil Engineering Dimension*. 2004. Vol. 4. N2. Pp. 100–105.
7. Houston D.F., Hill B.E., Garrett V.H., Kester E.B. Rice quality measurement, organic acids of rice and some other cereal seeds // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1963. Vol. 11. N6. Pp. 512–517.
8. Barber S., de Barber C.B. Chemical and biological data of rice proteins for nutrition and feeding // *In Amino acid composition and biological value of cereal proteins*. Springer, Dordrecht, 1985. Pp. 481–494. DOI: 10.1007/978-94-009-5307-9_29.
9. Azat S., Korobeinyk A.V., Moustakas K., Inglezakis V.J. Sustainable production of pure silica from rice husk waste in Kazakhstan // *Journal of cleaner production*. 2019. Vol. 217. Pp. 352–359.
10. Sapei L., Suseno N., Riadi L., Padmawijaya K.S., Thia S.G.W., Dewi V. Biosilica recovery from pulped rice husk by acid precipitation // *Chemeca*. 2018. P. 179.
11. Todkar B.S., Deorukhkar O.A., Deshmukh S.M. Extraction of Silica from Rice Husk // *International Journal of Engineering Research and Development*. 2016. Vol. 12. N3. Pp. 69–74.
12. Grady E.N., MacDonald J., Liu L., Richman A., Yuan Z.C. Current knowledge and perspectives of *Paenibacillus*: a review // *Microb. Cell. Fact.* 2016. Vol. 15. P. 203. DOI: 10.1186/s12934-016-0603-7.
13. Weselowski B., Nathoo N., Eastman A.W., MacDonald J., Yuan Z.C. Isolation, identification and characterization of *Paenibacillus polymyxa* CR1 with potentials for biopesticide, biofertilization, biomass degradation and biofuel production // *BMC microbiology*. 2016. Vol. 16. N1. P. 244.
14. Wen Y., Wu X., Teng Y., Qian C., Zhan Z., Zhao Y. et al. Identification and analysis of the gene cluster involved in biosynthesis of paenibactin, a catecholate siderophore produced by *Paenibacillus elgii* B69 // *Environ Microbiol.* 2011. Vol. 13. Pp. 2726–2737.
15. Ха З.Т., Канарский А.В., Канарская З.А., Щербаков А.В., Щербакова Е.Н. Эффективность культивирования бактерий рода *Paenibacillus mucilaginosus* на питательной среде на основе сахарозы // *Научный журнал НИУ ИТМО. Серия «Процессы и аппараты пищевых производств»*. 2019. Т. 3. С. 62–72.
16. Phi Q.T., Park Y.M., Seul K.J., Ryu C.M., Park S.H., Kim J.G. et al. Assessment of root-associated *Paenibacillus polymyxa* groups on growth promotion and induced systemic resistance in pepper // *Journal Microbiol Biotechnol.* 2010. Vol. 20. N12. Pp. 1605–1613.
17. Sang M.K., Kim E.N., Han G.D., Kwack M.S., Jeun Y.C., Kim K.D. Priming - mediated systemic resistance in cucumber induced by *Pseudomonas azotoformans* GC-B19 and *Paenibacillus elgii* MM-B22 against *Colletotrichum orbiculare* // *Phytopathology*. 2014. Vol. 104. N8. Pp. 834–842.
18. Kumar S., Chauhan P.S., Agrawal L., Raj R., Srivastava A., Gupta S. et al. *Paenibacillus lentimorbus* inoculation enhances tobacco growth and extenuates the virulence of cucumber mosaic virus // *PLoS ONE*. 2016. Vol. 11. N3. e0149980.

19. Asha B.M., Revathi M., Yadav A., Sakthivel N. Purification and characterization of a thermophilic cellulase from a novel cellulolytic strain, *Paenibacillus barcinonensis* // Journal of microbiology and biotechnology. 2012. Vol. 22. N11. Pp. 1501–1509.
20. Saxena N., Pore S., Arora P., Kapse N., Engineer A., Ranade D.R. et al. Cultivable bacterial flora of Indian oil reservoir: isolation, identification and characterization of the biotechnological potential // Biologia. 2015. Vol. 70. N1. Pp. 1–10.
21. Novia N., Pareek V.K., Hermansyah H., Jannah A.M. Effect of Dilute Acid-Alkaline Pretreatment on Rice Husk Composition and Hydrodynamic Modeling with CFD // Science and Technology Indonesia. 2019. Vol. 4. N1. Pp. 18–23.
22. Нгуен М.Х. Процессы термической переработки рисовой шелухи при получении активированного углеродного материала и их аппаратурное обеспечение: автореф. дис. канд. тех. наук. Томск, 2018. 24 с.
23. da Silva Menezes B., Rossi D.M., Squina F., Ayub M.A.Z. Xylooligosaccharides production by fungi cultivations in rice husk and their application as substrate for lactic acid bacteria growth // Bioresource Technology Reports. 2018. Vol. 2. Pp. 100–106.
24. Madu J.O., Agboola B.O. Bioethanol production from rice husk using different pretreatments and fermentation conditions // 3 Biotech. 2018. Vol. 8. N1. 15 p.
25. Морозова Ю.А., Скворцов Е.В., Алимova Ф.К., Канарский А.В. Биосинтез ксиланаз и целлюлаз грибами рода *Trichoderma* на послеспиртовой барде // Вестник Казанского технологического университета. 2012. Т. 15. №19. С. 120–122.
26. Юсупов Р.А., Бахтеев С.А., Гатиятуллин И.Р. Методика выполнения измерений концентрации серебра в технологических водах предприятий // Вестник Казанского технологического университета. 2011. Т. 19. С. 306–308.
27. Orata F. Derivatization reactions and reagents for gas chromatography analysis // Advanced Gas Chromatography Progress in Agricultural, Biomedical and Industrial Applications. 2012. Pp. 83–108.
28. Li X., Yang S.H., Yu X.C., Jin Z.X., Li W.D., Li L., Li M.G. Construction of transgenic *Bacillus mucilaginosus* strain with improved phytase secretion // Journal of applied microbiology. 2005. Vol. 99. N4. Pp. 878–884.
29. Коптяев В.В., Севастьянова Ю.В., Дулькин Д.А., Канарский А.В., Ха Т.З., Канарская З.А., Якубов Е.Р. Комплексная переработка рисовой шелухи с получением волокнистых полуфабрикатов // Проблемы механики целлюлозно-бумажных материалов: материалы международной научно-технической конференции, посвященной памяти профессоров В.И. Комарова. Архангельск, 2019. С. 341.
30. Maier R.M. Bacterial Growth. In Environmental Microbiology. Elsevier Inc, 2009. Pp. 37–54.
31. Adney B., Baker J. Measurement of cellulase activities. Laboratory analytical procedure. 1996. 11 p.
32. Bailey M., Biely J., Poutanen K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity // Journal Biotechnol. 1992. Vol. 23. N3. Pp. 257–270.
33. Dong M., Wang S., Xu F., Wang J., Yang N., Li, Q., Li W. Pretreatment of sweet sorghum straw and its enzymatic digestion: insight into the structural changes and visualization of hydrolysis process // Biotechnology for biofuels. 2019. Vol. 12. N1. Pp. 1–11.
34. Berg J.M., Tymoczko J.L., Stryer L. Biochemistry. 5th edition. New York: W H Freeman, 2002. 1050 p.
35. Stocks-Fischer S., Galinat J.K., Bang S.S. Microbiological precipitation of CaCO₃ // Soil Biology and Biochemistry. 1999. Vol. 31. N11. Pp. 1563–1571.

Поступила в редакцию 20 ноября 2019 г.

После переработки 21 января 2020 г.

Принята к публикации 18 февраля 2020 г.

Для цитирования: Ха Т.З., Канарский А.В., Канарская З.А., Кручина-Богданов И.В., Щербаков А.В., Щербакова Е.Н. Эффективность культивирования бактерий *Paenibacillus* на ферментолизатах клетчатки рисовой шелухи // Химия растительного сырья. 2020. №2. С. 271–282. DOI: 10.14258/jcrpm.2020026687.

Ha D.T.^{1*}, Kanarskiy A.V.¹, Kanarskaya Z.A.¹, Kruchina-Bogdanov I.V.³, Shcherbakov A.V.², Shcherbakova Ye.N.² THE EFFICIENCY OF *PAENIBACILLUS* BACTERIA CULTIVATION ON NUTRIENT MEDIUM FROM ENZYMATIC HYDROLYSATE OF RICE HUSKS

¹ Kazan National Research Technological University, ul. Tolstova, 8, Kazan, 420015 (Russia), e-mail: coldwind.91@mail.ru

² All-Russian Research Institute of Agricultural Microbiology, sh. Podbel'skogo, 3, St. Petersburg, 196608 (Russia)

³ LLC "Analytics. Materials Technologies", ul. Novorossiyskaya, 50, St. Petersburg, 194021 (Russia)

The full use of secondary raw materials from processing plants by biotechnological methods is economically feasible and promising for the biotechnological industry. The purpose of this study is developing technology for the utilization of rice husk to obtain nutrient medium for the cultivation of bacteria *Paenibacillus*, promising for the production of agricultural biological products, in particular, biological fertilizers and feed additives. The processing of rice husk by using chemical and biotechnological methods showed that optimized condition for the separation of fiber and mineral substances from rice husk is treating rice husk with sodium hydroxide with concentration 2.5% at 120 °C for 20 minutes. The possibility of obtaining simple sugars by enzymatic treatment of rice husk fiber with the enzyme preparation Accellerase 1500 for 24 hours at 55 °C was observed. Under these conditions, the enzymatic hydrolysate of rice husks contains 89% of reducing sugars of absolute dry matter, as well as amino acids and organic acids. It has been proved that the enzymatic hydrolysate of rice husk can be used as the main substrate for the cultivation of strains 560, 563, 567, 568, 572, 574, 17-2 bacteria *P. mucilaginosus* and 17-6 bacteria *P. salinicaceni*. Screening of bacteria *Paenibacillus* by specific growth rate, generation time, biomass yield, and also by the activity of extracellular enzymes, it was found that strain 560, which is recommended for further studies for developing technology of bioproducts for agricultural purposes.

Keywords: rice husk, fibers, enzymatic hydrolysate, nutrient medium, *Paenibacillus*, cultivation.

References

- Morgunov I., Kamzolova S., Lunina J. *Fermentation*, 2018, vol. 4, no. 2, p. 36.
- Cunha L., Martarello R., Souza P.M.D., Freitas M.M.D., Barros K.V.G., Ferreira Filho E.X., Magalhães P.O. *Enzyme research*, 2018, vol. 2018, 7 p.
- Jadhav A.C., Pandit P., Gayatri T.N., Chavan P.P., Jadhav N.C. *In Green Composites*. Springer, Singapore, 2019, pp. 1–24.
- Chandrasekhar S., Satyanarayana K.G., Pramada P.N., Raghavan P., Gupta T.N. *Journal of Materials Science*, 2003, vol. 38, no. 15, pp. 3159–3168.
- Sarangi M., Bhattacharyya S., Behera R.C. *Phase Transitions*, 2009, vol. 82, no. 5, pp. 377–386.
- Muntohar A.S. *Civil Engineering Dimension*, 2004, vol. 4, no. 2, pp. 100–105.
- Houston D.F., Hill B.E., Garrett V.H., Kester E.B. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1963, vol. 11, no. 6, pp. 512–517.
- Barber S., de Barber C.B. *In Amino acid composition and biological value of cereal proteins*. Springer, Dordrecht, 1985, pp. 481–494. DOI: 10.1007/978-94-009-5307-9_29.
- Azat S., Korobeinyk A.V., Moustakas K., Inglezakis V.J. *Journal of cleaner production*, 2019, vol. 217, pp. 352–359.
- Sapei L., Suseno N., Riadi L., Padmawijaya K.S., Thia S.G.W., Dewi V. *Chemeca*, 2018, p. 179.
- Todkar B.S., Deorukhkar O.A., Deshmukh S.M. *International Journal of Engineering Research and Development*, 2016, vol. 12, no. 3, pp. 69–74.
- Grady E.N., MacDonald J., Liu L., Richman A., Yuan Z.C. *Microb. Cell. Fact.*, 2016, vol. 15, p. 203. DOI: 10.1186/s12934-016-0603-7.
- Weselowski B., Nathoo N., Eastman A.W., MacDonald J., Yuan Z.C. *BMC microbiology*, 2016, vol. 16, no. 1, p. 244.
- Wen Y., Wu X., Teng Y., Qian C., Zhan Z., Zhao Y. et al. *Environ Microbiol.*, 2011, vol. 13, pp. 2726–2737.
- Ha D.T., Kanarskiy A.V., Kanarskaya Z.A., Shcherbakov A.V., Shcherbakova Ye.N. *Nauchnyy zhurnal NIU ITMO. Seriya «Protsessy i apparaty pishchevykh proizvodstv»*, 2019, vol. 3, pp. 62–72. (in Russ.).
- Phi Q.T., Park Y.M., Seul K.J., Ryu C.M., Park S.H., Kim J.G. et al. *Journal Microbiol Biotechnol.*, 2010, vol. 20, no. 12, pp. 1605–1613.
- Sang M.K., Kim E.N., Han G.D., Kwack M.S., Jeun Y.C., Kim K.D. *Phytopathology*, 2014, vol. 104, no. 8, pp. 834–842.
- Kumar S., Chauhan P.S., Agrawal L., Raj R., Srivastava A., Gupta S. et al. *PLoS ONE*, 2016, vol. 11, no. 3, e0149980.
- Asha B.M., Revathi M., Yadav A., Sakthivel N. *Journal of microbiology and biotechnology*, 2012, vol. 22, no. 11, pp. 1501–1509.
- Saxena N., Pore S., Arora P., Kapse N., Engineer A., Ranade D.R. et al. *Biologia*, 2015, vol. 70, no. 1, pp. 1–10.
- Novia N., Pareek V.K., Hermansyah H., Jannah A.M. *Science and Technology Indonesia*, 2019, vol. 4, no. 1, pp. 18–23.
- Nguyen M.H. *Protsessy termicheskoy pererabotki risovoy shelukhi pri poluchenii aktivirovannogo uglerodnogo materiala i ikh apparaturnoye obespecheniye: avtoref. dis. kand. tekh. nauk.* [The processes of thermal processing of rice husks upon receipt of activated carbon material and their hardware: abstract. dis. ... Cand. those. of sciences]. Tomsk, 2018, 24 p. (in Russ.).
- da Silva Menezes B., Rossi D.M., Squina F., Ayub M.A.Z. *Bioresource Technology Reports*, 2018, vol. 2, pp. 100–106.
- Madu J.O., Agboola B.O. *3 Biotech*, 2018, vol. 8, no. 1, 15 p.
- Morozova Yu.A., Skvortsov Ye.V., Alimova F.K., Kanarskiy A.V. *Vestnik Kazanskogo tekhnologicheskogo universiteta*, 2012, vol. 15, no. 19, pp. 120–122. (in Russ.).

* Corresponding author.

26. Yusupov R.A., Bakhteyev S.A., Gatiyatullin I.R. *Vestnik Kazanskogo tekhnologicheskogo universiteta*, 2011, vol. 19, pp. 306–308. (in Russ.).
27. Orata F. *Advanced Gas Chromatography Progress in Agricultural, Biomedical and Industrial Applications*, 2012, pp. 83–108.
28. Li X., Yang S.H., Yu X.C., Jin Z.X., Li W.D., Li L., Li M.G. *Journal of applied microbiology*, 2005, vol. 99, no. 4, pp. 878–884.
29. Koptyayev V.V., Sevast'yanova Yu.V., Dul'kin D.A., Kanarskiy A.V., Ha G.T., Kanarskaya Z.A., Yakubov Ye.R. *Problemy mekhaniki tsellyulozno-bumazhnykh materialov: materialy mezhdunarodnoy nauchno-tekhnicheskoy konferentsii, posvyashchennoy pamyati professorov V.I. Komarova*. [Problems of the mechanics of pulp and paper materials: materials of the international scientific and technical conference dedicated to the memory of professors V.I. Komarova]. Arkhangelsk, 2019, p. 341. (in Russ.).
30. Maier R.M. *Bacterial Growth. In Environmental Microbiology*. Elsevier Inc, 2009, pp. 37–54.
31. Adney B., Baker J. *Measurement of cellulase activities. Laboratory analytical procedure*. 1996, 11 p.
32. Bailey M., Biely J., Poutanen K. *Journal Biotechnol.*, 1992, vol. 23, no. 3, pp. 257–270.
33. Dong M., Wang S., Xu F., Wang J., Yang N., Li, Q., Li W. *Biotechnology for biofuels*, 2019, vol. 12, no. 1, pp. 1–11.
34. Berg J.M., Tymoczko J.L., Stryer L. *Biochemistry. 5th edition*. New York: W H Freeman, 2002, 1050 p.
35. Stocks-Fischer S., Galinat J.K., Bang S.S. *Soil Biology and Biochemistry*, 1999, vol. 31, no. 11, pp. 1563–1571.

Received November 20, 2019

Revised January 21, 2020

Accepted February 18, 2020

For citing: Ha D.T., Kanarskiy A.V., Kanarskaya Z.A., Kruchina-Bogdanov I.V., Shcherbakov A.V., Shcherbakova Ye.N. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2020, no. 2, pp. 271–282. (in Russ.). DOI: 10.14258/jcprm.2020026687.