

STUDY OF THE OPTIMAL CULTURE MEDIUM AND CULTIVATION CONDITIONS OF *ASPERGILLUS* SP. 262

J. Lapska, E. Omelchuk, Yu. Penchuk
National University of Food Technologies

Key words:

Micromycetes
Exoglucanase
Endoglucanase
Optimization of cultivation conditions
Culture medium

ABSTRACT

The optimal conditions for the *Aspergillus* sp. 262 cultivation were studied. The maximum biosynthesis of cellulolytic enzymes complex was observed after the process of culture medium cultivation (150 ml) with beet pulp, $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ and $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ during 4 days with the temperature of 42 °C at speed of 160 r/min with the 10 % of inoculate.

Article history:

Received 10.04.2013
Received in revised form
19.04.2013
Accepted 20.06.2013

Corresponding author:

E-mail:
npnuht@ukr.net

ПІДБІР ОПТИМАЛЬНОГО СКЛАДУ ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА ТА УМОВ КУЛЬТИВУВАННЯ *ASPERGILLUS* SP. 262 — ПРОДУЦЕНТА ФЕРМЕНТІВ ЦЕЛЮЛОЛІТИЧНОГО КОМПЛЕКСУ

Ю.Ю. Лапська, Є.О. Омельчук, Ю.М. Пенчук
Національний університет харчових технологій

*На основі отриманих експериментальних даних визначено джерела вуглецю, азоту і фосфору та підібрано умови культивування *Aspergillus* sp. 262 — продуцента целюлолітичних ферментів. Визначено, що у разі використання бурякового жому, $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ та $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, як компонентів поживного середовища, відбувається максимальний біосинтез комплексу целюлолітичних ферментів. Встановлено оптимальні умови культивування продуцента такі як: вплив температури, інтенсивності аерації, об'єму поживного середовища, тривалості культивування та відсоток посівного матеріалу на біосинтез ферментів целюлоз штамом максимального біосинтез комплексу ферментів. *Aspergillus* sp. 262 для отримання.*

Ключові слова: мікроміцети, екзоглюканаза, ендоглюканаза, оптимізація умов культивування, поживне середовище.

До гідролітичних ферментів, які мають перспективу широкого застосування у майбутньому, належать ферменти целюлолітичного комплексу. Відомо, що глибокий гідроліз високоупорядкованих форм целюлози здійснюється в результаті узгодженої дії поліферментної системи — ферментів целюлолітичного комплексу з різним механізмом

дії. В результаті цього процесу відбувається деградація клітковини, кінцевим результатом якого є утворення моносахариду — глюкози. Однак процес ферментативного гідролізу целюлози є складним і залежить від дії комплексу ферментів, який здійснюється в два етапи. Перший етап включає в себе руйнування високомолекулярної структури клітковини. Цей процес здійснюється складними фізико-хімічними взаємодіями, важлива роль в яких відводиться адсорбції ферментів на молекулі целюлози. На другому етапі здійснюються стадії хімічних перетворень вже частково розщепленої клітковини, що забезпечують її розклад до низькомолекулярних продуктів, таких як глюкоза, целобіоза, ксилоза. Дані продукти представляють великий інтерес як сировина для подальшої переробки її в біоетанол та інші спирти, амінокислоти, антибіотики, білкову біомасу тощо. Таким чином, в майбутньому рослинна біомаса може робити ті функції, які притаманні на сьогодні нафті [5].

Целюлолітичні ферменти мікроскопічних грибів поглиблено вивчаються, оскільки відіграють велике значення в господарській діяльності людини. Інтерес до них постійно росте завдяки великому потенціалу використання препаратів на основі целюлаз в сільському господарстві для тварин, як добавки до кормів для підвищення їх поживної цінності; також в текстильній та харчовій промисловості. Необхідність ефективної біоконверсії відновлювальної рослинної сировини у біопаливо, кормові та харчові продукти, а також у проміжну сировину для хімічної та мікробіологічної галузей є одним з основних причин дослідження целюлолітичних ферментів [1].

Все частіше для переробки різноманітних целюлозовмісних відходів використовуються комплексні целюлолітичні ферментні препарати та їх продуценти-мікроорганізми. Серед відходів органічної природи особливе місце займає лігноцелюлоза — цінна сировина для подальшої переробки в корисні продукти. Лігноцелюлоза, отримана з сирової деревини, використовується як джерело високоякісних харчових волокон для годівлі тварин порівняно недавно. У порівнянні з традиційно використовуваними кормовими ресурсами лігноцелюлоза характеризується більш високим вмістом сирової клітковини (> 55 %), що дає можливість включати в раціон інші важливі складові. У зв'язку з цим зростає необхідність у пошуку нових активних продуцентів ферментів целюлолітичного комплексу [6].

На сьогоднішній час найдешевшим джерелом целюлози являються відходи різноманітних виробництв, де використовується рослинна сировина. Найкращими постачальниками їх є різноманітні галузі промисловості та сільського господарства. До целюлозовмісної сировини, як відходу сільського господарства належать: солома вівса, пшениці, жита; рису, стебла бавовника; листя, стебла та облущені качани кукурудзи; просяне, вівсяне, соняшникове лушпиння; обрізки виноградної лози. У промисловості такими відходами є буряковий жом та вичавки із різних ягід та фруктів, залишки деревини у вигляді стружки та кори тощо [1, 3].

У зв'язку із зростанням попиту на ферменти целюлолітичного комплексу в різних галузях промисловості актуальною стала потреба в розробленні нових та удосконаленні вже існуючих технологій їх виробництва. Одним із важливих засобів інтенсифікації їх біосинтезу є підбір оптимальних умов культивування продуцентів целюлаз, що і було метою дослідження.

Об'єктом дослідження був термотолерантний штам *Aspergillus* sp. 262, який відібрано з колекції мікроорганізмів відділу фізіології та систематики мікроміцетів Інституту мікробіології і вірусології НАН України.

Культивування здійснювали на поживних середовищах, склад яких підібраний для максимального біосинтезу ферментів целюлолітичного комплексу. Для культивування *Aspergillus* sp. 262 використовували поживне середовище такого складу, г/л: буряковий жом — 20, сечовина — 1,56, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ — 2,6, KCl — 0,5, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,5, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ — 0,01.

Вирощували посівний матеріал на поживному середовищі аналогічного складу протягом 1, 2, 3, 4 та 5 діб. Посівний матеріал у колби вносили у кількості 5, 10, 15 % до об'єму поживного середовища.

Для встановлення оптимальних умов синтезу ферментів целюлаз штаму *Aspergillus* sp. 262 вирощували у колбах Ерленмейера (750 мл) з об'ємом поживного середовища 100, 150 та 200 мл, за швидкості обертання качалки 160 і 220 об/хв і температури 20, 28 та 42°C.

Динаміку накопичення ферментів, загального білку та зміну рН у культуральній рідині визначали кожні 12 годин протягом 144 годин повного терміну культивування.

Вміст загального білку визначали за допомогою методу Лоурі [4].

Екзоглюканазну активність визначали за адаптованою методикою Мандельса і Вебера, щодо мікроміцетів як об'єктів дослідження, засновану на принципі відновлення редуруючих цукрів, з використанням гексоціаноферату калію [4].

Активність ендоглюканази визначали віскозиметрично за допомогою віскозиметра Оствальда за зниженням в'язкості 0,3 %-вого розчину Na-КМЦ [4].

Результати дослідження оптимальної фази розвитку інокуляту для досліджуваних штамів наведено на діаграмі (рис. 1.)

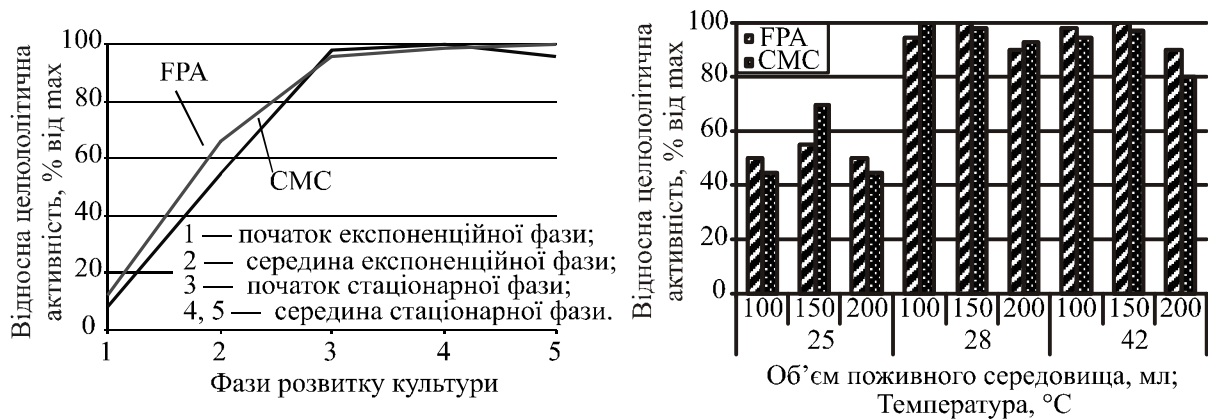


Рис. 1. Визначення оптимальної фази розвитку інокуляту

Рис. 2. Оптимальні умови культивування штаму *Aspergillus* sp. 262

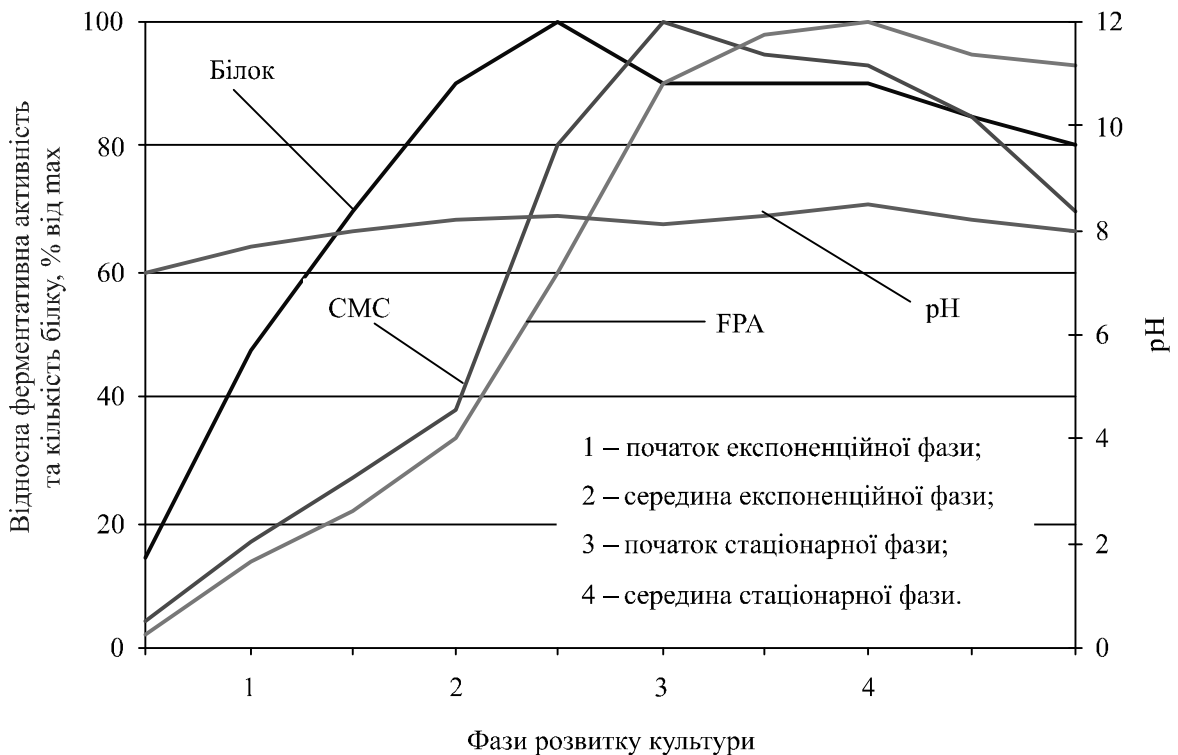


Рис. 3. Динаміка накопичення ферментів і загального білку в культуральній рідині

Визначено, що оптимальними умовами підготування посівного матеріалу для культивування штаму *Aspergillus* sp. 262 є внесення в середовище 10 % трьохдобової культури мікроміцета.

Результати дослідження впливу умов культивування для досліджуваного штаму *Aspergillus* sp. 262 відповідно наведено на діаграмі (рис. 2.)

На основі експериментальних даних було встановлено, що для культивування штаму *Aspergillus* sp. 262 з метою одержання максимального біосинтезу целюлаз оптимальними є такі технологічні параметри: частота перемішування –220 об/хв, температура культивування — 42°C, об'єм поживного середовища 150 мл.

В процесі дослідження динаміки біосинтезу целюлолітичних ферментів *Aspergillus* sp. 262 визначено, що максимум ендоглюканазної активності припадає на 96 годину культивування, екзоглюканазної — на 108 годину. Оптимальним часом культивування для *Aspergillus* sp. 262 є 96 годин (рис. 3.)

Висновок

Одержані результати дозволяють вивчити оптимальні умови культивування досліджуваного мікроміцета для отримання максимального біосинтезу ферментів целюлолітичного комплексу, які залежно від активності можна застосовувати для комплексного ферментативного гідролізу рослинної сировини у біопаливі, кормових та харчових продуктах, а також як проміжну сировину для хімічної та мікробіологічної галузей.

В результаті проведених дослідів було підвищено рівень екзоглюканазної та ендоглюканазної активності для штаму *Aspergillus* sp. 262 у 2,76 рази та у 2,18 рази відповідно.

Література

1. Грачева И.М. Технология ферментных препаратов / И.М. Грачева, А.Ю. Кривова // 3-е изд., перераб. и доп. — М.: Элевар, 2000. — 512 с.
2. Кирилов М.П. Использование многокомпонентных ферментных препаратов в комбикормах для сельскохозяйственных животных [Методические рекомендации] / М.П. Кирилов, В.А. Крохина, В.Н. Виноградов и др. — Дубровцы: ВНИИ Животноводства, 2003. — 22 с.
3. Кузьмина Л. А. Влияние состава питательной среды на биосинтез ферментов / А.Л. Кузьмина // Л., 2002. — 220 с.
- Польгалина Г.В. Определение активности ферментов [Справочник] / Г.В. Польгалина, В.С. Чердиченко, Л.В. Римарева — М.: Делипринт, 2003. — 375 с.
4. Jager G. Biocatalytic conversion of lignocellulose to platform chemicals / G. Jager, J. Buchs // Biotechnol. J. — 2012. — V. 7. — P. 1122–1136.
5. Dashtban M., Schraft H. Fungal Bioconversion of Lignocellulosic Residues; Opportunities & Perspectives / M. Dashtban, H. Schraft, W. Sin // International Journal of Biological Sciences. — 2009. — V.5. — P. 578–595.

ПОДБОР ОПТИМАЛЬНОГО СОСТАВА ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ И УСЛОВИЙ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ *ASPERGILLUS* SP. 262 — ПРОДУЦЕНТА ФЕРМЕНТОВ ЦЕЛЛЮЛОЛИТИЧЕСКОГО КОМПЛЕКСА

Ю.Ю. Лапская, Е.А. Омельчук, Ю.Н. Пенчук
Национальный университет пищевых технологий

На основе полученных экспериментальных данных определены источники углерода, азота и фосфора. Подобраны условия культивирования *Aspergillus* sp. 262 — продуцента целлюлолитических ферментов. Показано, что при использовании свежескопленного жома, $CO(NH_2)_2$ и

Na₂HPO₄ 12H₂O, в качестве составляющих питательной среды, происходит максимальный биосинтез комплекса целлюлолитических ферментов. Установлены оптимальные условия культивирования продуцента: влияние температуры, интенсивности аэрации, объема питательной среды, продолжительности культивирования и процент посевного материала на биосинтез ферментов целлюлаз штаммом *Aspergillus sp. 262* для получения максимального биосинтеза комплекса ферментов.

Ключевые слова: микромицеты, экзоглюканаза, эндоглюканаза, оптимизация условий культивирования, питательная среда.