

УДК 606:636.087.8

БОЛОХОВСЬКИЙ В.В., здобувач

МЕЛЬНИЧЕНКО О.М., д-р с.-г. наук

Білоцерківський національний аграрний університет

ОПТИМІЗАЦІЯ ПОЖИВНИХ СЕРЕДОВИЩ ДЛЯ КУЛЬТИВУВАННЯ ШТАМУ *BACILLUS MACERANS* ЯК ПРОДУЦЕНТА ПЕКТОЛІТИЧНОЇ КОРМОВОЇ ДОБАВКИ

Наведено результати досліджень відпрацювання оптимального складу поживного середовища для штаму *Bacillus macerans*. Вивчали вплив різних джерел Нітрогену (амонію сірчаноокислого, амонію хлористого, амонію шавлевокислого, амонію фосфорнокислого двозаміщеного, амонію лимоннокислого, пептону, гідролізату казеїну та сечовини) у складі поживного середовища для штаму *Bacillus macerans*. Досліджували вплив дії вуглеводів (цукру, мальтози, глюкози, крохмалю, нативної целюлози, NaKMЦ, лігніну, пектину бурякового, висівок пшеничних, жому бурякового) у складі поживного середовища. Встановлено, що оптимальним джерелом Нітрогену та вуглеводів у складі поживного середовища для продуцента *Bacillus macerans* є відповідно сечовина та жом буряковий.

Ключові слова: поживне середовище, штам *Bacillus macerans*, ензими, сечовина, жом буряковий, пектаттранселіміназа.

Постановка проблеми, аналіз останніх досліджень і публікацій. У годівлі свиней та сільськогосподарської птиці застосовують комбікорми, у складі яких до 85 % становить зернова група [1]. У зерні міститься значна кількість вуглеводів, серед яких є важкодоступні – целюлоза, геміцелюлоза, пектинові сполуки, лігнін та ін.

У всіх клітинних стінках і міжклітинному просторі рослин у різних концентраціях міститься нерозчинний пектин, який має функцію зв'язувального елемента між різними молекулами некрохмалистих поліцукрів з елементами клітин. Пектин формує міцний каркас, тим самим перешкоджає доступності ендогенних та екзогенних ензимів до поживних речовин. Найбільше пектину міститься у паренхімі рослинної тканини.

Пектин належить до некрохмалистих поліцукрів, які майже не засвоюються у організмі моногастричних тварин і виконують роль антипоживних факторів [2, 4]. Це, у свою чергу, перешкоджає травним ферментам у шлунково-кишковому каналі гідролізувати білки, ліпіди та вуглеводи, які зосереджені в ендоспермі. Відтак, трансформація поживних речовин корму у продукцію тварин зменшується.

Гідролізуються пектини за дії низки пектолітичних ферментів, які синтезуються вищими рослинами, мікроскопічними грибами, деякими видами дріжджів та бактеріями [5].

Мало вивченим продуцентом пектолітичних ферментів є *Bacillus macerans*, що має науковий і практичний інтерес у виготовленні кормових добавок для сільськогосподарських тварин та птиці в Україні. Крім того, не відпрацьовано оптимальні технологічні режими культивування штаму *Bacillus macerans*.

У зв'язку із цим, **метою** роботи є встановлення впливу оптимальних джерел Нітрогену та вуглеводів на інтенсивність синтезу пектаттранселіміназ продуцентом *Bacillus macerans*.

Матеріал і методи досліджень. Дослідження проводили в умовах лабораторії та виробничих потужностей ПП "Біотехнологія України–Центр" м. Ладижин Вінницької області. Для виробництва комплексної кормової добавки вивчали продуцент *Bacillus macerans*.

Для отримання вегетативного посівного матеріалу свіжу робочу культуру, отриману на косяках, суспендували в 5–10 мл стерильної води і висівали на рідке поживне середовище.

Під час підбору джерела Нітрогену за основу брали середовище, яке складалось із жому бурякового – 27,5 г/л; калію сірчаноокислого – 2,0 г/л; кальцію вуглекислого – 2,5 г/л; екстракту кукурудзи – 12,5 г/л; гідроксиду калію – 0,2 г/л.

До складу основного середовища добавляли різні джерела Нітрогену: амоній сірчаноокислий, амоній хлористий, амоній шавлевокислий, амоній виннокислий, амоній

лимоннокислий, пептон, гідролізат казеїну та сечовину (контроль) із розрахунку 0,35 % за Нітрогеном.

Після вибору оптимального джерела Нітрогену, замість бурякового жому застосовували інші джерела вуглеводів: цукор, мальтозу, глюкозу, крохмаль, нативну целюлозу, NaКМЦ, лігнін, пектин буряковий, висівки пшеничні, жом буряковий (контроль) із розрахунку 2,2 % за вуглеводами.

Оптимізацію поживних середовищ проводили у трикратній повторності методом культивування штаму *Bacillus macerans* на різних середовищах в колбах для лабораторної гойдалки місткістю 750 мл.

Пектаттранселіміназна активність у культуральній рідині визначали за ГОСТ 20264.3–81 [3].

Результати досліджень та їх обговорення. Досліджуючи вплив різних джерел Нітрогену на інтенсивність синтезу пектаттранселімінази продуцентом *Bacillus macerans* встановили, що активність комплексу ензимів була найвищою за умов застосування сечовини – на рівні 21650 од/мл (табл. 1).

Таблиця 1 – Залежність ферментативної активності пектаттранселімінази від джерела Нітрогену у поживному середовищі *Vac. macerans*

Джерело Нітрогену	Пектаттранселіміназна активність, од/мл	% до контролю
Амоній сірчаноокислий	16800±456,7 **	77,6
Амоній хлористий	15510±345,6**	71,6
Амоній щавлевоокислий	17480±534,2**	80,7
Амоній лимоннокислий	17100±354,2**	78,9
Амоній фосфорнокислий двозаміщений	20560±463,9	95,0
Пептон	19250±853,1	88,9
Гідролізат казеїна	19100±764,2*	88,2
Сечовина (контроль)	21650±455,2	100,0

Примітка:* – $p \leq 0,05$; ** – $p \leq 0,01$.

Використання амонію сірчаноокислого та хлористого супроводжувалось зниженням активності пектаттранселімінази порівняно з контрольними показниками на 22,4 та 28,3 % ($p \leq 0,01$) відповідно.

Внесення до складу поживного середовища амонію лимоннокислого та щавлевоокислого не давало високих результатів. Активність пектаттранселімінази була нижчою на 21,0 та 19,3 % ($p \leq 0,01$) відповідно, порівняно із варіантом де застосовували сечовину.

Під час застосування органічних джерел Нітрогену (пептону та гідролізату казеїну) різниця з контролем у активності пектаттранселімінази була нижчою, ніж у випадках, коли поживне середовище містило амоній сірчаноокислий, хлористий, щавлевоокислий та лимоннокислий. Включення до складу поживного середовища пептону та гідролізату казеїну супроводжувалось зменшенням активності досліджуваного ензиму на 11,0 та 11,8 % відповідно, порівняно з контролем.

Серед неорганічних джерел Нітрогену найкращі результати були отримані за використання амонію фосфорнокислого двозаміщеного. За активністю цього ензиму показник поступався контролю лише на 5,0 %.

Таким чином, за глибинного культивування штаму *Bacillus macerans* на середовищах з різними нітратовмісними сполуками рівень накопичення фермента пектинліази був досить високий – від 71,6 до 95,0 %. Найвищий рівень активності фермента спостерігали в середовищах, де як джерело Нітрогену застосовували білки тваринного походження (пептон та гідролізат казеїну). Застосування Нітрогену мінерального походження знижало активність ензиму на 20–30 % за винятком амонію фосфорнокислого двозаміщеного, де зниження активності відбувалось лише на 5,0 %.

Під час заміни бурякового жому у складі поживного середовища застосовували інші джерела вуглеводів: цукор, мальтозу, глюкозу, крохмаль, нативну целюлозу, NaКМЦ, лігнін, пектин буряковий, пектин яблучний, висівки пшеничні, (із розрахунку 2,2 % за вуглеводами) (табл. 2).

Таблиця 2 – Вплив джерела вуглеводів у поживному середовищі *Bacillus macerans* на синтез пектаттранселімінази

Джерело вуглеводів	Пектаттранселіміназна активність, од/мл
Глюкоза	1670±102,4***
Мальтоза	2360±203,5***
Цукроза	2050±178,4***
Крохмаль	8670±362,9***
Нативна целюлоза (хроматографічний папір)	12380±867,3***
Модифікована целюлоза (NaКМЦ)	10100±672,1***
Лігнін	4800±111,7***
Пектин буряковий	23900±673,6
Пектин яблучний	19680±1574,4*
Висівки пшеничні	13440±734,7***
Жом буряковий (контроль)	24300±835,9

Примітка: * – $p \leq 0,05$; *** – $p \leq 0,001$

На другому етапі підбір оптимального джерела вуглеводів проводили на середовищах із сечовиною – найефективнішим джерелом Нітрогену.

Експериментально встановлено, що найнижча активність пектаттранселімінази була у варіанті, де джерелом вуглеводів виступала глюкоза. Показник був меншим у 14,6 раза ($p \leq 0,001$) ніж у контролі. На поживному середовищі з умістом мальтози та цукрози, кількість синтезованого продуцентом ферменту становила 9,7 та 8,4 % відповідно, від контролю ($p \leq 0,001$).

Застосування лігніну не дало високих результатів у отриманні пектаттранселімінази, показник активності ензиму був у 5,1 рази менший, ніж у контролі.

За умов включення крохмалю у поживне середовище активність пектаттранселімінази була на рівні 35,7 % від контролю ($p \leq 0,001$).

У варіантах, де застосовували модифіковану целюлозу, нативну целюлозу та висівки пшеничні, рівень синтезу пектаттранселімінази продуцентом *Bacillus macerans* був вищим порівняно з легкодоступними вуглеводами і лігніном. Однак активність ензиму була нижчою у 2,4; 1,9 та 1,8 раза ($p \leq 0,001$) відповідно порівняно з контролем.

За умов використання пектину бурякового та пектину яблучного показник накопичення досліджуваного фермента був найбільш наближеним до контролю. Різниця з ним становила лише 1,6 та 19,0 % відповідно.

Застосування простих цукрів як єдиних джерел вуглеводів у поживному середовищі сприяло накопиченню біомаси бактерій, однак не стимулювало синтезу ферменту. Цей факт добре узгоджується з теорією індукції специфічним субстратом синтезу відповідного виду ферментів. Таким специфічним субстратом для пектинліази є пектин, який забезпечує ферментативну активність на рівні від 80,0 до 95,0 %. Внесення в поживне середовище субстратів, які містять некрохмалисті поліцукри (целюлоза, пектин), сприяє кращому накопиченню пектинліази, ніж додавання цукрів крохмалистої природи.

Таким чином, виявлено, що оптимальним джерелом Нітрогену та вуглеводів для продуцента *Bacillus macerans* є відповідно сечовина та жом буряковий.

Висновки та перспективи подальших досліджень. 1. Застосування у складі поживного середовища для штаму *Bacillus macerans* сечовини як джерела Нітрогену дає змогу синтезувати ензими пектолітичною активністю 21650±455,2 од/мл.

2. Оптимальним джерелом вуглеводів у поживному середовищі для штаму *Bacillus macerans* є жом буряковий, що дозволяє одержати пектаттранселіміназу з активністю 24300 од/мл.

Перспективним напрямом дослідження є вивчення впливу різних стабілізаторів на збереження пектолітичної активності ензимів продукованих штамом *Bacillus macerans*.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Болоховская В.А. Основные аспекты использования ферментной добавки Мацераса в комбикормах с повышенным содержанием трудноперевариваемых компонентов / В.А. Болоховская, В.В. Болоховский // Материалы конференции «Украина. Комбикорма 2006» (26–28 апреля, 2006 г.). – К., 2006. – С. 34–38.

2. Донченко Л.В. Технология пектина и пектинопродуктов / Л.В. Донченко. – М.: ДеЛи, 2000. – 256 с.
3. Препараты ферментные. Методы определения активности пектолитического комплекса: ГОСТ 20264.3–81. – [Введен в действие 2002-01-01]. – М.: Изд-во стандартов, 1981. – 18 с.
4. Свойства фитазы, пектинлиазы и α-галактозидазы *Penicillium canescens* / О.А. Сеницына, Е.А. Федорова, И.М. Вакар [и др.] // Третий москов. междунар. конгресс «Биотехнология состояние и перспективы развития», Март 14–18, – М., 2005. – С. 212.
5. Simtsyna O.A. Applications of the recombinant enzymes from *Penicillium canescens* in biotechnological processes International / O.A. Simtsyna, E.A. Fedorova, A.G. Pravilnikov // Conference Biocatalysis-2007 «Fundamentals&Applications», June 17–22, 2007. – Moscow-St Petersburg, 2007. – P. 54.

REFERENCES

1. Bolohovskaja V.A. Osnovnye aspekty ispol'zovanija fermentnoj dobavki Maceraza v kombikormah s povyshennym soderzhanijem trudnoperevarivaemykh komponentov / V.A. Bolohovskaja, V.V. Bolohovskij // Materialy konferencii «Ukraina. Kombikorma 2006» (26–28 aprelja, 2006 g.). – К., 2006. – S. 34–38.
2. Donchenko L.B. Tehnologija pektina i pektinoproductov / L.B. Donchenko. – М.: DeLi, 2000. – 256 s.
3. Preparaty fermentnye. Metody opredelenija aktivnosti pektoliticheskogo kompleksa: GOST 20264.3–81. – [Vveden v dejstvie 2002-01-01]. – М.: Izd-vo standartov, 1981. – 18 s.
4. Svoystva fitazy, pektinliazy i α-galaktozidazy *Penicillium canescens* / O.A. Sinicyna, E.A. Fedorova, I.M. Vakar [i dr.] // Tretij moskov. mezhdunar. kongress «Biotehnologija sostojanie i perspektivy razvitija», Mart 14–18, – М., 2005. – S. 212.
5. Simtsyna O.A. Applications of the recombinant enzymes from *Penicillium canescens* in biotechnological processes International / O.A. Simtsyna, E.A. Fedorova, A.G. Pravilnikov // Conference Biocatalysis-2007 «Fundamentals&Applications», June 17–22, 2007. – Moscow-St Petersburg, 2007. – P. 54.

Оптимизация питательных сред для культивирования штамма *Bacillus macerans* как продуцента пектолитической кормовой добавки

В.В. Болоховский, О.Н. Мельниченко

Изложены результаты исследований отработки оптимального состава питательной среды для штамма *Bacillus macerans*. Изучалось влияние аммония сернокислого, аммония хлористого, аммония фосфорнокислого двозамещенного, аммония лимоннокислого, пептона, гидролизата казеина и мочевины как источника Нитрогена в составе питательной среды для штамма *Bacillus macerans*. Исследовали влияние действия сахара, мальтозы, глюкозы, крахмала, нативной целлюлозы, NaKMЦ, линина, пектина свеклы, отрубей пшеницы, жом свеклы как источника углеводов в составе питательной среды.

Установлено, что оптимальным источником Нитрогена и углеводов в составе питательной среды для продуцента есть, соответственно, мочевина и жом свеклы.

Ключевые слова: питательная среда, штамм *Bacillus macerans*, энзимы, мочевина, жом свеклы, пектаттранселлиназа.

Надійшла 24.03.2014.