

Лапська Ю.Ю.<sup>1</sup>, Омельчук Є.О.<sup>1</sup>, Сирчин С.О.<sup>2</sup>, Красінсько В.О.<sup>1</sup>, Чернюк Б.В.<sup>1</sup>

*1 – Національний університет харчових технологій, Київ, Україна*

*2 – Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАНУ, Київ, Україна*

## **Оптимізація поживного середовища та умов культивування *Aspergillus* sp. 262 та *Corynascus* sp. 2006 – продуцентів целюлаз**

**Вступ.** Целюлази належать до групи гідролітичних ферментів, які здатні до гідролізу найбільш поширеного органічного полімеру – целюлози. Інтерес до них постійно росте завдяки великому потенціалу їх використання в сільському господарстві а також в ряді інших галузях промисловості. Відомо, що глибокий гідроліз целюлози здійснюється в результаті узгодженої дії поліферментної системи, яка складається із ферментів. Вони відрізняються між собою за молекулярною будовою і механізмом дії на молекулу целюлози. Відомо чотири ключових компоненти целюлазного комплексу: 1,4-β-D-глюканглюканогідролаза або ендоглюканаза (КФ 3.2.1.4); 1,4-β-D-глюканглюкогідролаза або екzogлюканаза (КФ 3.2.1.74); 1,4-β-D-глюканцелобіогідролаза або целобіаза (КФ 3.2.2.21). Кількість індивідуальних целюлолітичних ферментів а також їх різні форми, які входять в склад целюлазного комплексу різна і залежить від особливостей мікроорганізму-продуцента.

Перспектива промислового використання целюлаз базується на властивостях даного комплексу ферментів здійснювати гідроліз целюлози з утворенням глюкози. На сьогодні ферментні препарати на основі целюлаз широко використовуються у тваринництві та птахівництві в якості добавок до кормів для підвищення їх поживної цінності а також для збереження продуктивності тварин.

Раціональне використання ферментних препаратів призводить до прискореного накопичення низькомолекулярних продуктів в шлунково-

кишковому тракту тварин, що сприяє розвитку мікрофлори, інтенсифікації процесів мікробної ферментації кормів і їх прискореному росту та розвитку. Технології по використанню целюлолітичних ферментів в текстильній промисловості базуються на розкладанні первинної стінки волокон і видалення з них різних видів бруду. Тому пошук нових продуцентів ферментів целюлаз і вивчення їх властивостей, які є важливими для технологічного використання, на сьогодні є досить актуальним.

На сьогодні найбільш поширеним видом целюлозовмісної сировини є відходи. Кращими постачальниками їх є різні галузі промисловості і особливо сільське господарство. Тому відходи, які втратили свої споживчі властивості і не можуть бути використані за прямим призначенням через технологічні особливості підприємства можуть бути використані в якості субстратів для отримання ферментів целюлолітичного комплексу.

В зв'язку з перспективністю використання ферментів целюлолітичного комплексу в різних галузях промисловості стала необхідною потреба в розробленні засобів підвищення синтезу цих ферментів. А саме підбір оптимального поживного середовища та умов культивування штаму, що і було метою дослідження.

**Матеріали і методи.** Раніше було проведено скринінг серед великої кількості родів і видів мікроміцетів – можливих продуцентів целюлаз щодо здатності до синтезу ферментів целюлолітичного комплексу. В процесі проведеного ступінчастого скринінгу було виявлено два активних потенційних продуценти роду *Aspergillus* і *Corynascus*. В результаті було селекціоновано нові штами *Aspergillus* sp. 262 та *Corynascus* sp 2006.

Об'єктами дослідження були штами грибів *Aspergillus* sp. 262 та *Corynascus* sp. 2006 відібрані з колекції культур відділу фізіології та систематики мікроміцетів Інституту мікробіології і вірусології НАН України.

Для визначення потреби в окремих компонентах поживного середовища під час культивування продуцентів використовували оптимізоване середовище Чапека за Підоплічко, в якому змінювали джерела вуглецю, азоту та фосфору.

Культури вирощували у глибинних умовах у колбах Ерленмейєра об'ємом 750 мл.

Як джерело вуглецю в складі поживного середовища досліджували (у концентрації 2%) відходи сільського господарства: вівсяна солома, буряковий жом, соняшникове лушпиння, стебло і листя соняшника, деревна стружка.

Мінеральними джерелами азоту слугували нітрати натрію, калію та амонію; хлорид амонію, сульфат амонію; пептон і сечовина.

Як джерела фосфору вивчали різноманітні солі фосфорної кислоти: гідрофосфат натрію, калію та амонію; дигідрофосфат натрію і калію, фосфат амонію.

Умови культивування оптимізували на середовищах, адаптованих за джерелом вуглецю, азоту та фосфору.

Для встановлення оптимальних умов синтезу ферментів целюлаз штами *Aspergillus* sp. 262 та *Corynascus* sp 2006 вирощували у колбах Ерленмейєра (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 °С. Посівний матеріал у колби вносили в кількості 5, 10, 15% до об'єму поживного середовища.

Динаміку накопичення ферментів і загального білку у культуральній рідині визначали кожні 12 годин протягом 144 годин повного терміну культивування.

Результати дослідів оцінювали за екзоглюканазною на ендоглюканазною активністю у культуральній рідині за відповідними методиками.

Активність ендоглюканази визначали за допомогою віскозиметра Освальда за зниженням в'язкості 0,3%-вого розчину Na-КМЦ.

Активність екзоглюканази визначали за адаптованою методикою Мандельса і Вебера, щодо мікроміцетів як об'єктів дослідження, засновану на принципі відновлення редукуючих цукрів, з використанням розчину гексоціаноферату калію.

**Результати та обговорення.** Одним із головних чинників, що впливає на ріст мікроміцетів і біосинтез ними позаклітинних ферментів, є склад поживного середовища. До складу повноцінного середовища, що забезпечує ріст та синтез цільового продукту культурою, входять, окрім джерел вуглецю, сполуки азоту, мінеральні елементи, водень та кисень. У процесі культивування продуцента ензимів у разі правильно підбраного середовища не відбувається накопичення проміжних продуктів окиснення поживних речовин (кетокислот, ди- та три карбонових кислот, альдегідів тощо). З огляду на це важливим етапом дослідження для підвищення виходу ферментів целюлаз стало відпрацювання складу поживного середовища для вирощування штамів *Aspergillus* sp. 262 та *Corynascus* sp. 2006 і проведення оптимізації умов культивування.

Вивчено вплив складу поживного середовища і режиму ферментації на процес синтезу ферментів целюлолітичного комплексу штамами *Aspergillus* sp. 262 та *Corynascus* sp. 2006 за умов глибинного культивування.

В результаті досліджень було підбрано оптимальне джерело вуглецю (буряковий жом, вівсяна солома), азоту (сечовина, нітрат амонію) та фосфору (дигідрофосфат натрію, гідрофосфат амонію) для культивування обох штамів відповідно.

Доведено, що оптимальними умовами підготування посівного матеріалу для культивування штамів *Aspergillus* sp. 262 та *Corynascus* sp. 2006 є внесення в середовище 10% трьохдобової культури грибів.

Встановлені оптимальні технологічні параметри для культивування штамів *Aspergillus* sp. 262 та *Corynascus* sp. 2006 та отримання максимального біосинтезу ферментів целюлаз: частота перемішування – 160 об/хв та 220 об/хв, температура культивування – 42 °C, об'єм поживного середовища 150 мл за тривалості культивування протягом чотирьох діб відповідно.