

М.В. Стратан, А.А. Десятник

Институт микробиологии и биотехнологии АНМ, ул. Академическая, 1, МД-2028, Кишинев, Молдова, тел: (373 22)739824,
e-mail: cnmmoldova@yahoo.com

ВЛИЯНИЕ ПОСЕВНОГО МАТЕРИАЛА НА АМИЛОЛИТИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ШТАММА *ASPERGILLUS NIGER 33-19 CNMN FD-02*

*Изучено влияние типа, возраста и количества посевного материала на биосинтез амилаз штаммом мицелиального гриба *Aspergillus niger 33-19 CNMN FD-02* А. Установлено, что активность как стандартных, так и кислотостабильных амилаз выше при использовании в качестве посевного материала 10 мл (на 200 мл питательной среды) водной суспензии (1×10^6 спор/мл) спор 12 - 14-дневной культуры, выращенной на скошенной среде сусло-агар при температуре 28 - 30 °С. При этом максимум накопления амилолитических ферментов в культуральной жидкости зарегистрирован на 6-й день культивирования и составляет 172,2 ед/мл для стандартных амилаз (рН 4,7) и 274,0 ед/мл для кислотостабильных (рН 2,5). Для вегетативного инокулюма оптимальной является 24-часовая раскладка в количестве 15 мл, что обеспечивает активность стандартных и кислотостабильных амилаз, равную 145,2 и 143,6 ед/мл, соответственно.*

К л ю ч е в ы е с л о в а: биосинтез амилаз, *Aspergillus niger*, амилолитические ферменты, глубинное культивирование.

При совершенствовании многих технологических процессов широко используются амилазы микроорганизмов, которые заменяют и вытесняют амилазы растительного и животного происхождения. Объясняется это, прежде всего, в сотни раз большей продуктивностью микроорганизмов по сравнению с растениями и животными, дешевизной и доступностью микробиологического сырья.

Наиболее часто как продуценты ферментов амилаз используются плесневые грибы родов *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, актиномицеты, бактерии рода *Bacillus*, а также дрожжеподобные микроорганизмы *Endomycopsis* [3,8,12,14].

Среди микроскопических грибов способность к биосинтезу амилаз в большей степени установлена у представителей рода *Aspergillus*. Кроме того, некоторые из них обладают свойством продуцировать кислотоустойчивые α -амилазы. Последние практически полностью, на 90 %, сохраняют активность в кислой среде в течение 30-минутной инкубации при температуре 37 °С. В этих условиях обычные α -амилазы желто-зеленых аспергиллов



необратимо теряют каталитические свойства [4,14,15]. Ферменты амилолитического комплекса, продуцируемые микромицетами рода *Aspergillus*, нашли наиболее широкое применение.

Биосинтез ферментов зависит от физиологического состояния микроорганизмов – продуцентов и ряда физических и химических факторов культивирования: состав питательной среды, наличие биостимуляторов и индукторов для индуцированных ферментов, режим аэрации, pH и температура культивирования. Эти факторы определяют скорость развития и размножения микроорганизмов, образования ферментов, обуславливая модифицирование биосинтетической способности штамма-продуцента. Возраст, количество и тип посевного материала играют важную роль для биосинтеза и накопления ферментов в максимальных количествах, обеспечения воспроизводства технологического процесса, а также для получения некоторых метаболитов с высокой скоростью биосинтеза [1, 2, 4, 5, 8,10].

Цель настоящей работы — изучение влияния типа, возраста и количества посевного материала на биосинтез амилаз новым перспективным продуцентом *Aspergillus niger* 33-19 CNMN FD-02 A.

Материалы и методы исследований

Объектом исследований служил штамм-мутант *Aspergillus niger* 33-19 CNMN FD-02 A, полученный при гамма-облучении. Культивирование продуцента осуществлялось глубинным методом в колбах Эрленмейера емкостью 1 литр с 200 мл среды, в условиях постоянного перемешивания (180 - 200 об/мин), при температуре 28 - 30 °С, на среде подобранного оптимального состава, содержащей (г/л): крахмал — 3,0, фасолевою муку — 9,0, пшеничные отруби — 18,0, K_2HPO_4 — 2,0, KCl — 0,5, MgSO_4 — 0,5, вода, pH 5,0.

В качестве посевного материала использовали водную суспензию спор (10^6 спор /мл) 12 - 14-дневной культуры, выращенной на среде сусло-агар при температуре 28 - 30 °С, и вегетативный инокулюм, полученный при глубинном культивировании 12 - 14-дневной культуры на вышеназванной среде.

Для определения оптимального возраста спорового посевного материала были тестированы суспензии спор, полученные из культур различного возраста — 5, 10, 15, 20, 25 и 30 дней, выращенных на скошенном сусло-агаре. Амилолитическую активность определяли в фильтрах культуральной жидкости на 4-й, 5-й и 6-й день культивирования.

Амилолитическую активность определяли колориметрическим методом с йодом, используя в качестве субстрата раствор 1 %-ного растворимого крахмала, в стандартных условиях гидролиза при pH 4,7 для обычных амилаз и в экстремальных условиях гидролиза при pH 2,5 для кислотостабильных амилаз [11,13].

Результаты и их обсуждение

Штамм *Aspergillus niger* 33-19 CNMN FD-02 A получен при гамма-облучении штамма *Aspergillus niger* 33 CNMN FD-06 A продуцента амилаз. Мутантный вариант характеризуется высокой внеклеточной амилолитической активностью, зарегистрированной на 6-й день культивирования. Оптимальная температура культивирования и биосинтеза 28 - 30 °С, опти-



мальный рН для образования амилаз 5,0 - 5,2. Культура хранится на скошенной сусло-агаровой среде при температуре 3 - 7 °С. Частота пересева — 1 раз в 2 - 3 месяца. Штамм *Aspergillus niger* 33-19 CNMN FD-02 А депонирован в Национальной коллекции непатогенных микроорганизмов при Институте микробиологии и биотехнологии Академии Наук Молдовы как активный продуцент амилаз [16].

При глубинном культивировании плесневых грибов в качестве посевного материала используют мицелий или водную суспензию спор. Получение и стандартизация посевного материала осуществляется дифференцированно в зависимости от вида материала. Для каждого продуцента и каждого отдельного технологического процесса оптимальные показатели инокулюма, как и оптимальная фаза эволюции микроорганизма для получения максимального количества метаболитов, устанавливаются или корректируются индивидуально.

В работе тестированы два типа посевного материала: суспензия спор и вегетативный мицелий. Так как физиологическое состояние микроорганизма в момент посева влияет на последовательные фазы его развития, влияние возраста инокулюма на энзиматическую активность штамма *Aspergillus niger* 33-19 CNMN FD-02 А исследовалось в динамике на 4-й, 5-й и 6-й день культивирования микроорганизма. Это дало возможность определить в одном опыте время проявления максимума биосинтеза амилаз и продолжительности культивирования. Результаты данных исследований представлены на рисунке 1(а, б). Как следует из рис.1, оптимальным возрастом спорового посевного материала, который обеспечивает наиболее высокую энзиматическую активность как стандартных, так и кислотостабильных амилаз, является 15-дневная культура. Максимум накопления амилолитических ферментов в культуральной жидкости зарегистрирован на 6-й день культивирования и составляет 172,2 ед/мл для стандартных амилаз (рН 4,7) и 274,0 ед/мл для кислотостабильных (рН 2,5).

Для выявления влияния количества засеянных спор на биосинтез ами-

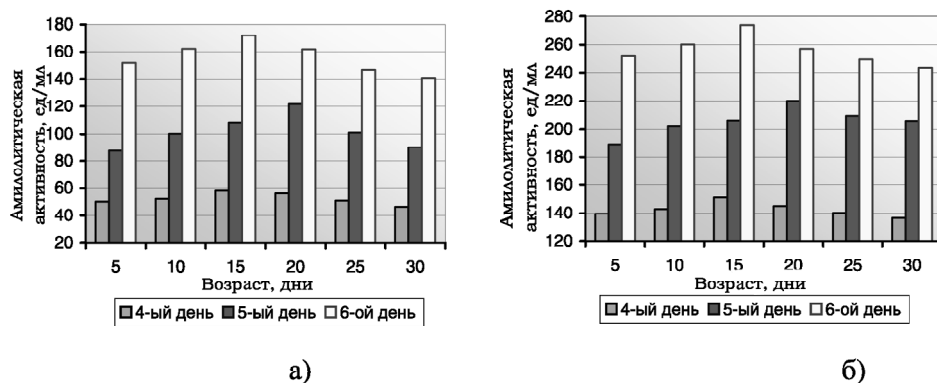


Рис.1. Динамика накопления амилолитических ферментов при глубинном культивировании штамма *Aspergillus niger* 33-19 CNMN FD-02 А в зависимости от возраста спорового посевного материала

а) ферментативная активность в стандартных условиях гидролиза, рН 4,7

б) ферментативная активность в экстремально-кислых условиях гидролиза, рН 2,5



лаз изучаемым штаммом, в колбы с 200 мл питательной среды вносили по 5, 10, 15, 20 мл суспензии спор, полученных с 14 — 15-дневной поверхностной культуры. Максимальная активность стандартных и кислотостабильных амилаз в зависимости от количества и возраста вегетативного посевного материала отмечалась в вариантах засеянных 10 мл суспензии спор, достигая уровня 171,3 ед/мл при рН 4,7 и 253,5 ед/мл при рН 2,5 (рис. 2).

Для культур грибов, которые не образуют обилия конидий, посевным материалом служит вегетативный мицелий. Это является ещё одним фактором усложнения стандартизации посевного материала, так как фаза раз-

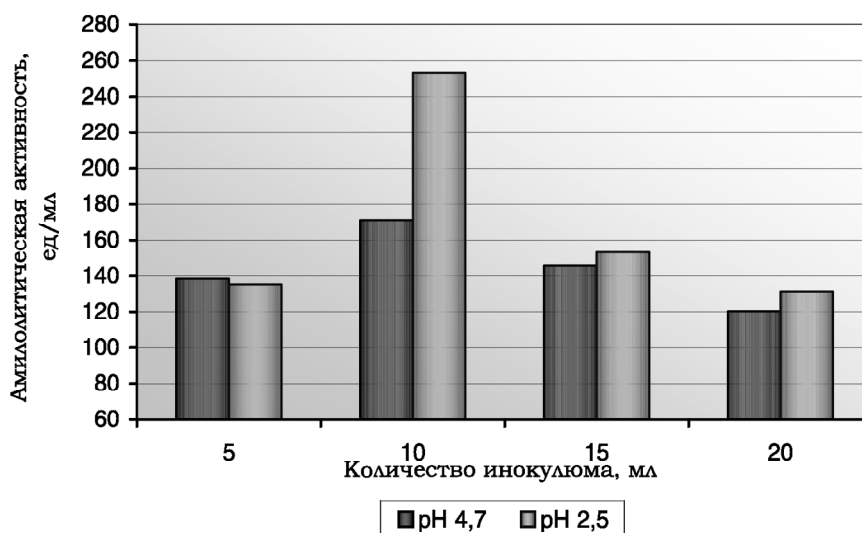


Рис. 2. Влияние количества спорового инокулюма на накопление амилолитических ферментов при глубинном культивировании штамма *Aspergillus niger 33-19 CNMN FD-02 A*

вития мицелия, используемого как посевной материал, влияет на следующие этапы развития микроорганизма.

Количество инокулюма значительно влияет на величину и форму агломератов, проявление диморфизма и выход метаболитов. В случае аскомицета *Aspergillus oryzae*, культуры, засеянные маленьким количеством инокулюма, характеризуются образованием большого количества биомассы, но низким выходом амилаз, так как в основном происходит метаболизм большого количества углеводов для образования биомассы [5].

В дальнейших опытах было изучено влияние возраста и количества инокулюма вегетативного посевного материала на амилолитическую активность штамма *Aspergillus niger 33-19 CNMN FD-02 A*. В исследованиях использовался мицелий 24, 48, 72 - часового возраста в количестве 10 и 15 мл однородного посевного материала. Изменение амилолитической активности в зависимости от количества и возраста вегетативного посевного материала представлено на рисунке 3 (а, б).

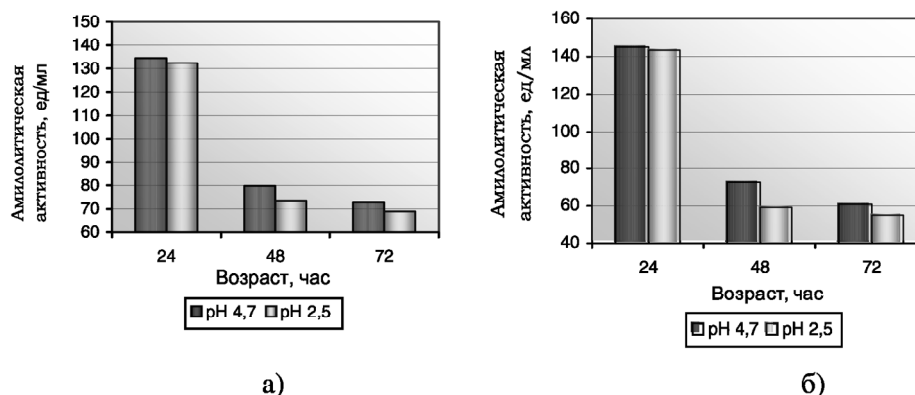


Рис. 3. Биосинтез амилаз штамма *Aspergillus niger* 33-19 CNMN FD-02 A в зависимости от возраста и количества вегетативного инокулюма

а) в количестве 10 мл;

б) в количестве 15 мл.

Показано, что оптимальным посевным материалом является 24-часовая культура, которая находится в логарифмической фазе развития.

Использование в качестве инокулюма 15 мл 24-часовой расплодки вегетативного мицелия обеспечивает активность стандартных и кислотостабильных амилаз, равную 145,2 и 143,6 ед/мл, соответственно. В варианте, где использовали 10 мл того же инокулюма, активность амилаз ниже и составляет 134,5 и 132,3 ед/мл, соответственно, для стандартных и кислотостабильных амилаз.

При сравнении полученных результатов установлено, что в зависимости от типа посевного материала активность обоих видов амилаз выше при использовании спорового посевного материала — 172,2 ед/мл и 274,0 ед/мл по сравнению с 145,2 ед/мл и 143,6 ед/мл в вариантах с вегетативным посевным материалом.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Cascaval Dan*. Bioinginerie on prelucrarea agroalimentara //Univ. Tehnica „Gh. Asachi” Iasi // Iaci 1998
2. *Clapco S* „Influenta unor factori de mediu asupra procesului de biosinteza a pectinazelor la tulpina de fungi *Penicillium viride* CNMN FD 04 P”. //Analele Stiintifice ale USM Seria „Stiinte chimico-biologice” // Chisinau 2004 p. 94-97.
3. *Deseatnic A*. Morfologia, fiziologia si activitatea biosintetica a unor micromicete producatoare de hidrolaze extracelulare. //Buletinul Academiei de Stiinte 2005 nr.1 p. 123-133//
4. *Deseatnic A., Tiurin J., Labliuc S.*, si al. Stabilirea parametrilor optimali de biosinteza a amilazelor de catre unele tulpini de fungi din genul *Aspergillus* Materialele Simpozionului al II-lea Nationala cu participare Internationala „Inginerie genetica si biotehnologii moderne” Chisinau. 2002. p. 290-293.
5. *Zarnea I*. Mecinicopschi Gh. Bioingineria preparatelor enzimaticе microbiene. Bucuresti 1980. p.195



6. *Zarnea G.* *Tratat de microbiologie generala. Vol II* 1984.I
7. *Коновалов С.А.* Биосинтез ферментов микроорганизмами. — М.: 1973. — № 3. — С. 19.
8. *Галич С.А.* Амилазы микроорганизмов. — К.: Наука, 1987. — 190 с.
9. *Лобанок А.Г., Астапович Н.И.* Биотехнология микробных ферментов // Наука и техника. — 1989.
10. *Закиров М.З.* Ферменты плесневых грибов. — Ташкент, 1975. — С. 51-69.
11. *Грачева И.М., Грачев Ю.П., Мосичев М.С.* Лабораторный практикум по технологии ферментных препаратов // Легкая и пищ. пром. — 1992.
12. *Квеситадзе Г.И.* Грибные и бактериальные амилазы. — Тбилиси: Мецниереба, 1984. — 154 с.
13. *Рухляева А.П.* Методы определения активности гидролитических ферментов. — М.: Наука, 1981.
14. *Безбородов А.М.* Биотехнология продуктов микробного синтеза. — М.: Агропромиздат, 1991. — С. 202 - 219.
15. *Scriban Rene.* *Biotechnologie.* — Paris. P. 317 - 360.
16. *Патент MD 2836 B1OP1* 8, 2005.

М.В. Стратан, О.А. Десятник

Институт мікробіології та біотехнології АНМ, вул. Академічна 1, МД-2028, Кишинів, Молдова, тел: (373 22) 739824, e-mail: cnmmoldova@yahoo.com

ВПЛИВ ПОСІВНОГО МАТЕРІАЛУ НА АМІЛОЛІТИЧНУ АКТИВНІСТЬ ШТАМУ *ASPERGILLUS NIGER* 33-19 CNMN FD-02

Реферат

Вивчено вплив типу, віку та кількості посівного матеріалу на біосинтез амілаз штамом міцеліального гриба *Aspergillus niger* 33-19 CNMN FD-02 A.

Встановлено, що активність як стандартних, так і кислотостабільних амілаз вища при використанні 10 мл (на 200 мл живильного середовища) водної суспензії (1×10^6 спор/мл) спор 12 - 14-денної культури, яка виросла на скошеному середовищі сусло-агар при температурі 28-30 °С. При цьому максимум накопичення амілолітичних ферментів та культуральної рідини зареєстровано на 6-ий день культивування і складає 172,2 од/мл для стандартних амілаз (рН 4,7) та 274,0 од/мл для кислотостабільних (рН 2,5).

Для вегетативного інокулюму оптимальним є 24-годинний розподок у кількості 15 мл, що забезпечує активність стандартних кислотостабільних амілаз, яка дорівнює 145,2 і 143,6 од/мл, відповідно.

К л ю ч о в і с л о в а: біосинтез амілаз, *Aspergillus niger*, глибинне культивування, амілолітичні ферменти.



M.V. Stratan, A.A. Desyatnic

Institute of Microbiology and Biotechnology of ASM
Akademicheskaya str., 1, MD-2028, Chisinau, Moldova, tel: (373 22) 739824,
e-mail: cnmmoldova@yahoo.com

**INOCULUM INFLUENCE ON AMYLOLYTIC ACTIVITY OF THE STRAIN
ASPERGILLUS NIGER 33-19 CNMN FD-02**

Summary

Inoculum influence of the type, age and quantity on the producing of amylases of *Aspergillus niger* 33-19 CNMN FD-02 A strain was studied. It was noticed that enzymatic activity of ordinary as well as of acid stable amylases is higher at using of inoculum 10 ml (into 200ml growing medium) spores suspension (1×10^6 spores/ml) of the 12 — 14 days age culture, cultivated on the splay wort-agar medium, at t 28 — 30 °C. Maximum of the amylolytic enzymes accumulation in the culture filtrate was established at the sixth day of cultivation, being 172.2 u/ml for ordinary amylases (pH 4.7) and 274.0 u/ml for acid stable (pH 2.5).

Using vegetative inoculum as inoculation material, the optimal effect was obtained. That is a 24-hours age culture in quantity of 15 ml, ensured the activity for ordinary as well as acid stable amylases equal to 145.2 u/ml and 143.6 u/ml, respectively.

Key words: biosynthesis of amilazes, *Aspergillus niger*, deep cultivation, amylolytic enzymes

