

МЕТОДИ

УДК 663.15.:577.15

ОПТИМІЗАЦІЯ КУЛЬТИВУВАННЯ *Penicillium* sp. 225 ТА *Aspergillus* sp. 8 TX — ПРОДУЦЕНТІВ ПОЗАКЛІТИННОЇ ІНУЛІНАЗИ

В. І. Стойко
Н. М. Жданова
В. Л. Айзенберг
Г. П. Капічон

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного
НАН України, Київ

E-mail: v_stoiko@mail.ru

Вивчено вплив різних джерел вуглецю, азоту та фосфору, температури, інтенсивності аерації, тривалості вирощування, відсотка посівного матеріалу на біосинтез інулінази мікроміцетами *Penicillium* sp. 225 та *Aspergillus* sp. 8 TX. Серед джерел вуглецевого живлення найкращими виявилися жмих топінамбура та подрібнений корінь цикорію, азотного — азотнокислий калій та хлорид амонію відповідно. На основі отриманих експериментальних даних підібрано склад живильних середовищ для вирощування досліджуваних грибів. Встановлено оптимальні умови культивування продуцентів: для *Penicillium* sp. 225 — температура 20 °С, об'єм живильного середовища 150 мл за швидкості перемішування 160 об/хв; для штаму *Aspergillus* sp. 8 TX — температура 28 °С, швидкість перемішування 220 об/хв, об'єм середовища — 150 мл. Використання 10% -го дводобового інокулюма під час культивування обох штамів упродовж 3 діб є оптимальним. За допомогою відповідних методів величину екзоінуліназної активності мікроміцетів підвищено майже у 10 разів.

Ключові слова: мікроскопічні гриби, інуліназна активність, живильне середовище, оптимізація умов культивування.

До чинників, які визначають рентабельність біотехнологічного виробництва, належить наявність конкурентоспроможних штамів мікроорганізмів — продуцентів біологічно активних речовин.

Мікроскопічні гриби продукують широкий спектр гідролітичних ензимів, до яких належить і 2,1-β-D-фруктозанфруктаногідролаза (інуліназа, КФ 3.2.1.7). Перспектива промислового використання інулінази базується на властивості цього ензиму здійснювати гідроліз інуліну з утворенням фруктози. Інуліназа має декілька галузей застосування: для одержання фруктозних сиропів, промислового отримання фруктози, як реактив для діагностики вмісту фруктози в продуктах споживання, а також у процесі виробництва молочної кислоти й етилового спирту тощо [1–6]. Тому пошук нових продуцентів інулінази та вивчення її властивостей, важливих для технологічного використання, є актуальним завданням.

Роботи з вивчення інуліназ проводять у Японії, Бразилії, Голландії, Угорщині, Да-

нії, Росії, Вірменії. Вітчизняні розробники аналогічних досліджень не проводять.

Здатність до синтезу інулінази характерна для мікроорганізмів різного таксономічного положення: бактерій, грибів та дріжджів [7–16]. Перевага використання мікроскопічних грибів як об'єктів нашого дослідження є цілком обґрунтованою, оскільки вони продукують екзоінуліназу, що є більш технологічно вигідним при виділенні ензиму у виробничих умовах порівняно з бактеріальною та дріжджовою ендоінуліназою [8, 9].

Раніше нами було проведено ступінчастий скринінг щодо здатності до синтезу інулінази серед 301 колекційної культури різних родів (39) та видів (106) мікроміцетів. У процесі скринінгу найактивнішими продуцентами виявилися представники родів *Aspergillus* та *Penicillium*. У результаті було селекціоновано два нових ефективних штамми: *Penicillium* sp. 225 (мезофільна культура) і *Aspergillus* sp. 8 TX (термотолерантна культура), які були здатні до підвищеного синтезу позаклітинної інулінази [17].

Метою цієї роботи стало розроблення складу живильного середовища для вирощування *Penicillium* sp. 225 та *Aspergillus* sp. 8 ТХ і оптимізація умов їх культивування для максимального біосинтезу інулінази.

Матеріали і методи

Об'єктами дослідження були штами грибів *Penicillium* sp. 225 та *Aspergillus* sp. 8 ТХ, відібрані з колекції культур відділу фізіології та систематики мікроміцетів Інституту мікробіології і вірусології НАН України.

Для визначення потреби в окремих компонентах живильного середовища під час культивування продуцентів використовували стандартне середовище Чапека, в якому змінювали джерела вуглецю, азоту та фосфору. Культури вирощували у глибинних умовах у колбах Ерленмеєра об'ємом 750 мл за температури 20–25 °С для *Penicillium* sp. 225 та 28–30 °С для *Aspergillus* sp. 8 ТХ.

Як джерела вуглецю в складі живильного середовища досліджували (у концентрації 0,8% із розрахунку на вуглець) моносахариди: арабінозу, ксилозу, глюкозу, галактозу, фруктозу, рамнозу; дисахариди: сахарозу, мальтозу, лактозу; полісахариди: крохмаль, інулін; багатоатомні спирти: гліцерол, інозит, маніт; рослинні субстрати: жмих топінамбура, подрібнений корінь цикорію [7–16].

Мінеральними джерелами азоту слугували нітрати натрію, калію та амонію, хлорид амонію, сульфат амонію; пептон та сечовина [7–16]. Джерела азоту вносили в концентрації 0,028% за вмістом азоту.

Як джерела фосфору вивчали різноманітні солі фосфорної кислоти за вмістом фосфору 0,023%: 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 ензиму штами *Penicillium* sp. 225 та *Aspergillus* sp. 8 ТХ вирощували у колбах Ерленмеєра об'ємом 750 мл з об'ємом живильного середовища 100, 150, 200 та 250 мл, за швидкості обертання качалки 160 і 220 об/хв і при температурі 20–25, 28–30 та 42 °С. До колби вносили посівний матеріал у кількості 1, 2, 5, 7, 10 і 15% до об'єму живильного середовища.

Інуліназну активність визначали за адаптованою нами методикою щодо мікроміцетів як об'єктів дослідження, заснованою на принципі відновлення редукувальних цукрів, з використанням 3,5-динітросаліци-

лової кислоти [18]. За одиницю інуліназної активності приймали таку кількість ензиму, що каталізує утворення 1 мкМ фруктози з інуліну за 1 хв у стандартних умовах ($t = 50$ °С, рН 4,6).

Інуліназну активність (A_I) рідких форм ензиму визначали за формулою:

$$A_I = \frac{K}{180TV} R, \text{ од/мл,}$$

де K — кількість моноцукрів, які утворилися під час ензиматичного гідролізу (визначається за калібрувальною кривою), мкг; T — час реакції, хв; V — об'єм проби ензиму, взятий для проведення реакції. У цій роботі $V = const = 0,02$ мл; R — розведення проби ензиму; 180 — маса 1 мкМ фруктози, мкг; $K/180$ — кількість мкМ фруктози, яка утворилася у результаті ензиматичного гідролізу інуліну.

На наведених графіках подано значення відносної інуліназної активності у відсотках від максимальної.

Протеїн визначали за методом Лоурі [19].

Результати та обговорення

Одним із головних чинників, що впливає на ріст мікроміцетів і біосинтез ними ензимів, є склад живильного 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 трикарбонових кислот, альдегідів тощо) [3]. З огляду на це важливим етапом дослідження для підвищення виходу позаклітинної інулінази стало відпрацювання складу живильних середовищ для вирощування *Penicillium* sp. 225 та *Aspergillus* sp. 8 ТХ і проведення оптимізації умов їх культивування.

Згідно з даними Жеребцова, максимальний біосинтез інулінази (8,78 од/мл) штамом *Bacillus polymyxa* 722 забезпечувався на середовищі, до складу якого входили: м'яса, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ та KH_2PO_4 [8].

Вивчаючи інуліназну активність у дріжджів *Kluuyveromyces marxianus*, дослідники Pessoa та Vitolo запропонували середовище такого складу: інулін, дріжджовий екстракт, ептон, сечовина та KH_2PO_4 [15]. Автори відзначають, що інулін як джерело вуглецю стимулює утворення інулінази порівняно

з глюкозою, фруктозою, сахарозою, лактозою, мальтозою та крохмалем. Активність інулінази при цьому становила 26 од./мл.

Відомо, що індуквані ензими є адаптованими і синтезуються у відповідь на наявність речовин, у перетворенні яких вони беруть участь. Індуктором інулінази можуть бути як інулін, так й інулінвмісні субстрати.

Маючи потужний enzymатичний апарат, мікроскопічні гриби, адаптуючись до середовища існування, використовують різноманітні джерела вуглецю. Серед цукрів особливо добре засвоюються гексози, зокрема глюкоза та фруктоза. Інтенсивно споживаються грибами також ди-, три- та полісахариди. Гетеротрофність грибів дає можливість використовувати їх для перероблення промислових відходів та органічних залишків, що накопичуються в біосфері [7].

Таким чином, підбираючи склад живильного середовища для культивування відібраних продуцентів інулінази, встановили, що залежно від штаму за наявності таких моносахаридів, як арабіноза, рамноза, глюкоза, ксилоза, галактоза, фруктоза та дисахаридів (лактоза і сахароза) показники інуліназної активності становили від 70 до 100%. Найнижчі показники відносної інуліназної активності зафіксовано на середовищах у присутності багатоатомних спиртів (маніт, інозит), а також мальтози та крохмалю. Значення активності інулінази у разі використання інуліну як індуктора досягало 40% відносної активності ензиму.

Найвищий рівень інуліназної активності у відібраних штамів зафіксовано на середовищах, де джерелом вуглецю слугували: для *Penicillium* sp. 225 — жмих топінамбура та арабіноза; для *Aspergillus* sp. 8 TX — подрібнений корінь цикорію та лактоза (рис. 1).

Економічно ефективнішим звичайно є використання дешевих природних комплексних джерел вуглецю (жмих топінамбура, подрібнений корінь цикорію).

Усі наступні експерименти проводили з використанням живильних середовищ, до складу яких входили топінамбур і цикорій (відповідно для *Penicillium* sp. 225 та *Aspergillus* sp. 8 TX).

Для оцінки оптимального відсотка індуктора використовували середовища з відсотковим вмістом топінамбура (для *Penicillium* sp. 225) та цикорію (для *Aspergillus* sp. 8 TX) від 0,5 до 7%.

Встановлено, що найвища індукція синтезу інулінази спостерігалась на середовищах з 2% джерела вуглецю. Концентрація індуктора більше 2% пригнічувала вихід інулінази (рис. 2).

Істотну роль у живленні грибів відіграють сполуки азоту. Більшість мікроскопічних грибів здатні до засвоєння нітратів та нітритів, а також змішаних джерел азоту [7].

Дані щодо впливу джерел азоту на інуліназну активність продуцентів ензиму *Penicillium* sp. 225 та *Aspergillus* sp. 8 TX наведено на рис. 3. Традиційним джерелом азоту для грибів обрано азотнокислий калій. Саме це джерело азоту сприяло найбільшому значенню інуліназної активності. Азотнокислий натрій може бути також застосований як джерело азоту для *Penicillium* sp. 225. Штам *Aspergillus* sp. 8 TX активніше використовував для синтезу інулінази такі джерела азоту, як сечовину, пептон і, особливо активно, — хлористий амоній. Компонентний склад живильних середовищ для досягнення максимального біосинтезу інулінази дослідженими грибами відрізнявся за джерелами як вуглецю, так і азоту.

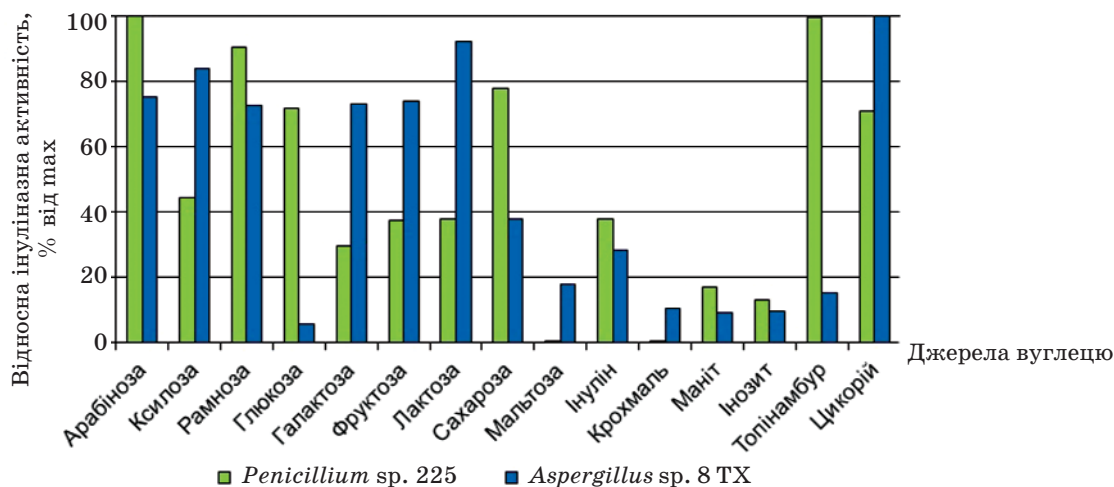


Рис. 1. Вплив різних джерел вуглецю на синтез інулінази *Penicillium* sp. 225 та *Aspergillus* sp. 8 TX

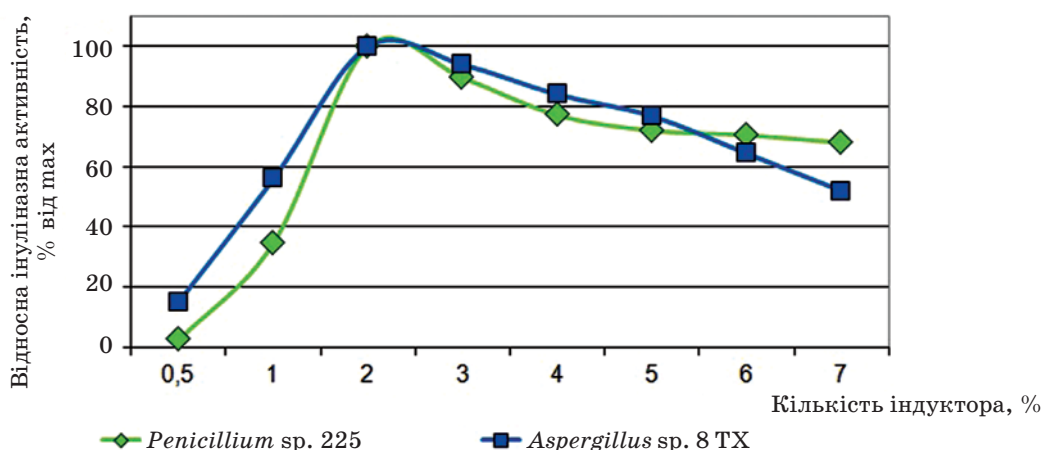


Рис. 2. Вплив кількості індуктора на синтез інулінази *Penicillium* sp. 225 та *Aspergillus* sp. 8 TX

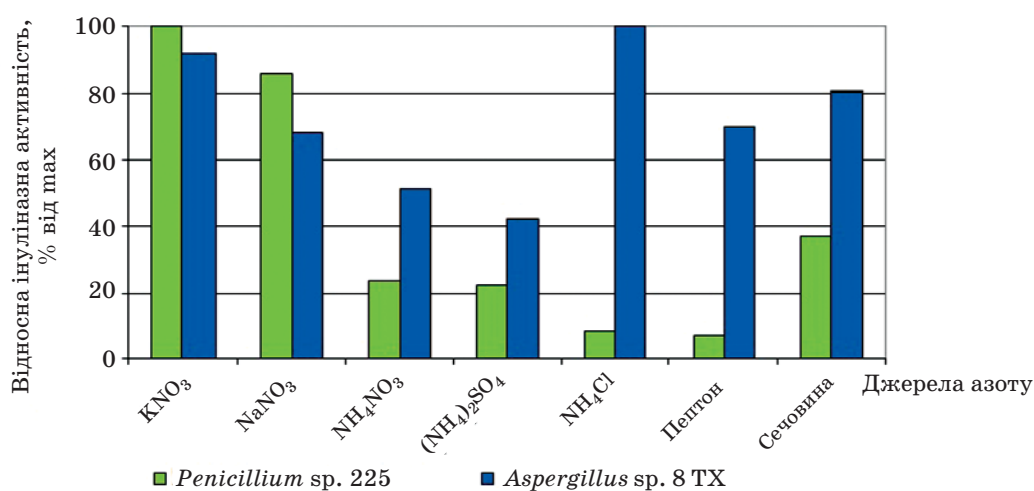


Рис. 3. Вплив різних джерел азоту на синтез інулінази культурами *Penicillium* sp. 225 та *Aspergillus* sp. 8 TX

Дослідження впливу різних фосфорвмісних солей на активність позаклітинної інулінази показало, що найвищу активність інулінази спостерігали на середовищі з однозаміщеним фосфорнокислим калієм. У цьому випадку KH_2PO_4 як джерело фосфатного живлення був оптимальним для обох штамів (рис. 4).

Отримані нами дані щодо складу живильних середовищ для культивування продуцентів інулінази узгоджуються з даними інших дослідників. Під час культивування гриба *A. niger* використовували середовище із сахарозою, дріжджовим екстрактом, мінеральними солями NaNO_3 та KH_2PO_4 . При цьому величина інуліназної активності становила 31,2 од/мл (метод з використанням 3,5-динітросаліцилової кислоти) [11]. За даними Onodera і Shiomі, у складі жи-

вільного середовища для вирощування *P. purpurogenum* були присутні інулін і мальтоза (джерела вуглецю) та солі KH_2PO_4 і $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ [13].

Встановлення оптимальних технологічних параметрів культивування продуцента, зокрема інтенсивності аерації та перемішування середовища за різних температур, є важливим етапом біотехнологічних досліджень. Вивчаючи вплив швидкості обертання і об'єму середовища на синтез інулінази, встановили, що максимальна інуліназна активність у культуральній рідині *Penicillium* sp. 225 спостерігалася за швидкості перемішування 160 об/хв, температури 20 °C і об'єму 150 мл. Для штаму *Aspergillus* sp. 8 TX оптимальними параметрами виявилися: швидкість перемішування 220 об/хв, температура 28 °C і об'єм середовища 150 мл (рис. 5–6).

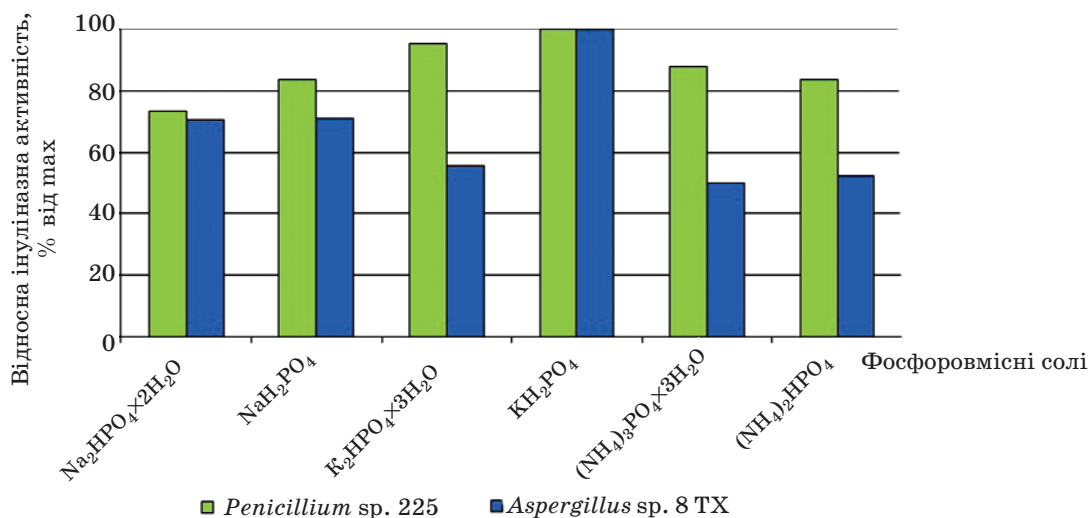


Рис. 4. Вплив різних фосфоровмісних солей на синтез інулінази культурами *Penicillium* sp. 225 та *Aspergillus* sp. 8 TX

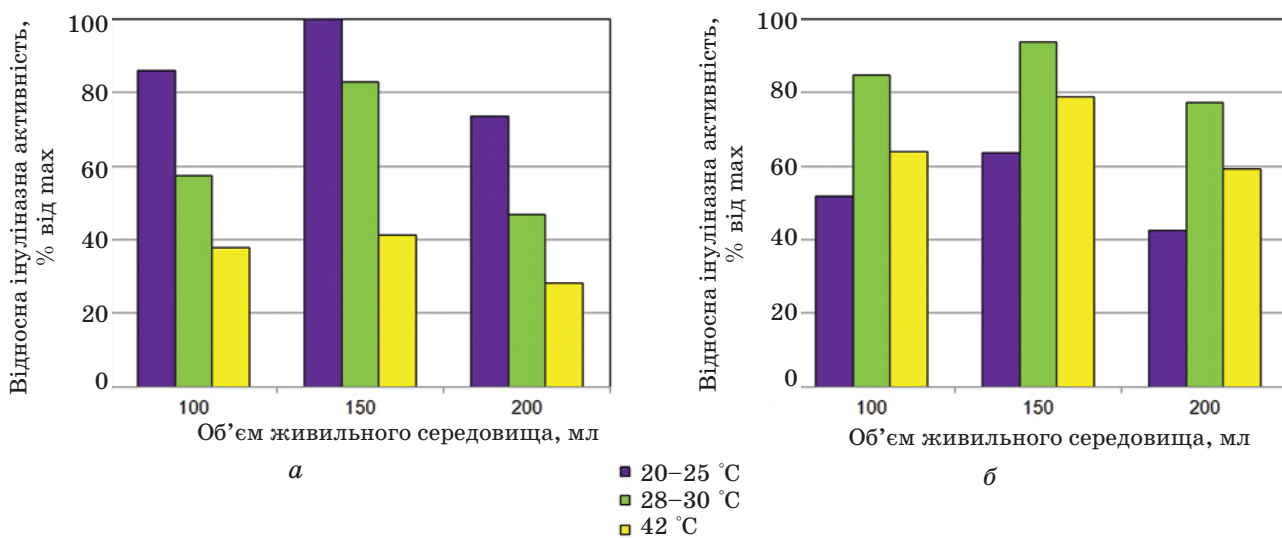


Рис. 5. Вплив температури та об'єму живильного середовища на біосинтез інулінази за швидкості перемішування 160 об/хв: а — *Penicillium* sp. 225; б — *Aspergillus* sp. 8 TX

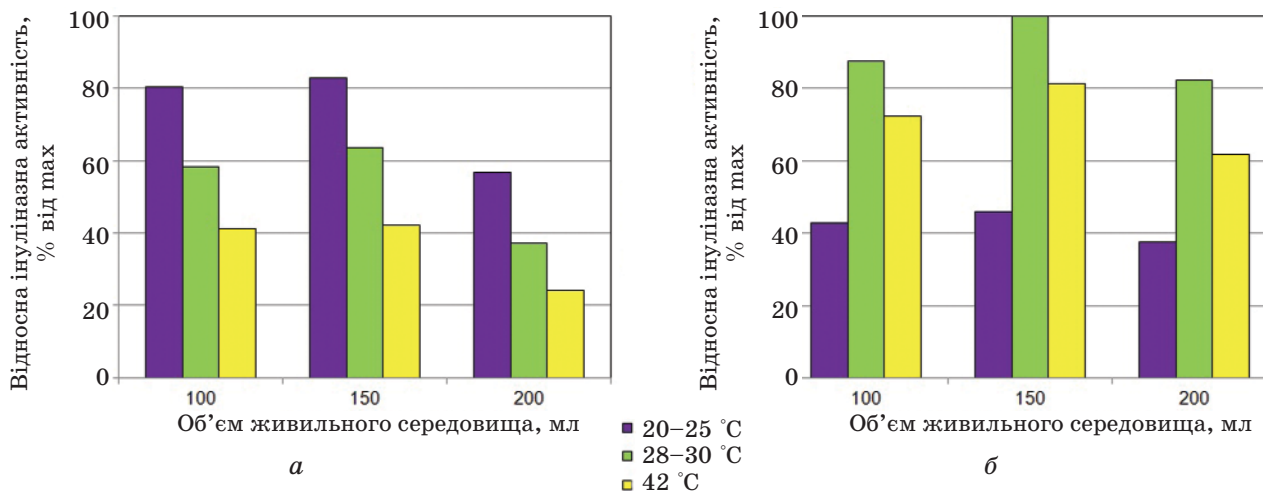


Рис. 6. Вплив температури та об'єму живильного середовища на біосинтез інулінази за швидкості перемішування 220 об/хв: а — *Penicillium* sp. 225; б — *Aspergillus* sp. 8 TX

Також нами підібрано оптимальну кількість посівного матеріалу для культивування селекціонованих штамів грибів (рис. 7). Встановлено, що найвищий рівень синтезу позаклітинної інулінази був при додаванні 10% інокулюма.

Не менш важливим параметром культивування є вік посівного матеріалу. У разі використання однодобового інокулюма час культивування досліджених мікроміцетів істотно не змінювався порівняно з часом, необхідним для ферментації без використання інокулюма. На відміну від однодобового, дводобовий інокулюм дає набагато кращі результати. Проведені нами дослідження показали, що використання посівного матеріалу у вигляді дводобового інокулюма скорочує час культивування продуцентів з п'яти днів до трьох (рис. 8).

Таким чином, використовуючи відповідні методи, нам вдалось підвищити величину екзоінуліназної активності мікроміцетів до 10 разів: для штаму *Penicillium* sp. 225 — з 3,23 од/мл до $27,7 \pm 0,02$ од/мл, для *Aspergillus* sp. 8 TX — з 2,14 од/мл до $22,4 \pm 0,03$ од/мл.

Унаслідок проведених експериментів підібрано склад живильних середовищ за джерелами вуглецю, азоту і фосфору та проведено оптимізацію умов культивування (температура, тривалість вирощування, відсоток інокулюма) відібраних мікроміцетів. Отримані вітчизняні високотехнологічні продуценти позаклітинної інулінази є конкурентоспроможними і мають значні перспективи використання у біотехнології.

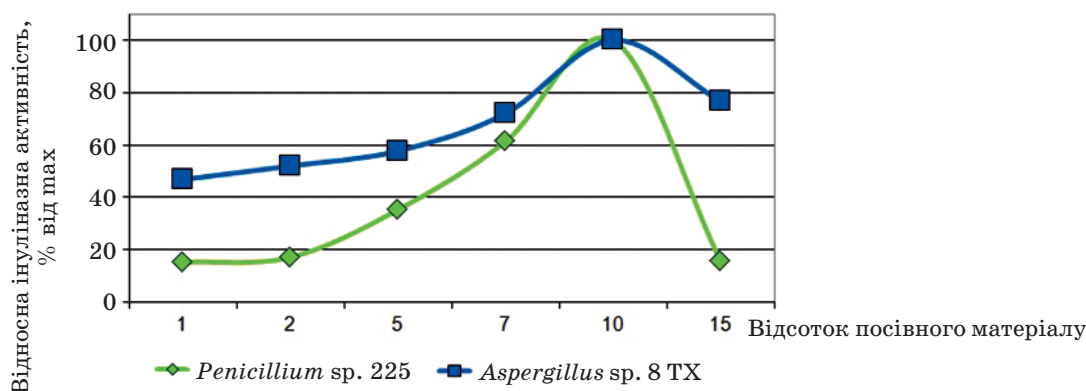


Рис. 7. Вплив різних концентрацій інокулюма на синтез інулінази культурами *Penicillium* sp. 225 та *Aspergillus* sp. 8 TX

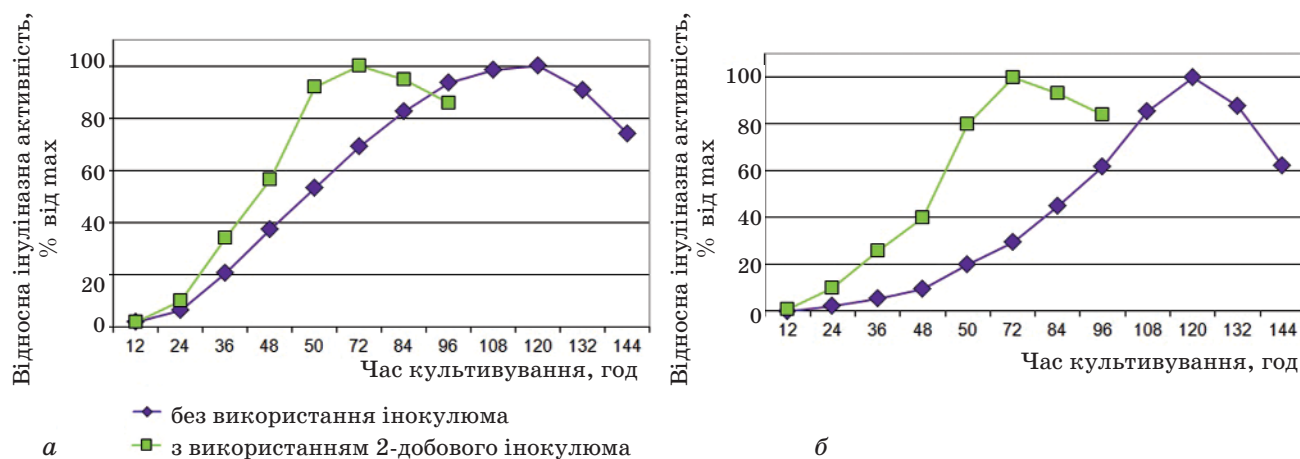


Рис. 8. Накопичення інулінази в динаміці: а — *Penicillium* sp. 225; б — *Aspergillus* sp. 8 TX

ЛИТЕРАТУРА

1. Szambelan K., Nowak J. Acid and enzymatic hydrolysis of *Jerusalem artichoke* (*Helianthus tuberosus* L.) tubers for further ethanol production // EJPAU. — 2006. — V. 9, N 4. — <http://www.ejpau.media.pl/volume9/issue4/art-38.html>.
2. Вагабов М. З., Керимова З. М., Мальцева Т. В., Корнеева О. С. Применение ферментных препаратов с целью ускоренного гидролиза инулина при производстве этилового спирта // Биотехнология. — 2005. — № 1. — С. 34–36.
3. Грачова И. М., Кривова А. Ю. Технология ферментных препаратов. — М.: Элевар, 2000. — 512 с.
4. Микробные ферменты и биотехнология / Под ред. В.М. Фогарти. — М: Агропромиздат, 1986. — 242 с.
5. Грушецкий Р. И. Разработка получения инулина из топинамбура. — К.: Вища школа, 1993. — 150 с.
6. Zittan L. Enzymatic hydrolysis of inulin — an alternative way to fructose production // Starch. — 1981. — V. 11. — P. 373–377.
7. Беккер З. Э. Физиология и биохимия грибов. — М.: Изд-во Моск. ун-та, 1988. — 230 с.
8. Жеребцов Н. А., Абрамова И. Н., Шеламова С. А. Выделение экстрацеллюлярной бактериальной инулиназы и изучение ее физико-химических свойств // Биотехнология. — 2002. — № 3. — С. 13–20.
9. Gill P. K., Manhas R. K., Singh J., Singh P. Purification and characterization of an exo-inulinase from *Aspergillus fumigatus* // Appl. Biochem. Biotechnol. — 2004. — V. 117, N 1. — P. 19–32.
10. Kulminskaya A. A., Arand M., Eneyskaya E. V., Ivanen D. R. Biochemical characterization of *Aspergillus awamori* exoinulinase: substrate binding characteristics and regioselectivity of hydrolysis // Biochim. Biophys. Acta. — 2003. — V. 1650, N 1–2. — P. 22–29.
11. Skowronek M., Fiedurek J. Optimisation of inulinase production by *Aspergillus niger* using simplex and classical method // Food Technol. Biotechnol. — 2004. — V. 42, N 3. — P. 141–146.
12. Rosemeire A. B., Pessoni, Marcia R. Braga, Rita de Cassia L. et al. Purification and properties of exo-inulinases from *Penicillium janczewskii* growing on distinct carbon sources // Mycologia. — 2007. — V. 99, N 4. — P. 493–503.
13. Onodera Sh., Shiomi N. Purification and Substrate Specificity of endo-Type Inulinase from *Penicillium purpurogenum* // Agric. Biol. Chem. — 1988. — V. 52, N 10. — P. 2569–2576.
14. Балаян А. М., Пивазян Л. А., Хачатурян Р. Н. и др. Инулиназы *Penicillium palitans* и *Penicillium cyclopium* 895 // Биотехнология. — 2001. — № 3. — С. 72.
15. Pessoa A., Vitolo M. Inulinase from *Kluyveromyces marxianus*: culture medium composition and enzyme extraction // Braz. J. Chem. Eng. — 1999. — V. 16, N 3. — P. 291–297.
16. Kalil S. J., Suzan R., Maugeri F., Rodrigues M. I. Optimization of Inulinase Production by *Kluyveromyces marxianus*. Using Factorial Design // Appl. Biochem. Biotechnol. — 2001. — V. 94. — P. 257–263.
17. Стойко В. И., Жданова Н. М., Айзенберг В. Л., Капічон Г. П. Скринінг мікроміцетів — продуцентів інулінази // Біотехнологія. — 2010. — Т. 3, № 2. — С. 48–55.
18. Айзенберг В. Л., Стойко В. И., Демиденок Е. А. и др. Методика количественного определения активности грибной инулиназы с использованием реактива Самнера // Биотехнология. — 2007. — № 5. — С. 95–96.
19. Lowry O. H., Rosebrough H. J., Faar A. L., Randal R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // J. Biol. Chem. — 1963. — V. 193, N 1. — P. 675–677.

**ОПТИМИЗАЦИЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ
Penicillium sp. 225 И *Aspergillus* sp. 8 TX —
ПРОДУЦЕНТОВ ВНЕКЛЕТОЧНОЙ
ИНУЛИНАЗЫ**

В. И. Стойко
Н. Н. Жданова
В. Л. Айзенберг
А. П. Капичон

Институт микробиологии и вирусологии
НАН Украины, Киев

E-mail: v_stoiko@mail.ru

Изучено влияние разных источников углеводов, азота и фосфора, температуры, интенсивности аэрации, продолжительности культивирования, процента посевного материала на биосинтез инулиназы микромицетами *Penicillium* sp. 225 и *Aspergillus* sp. 8 TX. Среди источников углеводного питания лучшими оказались жмых топинамбура и порошок цикория, азотного — азотнокислый калий и хлорид аммония соответственно. Установлены оптимальные условия культивирования продуцентов: для *Penicillium* sp. 225 — температура 20 °С, объем питательной среды 150 мл при скорости перемешивания 160 об/мин; для штамма *Aspergillus* sp. 8 TX — температура 28 °С, скорость перемешивания 220 об/мин, объем среды 150 мл. Использование 10%-го двухсуточного инокулюма при культивировании обоих штаммов на протяжении 3 сут оптимально. С помощью соответствующих методов инулиназная активность увеличена почти в 10 раз.

Ключевые слова: микроскопические грибы, инулиназная активность, оптимизация условий культивирования.

**OPTIMIZATION OF CULTIVATION
OF *Penicillium* sp. 225
AND *Aspergillus* sp. 8 TX
SYNTHESIZING EXOINULINAZE**

V. Stoiko
N. Zhdanova
V. Aisenberg
A. Kapichon

Institute of Microbiology and Virology of
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv

E-mail: v_stoiko@mail.ru

The influence of different sources of carbon, nitrogen and phosphorus, temperature, intensity of airing, time of culturing, percent of material of sowing on the biosynthesis of exoinulinase of *Penicillium* sp. 225 and *Aspergillus* sp. 8 TX has been investigated. Among carbon sources the best one were found to be the grind roots of American artichoke and chicory, and among nitrogen sources — potassium nitrate and ammonium chloride, respectively. On the basis of the experimental findings neat composition of nutrient medium was estimated for growing of the selected fungi. The following optimal conditions of culturing of exoinulinase fungi producers were established for *Penicillium* sp. 225: temperature — 20 °С, volume of a nutrient medium — 150 ml, rotation rate — 160 rpm; for *Aspergillus* sp. 8 TX: temperature — 28 °С, rotation rate — 220 rpm, volume of a nutrient medium — 150 ml. Use of 10% two-day inoculum at cultivation of both cultures during 3 days was shown to be optimal. Activity of exoinulinase of micromicetes was increased almost 10-fold via use of the proper methods.

Key words: microscopic fungi, inulinase activity, nutrient medium, optimization of cultivation conditions.