

УДК 612. 398:577.121.3



**СКРИНІНГ ШТАМІВ МІКРООРГАНІЗМІВ ЗА
ПРОДУКТИВНІСТЮ ТА ЕФЕКТИВНІСТЮ ПРОЦЕСІВ
БІОКОНВЕРСІЇ ЛІГНОЦЕЛЮЛОЗНОЇ СИРОВИНИ**

Н. Є. БЕЙКО, науковий співробітник,

С. І. ПРИЙОМОВ, доктор технічних наук, провідний науковий
співробітник,

О. О. ТІГУНОВА, провідний інженер

ДУ «Інститут харчової біотехнології і геноміки НАН України»

E-mail: innagoriunova@yandex.ua

***Анотація.** Завданням роботи було проведення порівняння ступеня біоконверсії різних лігноцелюлозних субстратів мікроорганізмами. В результаті проведених досліджень було відібрано дві культури *Pichia apotala* K-1 і *Aspergillus awamori* sp з «Колекції штамів мікроорганізмів та ліній рослин для харчової і сільськогосподарської біотехнології» ДУ «Інститут харчової біотехнології і геноміки НАН України». Встановлено, що біоконверсія целюлозовмісної сировини є регульованим процесом і залежить не тільки від фізіологічних особливостей продуцентів, але й від попередньої обробки сировини.*

***Ключові слова:** лігноцелюлозна сировина, біоконверсія, штами-продуценти*

В умовах економічної кризи паливні концерни проводять інтенсивний пошук нових поновлювальних джерел енергії та можливості використання відходів сільського господарства [2].

Найбільш перспективною та доступною заміною сировини харчового призначення для отримання вторинних метаболітів біосинтезу є лігноцелюлоза – відходи, що утворюються під час переробки залишків рослин. Біоконверсія лігноцелюлозних відходів може сприяти подоланню багатьох економічних і екологічних проблем та створенню підґрунтя для організації нових і удосконалення вже існуючих біотехнологій [3].

В сухій рослинній біомасі знаходиться близько 50 % целюлози. Це найпоширеніший біополімер, який є цінним джерелом вуглецю та енергії [4]. Складність використання целюлози полягає в тому, що в природному стані



вона знаходиться в складі нерозчинного комплексу з геміцелюлозамі лігніном. Крім того, окремі молекули целюлози орієнтуються одна відносно одної подібно кристалам за рахунок утворення водневих зв'язків, що перешкоджає дії гідролітичних агентів [5, 6].

Мета дослідження – здійснити скринінг штамів мікроорганізмів, визначити рівень біоконверсії лігноцелюлозного субстрату в моноцукри та оцінити ефективність їх застосування.

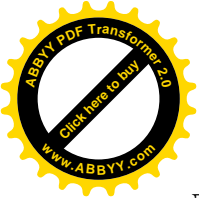
Матеріали та методи досліджень. Об'єкти досліджень: мікроорганізми – *A. niger sp.*, *A. niger 4*, *A. orizae 49-Б*, *A. awamori 9*, *Tremela sp.*, *Endomycopsis sp.*, *Rhizopus-BHP-179*, *Penicillium sp.*, *Pichia K-1*, *B. subtilis MK-1* із «Колекції штамів мікроорганізмів та ліній рослин для харчової і сільськогосподарської біотехнології» ДУ «Інститут харчової біотехнології і геноміки НАН України».

Бактеріальні культури зберігали на м'ясо-пептонному агарі (м'ясо-пептонний бульйон із 2 % агару), дріжджові та грибні культури на сусло – агарі (солодове сусло з 2 % агару).

Бактерії вирощували на штрихових пластинах із середовищем МПА (склад: на 100 мл МПБ – 0,1 г глюкози; 0,25 г дріжджового екстракту). Інокуляцію продуцентів проводили на рідкому середовищі – збагаченому МПБ (склад: на 100 мл МПБ – 0,1 г глюкози; 0,25 г дріжджового екстракту) [1].

Культивування бактерій проводили на збагаченому м'ясо-пептонному агарі (склад: м'ясо-пептонний бульйон – 0,1 л; глюкоза – 0,1 г; дріжджовий екстракт – 0,25г; агар – 2%). Для культивування грибів використовували середовище наступного складу (%): цукрози – 2,0; NaNO_3 -0,9; KH_2PO_4 – 0,1; KCl – 0,05; MgSO_4 – 0,05; FeSO_4 – 0,001; крохмаль – 1,0. Дріжджі культивували на солодовому суслі з концентрацією сухих речовин 8 %. Культивування проводили на шейкері за температури від 28 °С до 32 °С протягом доби.

Вирощування мікроорганізмів проводили в колбах Ерленмейера місткістю 250 мл, в які задавали по 50 мл середовища наступного складу (г/л): подрібнених стеблин дроговидного проса – 60,0; ДАФ – 2,0; дріжджового екстракту – 0,5.



Інокуляцію проводили суспензією, що містила 1,1 млрд. кл. дводобової культури, попередньо вирощеної на агаризованому середовищі, з розрахунку 15 млн. на 1 мл середовища. Посівний матеріал задавали в кількості 10 % від об'єму середовища.

Для визначення активності росту відібраних мікроорганізмів на середовищі, де в якості джерела вуглецю була целюлоза, використовували ензиматичне середовище наступного складу, %: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,5; K_2HPO_4 -0,5; MgSO_4 -0,05; ДЕ -0,1; целюлоза -2,0.

Культивування мікроорганізмів проводили в шейкері «BIOSAN» ES – 20 (Латвія) з 240 об/хв протягом чотирьох діб.

Інтенсивність росту визначали за синтезом біомаси після трьохдобової інкубації за температури від 28 °С до 32 °С. Кількість накопиченої біомаси визначали ваговим методом.

Скринінг активних культур проводили в два етапи. Перший етап полягав в прямому відборі активних культур різних видів мікроорганізмів за інтенсивністю росту на лігніноцелюлозному середовищі. Другий етап – визначення активності біоконверсії лігноцелюлозної сировини в умовах ферментації на оптимізованому ензиматичному середовищі.

Гідроліз сухої маси проса проводили обробленням кислотою (H_2SO_4) низької концентрації (2 %) за температури 137 °С протягом 2 годин.

Визначення концентрації цукрів у середовищі і культуральній рідині проводили антроновим методом [1].

Усі досліди проводили у 3 повторюваності.

Статистична обробка експериментальних даних була зроблена за допомогою програми Microsoft Excel. Різницю між двома середніми величинами вважали достовірною при $p < 0,05$.

Результати дослідження та їх обговорення. Результати першого етапу скринінгу активних культур прямим відбором представлені в таблиці 1 (посів на поверхню агаризованого середовища в чашки Петрі) і таблиці 2 (ферментація рідкого лігноцелюлозного середовища).



1. Ріст мікроорганізмів на агаризованому лігноцелюлозному середовищі

Зразки	Інтенсивність росту
<i>A. niger sp.</i>	++*
<i>A. niger 4</i>	+++*
<i>A. oryzae_49-Б</i>	++
<i>Asp. awamori sp</i>	+++
<i>Tremela sp</i>	++
<i>Endomycopsis sp</i>	+*
<i>Rhizopus BHP-179</i>	+++
<i>Penicillium sp</i>	+++
<i>Pichia anomala K-1</i>	+++
<i>Bac. subtilis МК-1</i>	+
Контроль	-

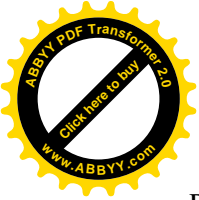
Примітка: +, ++, +++ - інтенсивність росту

Найбільшу інтенсивність росту на агаризованому середовищі із дротовидного проса мали культури: *A. niger 4*, *A. awamor sp*, *Rhizopus BHP-179*, *Penicillium sp*, *P. anomala K-1*. Інтенсивність росту відповідала і кількості накопиченої біомаси (табл. 2) за умов ферментації на рідкому середовищі із біомасою дротовидного проса.

2. Технологічні показники ферментації лігноцелюлозної сировини

Мікроорганізми	pH, од.	СР, %	Концентрація біомаси, г/л
<i>A. niger sp.</i>	7,5	4,0	8,7
<i>A. niger 4</i>	7,7	3,5	9,06
<i>A. oryzae49-Б</i>	6,4	3,2	8,15
<i>A. awamori sp.</i>	7,8	3,5	9,02
<i>Tremela sp</i>	7,4	3,5	7,95
<i>Endomycopsis sp</i>	4,74	3,5	7,8
<i>Rhizopus BHP-179</i>	7,6	4,0	9,0
<i>Penicillium sp</i>	7,6	4,0	9,4
<i>Pichia anomala K-1</i>	7,98	3,0	12,0
<i>B. subtilis МК-1</i>	6,5	3,0	7,9

Перший етап скринінгу показав, що для культур з найбільшою інтенсивністю росту спостерігалась варіабельність концентрації біомаси від 7,8 до 12 г/л.



Для подальшої роботи за результатами першого етапу скринінгу відібрано штами мікроорганізмів з найбільшим рівнем накопиченої біомаси: *P. anomala* K- 1, *Penicillium* sp, *Rhizopus* BHP-179, *A. niger* 4, *A. awamori* 9. Було проведено ферментацію збагаченого ензиматичного середовища вибраними штамами мікроорганізмів. Технологічні показники ферментації представлені в таблиці 3.

3. Технологічні показники ферментації відібраними штамами

Мікроорганізми	pH	CP	Концентрація біомаси, г/л
<i>Pichia anomala</i> K- 1	3,6	2,4	16,8
<i>A. awamori</i> 9	3,6	1,9	16,3
<i>A. niger</i> 4	3,6	2,13	11,5
<i>Rhizopus</i> BHP-179	3,5	2,6	12,0
<i>Penicillium</i> sp.	3,5	2,0	10,6

В результаті скринінгу за накопиченням біомаси для подальших досліджень відібрано штами мікроорганізмів: *P. anomala* K-1 та *A. awamori* 9.

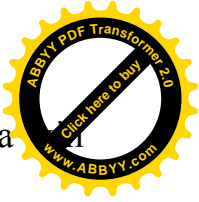
Оскільки, основним структурним компонентом сухої рослинної маси є целюлоза, то було проведено ферментацію синтетичного середовища з додаванням целюлози як джерела вуглецю. Технологічні параметри ферментації представлені в таблиці 4.

4. Ферментація целюлози відібраними штамами мікроорганізмів

Штами мікроорганізмів	pH	Сухі речовини, %	Біомаса, г/л
<i>Pichia anomala</i> K-1	4,2	1,8	28,3
<i>A. awamori</i> sp.	5,5	2,9	26,5

За результатами дослідження найбільший показник накопичення біомаси був у *P. anomala* K-1 (28,3 г/л) в порівнянні з *A. awamori* sp. (26,5 г/л). Це частково можна пояснити більш глибоким розщепленням целюлози штамом *P. anomala* K-1 та утворенням додаткової кількості цукрів, які далі споживаються культурою.

Слід відмітити, що важливим фактором, який впливав на ферментацію, була підготовка субстрату. Підготовка субстрату включала етап подрібнення сировини, оскільки якість і рівномірність помелу обумовлюють температурний



режим водно-теплової обробки сировини і ступінь втрат вуглеводів на стадії.

Було досліджено вплив ступеню подрібнення сировини на вміст цукрів та накопичення біомаси (рис. 1).

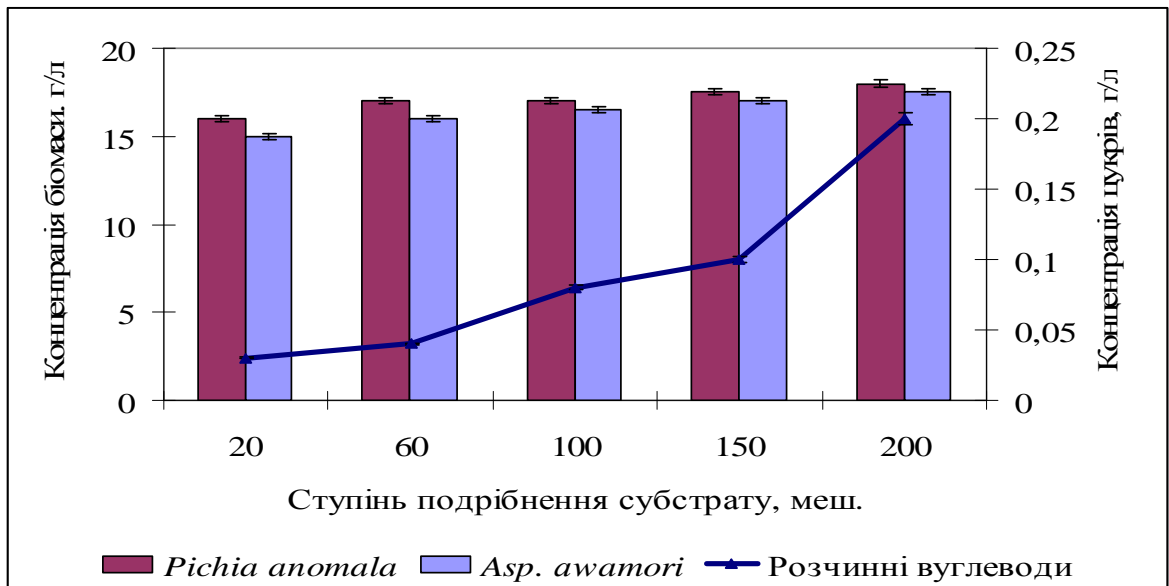


Рис. 1. Залежність концентрації біомаси відібраних мікроорганізмів від ступеня подрібнення субстрату

Дослідження показали, що зі збільшенням ступеня подрібнення біомаси дроговидного проса до 200 меш синтез біомаси збільшувався, а з подальшим подрібненням практично не змінювався. Це пояснюється тим, що за збільшення ступеня диспергування сировини настає більш глибоке розщеплення целюлози (до певного рівня) та утворюється додаткова кількість вуглеводів.

Було проведено дослідження впливу концентрації подрібненої біомаси дроговидного проса в середовищі на синтез біомаси. Результати представлені на рис. 2.

Показано, що оптимальна концентрація субстрату у середовищі склала 60 г/л. Слід відмітити, що зростання концентрації субстрату призводило до зменшення кількості накопиченої біомаси мікроорганізмів. Підвищення вмісту сухих речовин в середовищі пригнічувало життєдіяльність продуцентів.

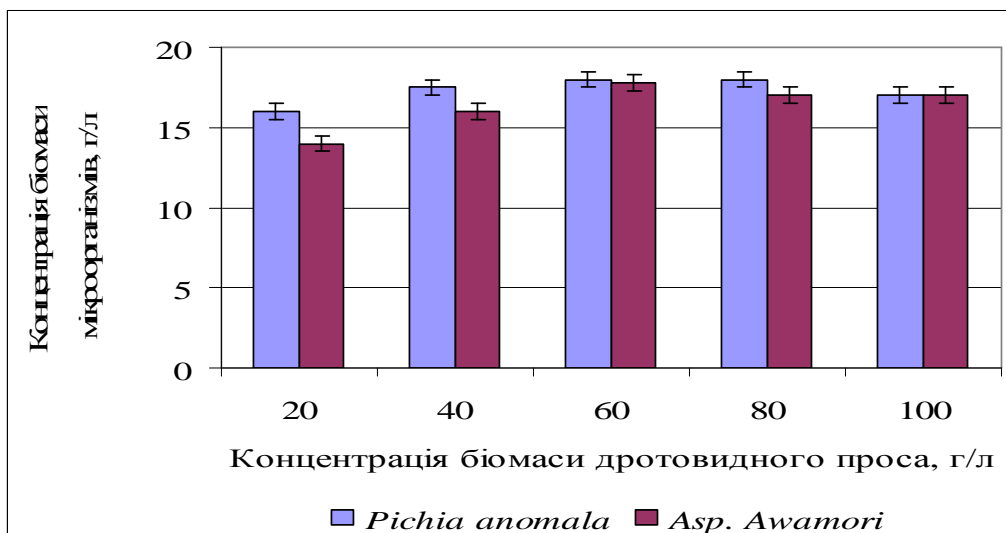


Рис. 2. Залежність біомаси мікроорганізмів від концентрації субстрату

Враховуючи такі чинники як ступінь подрібнення і вміст сухих речовин, проведено відпрацювання температурного режиму водно-теплової обробки сировини – подрібненої біомаси проса. Результати представлені на рис 3.

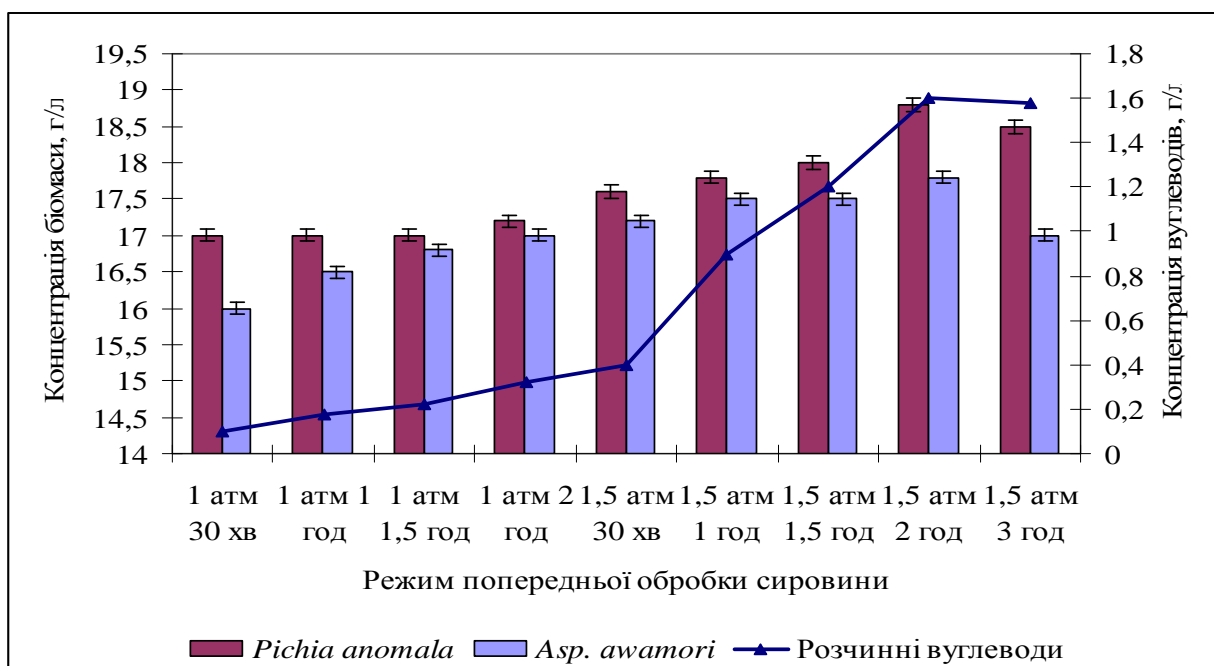
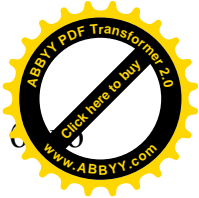
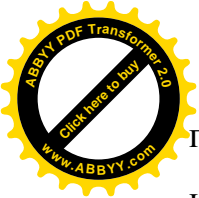


Рис. 3. Залежність концентрації біомаси мікроорганізмів від режиму водно-теплової обробки сировини

В результаті дослідження було показано, що найбільшу концентрацію біомаси накопичували культури *P. anomala* К-1 (18,8 г/л) і *A. awamori* 9 (17,8 г/л) за використання попередньо обробленої сировини за 1,5 атм (127 ± 1 °C)



протягом 2 год (рис. 3). Подальше збільшення часу обробки сировини недоцільним, оскільки кількість накопиченої біомаси зменшувалась.

Стадія попередньої підготовки сировини має багато варіантів. Одним із них є органозольна підготовка сировини з використанням розбавлених кислот. Було проведено ферментацію з використанням кислотних гідролізатів біомаси дротовидного проса. Технологічні показники ферментації гідролізованої сухої біомаси дротовидного проса представлені в таблиці 5.

5. Вплив кислотного гідролізу сировини на технологічні показники культивування

Технологічні показники		Штами мікроорганізмів	
		<i>Pichia anomala K-1</i>	<i>A. awamori sp.</i>
До гідролізу	Вміст розчинних цукрів	1,62	1,62
	pH	4	4
	Сухі речовини	2,5	2,8
	Біомаса	18,8	17,8
Після гідролізу	Вміст розчинних цукрів	2,65	2,65
	pH	3,5	3,5
	Сухі речовини	2,3	2,4
	Біомаса	24,9	23,0

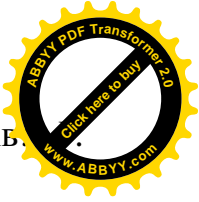
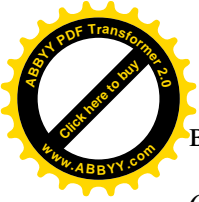
Наступним етапом було проведення культивування з використанням штамів мікроорганізмів, відібраних в результаті другого етапу скринінгу на ензиматичному середовищі з урахуванням ступеня подрібнення стеблин, концентрації сухих речовин в середовищі і режиму водно-теплової обробки. Технологічні показники ферментації представлені в таблиці 6.

6. Технологічні показники культивування на лігноцелюлозній сировині відібраними штамми мікроорганізмів

Штами мікроорганізмів	pH	Сухі речовини	Біомаса
<i>Pichia anomala K-1</i>	3,5	2,3	24,9
<i>A. awamori sp.</i>	3,5	2,4	23,5

Висновки

Проведено скринінг культур з Колекції за активністю біоконверсії лігноцелюлозної сировини і їх продуктивністю. В результаті скринінгу



відібрано найбільш перспективні і продуктивні штами мікроорганізмів *anomala* K-1 і *A. awamori* sp.

Встановлено основні технологічні параметри стадії підготовки лігноцелюлозної сировини: ступінь подрібнення (200 меш), водно-теплову обробку (тиск 1,5 атм. протягом 2 год.) та кислотний гідроліз біомаси проса (H₂SO₄ концентрацією 2 %). Оптимальною концентрацією субстрату було 60 г/л.

Таким чином, під час культивування за оптимальних умов концентрація біомаси *Pichia anomala* K-1 становила 24,9 г/л, а концентрація біомаси *A. awamori* sp. – 23,5 г/л.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Оленников Д. Н. Методика количественного определения группового состава углеводного комплекса растительных объектов / Д. Н. Оленников, Л. М. Танхаева // Химия растительного сырья. – 2006. - № 4. – С. 29-32.
2. Скрининг культур грибов, дрожжей и бактерий для биоконверсии лигноцеллюлозного сырья в моносахара. / [Тигунова Е. А., Хоменко А. И., Ткаченко А. Ф. и др.] // Материалы конференции «Актуальные проблемы биоэкологии», 23-25 октября 2014г., –Минск. – С. 23.
3. Шульга С. М. Лігноцелюлоза як альтернативна сировина для одержання біобутанолу / С. М. Шульга, О. О. Тигунова, Я. Б. Блюм // BiotechnologiaActa. – 2013. – Том 6. – №2. – С. 9-21.
4. Arora R., Manisseri C., et.al. Monitoring and Analyzing Process Streams Towards Understanding Ionic Liquid Pretreatment of Switchgrass (*Panicum virgatum* L.) // Bioenerg. Res. – 2010. – v. 3. – P.134-145.
5. Li C., Knierim B., et.al. Comparison of dilute acid and ionic liquid pretreatment of switchgrass: biomass recalcitrance, delignification and enzymatic saccharification // Bioresour. Technol. – 2010. – v. 101. – P. 4900 - 4906.



6. Shen H., Poovaiah R. C., Ragauskas A. J. Enhanced characteristics of genetically modified switchgrass (*Panicum virgatum* L.) for high biofuel production// *Biotechnology for Biofuels*. – 2013. – 6(71). – P.1-15

СКРИНИНГ ШТАММОВ МИКРООРГАНИЗМОВ ПО ПРОДУКТИВНОСТИ И ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОЦЕССОВ БИОКОНВЕРСИИ ЛИГНОЦЕЛЛЮЛОЗНОГО СЫРЬЯ

Н. Е. Бейко, С. И. Приёмов, Е. А. Тигунова

Аннотация. Задачей данной работы было провести сравнение биоконверсионных способностей микроорганизмов на лигноцеллюлозном сырье. В результате проведенных исследований было отобрано две культуры *Pichia anomala* K-1 и *Asp. awamori* sp. из «Коллекции штаммов микроорганизмов и линий растений для пищевой и сельскохозяйственной биотехнологии» ГУ «Института пищевой биотехнологии и геномики» НАН Украины. Показано, что биоконверсия целлюлозосодержащего сырья представляет собой регулируемый процесс и зависит не только от физиологических особенностей продуцентов, но и от предварительной обработки сырья.

Ключевые слова: лигноцеллюлозное сырье, биоконверсия, штаммы-продуценты

SCREENING OF MICROBIAL STRAINS ON EFFICIENCY AND EFFECTIVENESS IN THE BIOCONVERSION OF LIGNOCELLULOSIC FEEDSTOCKS

N. E. Beyko, S. I. Priyomov, O. O. Tiginova

Abstract. The task of this study was to compare the bioconversion abilities of microorganisms in the lignocellulosic feedstock. As a result of the survey were selected two cultures *Pichia anomala* K-1 and *Asp. awamori* sp. from the "Collections of microbial strains and lines of plants for food and agricultural biotechnology" SI "Institute of Food Biotechnology and Genomics" of NAS of Ukraine. It is shown that the bioconversion of cellulosic raw materials is regulated process, and depends not only on the physiological characteristics of producers, but also on the pretreatment material.

Key words: lignocellulosic feedstock, bioconversion, producing strain