

РГП «Институт микробиологии и вирусологии» КН МОН РК, г.Алматы

**БИОСИНТЕЗ ФЕРМЕНТОВ ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ
МИЦЕЛИАЛЬНЫМИ МИКРООРГАНИЗМАМИ.****Аннотация**

На биосинтез ферментов микроорганизмами влияют не только активность продуцента и условия направленного их синтеза, но и оптимальный способ их культивирования. При традиционном глубинном культивировании апикальный рост мицелиальных микроорганизмов обуславливает образование пеллетов, труднодоступных питательным веществам среды и кислороду, которые в ограниченном объеме питательной среды со временем теряют свою физиологическую активность. Оптимальный доступ питательных веществ к культуре осуществляется при линейном выращивании гиф поверхностным методом культивирования, при котором биосинтетическая способность культур низкая. Нами разработан эффективный метод длительного культивирования микроорганизмов, сочетающий поверхностный линейный рост гиф на носителе в иммобилизованном состоянии с активным глубинным культивированием продуцентов ферментов.

Ключевые слова: пеллеты, мицелиальные микроорганизмы

Для максимального использования биосинтетического потенциала микроорганизмов-продуцентов ферментов важно выращивать их не только в условиях направленного синтеза целевых продуктов, но и оптимальным способом их культивирования. Известно, что лучшие условия для образования гидролитических ферментов создаются в глубинной культуре, т.к. для биосинтеза ферментов большое значение имеет аэрация питательной среды.

Периодический глубинный процесс культивирования характеризуется ростом микроорганизмов в ограниченном объеме питательной среды без возможности ее замены, что приводит к падению физиологической активности культуры. Кроме того при глубинном культивировании мицелиальных микроорганизмов в силу их апикального характера роста биомасса их растет в виде пеллетов трудно доступных питательным веществам и кислороду, что приводило к падению синтетической активности культуры микроорганизмов.

Необходимо было разработать оптимальный метод культивирования мицелиальных микроорганизмов, который бы сочетал выращивание культуры поверхностным методом на носителе в глубинных условиях роста.

Цель: Разработать эффективный метод глубинного культивирования для мицелиальных микроорганизмов-продуцентов ферментов, в котором гифы продуцентов не закручивались бы в пеллеты, а росли в виде пленки иммобилизованной на носителе, в которой клеткам были бы легко доступны питательные вещества среды и кислород.

Материалы и методы**Микроорганизмы**

Продуцентами пектиназы *Aspergillus awamori* 16; α -амилазы - *Asp.oryzae* 3-9-15. Все культуры поддерживались на агаровых косяках со средой Чапека. Посевным материалом служили суспензия спор 5-7 дневной культуры разбавленная в стерильной дистиллированной воде при концентрации спор $1,3 \times 10^7$ клеток/мл.

Среды

Среда Чапека: NaNO_3 – 0,15 г; сахароза – 2,0 г; KH_2PO_4 – 0,1 г; MgSO_4 – 0,05 г; KCl – 0,05 г; FeSO_4 – 0,001 г на 1 литр.

Среда для *Aspergillus awamori* 16: глюкоза – 2 г; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 7,0 г; MgSO_4 – 0,05 г; KCl – 0,05 г; KH_2PO_4 – 0,1 г; FeSO_4 – 0,001 г на 100 мл.

Среда для *Aspergillus oryzae* 3-9-15: сахароза – 2 г; NaNO_3 – 5,0 г; KH_2PO_4 – 0,1 г; MgSO_4 – 0,05 г; KCl – 0,05 г; FeSO_4 – 0,001 г на 100 мл.

Образование ферментов

Для образования ферментов использовали колбы Эрленмейера на 750 мл со 100 мл питательной среды, которую засеивали суспензией спор в количестве 2 мл 5-7 дневной культуры, выращенной в пробирках на скошенной питательной среде Чапека. Культивировали на качалке (280 об/мин при 28⁰С), в течение длительного времени с заменой питательной среды через каждые 3 суток и в последующие дни через 1-2 суток.

Определение ферментативной активности.

Активность α -амилазы определяли двумя методами: по способности фермента производить гидролиз крахмала до конечных декстринов, не опрашивающихся йодом (в единицах АС) и по осахаривающей способности (в единицах ОС).

Определение пектолитической активности (ПКА) проводили по количеству нерасщепленного пектина до и после воздействия на него пектинрасщепляющих ферментов (ПГ и ПЛ). ПГ активность определяли также по редуцирующим веществам методом Шомадьи-Нельсона, основанного на падении вязкости пектиновых растворов в вискозиметре Оствальда. Количественное определение пектина основано на получении медной соли пектиновой кислоты.

Результаты и обсуждения

Изучение роста мицелиальных микроорганизмов и образование ими гидролитических ферментов тесным образом связано с методом их культивирования. При обычном глубинном культивировании свободных клеток микромицетов апикальный характер их роста обуславливает образование массы мицелия, растущей в виде шариков (пеллетов) или хлопьевидной массы. Форма мицелия, образующаяся в процессе глубинного культивирования, прямым образом влияет на продуктивность культуры.

Поскольку метоболические реакции зависят от концентрации питательных веществ, то клетки, находящиеся на поверхности мицелиальных шариков, имеют максимальный доступ к питательным веществам. Поэтому наиболее продолжительное время максимальный доступ к питательным веществам имеют клетки мицелия, растущие в виде пленки. Пленка в условиях глубинного культивирования превращается в нитчатогубчатую структуру, в которой гифы мицелия растут линейно без скручивания их в пеллеты и хорошо доступны питательным веществам и кислороду. Для образования пленки созданы условия адсорбции посевного материала на поверхности монолитной подложки с большой адсорбционной поверхностью, на которой культура закреплялась и линейно росла вдоль ее поверхности длительное время. В условиях аэрации и механического перемешивания на качалке образуется непрерывно растущая нитчатогубчатая структура, которая длительное время продуцирует ферменты.

В наших исследованиях продуцентами ферментов были выбраны микромицеты из рода *Aspergillus* – *Asp. awamori* 16 и *Asp. oryzae* 3-9-15 – продуценты пектиназы и α -амилазы. Сравнительное изучение образования пектинрасщепляющих ферментов (ПР) и α -амилазы – свободными (СК) и иммобилизованными клетками (ИК) показало, что при иммобилизации нитчатогубчатой культуры биосинтез ферментов происходит активно и достаточно длительное время (рисунок 1). Увеличивается стационарная фаза образования ферментов в 2,5-3 раза.

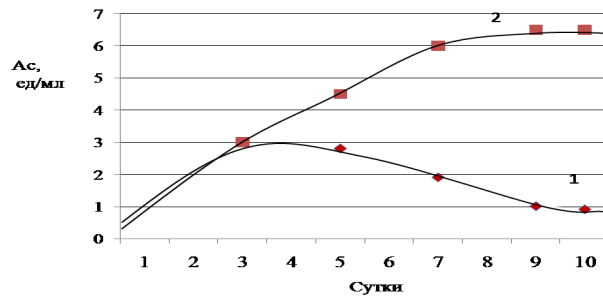


Рисунок 1 – Динамика образования α -амилазы разными структурами мицелия *Asp.oryzae* 3-9-15. 1- массой клеток растущей пеллетами; 2- нитчато-губчатым иммобилизованным мицелием.

Свободные клетки *Asp.oryzae* 3-9-15 – продуцента α -амилазы и *Asp.awamori* 16 – продуцента пектинрасщепляющих ферментов в периодических условиях культивирования имеют ограниченный цикл развития, они образуют максимум ферментов на 3 сутки (рисунок 2-3).

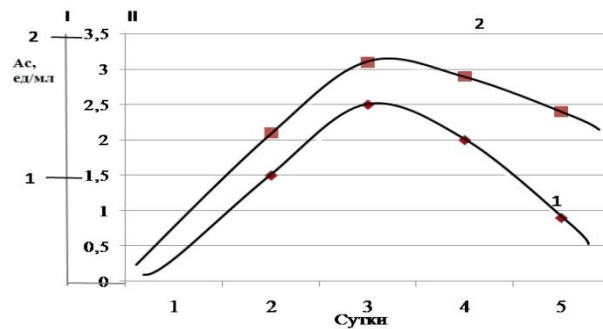


Рисунок 2 – Динамика образования α -амилазы периодической культуры *Asp.oryzae* 3-9-15. I, 1 – биомасса, г; II, 2 – активность α -амилазы, ед/мл.

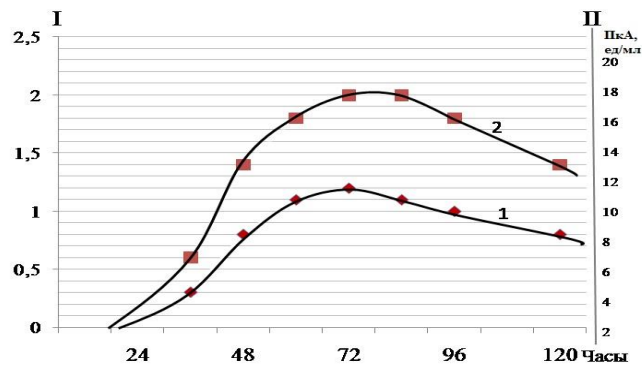


Рисунок 3 – Динамика образования ПР ферментов периодической культурой *A.awamori* 16. I, 1 – масса сухого мицелия, г; II, 2 – ПкА, ед/мл

При последующем культивировании СК происходит автолиз клеток, который приводит к постепенному падению ферментативной активности культуральной жидкости.

Таким образом, при традиционном периодическом методе культивирования выращивание микромицетов продолжали 3-4 суток, затем процесс останавливали из-за резкого снижения биосинтеза ферментов, связанного с лизисом культуры. Предложенный метод культивирования микроорганизмов обеспечивает непрерывное выращивание

продуцентов ферментов на подложке без остановки в течение от 12-15 суток до 2-4 месяцев с многократным получением целевых ферментов через каждые 1-3 суток культивирования с помощью устройства разработанного нами (Патент №104754) (таблица1).

Для длительного культивирования микромицетов периодически удаляем мицелий с подложки. После первого удаления мицелия с подложки начинается второй этап процесса биосинтеза, для начала которого характерно падение активности КЖ. Через 2-4 суток после снятия мицелия даже следовые количества старых клеток, оставшихся в порах носителя, способны продуцировать столько фермента, сколько 2-3 г молодого мицелия на первом этапе культивирования, а именно 60-80 ед/мл ПГ при продуктивности культуры 20-30 ед/г мицелия.

Таблица 1 - Характеристика процесса культивирования свободных и иммобилизованных клеток *A.awamory 16* на пенополиуретановой подложке

Параметры культивирования	Свободные клетки	Иммобилизованные клетки
Продолжительность культивирования, сут	3	60 и более
Объем использованной питательной среды, мл	100	6000
Интервалы между получением КЖ и сменой ее на новую порцию питательной среды, сут	3	1-2
Сумма получаемой КЖ, мл	85	4600
Суммарное количество ферментов через 60 суток культивирования у иммобилизованной культуры в 4600 мл, ПГ активность по редуцирующим веществам, ед/мл	-	16 468
ПЛ, ед/мл	-	55 660
Суммарное количество фермента у свободных клеток за 3 сут		
ПГ, ед/мл	180	-
ПЛ, ед/мл	200	-

Далее, закономерности, наблюдаемые на первом этапе, повторяются и на втором. На третьем этапе активность увеличивается в 10-12 раз по сравнению с таковой периодической культуры. В процессе многоэтапного культивирования наблюдали стабильно увеличивающуюся продуцирующую способность культуры, которая сохраняется на протяжении всего срока культивирования – в течение 60 сут. (рисунок 4).

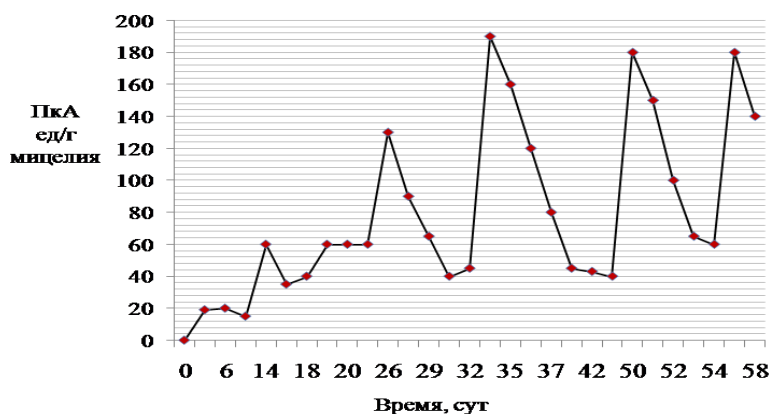


Рисунок 4 – Динамика продуктивности иммобилизованной культуры *A.awamory 16*

Таким образом, при иммобилизации *A.awamory 16* имеет место повышение активности ферментов КЖ от 2 до 6 раз на первом этапе и в 10-12 раз - на третьем, а также удлинение фазы активного образования ферментов по сравнению с периодической

культурой с 3 до 11-14 сут. Кроме активации культуры наблюдали стабилизацию продуцирующей способности гриба, которая сохраняется на протяжении всего срока культивирования (60 сут.). Частота получения целевого продукта постепенно увеличивается. Если при периодическом культивировании целевой продукт получали на третьи сутки, то при иммобилизации – через 1-2 суток в зависимости от количества агрегированного мицелия.

Литература:

1 John S. Pirt Principles of Microbe cell cultivation. Blackwell Scientific Publications Oxford London Edinburgh Melbourne, 1978

2 Botella C., I de Ory, C.Webb, D. Cantero and A.Blandino, Hydrolytic enzyme production by *Aspergillus awamory* on grape pomace, *J.Biochem Eng.*, 2005.- Vol.26.- P.100-106.

3 Kutines A., K.Belafi –Bako, A.Kabiri – Badr, L. Toth, L. Gubicza and C.Webb., Enzymatic hydrolysis of polysaccharides hydrolysis of starch by an enzyme complex from fermentation by *Aspergillus awamory*, *Trans. I ChemEC*, 79, 2001.- P. 41-45.

4 Blieva R.K. Biosynthesis of enzymes by aggregated and immobilized mycelium of micromycetes. *J.microbiol Biothechnol.*- 1988. -Vol.3, №2.- P. 37-44.

5 Blieva R.K. and Belkhojaeva A.A. A comparative study of physiology of immobilized and free cell of *Aspergillus awamory* 16 prodicina pectin-decomposina enzymes. // *In:Physiology of immobilized cells.* Elsevier, Amsterdam – 1990. – P.513-516.

Түйін

Р.Қ.Блиева

РМК «Микробиология және вирусология институты» ҚР БҒМ ҒК, Алматы қ.

ИММОБИЛИЗАЦИЯЛАНҒАН МИЦЕЛИЙЛІ МИКРООРГАНИЗМДЕРДІҢ ФЕРМЕНТТЕРДІ БИОСИНТЕЗДЕУІ

Мақалада ферменттердің продуценті – мицелийлі микроорганизмдердің биосинтездеуші қабілетін арттыру жолдарын іздестіру жайлы тәжірибелік материалдар берілген. Микроорганизмдерді подложкада иммобилизацияланған күйде тереңде өсіру жағдайында дақылдаудың тиімді әдісі жасалынды. Бұл әдіс культураның өнімділігін жоғарылатады және оның автоселекциясын қамтамасыз етеді.

Кілт сөздер: пеллеттер, мицелийлі микроорганизмдер

Bliyeva R.K.

SNE “Institute of microbiology and virology” SK MES RK, Almaty, Kazakhstan

BIOSYNTHESIS OF ENZYMES BY IMMOBILIZED FILAMENTOUS MICROORGANISMS

Summary

Biosynthesis of enzymes by microorganisms is affected not only by the activity of producers and conditions of their directed synthesis, but also by the best possible way of their cultivation. In the traditional submerged cultivation, apical growth of filamentous microorganisms causes the formation of pellets, which are of hard access for nutrients and oxygen, and which are in limited volume of nutrient medium with time lose their physiological activity. Optimal access of nutrients to the culture is implemented with a linear growing of hyphae by a surface method of cultivation where the biosynthetic ability of cultures is low. We have developed an effective method of long-term cultivation of

microorganisms combining surface linear growth of hyphae on the carrier in immobilized state with active submerged cultivation of enzyme producers.

Key words: pellets, filamentous microorganisms

For the maximum use of biosynthetic potential of microorganisms-producers of enzymes it is important to grow them not only in terms of the directed synthesis of desired products, but also the best possible way of their cultivation. It is known, that the best conditions for the formation of hydrolytic enzymes are created in submerged culture, because aeration of nutrient medium is of great importance for biosynthesis of enzymes.

Periodic submerged cultivation process is characterized by the growth of microorganisms in a limited volume of nutrient medium without the possibility of its replacement, which leads to a fall of the physiological activity of the culture. Furthermore, in the submerged cultivation of filamentous microorganisms, due to their apical nature of growth, their biomass grows in the form of pellets which are of hard access for nutrients and oxygen, leading to a fall of the synthetic activity of the culture of microorganisms.

It was necessary to develop the optimal method of cultivation of filamentous microorganisms, which would combine growing culture by the surface method on the carrier in a deep growth conditions.

The objective: to develop an effective method of submerged cultivation for microorganisms-producers of enzymes, in which hyphae of producers would not become pellets, but grew in the form of a film, immobilized on a carrier in which nutrients and oxygen would be available for the cells.

Materials and Methods

Microorganisms

Producers of pectinase used were *Aspergillus awamori* 16 and *Penicillium cyclopium*. All cultures were maintained on agar slants with Czapek's medium. Inoculum was a suspension of spores of 5 -7 day culture diluted in sterile distilled water at a concentration of spores $1,3 \times 10^7$ cells / ml.

Environment

Capek's medium contained: NaNO_3 – 1,0 g.; Sucrose – 2,0 g; KH_2PO_4 – 1,0 g; MgSO_4 – 0,5 g; KCl – 0,5 g; FeSO_4 - 0,001 g per liter.

Environment for *Aspergillus awamori* 16 contained: Glucose - 2 g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,7 g; MgSO_4 – 0,05 g; KCl – 0,05 g; KH_2PO_4 – 0,1 g; FeSO_4 – 0,001 g per 100 ml.

Environment for *Aspergillus oryzae* 3-9-15 contains: Sucrose - 2 g; NaNO_3 – 0.9 g; KH_2PO_4 – 0,1 g; MgSO_4 – 0,05 g; KCl – 0,05 g; FeSO_4 - 0,001 g 100 ml.

The formation of enzymes

For the formation of enzymes we used 750 ml shaker bulbs with 100 ml of culture medium, which is seeded with a spore suspension of 2 ml of 5 – 7 day old culture grown on the stock with Capek's medium. Cultivation implemented on a shaker (280 rev / min at 28°C) for a prolonged period, with the replacement of the culture medium every 3 days and every 1-2 days afterwards.

Determination of enzyme activities

A-amylase activity was determined with two methods: a) by the ability of an enzyme to produce hydrolysis of starch until final dextrins, not polled by iodine (in units of AU) and b) by the saccharifying capacity (in units of the OS).

Determination of pectolytic activity (PA) was performed on the number of unfissioned pectin before and after exposure to pectin diluting enzymes (PG and PL). Quantitative determination of the pectin is based on the obtainment of pectin acid copper salt.

Results and Discussion

Study of the growth of filamentous microorganisms and their formation of hydrolytic enzymes are closely related to the method of their cultivation. Apical nature of micromycetes' growth during normal subsurface cultivation of free cells causes the formation of masses of mycelium growing in the form of pellets. Form of mycelium formed during submerged culturing directly affects crop productivity.

Since metabolic reactions depend on the concentration of nutrients, cells on the surface of filamentous pellets have the maximum access to nutrients. Therefore, cells of mycelium growing in the form of a spathella have greatest access to nutrients for the longest period. Spathella in submerged culturing transforms into filamentous-spongy structure, in which hyphae of mycelium grow linearly, are accessible to nutrients and oxygen. For the formation of the spathella we have created conditions of adsorption of inoculum on the surface of a monolithic substrate with a large adsorption surface on which culture retained and grew linearly along the surface for a long time. In conditions of aeration and mechanical agitation on a shaker, filamentous sponge-like structure is formed which produces enzymes for a prolonged period.

In our studies, producers of enzymes were selected micromycetes of the genus *Aspergillus* - *Asp.niger* and *Asp.oryzae* 3-9-15 - producers of pectinase and α -amylase. A comparative study of pectin diluting enzymes (PD) and α -amylase - free (FC) and immobilized cells (IC) showed that during the immobilization of filamentous-spongy culture, biosynthesis of enzymes is active and for a significant period of time (figure 1). Stationary phase of enzymes formation increases 2.5 - 3 times.

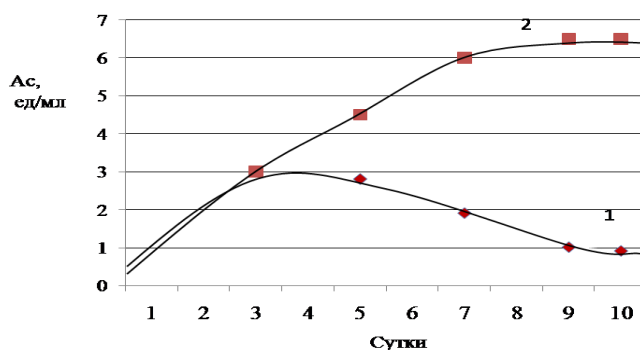


Figure 1 - Dynamics of α -amylase formation by different structures of mycelium. *A.awamori* 16. 1 - by mass of cells growing through pellets, 2 – by filamentous-spongy mycelium immobilized on paralon.

Free cells have a limited development cycle; they form greatest amount of enzymes on 3-9 day (figure 2-3).

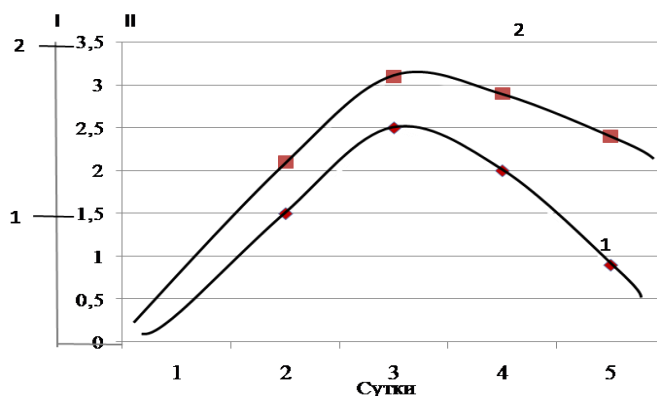


Figure 2 - Dynamics of α -amylase of batch culture *Asp.oryzae* 3-9-15, I, 1 - Biomass, g; II, 2 – α -Amylase activity, units/ml.

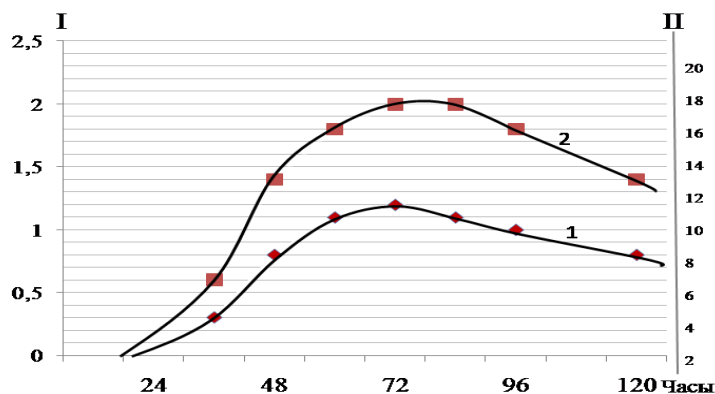


Figure 3 - Dynamics of the formation of PD enzymes of batch culture *A. awamori 16*.
I, 1 - mass of dry mycelium, g; II, 2 - RCA, U / ml

During subsequent culturing of FC, with the replacement of the environment within the same period of time, as that of the IC, there is autolysis of cells, which leads to a gradual fall of the enzymatic activity of the cultural fluid.

Thus, the traditional method of microorganism's growth cultivation for 3-4 days is followed by the pause of the process because of fall of enzymes biosynthetic associated with lysine culture. Our method of culturing microorganisms extends continuously on the substrate without interruption for a period of 12-15 days to 2-4 months with multiple target enzymes every 1-2 days (table 1).

After removing mycelium from the substrate the second stage of the process of biosynthesis begins with a fall in activity of liquid medium. After 2-4 days after removal of mycelium, even trace amounts of old cells remained in the pores of the carrier, are capable of producing as much enzyme as 2-3 g. of young mycelium on the first stage of cultivation, namely, 60-80 U / ml liquid medium in crop productivity 20 - 30 U / g of mycelium.

Table 1 -Characteristics of the cultivation process of free and immobilized cells *A. awamori 16* on polyurethane substrate

Cultivation parameters	Free cells	Immobilized cells
Duration of cultivation, days	3	60 and more
Volume of used medium, ml.	100	6000
The intervals between the receipt of liquid medium and replace with a new batch of medium, days	3	1-2
Amount received liquid medium, ml	85	4600
The total amount of enzymes after 60 days of cultivation in the immobilized culture in 4600 ml, PG activity by reducing substances, U / ml	-	16 468
Submarine, U / ml	-	55 660
The total amount of enzyme in the cell-free in 3 days		
PG, U / ml	180	-
Submarine, U / ml	200	-

Furthermore, the patterns observed in the first phase are also repeated on the second phase. On the third stage, activity increased 10-12 times compared to that of batch culture. In the process of multi-stage cultivation was observed to steadily increasing producing capacity of culture, which is maintained for the duration of culture - within 60 days (figure 4).

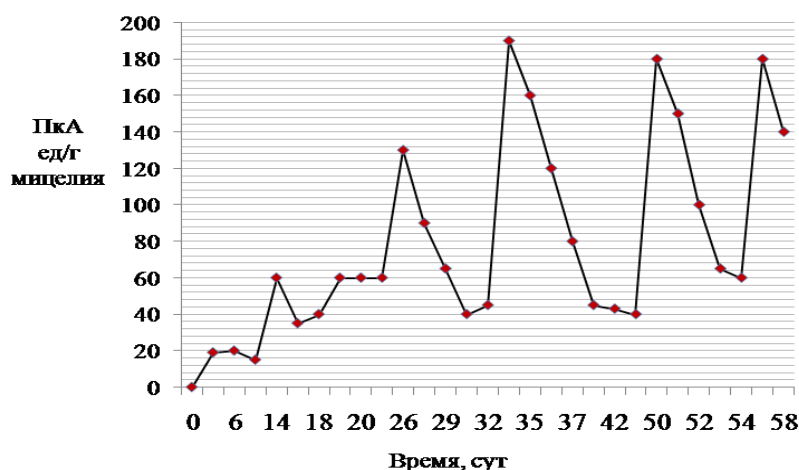


Figure 4 - The dynamics of productivity of the immobilized culture *A.awamori* 16

Therefore, during the immobilization of *A.awamori* 16 increased activity of liquid medium enzymes 2 to 6 times in the first stage and 10 to 12 times in the third, as well as the elongation of the phase of active enzymes formation takes place, as compared to batch culture from 3 to 11-14 days. In addition to the activation of culture, stabilization of culture-producing ability of the fungus was observed, which is maintained throughout the period of cultivation (60 days). Frequency of obtainment of the desired product is gradually increasing. If the periodic cultivation of target product was obtained on the third day, during immobilization it was obtained in 1-2 days, depending on the number of aggregated mycelium.

References:

- 1 John S. Pirt Principles of Microbe cell cultivation. Blackwell Scientific Publications Oxford London Edinburgh Melbourne, 1978
- 2 Botella C., I de Ory, C.Webb, D. Cantero and A.Blandino, Hydrolytic enzyme production by *Aspergillus awamory* on grape pomace, *J.Biochem Eng.*, 2005.- Vol.26.- P.100-106.
- 3 Kutines A., K.Belafi –Bako, A.Kabiri – Badr, L. Toth, L. Gubicza and C.Webb., Enzymatic hydrolysis of polysaccharides hydrolysis of starch by an enzyme complex from fermentation by *Aspergillus awamory*, *Trans. I ChemEC*, 79, 2001.- P. 41-45.
- 4 Blieva R.K. Biosynthesis of enzymes by aggregated and immobilized mycelium of micromycetes. *J.microbiol Biothechnol.*- 1988. -Vol.3, №2.- P. 37-44.
- 5 Blieva R.K. and Belkhojaeva A.A. A comparative study of physiology of immobilized and free cell of *Aspergillus awamory* 16 prodicina pectin-decomposina enzymes. // In: *Physiology of immobilized cells*. Elsevier, Amsterdam – 1990. – P.513-516.