

А.Ю. Полетаев, О.В. Кригер, П.В. Митрохин

ОПТИМИЗАЦИЯ ПАРАМЕТРОВ ВЫРАЩИВАНИЯ ПРОДУЦЕНТА КЕРАТИНАЗЫ *STREPTOMYCES ORNATUS* S 1220*

В статье представлены исследования по изучению влияния субстрата на рост мицелия *Streptomyces ornatus* S 1220, выявлена оптимальная питательная среда и условия культивирования. Измерена удельная кератиназная активность при выращивании культуры и исследована ее изменчивость в зависимости от добавления в культуральную жидкость различных солей. Подведены итоги оптимизации, спрогнозировано выгодное применение исследуемой культуры в промышленных масштабах.

Кератин, перо, синтез, культивирование, оптимизация, кератиназная активность.

Введение

В процессе переработки птиц остается ценное по своим биологическим свойствам перьевое сырье, которое состоит примерно на 85 % из кератина. Кератины являются самыми распространенными белками в эпителиальных клетках позвоночных и представляют собой основные компоненты кожи и ее придатков, таких как ногти, волосы, перья и шерсть. Химическая оценка кератинсодержащего сырья позволяет положительно оценить потенциальные возможности этих белковых ресурсов как источников незаменимых аминокислот. Это обстоятельство служит основой для изыскания путей рационального использования сырья. Существуют различные способы его переработки. Наряду с физическими и химическими методами получения аминокислот наилучшим считается ферментативный способ переработки белоксодержащего сырья, так как в результате ферментативной реакции сохраняются все незаменимые аминокислоты. Поскольку использование ферментных препаратов в промышленности может быть очень дорогим, то актуальным является изыскание более дешевых методов переработки кератинсодержащего сырья. Удешевить процесс переработки кератинового сырья становится возможным при использовании метода биоконверсии живой культурой микроорганизма. Суть метода заключается в культивировании микроорганизмом продуцентом ферментов, с помощью которых происходит дальнейшее разложение субстрата. При этом необходимо подобрать такой продуцент и такие условия для его культивирования, чтобы процесс биоконверсии протекал быстро и эффективно. В связи с этим в качестве объекта исследования нами был выбран штамм продуцент кератиназы *Streptomyces*

ornatus S 1220. Выбор данного штамма обусловлен дешевизной компонентов, входящих в состав питательной среды; кроме того, штамм *Str. ornatus* отличается от типичных продуцентов высокой продуктивностью кератиназы, меньшими сроками культивирования и биосинтеза фермента [4].

Целью настоящей работы явилось определение оптимальной питательной среды, способствующей высокому выходу биомассы *Streptomyces ornatus* S 1220, установление наиболее подходящей температуры выращивания, а также периода, в течение которого происходит накопление биомассы быстрее всего, определение влияния химических добавок на удельную ферментную активность. Для достижения целей необходимо решить следующие задачи: определить химический состав пера, установить влияние комбинированных питательных сред на выход кератиназы продуцента, изучить влияние внешних условий на рост и продуктивность бактерий-продуцентов, оптимизировать установленные параметры.

Материалы и методы исследований

Для определения массовой концентрации катионов пера применялась система капиллярного электрофореза «Капель-105», весы лабораторные ВСЛ-200, центрифуга СМ-50. Для определения массовой концентрации общего азота/белка использовался анализатор общего азота/белка Rapid N cube; весы лабораторные ВСЛ-200. Определение белка в биомассе осуществляли на анализаторе белка RAPID N ELEMENTAR в соответствии с европейскими стандартами. Принцип метода заключается в определении азота за счет сжигания анализируемого вещества известной массы в условиях высокой температуры (около 900 °С) камеры в присутствии кисло-

* Работа выполнена в рамках Федеральной целевой программы «Кадры инновационной России» на 2009–2013 гг.

рода, что приводит к высвобождению углекислого газа, воды и азота, массовая доля которого детектируется прибором. В работе использовались питательные среды: крахмальная (ГОСТ Р 52060-2003), селективная среда Чапека (ТУ 9229-014-00419789-95), мясопептонный агар (МПА, ГОСТ-17206-96). Для исследования влияния химических компонентов в качестве субстрата на увеличение удельной кератиназной активности осуществлено культивирование *Streptomyces ornatus* S 1220 на питательном бульоне с добавлением таких солей, как NaCl, K_2HPO_4 , CaCO_3 . Кератиназную активность определяли модификационным методом. Его суть заключается в следующем: брали 200 мг измельченных перьев (предварительно промытых хлороформом и водой, высушенных на воздухе), добавляли 10 мл 0,05 М боратного буфера pH 9,0 и 1 мл фильтрата культуральной жидкости. Энергично встряхивали и

оставляли на 3 часа при 37 ± 1 °C для гидролиза кератина. Одновременно ставили 2 контроля на растворение перьев в буфере и содержание растворимого белка в культуральной жидкости. По окончании гидролиза оставшийся нерасщепленный белок осаждали раствором ТХУ кислоты и фильтровали. В фильтрате измеряли оптическую плотность при 340 нм. По калибровочной кривой, построенной по растворам сывороточного альбумина, определяли количество расщепленного белка ($\text{мкг}/\text{см}^3$) культуральной жидкости за 1 час гидролиза.

Результаты и их обсуждение

В ходе проведенных опытов установлено общее содержание белка, массовая доля которого составила порядка 87,5 %. Кроме того, определена массовая концентрация катионов. Результаты представлены в табл. 1.

Таблица 1

Массовая концентрация катионов пера

Определяемый параметр	Объем гидролизата, мл	Массовая концентрация катионов в пробе, $\text{мг}/\text{дм}^3$		Среднее значение, $\text{мг}/\text{дм}^3$	Массовая доля катиона в образце, $x \pm \Delta$, г/кг
		1	2		
Калий	12,5	6,861	6,794	6,828	$17,07 \pm 1,72$
Натрий	12,5	16,888	16,675	16,782	$41,96 \pm 4,22$
Магний	12,5	1,795	1,775	1,785	$4,46 \pm 0,45$
Кальций	12,5	8,933	8,357	8,645	$21,61 \pm 0,22$

Результаты исследований, проведенных с пером, говорят о том, что перо является не только биологически ценным продуктом, но и содержит в себе катионы, необходимые для роста стрептомицета [4].

Из широкого набора воздействий, которые окружающая среда может оказывать на организмы, к числу наиболее экстремальных относится температура. Живой организм приспосабливается к определенным температурным условиям. От температуры зависит рост микроорганизма, она оказывает влияние на все стороны его физиологической функции. С изменением температуры скорость роста микроорганизмов может замедлиться, а может увеличиться. Зная, что температурный оптимум для роста мицелия составляет в среднем 30 °C [3], мы проводили опыты при 30 ± 1 и 37 ± 1 °C на трех различных питательных средах: крахмальный агар, МПА и среда Чапека. Засеянные чашки помещали в термостат при указанных выше температурах.

Для того чтобы установить наиболее рациональную среду и температуру для прироста биомассы, *Streptomyces ornatus* S 1220 выращивали в течение 7 суток на указанных средах и определяли содержание белка в биомассе.

Таким образом, в ходе исследований проводили подсчет числа выросших в чашках колоний и определяли концентрацию микроорганизмов в 1 г биомассы. Установлено, что максимальное накопление биомассы *Streptomyces ornatus* S 1220 происходит на 7 сутки на всех трех питательных средах, но максимальная динамика накопления биомассы происхо-

дит в течение 3 суток, затем скорость роста значительно замедляется. При этом оптимальная температура культивирования составила 30 ± 1 °C при выращивании на каждой из сред. Результаты представлены в табл. 2.

Таблица 2

Накопление биомассы в процессе культивирования *Streptomyces ornatus* S 1220 при различной температуре

Температура, °C	Количество микроорганизмов, $\times 10^{-3}$ КОЕ/г			
	1 сутки	3 сутки	5 сутки	7 сутки
Крахмальный агар				
30,00	146	345	360	375
37,00	16	35	50	52
МПА				
30,00	200	590	630	645
37,00	20	100	105	110
Среда Чапека				
30,00	101	235	250	265
37,00	10	35	38	40

Из табл. 2 видно, что при повышении температуры продуцент кератиназы становится малоактивным, а также наибольший прирост биомассы происходит при 30 °C на мясопептонном агаре.

После этого определяли содержание общего белка в течение 7 суток. Исследования проводили при 30 °C, так как при этой температуре происходит наибольший

прирост биомассы. Содержание общего белка рассчитывали произведением общего азота на пересчетный коэффициент для белков живых организмов, составляющий 6,25. Данные представлены в табл. 3.

Таблица 3

Накопление белка в биомассе в процессе культивирования *Streptomyces ornatus* S 1220 при оптимальной температуре (30 °С)

Массовая доля белка в мицелии, %			
сутки			
1	3	5	7
Крахмальный агар			
2,04	18	24	26
Питательный агар			
5,6	59	68	70
Среда Чапека			
5,9	22	26	30

В ходе исследований по определению массовой доли белка было установлено, что на МПА при 30 °С происходит сравнительно большое накопление белка. Массовая доля белка на седьмые сутки составила порядка 70 %. Исходя из вышесказанного для дальнейших исследований мы выбрали именно мясопептонный агар.

После того как были определены оптимальные условия для выращивания *Streptomyces ornatus* S 1220, дополнительно проведены исследования по оптимизации параметров, влияющих на активность кератиназы.

Существует много факторов, оказывающих влияние на скорость ферментативной реакции. Для того чтобы определить наилучшие условия конверсии кератинсодержащего сырья в аминокислоты, необходимо подобрать такие компоненты для питательной среды, которые увеличивали бы удельную активность кератиназы.

В исследованиях проверяли, как изменяется удельная активность кератиназы в течение семи суток в зависимости от добавления солей, таких как NaCl, K_2HPO_4 , CaCO_3 . Концентрация солей выбрана согласно имеющимся литературным данным: NaCl – 0,25 %; K_2HPO_4 – 0,1 %; CaCO_3 – 0,3 % [1, 2]. По окончании культивирования культуральную жидкость отделяли от мицелия центрифугированием (3500–4000 об/мин), надосадочную жидкость – фильтрованием. В фильтрате определяли кератиназную активность [5]. Значения удельной кератиназной активности снимали на 1, 3, 5 и 7 сутки. Результаты представлены в табл. 4.

Таблица 4

Изменение удельной активности кератиназы в процессе культивирования *Streptomyces ornatus* S 1220

Удельная активность кератиназы, Е/мг белка			
1 сутки	3 сутки	5 сутки	7 сутки
NaCl			
3,4	11,2	12,7	13,2
K_2HPO_4			
2,6	11,0	13,2	14,7
CaCO_3			
2,5	11,7	12,8	13,5

Из табл. 4 видно, что удельная кератиназная активность возрастала в течение 7 суток при добавлении указанных солей в каждую из питательных сред. Однако наивысшая удельная кератиназная активность была достигнута на 7 сутки при добавлении K_2HPO_4 . На третьи сутки исследуемая активность значительно возросла в каждом из опытных образцов, но больше всего при добавлении карбоната кальция (11,7 ед/мг).

Кроме того, параллельно определяли в течение семи суток титруемую, активную кислотность и удельную кератиназную активность при температуре 30 °С, но без добавления каких-либо солей. Результаты представлены в табл. 5.

Таблица 5

Изменение рН, Т и кератиназной активности в процессе культивирования *Streptomyces ornatus* S 1220 на МПБ при 30 °С

Показатель	Сутки			
	1	3	5	7
Титруемая кислотность, °Т	18	18	17	16
Активная кислотность, ед. рН	6,5	6,5	6,5	6,5
Удельная кератиназная активность, Е/мг белка	2,6	11,0	11,9	12,8

В результате проведенного исследования стало ясно, что на протяжении семи суток активная кислотность не изменялась и держалась на уровне 6,5 единицы. Титруемая кислотность снизилась с 18 до 16 °Т с третьи по седьмые сутки, это свидетельствует о том, что содержание общего количества кислот в культуральной жидкости стало уменьшаться к концу инкубации. В то же самое время удельная кератиназная активность сильно увеличилась за трое суток и незначительно увеличивалась до конца культивирования. Отсюда следует, что концентрация кератиназы возрастала в связи с высокой динамикой накопления биомассы в течение 3 суток.

Заключение

Из проведенных исследований выяснили, что оптимальный срок для выращивания *Streptomyces ornatus* S 1220 составляет трое суток, выращивание необходимо осуществлять при 30 °С на МПБ с добавлением CaCO_3 . При добавлении соли повышается кератиназная активность, а оптимальность выращивания стрептомицета в течение 3 суток обусловлена тем, что за это время накопление биомассы *Streptomyces ornatus* S 1220 происходит быстрее всего. Кроме того, за это время в культуральной жидкости кератиназа достигает активности, достаточной для эффективной биоконверсии кератинсодержащего сырья.

На наш взгляд, применение найденных параметров позволит эффективно использовать штамм *Streptomyces ornatus* S 1220, увеличит выход заменимых и незаменимых аминокислот при переработке пера как источника кератина. Применение данного микробиологического способа переработки кератинсодержащего сырья частично позволит изба-

витель от отходов на птицеперерабатывающих предприятиях, а также даст возможность использо-

вать полученные аминокислоты в кормовой, пищевой и фармацевтической промышленности.

Список литературы

1. Jayalakshmi, T. Isolation and Screening of a Feather-Degrading Keratinolytic Actinomycetes from Actinomyces sp / T. Jayalakshmi, P. Krishnamoorthy, G. Ramesh, P. Sivamani // Journal of American Science. – 2010. – № 6. – P. 45–48.
2. Radhika, T. Optimization of keratinase production and enzyme activity using response surface methodology with streptomyces sp7 / Radhika Tatineni, Kiran Kumar D., Ravi Chandra P., Lakshmi Narasu M. // Applied Biochemistry and Biotechnology. – 2006. – V. 141. – № 2–3. – P. 187–201.
3. Takiuchi I., Higuchi D., Sei Y., Koga M. Isolation of an extracellular proteinase (keratinase) from *Microsporium canis*. – *Sa-bouraudia*, 1982, 20, 281–288.
4. Пат. 2034924 Российская Федерация, МПК⁷ с 12 N 9/50, с 12 R 1: 465. Штамм *Streptomyces ornatus* продуцент кератиназы / Бандоян А.К.; заявитель и патентообладатель Воронеж. науч.-исслед. ин-т связи. – № 93011685/13; заявл. 03.03.93; опубл. 10.05.95, Бюл. № 57. – 4 с.
5. <http://www.claw.ru/a-natural/25453.htm>.

ГОУ ВПО «Кемеровский технологический институт
пищевой промышленности»,
650056, Россия, г. Кемерово, б-р Строителей, 47.
Тел./факс: (3842) 73-40-40
e-mail: office@kemtipp.ru

SUMMARY

A.U. Poletaev, O.V. Kriger, P.V. Mitrohin

Optimization of cultivation parameters of keratinase producer *Streptomyces ornatus* S 1220

The article deals with the researches on a substratum influence on mycelium *Streptomyces ornatus* S 1220 growth. The optimum nutrient medium and cultivation conditions have been revealed. Keratinase specific activity during culture cultivation has been measured. Its variability depending on addition of various salts into culture liquid has been investigated. The optimization results have been summed up and favourable commercial application of investigated culture has been predicted.

Keratin, feather, synthesis, cultivation, optimization, keratinase activity.

Kemerovo Institute of Food Science and Technology
47, Boulevard Stroiteley, Kemerovo, 650056, Russia
Phone/Fax: +7(3842) 73-40-40
e-mail: office@kemtipp.ru

