

УДК 579.2

DOI 10.19110/1994-5655-2021-5-61-65

И.Г. ШИРОКИХ^{*,}, Н.А. БОКОВ^{**,***},
Я.И. НАЗАРОВА^{**}**

ВЛИЯНИЕ ИСТОЧНИКОВ АЗОТА В ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЕ НА РОСТ И ЦЕЛЛЮЛАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ СТРЕПТОМИЦЕТОВ

^{*} *Институт биологии
ФИЦ Коми НЦ УрО РАН,
г. Сыктывкар*

^{**} *Федеральный аграрный научный центр
Северо-Востока имени Н.В. Рудницкого,
г. Киров*

^{***} *Вятский государственный университет,
г. Киров*

*irgenal@mail.ru,
nikita-bokov@mail.ru*

I.G. SHIROKIKH^{*,}, N.A. BOKOV^{**,***},
YA.I. NAZAROVA^{**}**

IMPACT OF NITROGEN SOURCES IN THE NUTRIENT MEDIUM ON THE GROWTH AND CELLULASE ACTIVITY OF STREPTOMYCETES

^{*} *Institute of Biology, Federal Research Centre
Komi Science Centre, Ural Branch, RAS,
Syktyvkar*

^{**} *N.V. Rudnitsky Federal Agrarian Science
Centre of the Northeast,
Kirov*

^{***} *Vyatka State University,
Kirov*

Аннотация

Определены биомасса и целлюлазная активность двух перспективных почвенных изолятов стрептомицетов в зависимости от введения в среду органических (пептон, гидролизат казеина) и минеральных (NH_4Cl , NaNO_3 , NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KNO_3) источников азота. Для продукции целлюлаз штаммами *Streptomyces* sp. Mb 4–2 и 1.3 наиболее предпочтительными явились неорганические соли – NH_4NO_3 и NH_4Cl соответственно. Для роста стрептомицетов и накопления биомассы лучшими источниками азота служили пептон и гидролизат казеина. Полученные результаты представляют интерес для разработки новых экологически чистых технологий с использованием стрептомицетов-целлюлолитиков.

Ключевые слова:

Streptomyces, источники азота, деструкция целлюлозы, активность целлюлаз, растительные материалы и отходы

Abstract

Biomass accumulation and cellulase activity were determined in two promising soil isolates during liquid phase cultivation depending on organic (peptone, casein hydrolysate) and mineral (NH_4Cl , NaNO_3 , NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KNO_3) nitrogen sources. The only source of carbon in the medium was straw (10%). Using two-factor analysis of variance, it was found that the production of cellulase complex enzymes is equally influenced by the nitrogen source ($F=225,92$; $p<0,0001$), the producer strain ($F=205,98$; $p<0,0001$), the interaction of these factors ($F=225,06$; $p<0,0001$). Inorganic nitrogen sources were the most preferred for cellulase production: NH_4NO_3 provided enzymatic activity in *Streptomyces* sp. Mb 4-2 is $912,82\pm 60,40$ units/10 min /g, and NH_4Cl in *Streptomyces* sp. 1.3 NH_4Cl is $531,37\pm 27,25$ units/10 min /g, which is 58–481 % and 34,5–409% more, respectively, than on other tested nitrogen sources. The accumulation of biomass during growth was more dependent on the nitrogen source ($F=65,47$; $p<0,0001$) than on the strain of streptomycetes ($F=18,65$; $p<0,0001$). The interaction of these factors did not have a significant effect on the accumulation of biomass ($F=1,11$; $p=0,38$). Peptone and casein hydrolysate became the best nitrogen source for the growth of streptomycetes, providing an average of 19 % more biomass than inorganic nitrogen sources. It is shown that the optimization of the nutrient medium by the nitrogen source makes it possible to regulate the growth rates of streptomycetes-producing cultures and achieve maximum cellulase yield. The results obtained are of interest for the development of new environmentally friendly technological processes using streptomycetes in the production of cellulase

complex enzymes and in the destruction of cellulose-containing agricultural waste.

Введение

В последние годы все больший интерес представляют экологически чистые технологии, внедряемые на предприятиях различных отраслей промышленности. При производстве товаров по экологически чистым технологиям используются материалы, оказывающие минимальное воздействие на окружающую среду. Особую популярность приобретают технологии рециклинга, позволяющие перерабатывать отходы и вторично запускать получаемый продукт в производственный цикл.

В этом контексте особый интерес представляет использование отходов сельского хозяйства. Отходы растениеводства в основном представлены лигноцеллюлозными субстратами (листья, стебли, шелуха, корни, другие неиспользованные части растений). Лигноцеллюлоза – основной структурный компонент растений, состоит из целлюлозы, гемицеллюлозы и лигнина. Наиболее ценной для промышленного производства является целлюлоза.

Известно об использовании целлюлозосодержащих отходов в качестве субстратов для культивирования микроорганизмов, предназначенных для получения клеточных белков, органических кислот, грибов, биологически активных вторичных метаболитов, ферментов, пребиотических олигосахаридов и в качестве источников ферментируемых сахаров при производстве биоэтанола второго поколения [1, 2]. Микробные ферменты активно участвуют в перечисленных процессах, но также могут сами по себе являться целевыми продуктами. Целлюлазы наиболее часто используются в пищевой, целлюлозно-бумажной, текстильной промышленности, производстве стиральных порошков и биоэтанола [2].

Деструкция целлюлозы является комплексным процессом, требующим совместного действия трех групп ферментов:

- эндоцеллюлазы (иначе – эндоглюканазы) (ЕС 3.2.1.4), которые случайным образом разрезают внутренние аморфные участки целлюлозной полисахаридной цепочки, образуя олигосахариды различной длины и, следовательно, новые восстанавливающие и невосстанавливающие концы, разрушаемые экзоцеллюлазами;

- экзоцеллюлазы (целлобиогидролазы (ЕС 3.2.1.91)), одна часть которых действует на восстанавливающий (со свободной ОН-группой) конец целлюлозы, другая – на невосстанавливающий, отщепляя целлобиозу;

- β-глюкозидазы (ЕС 3.2.1.21), гидролизующие растворимые олигосахара и целлобиозу до глюкозы [3–5].

Целлюлазы, используемые сегодня в промышленном производстве, вырабатываются в основном грибами [6]. Но в природе важную роль в

Keywords:

Streptomyces, nitrogen sources, cellulose degradation, cellulase activity, plant materials and waste

деградации и рециркуляции целлюлозы играют почвенные бактерии – стрептомицеты, имеющие сходные с грибами мицелиальную организацию и экологические функции. Стрептомицеты способны использовать широкий спектр источников углерода и азота, продуцировать антибиотики для снижения конкуренции за субстрат, формировать споры в условиях лимитации ресурсов [7, 8]. Существует ряд сообщений о производстве стрептомицетами целлюлаз и ксиланаз [9]. Являясь прокариотами, стрептомицеты легче поддаются генетическим манипуляциям и могут оказаться хорошими кандидатами в производстве целлюлозолитических ферментов. Помимо направленной селекции штаммов-продуцентов для увеличения продукции целлюлолитических ферментов в процессе ферментации растительных отходов зачастую производят оптимизацию состава питательной среды, варьируя в среде концентрацию катионов [9, 10], pH [11, 12] и источники азота [11, 13 – 15].

Цель работы – выявить оптимальные источники азота для жидкофазного культивирования двух штаммов стрептомицетов-целлюлолитиков.

Объекты и методы исследования

В работе были использованы два природных изолята из почв Кировской области – штаммы *Streptomyces* sp. МБ 4–2 и 1.3, показавшие ранее высокую целлюлазную активность при деградации соломы [16]. Для культивирования применяли жидкую питательную среду следующего состава (г/л): K_2HPO_4 – 2, NaCl – 2, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 1, $MnSO_4$ – 0,05, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,05, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ – 2. Устанавливали исходное значение pH 7,2. В качестве единственного источника углерода служила измельченная солома в количестве 1 об.%. Источники азота вносили в среду в зависимости от варианта, в эквимолекулярных по азоту количествах (г/л): NH_4Cl – 2, $NaNO_3$ – 3,2, NH_4NO_3 – 1,5, $(NH_4)_2SO_4$ – 2,5, KNO_3 – 3,77, пептон – 10, гидролизат казеина – 10.

Стрептомицеты выращивали в конических стеклянных колбах объемом 250 мл, содержащих по 50 мл жидкой питательной среды. Инокулятом служили два агаровых блока (диаметром 10 мм), вырезанных керном из 5-суточных газонных культур, выращенных на овсяном агаре при 28 °С. Ферментацию проводили стационарно в течение 15 сут. при 28 °С. Повторность в эксперименте – 3-кратная. Биомассу стрептомицетов измеряли после центрифугирования жидких культур при 7000 об./мин в течение 10 мин и высушивания при 105 °С до постоянного веса. Целлюлазную активность определяли в надосадочной жидкости с реактивом на основе динитросалициловой кислоты (ДНС) спектрофотометрически (540 нм) [17]. Активность фермента выражали в условных единицах (усл. ед./10 мин·г), производя перерасчет на 1 г сухой биомассы бактерий.

Статистическая обработка результатов выполнена методом двухфакторного дисперсионного анализа с использованием программ Microsoft Excel и Statgraphics. Значимыми считали различия при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение

В ходе работы изучили влияние органических и неорганических источников азота на накопление биомассы *Streptomyces* sp. 1.3 и Мб 4–2 в процессе жидкофазного стационарного роста культур. При культивировании стрептомицетов на средах с органическими источниками азота (гидролизат казеина, пептон) сухая биомасса продуцентов целлюлаз в среднем была выше, чем при культивировании этих же штаммов на средах с минеральными источниками азота (рис. 1). Оба штамма продемонстрировали максимальный уровень накопления биомассы за 15-суточный период на среде с пептоном: *Streptomyces* sp. Мб 4–2 – $602,6 \pm 12,9$ мг и *Streptomyces* sp. 1.3 – $578,3 \pm 21,5$ мг, что соответственно на 33,5 и 27,0 % больше, чем на минеральной питательной среде с NH_4Cl . Эти результаты совпадают с данными других работ по стрептомицетам, авторы которых также отмечают, что оптимальными для наращивания биомассы являются органические источники азота – мясной экстракт и пептон [11, 15].

Среди сравниваемых минеральных источников азота наибольшую продуктивность обоих штаммов поддерживал KNO_3 , минимальный уровень продуктивности обеспечивался введением в среду NaNO_3 . Биомасса стрептомицетов, выращенных в средах с добавлением других солей, различалась по вариантам недостоверно.

Результаты двухфакторного дисперсионного анализа полученных в эксперименте данных показали, что форма доступного азота оказала на продуктивность биомассы в 3,5 раза более значительное влияние ($F=65,47$; $p < 0,0001$), чем штамм стрептомицета ($F=18,65$; $p < 0,0001$). Вклад взаимодейст-

вия этих факторов в варьирование показателя оценивался как незначительный ($F= 1,11$; $p=0,38$).

Введение в среду различных источников азота оказало на целлюлазную активность стрептомицетов еще более выраженное влияние, чем на выход биомассы. Но, в отличие от биомассы, максимальной активности фермента содействовало введение в среду минеральных, а не органических источников азота. Ранее в доступной нам литературе об этом не упоминалось. Напротив, при изучении реакции стрептомицетов на различные источники азота лучшие результаты в отношении целлюлазной активности обеспечивались введением в питательные среды органических источников азота, таких как дрожжевой экстракт [13] и пептон [11, 14, 15]. В наших экспериментах максимальную целлюлазную активность на уровне $912,82 \pm 60,40$ ед./10 мин/г обеспечил штамм *Streptomyces* sp. Мб 4–2 при росте на среде с NH_4NO_3 (рис. 2). Это в 3,3–3,4 раза выше, чем при выращивании этого стрептомицета на средах, содержащих гидролизат казеина ($270,71 \pm 31,33$ усл. ед./10 мин /г) и пептон ($275,2 \pm 14,00$ усл. ед./10 мин /г). Максимальная целлюлазная активность штамма *Streptomyces* sp. 1.3 ($531,37 \pm 27,25$ усл. ед./10 мин /г) отмечена на среде с другим минеральным источником азота – NH_4Cl . В этих условиях ферментативная активность *Streptomyces* sp. 1.3 достоверно не отличалась от активности штамма *Streptomyces* sp. Мб 4–2 ($577,53 \pm 14,38$ усл. ед./10 мин /г). На средах с другими источниками азота как органическими, так и минеральными целлюлазная активность *Streptomyces* sp. 1.3 была достоверно ниже, варьируя в пределах от 129,8 (пептон) до 395,0 ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) усл. ед./10 мин /г.

Результаты статистической обработки данных по целлюлазной активности двух штаммов, полученные методом двухфакторного дисперсионного анализа, подтвердили, что на варьирование этого показателя практически в равной степени оказыва-

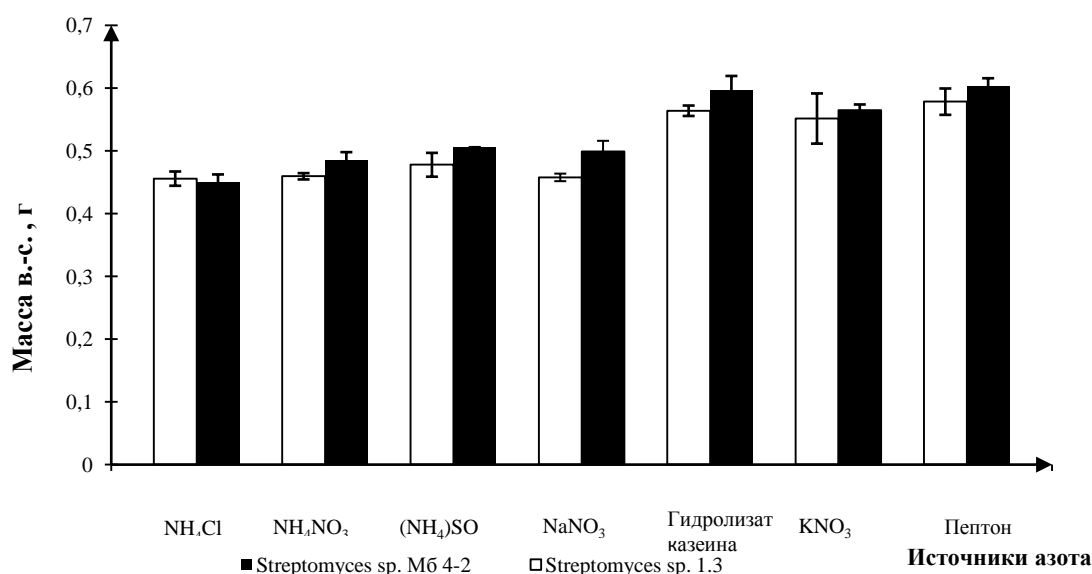


Рис. 1. Накопление биомассы двумя культурами стрептомицетов в зависимости от источника азота в жидкой питательной среде.

Fig.1. Accumulation of biomass by two streptomycetes cultures depending on the nitrogen source in a liquid nutrient medium.

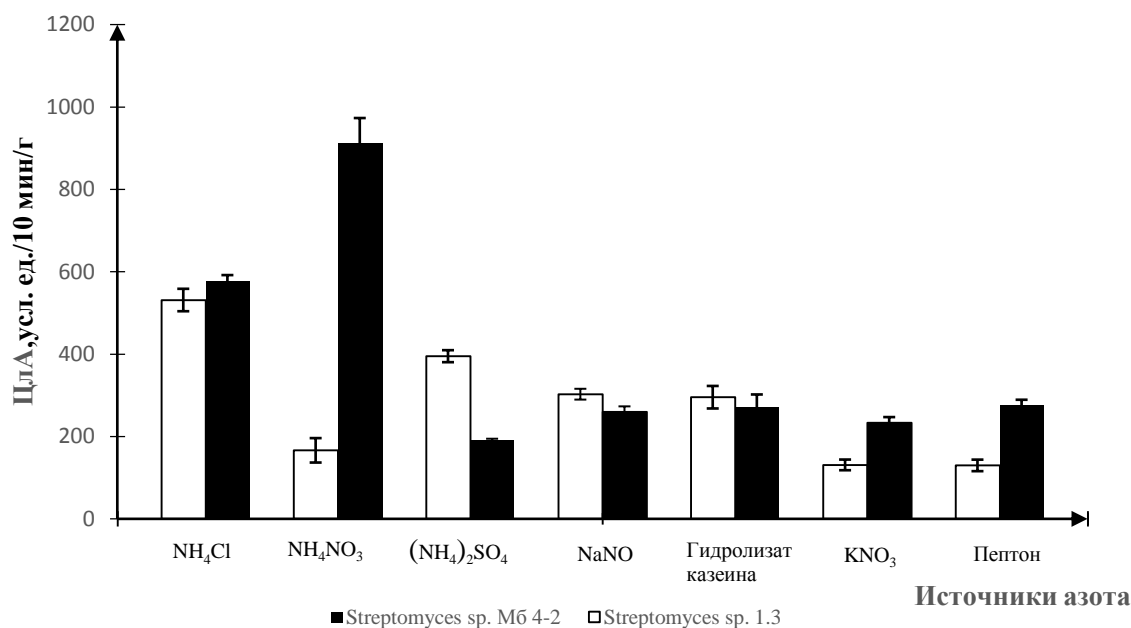


Рис. 2. Целлюлазная активность двух штаммов стрептомицетов в зависимости от источника азота в жидкой питательной среде.

Fig. 2. Cellulase activity of two strains of streptomycetes depending on the nitrogen source in a liquid nutrient medium.

ют влияние как источник азота ($F=225,92$; $p<0,0001$), так и штамм-продуцент ($F=205,98$; $p<0,0001$), а также взаимодействие этих факторов ($F=225,06$; $p<0,0001$).

Отсюда следует, что оптимизация состава питательной среды по источнику азота для реализации целлюлолитического потенциала отдельными культурами стрептомицетов должна носить индивидуальный характер. Замена одного компонента среды другим может обеспечить статистически значимое увеличение продукции целлюлазы. В отличие от имевшихся ранее в литературе сведений, максимальные значения целлюлазной активности штаммами *Streptomyces* sp. М6 4–2 и 1.3 были достигнуты на средах не с органическими, а с минеральными источниками азота – NH_4Cl и NH_4NO_3 .

Установлено также значимое влияние источника азота на выход биомассы штаммов-продуцентов целлюлаз. В большей степени, чем неорганические соли, росту исследуемых культур стрептомицетов в условиях жидкофазного культивирования способствовали органические источники – гидролизат казеина и пептон, что совпадает с данными литературы. Штаммоспецифичность в реакции стрептомицетов-целлюлолитиков на те или иные источники азота по показателю накопления биомассы не прослеживалась.

Вывод

Таким образом, результаты проведенных экспериментов показали, что оптимизация питательной среды по источнику азота позволяет регулировать темпы роста культур стрептомицетов-продуцентов и добиваться максимального выхода целлюлазы. Полученные данные представляют интерес для разработки новых экологически чистых технологических процессов с использованием стреп-

томицетов в производстве ферментов целлюлазного комплекса и при деструкции целлюлозосодержащих отходов сельского хозяйства.

Литература – References

1. *Sánchez C.* Lignocellulosic Residues: Biodegradation and Bioconversion by Fungi // *Biotechnology Advances*. 2008. Vol. 27. P. 185–194. DOI:10.1016/j.biotechadv.2008.11.001
2. *Vermelho A.B., Supuran C.T., Guisan J.M.* Microbial enzyme: applications in industry and in bioremediation. *Enzyme Res.* 2012. Vol. 2012 P. 1–2. DOI: 10.1155/2012/980681
3. *Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology / L.R. Lynd, P.J. Weimer, W.H. van Zyl, I.S. Pretorius // Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2002. Vol. 66. P. 506–577. DOI: 10.1128/MMBR.66.3.506-577.2002
4. *Lee J.* Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol // *J. Bio-technol.* 1997. Vol. 56. P. 1–24. DOI: 10.1016/s0168-1656(97) 00073-4
5. *Wilson D.B.* Three microbial strategies for plant cell wall degradation // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2008. Vol. 1125. P. 289–297. DOI: 10.1196/annals.1419.026
6. *Jayasekara S., Ratnayake R.* Microbial cellulases: An overview and applications. In *Cellulose*. Elsevier, 2019. P. 1–21. DOI: 10.5772/intechopen.84531
7. *Systems biology and biotechnology of Streptomyces species for the production of secondary metabolites / K.S. Hwang, H.U. Kim, P. Charusanti, B.Ø. Palsson, S.Y. Lee // Biotechnol Adv.* 2014. Vol. 32. № 2. P. 255–268. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2013.10.008

8. *Gopalakrishnan V., Srinivas S.L. Streptomyces*. In *Beneficial Microbes in Agro-Ecology*. Academic Press, 2020. P. 55–71. DOI:10.1016/B978-0-12-823414-3.00005-8.
9. *Saini A., Aggarwal N.K., Sharma A. Actinomycetes: a source of lignocellulolytic enzymes* // *Enzyme Res.* 2015. Vol. 2015. P. 1–15. DOI:10.1155/2015/279381
10. *Cellulolytic Streptomyces Sp. Isolated from a Highly Oligotrophic Niche Shows Potential for Hydrolyzing Agricultural Wastes* / *S. Celaya-Herrera, L.E. Casados-Vázquez, I. Valdez-Vazquez, F. Barona-Gymez, D.K. Bideshi, J.E. Barboza-Corona* // *BioEnergy Research*. 2021. Vol. 14. P. 333–343. DOI:10. 1007/s12155-020-10174-z
11. *Sureshkumar C., Munisamy P. Optimization of Process Parameters for Carboxymethyl Cellulase Production under Submerged Fermentation by Streptomyces lividians* // *Journal of Academia and Industrial Research*. 2015. Vol. 3. P. 371–379.
12. *Alam M., Sultana M., Anwar M.N. Isolation, identification and characterization of four cellulolytic actinomycetes and their cellulases* // *Chittagong University Journal of Biological Sciences*. 2013. Vol 6. P. 159–173. DOI:10.3329/cujbs.v6i1-2.17241
13. *Sinjaroonsak S., Chaiyaso T., H-Kittikun A. Optimization of Cellulase and Xylanase Productions by Streptomyces thermocoprophilus Strain TC13W Using Oil Palm Empty Fruit Bunch and Tuna Condensate as Substrates* // *Appl Biochem Biotechnol*. 2019. Vol. 189. № 1. P. 76–86. DOI: 10.1007/s12010-019-02986-3.
14. *Isolation Screening and Optimization of process parameters for enhanced production of cellulase by solid state fermentation* / *P.R. Yadav, P.B. Chauhan, M. Gahlout, H. Prajapat* // *Int. J. Adv. Res. Biol. Sci.* 2016. Vol. 3. № 5. P. 21–27.
15. *Optimization of extracellular endoxylanase, endoglucanase and peroxidase production by Streptomyces sp. F2621 isolated in Turkey* / *M. Tuncer, A. Kuru, M. Isikli, N. Sahin, F.G. Celenk* // *J Appl Microbiol.* 2004 Vol. 97. № 4. P. 783–791. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2004.02361.x.
16. *Сравнительная характеристика роста и целлюлазной активности стрептомицетов на различных субстратах* / *И.Г. Широких, Я.И. Назарова, Н.А. Боков, Т.Я. Ашихмина* // *Теоретическая и прикладная экология*. 2021. № 2. С. 122–127. DOI: 10.25750/1995-4301-2021-2-122-127
Sravnitel'naja harakteristika rosta i celljuzlaznoj aktivnosti streptomicetov na razlichnyh substratah [Comparative characteristics of the growth and cellulase activity of streptomyces on different substrates / *I.G. Shirokikh, Ja.I. Nazarova, N.A. Bokov, T.Ja. Ashihmina* // *Teoreticheskaja i prikladnaja ekologija [Theoretical and applied ecology]*. 2021. № 2. P. 122–127. DOI: 10.25750/1995-4301-2021-2-122-127
17. *Miller G.L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar* // *Analytical Chemistry*. 1959. V. 31. No. 3. P. 426–442. DOI: 10.1021/ac60147a030

Статья поступила в редакцию 05.10.2021.