

УДК 57.082.26:663.033.001.8

ОСОБЕННОСТИ ТВЕРДОФАЗНОЙ ФЕРМЕНТАЦИИ

© *К.А. Смирнов^{1*}, Ю.Д. Алашкевич^{1,2}, Н.С. Решетова¹*

¹*Сибирский государственный технологический университет, пр. Мира, 82, Красноярск, 660049 (Россия) E-mail: sibstu@sibstu.kts.ru*

²*Институт химии и химической технологии СО РАН, пр. К. Маркса, 42, Красноярск, 660049 (Россия)*

Представлен сравнительный анализ способов ферментации мицелиальных форм микроорганизмов (МФМ). Целью исследований является разработка биореактора для твердофазной ферментации МФМ. Полученный биопрепарат имеет относительно низкую себестоимость и более высокие количественные и качественные характеристики по сравнению с препаратами, получаемыми традиционными способами культивирования.

Ключевые слова: твердофазная ферментация, грибы, биореактор.

Введение

Традиционным способом применения твердофазной ферментации (ТФФ) является производство продуктов вторичного метаболизма (антибиотики, алкалоиды, гормоны роста и т.д.), биологическое топливо, ферменты, органические кислоты, ароматические соединения, биологическая детоксификация агропромышленных отходов, пищевые добавки, биофармацевтические продукты и т.д. [1]. Эта технология привлекла внимание как альтернатива жидкофазного культивирования. Продукты, полученные ТФФ, более устойчивы, затраты на энергопотребление ниже, объем ферментеров меньше, а объемы загрязняющих стоков значительно снижены [3]. Данная статья отражает краткий обзор главных особенностей ТФФ и ее применение по сравнению с жидкофазной ферментацией (ЖФФ) и поверхностной твердофазной ферментацией, подтвержденных собственными экспериментальными исследованиями.

Экспериментальная часть

Процесс ТФФ может быть определен как «рост микроорганизмов (главным образом грибов) на сырых твердых материалах в отсутствии свободной влаги» [2,3]. Традиционными субстратами для культивирования являются сельскохозяйственные продукты: рис, пшеница, ячмень, просо, бобовые. Однако, представляют интерес и нетрадиционные субстраты, такие как отруби пшеницы, соевый жмых, отходы целлюлозно-бумажной промышленности.

Сравнение между ЖФФ и ТФФ выявило следующее [2–4]:

1. Низкое содержание воды уменьшает возможности контаминации бактериями и дрожжами.
2. Условия окружающей среды подобны естественной среде обитания для грибов, которые составляют основную группу микроорганизмов, используемых для ТФФ.
3. Более высокий уровень аэрации, особенно необходимый в процессах с интенсивным окислительным метаболизмом.
4. Инокуляция вместе со спорами облегчает однородное рассеивание в среде.
5. Твердые субстраты обычно дают все питательные вещества, необходимые для роста колонии.
6. Обогащенные субстраты позволяют использовать более простые и экономичные конструкции биореакторов.
7. Малые энергозатраты – в некоторых случаях отсутствует потребность в автоклавировании, обработке паром, механическом перемешивании и аэрации.
8. В силу высокой концентрации продукта необходимость в специальных растворителях снижена.

* Автор, с которым следует вести переписку.

9. Низкий уровень влажности может положительно сказаться на производстве определенных продуктов, которые не могут быть культивированы в условиях ЖФФ.
10. Производительность для продуктов, полученных ТФФ, более высокая.
В то же время ТФФ имеет некоторые недостатки при сравнении с ЖФФ [2, 4–6]:
 1. Могут использоваться только микроорганизмы, которые способны расти при низких уровнях влажности.
 2. Обычно субстраты требуют предварительной обработки (уменьшение размера, гомогенизация, физический, химический или ферментативный гидролиз, варка или обработка пара).
 3. Затруднен анализ параметров биомассы (влажность, рН, массообмен, теплообмен).
 4. Возникают трудности в контроле параметров процесса (рН фактор, влагосодержание и концентрация субстрата, кислорода и биомассы).
 5. Много важных научных и технических аспектов очень слабо изучены. Информация о проектировании и работе реакторов на крупном масштабе недостаточна.
 6. Возможность контаминации нежелательными грибами.
 7. Затруднения в отводе метаболической температуры, произведенной в течение роста.
 8. Экстракты, содержащие продукты, полученные ТФФ, часто являются вязкими.
 9. Массопередача ограничена распространением колонии.
 10. В некоторых ТФФ аэрация может быть затруднена из-за высокой концентрации твердых частиц.
 11. Время культивирования увеличено в связи с потребностью спор в прорастании.
 12. Время культивирования более длительно, чем в ЖФФ.

Значительная часть выявленных недостатков ТФФ, по сравнению с ЖФФ, может быть снята при использовании результатов глубокого изучения твердофазной ферментации. Ряд исследователей утверждают, что ТФФ эффективнее и экономичнее, чем ЖФФ в производстве широкого спектра биопродуктов (корма, ферменты, органические кислоты, биопульпа, ароматизаторы, антибиотики, компост, биопестициды и т.д.). Результаты проведенных экспериментов убедительно показывают, что качество продуктов, полученных ТФФ, в ряде случаев значительно выше, чем продуктов, полученных жидкофазным способом [3]. В связи с этим мы считаем, что целесообразно проводить дальнейшие исследования в области твердофазной ферментации по устранению недостатков, связанных с анализом биомассы, контролированием основных параметров процесса, контаминацией, отводом метаболической температуры и аэрацией.

При выборе микроорганизмов для культивирования необходимо учитывать их специфические свойства. Бактерии и дрожжи также могут быть культивированы твердофазным способом [3]. Однако мицелиальные грибы лучше всего приспособлены для ТФФ вследствие их физиологических, энзимологических и биохимических свойств. Нитевидный способ роста грибов позволяет мицелиальным грибам проникнуть в твердые субстраты, что также дает им главное преимущество перед одноклеточными микроорганизмами для колонизации субстрата и использования доступных питательных веществ. Кроме того, их способность расти в условиях низкой водной деятельности и высокого осмотического давления делает грибы эффективными и конкурентоспособными в естественной микрофлоре для биоконверсии твердых субстратов [3].

В ТФФ можно выявить два типа процессов, в зависимости от природы твердой фазы. В первом случае твердые частицы субстрата служат основой для роста и источником питательных веществ. Такими субстратами являются не растворимые в воде гетерогенные материалы – побочные продукты от сельскохозяйственной и пищевой промышленности, которые имеют крахмалистую или лигноцеллюлозную природу (зерна и побочные продукты зерна, маниока, картофель, бобы и мякоть сахарной свеклы) [7].

Во втором случае субстрат (выжимки сахарной свеклы, пенька, инертные волокна, смолы, пена полиуретана и вермикулит) пропитан жидкой средой, которая содержит все питательные вещества (сахар, липиды, органические кислоты и т.д.). Этот способ используется реже, но обладает рядом преимуществ. Использование определенной жидкой среды и инертной основы улучшает управление процессом, но этот способ не всегда экономически целесообразен [6].

Основными факторами, оказывающими влияние на результаты ТФФ, являются такие свойства субстрата, как размер частиц, их форма и пористость, а также массопередача, температура, уровень кислотности и влагосодержание среды [3].

Роль влагосодержания субстрата была широко описана и рассмотрена различными авторами [2, 3, 7]. Влагосодержание – критический фактор процесса ТФФ, который имеет влияние на рост и биосинтез мета-

болитов [2, 3]. Оптимальный уровень влажности субстрата колеблется между 30 и 75%. Более низкое влаго-содержание вызывает снижение растворимости питательных веществ, споруляцию. Более высокий уровень влажности вызывает стерические помехи роста, сокращение пористости и обмен кислородом, увеличивается риск бактериального загрязнения [5].

В ТФФ различают два типа массопередачи: в микромасштабе (передачей в ячейки и из ячеек микроорганизма) и в макромасштабе (передача кислорода, конвекция) вне ячеек [3].

Увеличение температуры в ТФФ – следствие метаболической деятельности, когда удаление высокой температуры недостаточно. Это затрагивает непосредственно прорастание спор, рост и формирование продукта. Достигнутый температурный уровень – функция типа микроорганизма, пористости, диаметра частицы и глубины основания [3].

Контролировать температуру при ТФФ несколько труднее, чем в ЖФФ, в связи с природой субстрата. Таким образом, методы контроля, используемые в ЖФФ, не подходят для ТФФ. Традиционный способ контроля – вентиляция [3]. Высокий уровень аэрации способен снизить водную активность, поэтому используется насыщенный кислород [3].

Измерение и контроль этой переменной в ТФФ затруднены. Уровень рН фактора контролируется добавлением источников азота (соли аммония, соли нитратов) [3].

Твердофазной ферментацией производят традиционные пищевые продукты типа «кожи», индонезийского «темпеh» или индийского «gagi». ТФФ также используется для производства ферментов, органических кислот, биопестицидов, биологического топлива, ароматизаторов. Также ТФФ применяется в биоремедиации, биологическом распаде опасных веществ, детоксификации агропромышленных остатков. Твердофазный способ ферментации нашел широкое распространение в промышленности (табл. 1) [3, 7].

В Сибирском государственном технологическом университете на кафедре машин и аппаратов промышленных технологий совместно с кафедрой химической технологии древесины и биотехнологии, проводятся исследования процесса глубинной твердофазной ферментации, целью является получение биопрепарата – аналога препарату «Триходермин». Данный биопрепарат подавляет развитие других микроорганизмов, в том числе фитопатогенов, путем воздействия на них прямым паразитированием, конкуренцией за субстрат, выделением ферментов, антибиотиков (глиоуксин, виридин, триходермин и др.), тем самым угнетая развитие многих видов возбудителей заболеваний и тормозя репродуктивную способность патогенов [2].

Для повышения эффективности проведения процесса нами предложено осуществлять твердофазное культивирование штамма MG-6 (гриб рода *Trichoderma* Pers. Fr. (Eumycotina, Deuteromycotina, Nephromycetes; телеоморфа относится к роду *Nurocrea* и близким родам *Ascomycotina*, *Nurocreaceae*) в условиях активного перемешивания. Для проведения эксперимента была разработана специальная экспериментальная установка, принципиальная схема которой представлена на рисунке 1.

Обсуждение результатов

Исследования полученного биопрепарата показали более высокий выход конидий при глубинном способе ферментации по сравнению с поверхностным способом культивирования (табл. 2).

При этом округлая форма образовавшихся гранул препарата и их размеры (диаметр от 1 до 4 см) увеличивает срок хранения биопрепарата, повышает его устойчивость к внешним воздействиям при внесении в почву (рис. 2).

Полученный биопрепарат в мае 2008 г. засевался на опытных площадях Института леса им. Сукачева СО РАН. Высевалось 2 линейки по 50 семян. Первая линейка – контрольная (семена не подвергались обработке), во второй семена обрабатывались биопрепаратом.

Результаты сравнения всхожести обработанных биопрепаратом семян с контрольной линейкой представлены в таблице 3. Показатели произрастания семян кедр, обработанных биопрепаратом, выше на 75% по сравнению с контрольной линейкой.

Таблица 1. Применение ТФФ в различных отраслях народного хозяйства

Сектор	Примеры
Агропромышленная индустрия	Биотрансформация отходов сельского хозяйства. Пищевые добавки.
Контроль состояния окружающей среды	Биоремедиация и переработка опасных компонентов. Биологическая детоксикация агропромышленных отходов.
Промышленная ферментация	Производство энзимов, БАВ, органических кислот, биотоплива.

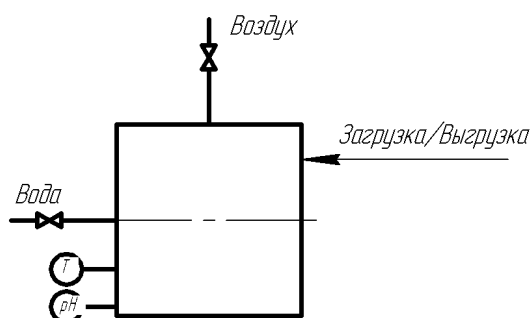


Рис. 1. Принципиальная схема установки



Рис. 2. Гранулы биопрепарата после культивирования в установке

Таблица 2. Конидиогенез аборигенных штаммов грибов рода *Trichoderma* на коре пихты исходной

Штамм	Титр, спор/г	
	Культивирование в биореакторе	Поверхностное культивирование
MG-6	$5,86 \cdot 10^9$	$2,37 \cdot 10^9$

Таблица 3. Результаты экспериментальных исследований

Материал	Количество проросших семян, %	
	Контрольная линейка	С обработкой биопрепаратом MG-6
Кедр	8	14

Выводы

На основании анализа литературы и полученных экспериментальных данных можно сделать вывод о том, что глубинная твердофазная ферментация является эффективным способом культивирования мицелиальных форм микроорганизмов. В связи с тем, что при жидкофазном культивировании невозможно образование конидий [2], следует отдавать предпочтение именно твердофазному способу ферментации.

Культивирование в экспериментальной установке (рис. 1) обеспечивает более высокий выход титр по сравнению с поверхностным твердофазным культивированием.

Пробные эксперименты по выращиванию культуры кедровых шишек показали, что мицелиальные формы микроорганизмов, полученные способом твердофазной ферментации, обладают достаточно высокой эффективностью, оказывают положительное воздействие на прорастание семян.

Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что устранение части недостатков ТФФ [2–6] повысит количественные и качественные характеристики биопрепарата, а также значительно снизит себестоимость готовой продукции.

Список литературы

1. Винаров А.Ю., Гордеев Л.С. Ферментационные аппараты для процессов микробиологического синтеза. М., 2005. 278 с.
2. Громовых Т.И., Прудникова С.В., Громовых В.С., Могильная О.А. Новые аборигенные штаммы грибов рода *Trichoderma*, распространенные на территории средней Сибири // Микология и фитопатология. 2001. Т. 35. Вып. 35. С. 56–61.
3. Perez-Guerra N., Torrado-Agrasar A., Lopez-Macias C., Pastrana L. Main characteristics and applications of solid substrate fermentation // Electronic journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry. Vigo, 2003. P. 343–350
4. Acuña-Arguelles M., Gutiérrez-Rojas M., Viniestra-González G., Favela-Torres E. Biotechnol. Lett. // Electronic journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry. Vigo, 1994. P. 23–28.
5. Ellaiah P. K., Adinarayana Y., Bhavani, Padmaja P., Srinivasulu B. Analysis of Growth Kinetic Profiles in Solid-State Fermentation // Process of Biochemistry. 2002. P. 615–620.
6. Lonsane B.K., Ghildyal N.P., Budiartman S., Ramakrishna S.V. Enzyme // Microbiological. Technology. London, 1995. P. 258–265.
7. Raghavarao K. S. M. S., Ranganathan T. V., Karanth N.G. Biochemical Engineering // Applied and environmental microbiology. Quebec, Canada, 2003. P. 127–135.

Поступило в редакцию 17 апреля 2009 г.

После переработки 27 мая 2009 г.