



УДК 579.64

## Оптимизация параметров культивирования консорциума микроорганизмов – деструкторов кератина в биотехнологических целях

А. И. Пискаева<sup>1</sup>, А. Ю. Просеков<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Кемеровский технологический институт пищевой промышленности (университет), Кемерово*

<sup>2</sup>*Кемеровский государственный университет, Кемерово*  
E-mail: [a\\_piskaeva@mail.ru](mailto:a_piskaeva@mail.ru)

**Аннотация.** Описана актуальность использования биотехнологических приёмов для утилизации пухо-перьевых отходов сельского хозяйства. Использован ранее определённый набор штаммов микроорганизмов (*Bacillus pumilus* AL16, *Microbacterium terregens* AC1180, *Aeromonas* sp. B5376, *Arthrobacter globiformis* AC1529, *Streptomyces olivocinereus* AC1169, *Acinetobacter* sp. B3905), способных к многоступенчатому гидролизу сложных соединений в составе отходов и обладающих антагонистической активностью в отношении патогенной микрофлоры. Установлено, что максимальный прирост биомассы наблюдается при использовании мальтозы и триптона в качестве источников углерода и азота. Оптимальная среда имеет следующий состав (г/дм<sup>3</sup>): мальтоза – 8; триптон – 8; хлорид натрия – 6. В ходе исследований установлены оптимальные параметры культивирования микробного консорциума для утилизации пухо-перьевого сырья в сельскохозяйственное удобрение: температурный оптимум – 38±2 °С, продолжительность культивирования – 22±1 ч, число оборотов мешалки – 90±2 об/мин, показатель pH – 7, объём подачи воздуха при аэрации – 1,132 дм<sup>3</sup>/мин.

**Ключевые слова:** утилизация отходов, пухо-перьевое сырьё, органическое удобрение, микроорганизмы, консорциум, культивирование.

### **Введение**

Утилизация отходов и побочных продуктов в отраслях пищевой и перерабатывающей промышленности создаёт ряд экологических проблем в сфере обеспечения устойчивого развития и охраны окружающей среды [11; 13].

При коммерческой переработке птицы в виде побочного продукта в больших количествах образуются пухо-перьевые отходы, в химическом отношении представляющие собой нативный кератин [1]. Высокая механическая стабильность, жёсткость и большое число дисульфидных связей нативного кератина делают его устойчивым к деградации протеолитическими ферментами, такими как пепсин, трипсин и папаин [6–8]. Образующие отходы накапливаются, а их утилизация путём складирования, захоронения или сжигания приводит не только к разрушению верхнего слоя

почвы в связи с высоким содержанием азота, но и к значительным потерям биологических ресурсов, таких как белки и ферменты [9].

Получение биоудобрений на основе куриного пера давно привлекает внимание учёных-исследователей [4]. Перьевая мука является дешёвым и легко доступным источником азота (с содержанием элемента до 15 %) и может использоваться в качестве эффективного биоудобрения с высокими биогенными свойствами.

Альтернативу существующим технологиям производства азотных удобрений представляет собой микробная деградация пухо-перьевых отходов. Существуют бактерии, способные использовать пухо-перьевые отходы в качестве основного органического субстрата и источника углерода, азота, серы и энергии [3; 12]. Деградированный продукт, полученный на основе перьевых отходов, может стать богатым источником соответствующего количества триптофана, который является основой синтеза индоллил-3-уксусной кислоты (ИУК) [2; 13]. Как известно, ИУК является основным регулятором роста, повышающим доступность питательных веществ для растений и способствующим росту корней [14].

Настоящее исследование направлено на оптимизацию параметров культивирования сформированного на основании результатов ранее проведённых нами исследований [10] консорциума микроорганизмов - деструкторов кератина.

### **Материалы и методы**

Для создания микробного консорциума по переработке пухо-перьевых отходов в сельскохозяйственное удобрение нами использовались следующие штаммы: *Bacillus pumilus* AL16, *Microbacterium terregens* AC1180, *Aeromonas* sp. B5376, *Arthrobacter globiformis* AC1529, *Streptomyces olivocinereus* AC1169, *Acinetobacter* sp. B3905.

Для подбора оптимального состава питательной среды отмечали изменения прироста биомассы в зависимости от варьирующего содержания источников углерода и азота в питательной среде. На основании данных предварительного биохимического анализа подобранных штаммов при выборе состава питательной среды подбирали такие источники углерода, которые способны утилизировать все штаммы, входящие в консорциум: глюкоза (AppliChem), лактоза (AppliChem), мальтоза (Sigma-Aldrich (Merck)). Для определения оптимальных источников азота использовали пептон (Vacto, BD), сульфат аммония (Sigma-Aldrich (Merck)), дрожжевой экстракт (Vacto, BD), триптон (Vacto, BD) как наиболее доступные. Культивирование вели при температуре  $37 \pm 2$  °С, являющейся оптимальной для большинства штаммов, входящих в консорциум. Измерение прироста биомассы производили спустя 4, 8, 12 и 24 ч культивирования с использованием многорежимного ридера Glomax Multi (Promega, США).

Для определения оптимальной температуры культивирования варируют температуру в пределах от 30 до 40 °С с шагом 5 °С. Культивирование вели на подобранной оптимальной среде, продолжительность куль-

тивирования составила 24 ч. О влиянии температуры судили по изменению прироста биомассы спустя 4, 8, 12 и 24 ч.

Для определения оптимального показателя аэрации консорциум микроорганизмов высевали в жидкую питательную среду оптимального состава в биореактор BioStat A plus (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Германия) объёмом 5 дм<sup>3</sup>. К биореактору подключали датчики насыщения кислородом и задавали среднюю фиксированную скорость вращения мешалки 85–95 об/мин, варьируя только скорость подачи воздуха. Продолжительность культивирования составила 24 ч. Отмечали изменения прироста биомассы и потребления кислорода. По полученным данным варьировали показатели насыщенности среды кислородом.

Для выявления сахаролитических свойств (способность расщеплять углеводы и высокоатомные спирты) исследуемую культуру засеивали в среды Гисса, содержащие глюкозу, сахарозу, манит, дульцит, лактозу, мальтозу, глицерин. После инкубирования посевов в термостате в течение 24 ч при температуре 37 °С учитывали результат ферментации углеводов по изменению цвета индикатора бромтимолсинего и соответственно питательной среды. Ход расщепления углеводов учитывали по кислотообразованию и обнаружению конечных газообразных продуктов. Газообразование в средах Гисса определяли по наличию пузырьков воздуха различной величины.

Протеолитическую активность культур определяли путём посева уколом в столбик застывшего желатина. Засеянные пробирки, а также пробирки с незасеянным желатином инкубировали при температуре 37 °С. После охлаждения опытных и контрольных пробирок в холодной воде учитывали результат по «текучести» столбика желатина. Наличие протеолитической активности исследуемого штамма свидетельствовало о выработке фермента желатиназы, под влиянием которого происходит разжижение желатина.

Степень протеолиза определяли по образованию конечных продуктов распада.

Каталазную активность исследуемых культур изучали путём суспендирования культуральной массы в 3%-ной перекиси водорода на предметном стекле. Кроме этого, каталазную активность тестировали непосредственно у выросших культур на МПА. Для этого на поверхность культуры на скошенном агаре наносили несколько капель 3%-ной перекиси водорода.

Наличие каталазы оценивали по появлению пузырьков газа (атомарный кислород, отщеплённый каталазой от перекиси водорода).

Уреазную активность штаммов определяли на агаре Кристенсена с мочевиной. Критерием оценки активности уреазы служила степень окрашивания среды в малиновый цвет после 1–4 сут. выращивания при температуре 37 °С.

Для определения кератиназной активности к навеске измельчённого пухо-перьевого сырья, предварительно промытого смесью хлороформа и воды и высушенного естественным путём, добавляли 10 см<sup>3</sup> 0,05 М боратного буфера (рН 9,0), содержащего количество фермента, эквивалентное 0,02 единицы общей протеолитической активности, встряхивали и оставляли на 3±0,06 ч при температуре 37±2 °С для гидролиза кератина. Одно-

временно контролировали растворение пухо-перьевого сырья в буфере и содержание растворимого белка в культуральной жидкости.

Количество расщеплённого белка (мкг/см<sup>3</sup>) за единицу времени (1 ч) гидролиза определяли по калибровочной кривой, построенной по растворам сывороточного альбумина.

По окончании гидролиза нерасщеплённый сывороточный белок осаждали раствором трихлоруксусной кислоты, после чего фильтровали через беззольный фильтр средней плотности (Munktell & Filtrak GmbH, Германия). В фильтрате измеряли оптическую плотность при 340 нм с помощью ридера Glomax Multi.

Все эксперименты проводились в трёхкратной повторности.

### **Результаты и обсуждение**

Помимо сложной органической составляющей отходы птицеперерабатывающих предприятий отличаются высоким уровнем контаминации патогенной микрофлорой. Известно, что пухо-перьевые отходы и помёт являются хорошей средой для роста потенциально патогенных микроорганизмов, в том числе кишечной палочки и колиформных бактерий, *Clostridium* sp., *Enterococcus* sp., *Listeria* sp., *Campylobacter* sp. [5].

В связи с этим штаммы для консорциума подбирались с учётом наличия антагонистической активности и способности продуцировать несколько подклассов ферментов одновременно или последовательно в зависимости от наличия субстрата. Так, *Bacillus pumilus* AL16 – продуцент кератиназ, дисульфидных редуктаз и комплекса других протеолитических ферментов, антагонист *Escherichia coli*, *Candida albicans*; *Microbacterium terregens* AC1180 – продуцент комплекса амилалитических ферментов; *Aeromonas* sp. B5376 – продуцент целлюлаз и гемицеллюлаз, антагонист патогенных дрожжей; *Arthrobacter globiformis* AC1529 – продуцент комплекса лиаз (фенилсеринальдолаза, сериндегидратаза); *Streptomyces olivocinereus* AC1169 – продуцент комплекса протеолитических и липолитических ферментов, глюкоизомеразы, антагонист *Salmonella typhimurium*; *Acinetobacter* sp. B3905 – продуцент комплекса протеолитических ферментов, фосфатазы, антагонист фитопатогенных грибов рода *Fusarium*.

В ходе предыдущих исследований, направленных на выбор соотношения микроорганизмов, установлено, что оптимальное соотношение *B. pumilus* AL16 : *M. terregens* AC1180 : *Aeromonas* sp. B5376 : *A. globiformis* AC1529 : *S. olivocinereus* AC1169 : *Acinetobacter* sp. B3905 составляет 3:1:2:1:2:1 [10].

При подборе оптимального состава питательной среды отмечено, что максимальный прирост биомассы наблюдается при использовании мальтозы и триптона в качестве источников углерода и азота соответственно. Для дальнейшей оптимизации варьировали их концентрации (табл. 1, 2).

Таблица 1

Динамика биомассы микроорганизмов-деструкторов (г/дм<sup>3</sup>)  
в зависимости от концентрации мальтозы в питательной среде

Концентрация мальтозы, г/дм <sup>3</sup>	Продолжительность культивирования, ч			
	4	8	12	24
4	1,104	1,232	1,299	1,658
6	1,136	1,304	1,321	1,729
8	1,208	1,309	1,393	1,976
10	1,228	1,317	1,401	1,989
12	1,356	1,401	1,423	2,022
14	1,467	1,761	1,867	2,028

Таблица 2

Динамика биомассы микроорганизмов-деструкторов  
в зависимости от концентрации триптона в питательной среде

Концентрация триптона, г/дм <sup>3</sup>	Продолжительность культивирования, ч			
	4	8	12	24
6	0,111	1,127	1,198	1,106
8	0,132	1,197	1,245	1,298
10	0,137	1,198	1,236	1,299
12	0,141	1,187	1,192	1,301
14	1,152	1,203	1,222	1,305
16	1,161	1,229	1,245	1,303

В соответствии с данными, представленными в таблицах 1 и 2, наибольший прирост биомассы наблюдается при содержании в среде мальтозы в количестве 14 г/дм<sup>3</sup>, триптона 14 г/дм<sup>3</sup>. Отмечено, что, начиная с концентрации мальтозы и триптона 8 г/дм<sup>3</sup>, прирост биомассы спустя 24 ч незначителен – 0,009 г/дм<sup>3</sup> и 0,001 г/дм<sup>3</sup> соответственно. Вследствие этого выбраны концентрация мальтозы и триптона 8 г/дм<sup>3</sup>. Оптимальная среда имеет следующий состав (г/дм<sup>3</sup>): мальтоза – 8; триптон – 8; хлорид натрия – 6.

Учитывая, что температурный оптимум для роста большинства штаммов составляет в среднем 36,5 °С, опыты, как указано выше, проводили при варьировании температуры в пределах от 30 до 44 °С с шагом 4 °С (табл. 3). В ходе определения оптимальных температурных параметров установлено, что скорость прироста биомассы максимальна при 38±1 °С. При увеличении температуры до 40±1 °С скорость остаётся высокой, однако, учитывая оптимальный для некоторых штаммов показатель 36±2 °С, в качестве оптимального для культивирования консорциума в целом принято значение 38±2 °С.

Аэрация – искусственный фактор, определяющий развитие микроорганизмов в процессе культивирования. Параметры аэрации определяются в соответствии с характерными особенностями развития и размножения, состава питательной среды, продолжительности, температуры культивирования и т. д. В ходе культивирования в соответствии с показателями роста микроорганизмов и потребления кислорода изменяли насыщенность кислородом питательной среды (рис. 1).

Таблица 3

Динамика биомассы микроорганизмов-деструкторов  
в зависимости от температуры культивирования

Температура, °С	Продолжительность культивирования, ч			
	4	8	12	24
30	1,204	1,230	1,268	1,295
34	1,206	1,259	1,312	1,324
38	1,216	1,299	1,336	1,359
40	1,215	1,302	1,315	1,345
44	1,208	1,211	1,234	2,277

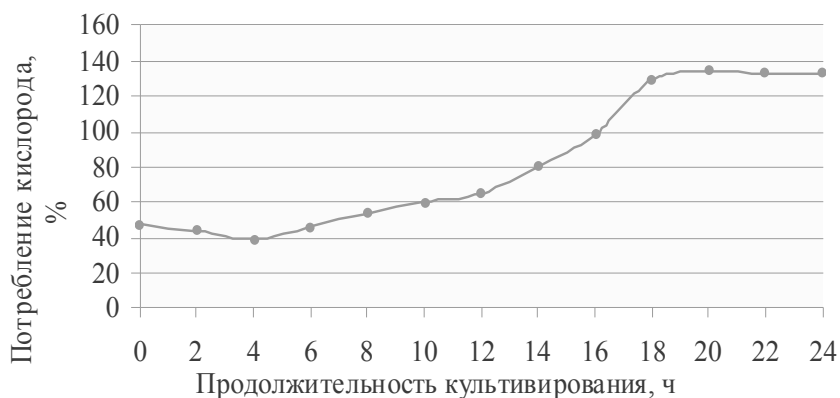


Рис. 1. Динамика насыщения кислородом питательной среды в процессе культивирования консорциума микроорганизмов-деструкторов кератина

Как свидетельствуют результаты эксперимента, в первый час культивирования насыщенность среды кислородом составляет 47,5 %, в этот период протекает адаптация бактерий и распределение по объёму. На четвертом часу культивирования отмечалось снижение объёма потребляемого кислорода до минимального значения 33,7 %, что соответствует стадии активации роста микроорганизмов. При дальнейшем культивировании начали подачу кислорода в среду с целью стимуляции роста бактерий до выхода на кислородное плато. Согласно данным эксперимента оптимальный для роста и развития консорциума объём подачи воздуха должен составлять 1,132 дм<sup>3</sup>/мин. Такая интенсивность аэрации обеспечивает нормальное развитие штаммов без признаков кислородного голодания.

Адаптацию микроорганизмов к постоянной подаче кислорода для оптимизации параметров ферментации проводили по показателям аэрации 0,475; 0,535; 0,982; 1,132 дм<sup>3</sup>/мин. В ходе эксперимента отмечали изменение прироста биомассы и ферментативной активности (рис. 2).

Высокая ферментативная активность наблюдается при показателях аэрации 0,982–1,132 дм<sup>3</sup>/мин, при показателях аэрации 0,475 и 0,535 дм<sup>3</sup>/мин активность ферментов и скорость прироста биомассы сравнительно невелики, что обусловлено недостатком кислорода.

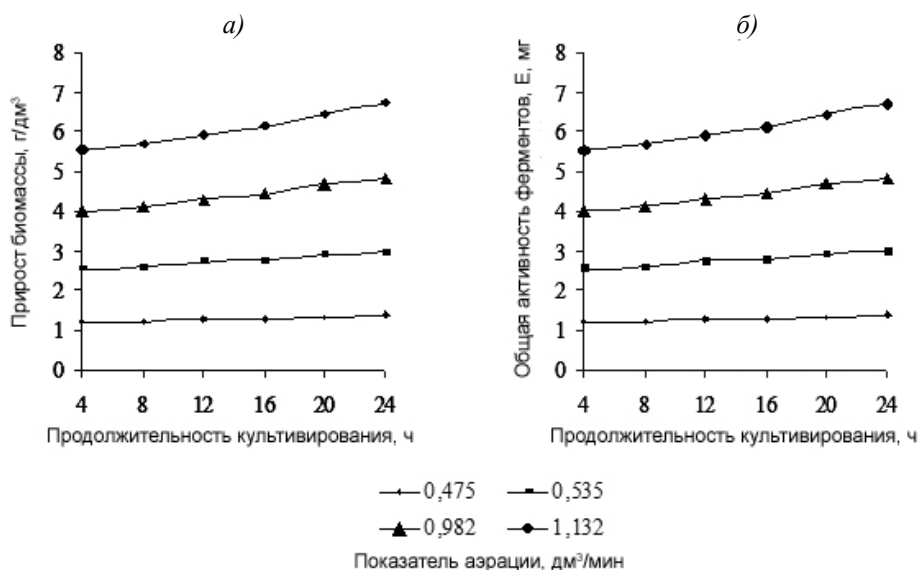


Рис. 2. Зависимость прироста биомассы (а) и общей активности ферментов (б) от потребления кислорода в процессе культивирования консорциума микроорганизмов-деструкторов кератина

В результате проведённых экспериментов установлены следующие параметры процесса культивирования микробного консорциума в биореакторе, признанные нами оптимальными: продолжительность культивирования  $22 \pm 1$  ч, объём подачи воздуха  $1,132 \text{ дм}^3/\text{мин}$ , температура  $38 \pm 2$  °С. Два других оптимальных параметра (число оборотов мешалки –  $90 \pm 2$  об/мин, показатель рН – 7) были определены в ходе предыдущих исследований [10].

Описанные условия культивирования микробного консорциума были успешно применены при наработке биопрепарата в объёмах, необходимых для определения оптимальной концентрации его внесения в экспериментах по биодegradации пухо-перовых отходов в удобрение.

### Заключение

В результате проведённых исследований установлен оптимальный состав питательной среды для культивирования консорциума *Bacillus pumilus* AL16, *Microbacterium terregens* AC1180, *Aeromonas* sp. B5376, *Arthrobacter globiformis* AC1529, *Streptomyces olivocinereus* AC1169, *Acinetobacter* sp. B3905. Установлено, что максимальный прирост биомассы наблюдается при использовании мальтозы и триптона в качестве источников углерода и азота. Оптимальная среда имеет состав, г/дм³: мальтоза – 8; триптон – 8; хлорид натрия – 6.

Определены оптимальные параметры культивирования консорциума в биореакторе. На основании изменений прироста биомассы микроорганизмов от варьирования температурного режима определён температурный оптимум ( $38 \pm 2$  °С) и продолжительность культивирования ( $22 \pm 1$  ч). На ос-

новании данных о зависимости прироста биомассы и общей активности ферментов от потребления кислорода установлен оптимальный объём подачи воздуха – 1,132 дм<sup>3</sup>/мин. Такой показатель аэрации обеспечивает нормальное развитие штаммов без признаков кислородного голодания.

#### Список литературы

1. Characterization of a multifunctional feather-degrading *Bacillus subtilis* isolated from forest soil / J. H. Jeong [et al.] // *Biodegradation*. – 2010. – N 21. – P. 1029–1040.
2. Das R. Production of indole acetic acid by novel bacterial strain of *Planomicrobium chinense* isolated from diesel oil contaminated site and its impact on the growth of *Vigna radiate* / R. Das, B. N. Tiwary // *Eur. J. Soil. Biol.* – 2014. – N 62. – P. 92–100.
3. Hydrolysis of Feather Keratin by Immobilized Keratinase / X. Lin [et al.] // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1996. – N 58. – P. 3271–3275.
4. Identification and functional characterization of indole-3-acetamide mediated IAA biosynthesis in plant associated *Fusarium* species / E. Tsavkelova [et al.] // *Fungal Genet. Biol.* – 2012. – N 49. – P. 48–57.
5. Impact of a microbial-mineral biopreparation on microbial community and odorization of manures / K. Matusiak [et al.] // *Biological Wastes*. – 2015. – N 62. – P. 791–798.
6. Keratinolytic activities of a new feather-degrading isolate of *Bacillus cereus* LAU 08 isolated from Nigerian soil / A. Lateef [et al.] // *Int. Biodeter. Biodegr.* – 2010. – N 64. – P. 162–165.
7. Keratinolytic enzyme-mediated biodegradation of recalcitrant feather by a newly isolated *Xanthomonas* sp. P5 / J. H. Jeong [et al.] // *Polym. Degrad. Stab.* – 2010. – N 95. – P. 1969–1977.
8. Kim J. M. Feather degrading *Bacillus* species from poultry waste / J. M. Kim, W. J. Lim, H. J. Suh // *Process Biochem.* – 2010. – N 37. – P. 287–291.
9. Lasekan A. Potential of chicken by-products as sources of useful biological resources / A. Lasekan, F. Abu Bakar, D. Hashim // *Waste Manage.* – 2013. – N 33. – P. 552–556.
10. Piskaeva A. I. Comparative Analysis of the Activity of Silver Nanoparticles against Native Microflora from Poultry Processing Plants Wastes / A. I. Piskaeva, Ju. Ju. Sidorin, A. Ju. Prosekov // *Advanced Materials Research*. – 2016. – N 1. – P. 50–58.
11. Prosekov A. Ju. Neobhodimost' formirovaniya znaniy o principah i vozmozhnostyah biotekhnologii / A. Ju. Prosekov, O. V. Mudrikova // *Mezhdunarodnyj zhurnal jeksperimental'nogo obrazovaniya*. – 2011. – N 7. – P. 75.
12. Russ W. Utilizing waste products from the food production and processing industries / W. Russ, R. M. Pittroff // *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* – 2004. – N 2. – P. 57–62.
13. Tiwary E. Medium optimization for a novel 58 kDa dimeric keratinase from *Bacillus licheniformis* ER-15; biochemical characterization and application in feather degradation and dehairing of hides / E. Tiwary, R. Gupta // *Bioresour. Technol.* – 2010. – N 1. – P. 6103–6110.
14. Vessey J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers / J. K. Vessey // *Plant Soil*. – 2012. – N 255. – P. 571–586.



## Optimization of Cultivation Parameters of the Microbial Consortium for Recycling of Feather Wastes into Fertilizer

A. I. Piskaeva<sup>1</sup>, A. Yu. Prosekov<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Kemerovo Institute of Food Science and Technology (University), Kemerovo*

<sup>2</sup>*Kemerovo State University, Kemerovo*

**Abstract.** The relevance of the use of biotechnological methods for the recycling of feather wastes into agriculture fertilizers are described. Strains of microorganisms (*Bacillus pumilus* AL16, *Microbacterium terregens* AC1180, *Aeromonas* sp. B5376, *Arthrobacter globiformis* AC1529, *Streptomyces olivocinereus* AC1169, *Acinetobacter* sp. B3905) with the ability to multistage hydrolysis of complex compounds included in the waste and having antagonistic activity against pathogenic microorganisms are selected. Maximum biomass increase seen when using tryptone and maltose as carbon and nitrogen sources are founded. The optimal composition of the medium is, g/dm<sup>3</sup>: maltose – 8; tryptone – 8; sodium chloride – 6. The optimal parameters of the cultivation of microbial consortium for recycling of feather wastes into agricultural fertilizers are established: the temperature optimum – 38±2 °C, the duration of cultivation – 22±1 h, the mixing rate – 90±2 rpm, the pH rate – 7, the amount of oxygen supply – 1,132 dm<sup>3</sup>/min.

**Keywords:** waste management, feather wastes, organic fertilizer, microorganisms, consortium, cultivation.

*Пискаева Анастасия Игоревна*  
*аспирант*  
*Кемеровский технологический*  
*институт пищевой промышленности*  
*(университет)*  
*650056, г. Кемерово, бул. Строителей, 47*  
*тел.: (923)606–33–73*  
*e-mail: a\_piskaeva@mail.ru*

*Piskaeva Anastasia Igorevna*  
*Post graduate*  
*Kemerovo Institute of Food Science and*  
*Technology (University)*  
*47, Stroiteli Blvd., Kemerovo, 650056*  
*tel.: (923) 606–33–73*  
*e-mail: a\_piskaeva@mail.ru*

*Просеков Александр Юрьевич*  
*доктор технических наук, профессор*  
*Кемеровский государственный университет*  
*650043, г. Кемерово, ул. Красная, 6, к. 1*  
*тел.: (3842) 58-12-26*  
*e-mail: rector@kemsu.ru*

*Prosekov Aleksandr Yurievich*  
*Doctor of Sciences (Technics), Professor*  
*Kemerovo State University*  
*6-1, Krasnaya st., Kemerovo, 650043*  
*tel.: (3842) 58-12-26*  
*e-mail: rector@kemsu.ru*