

МРНТИ: 62.09.39

Ж.Б. СУЛЕЙМЕНОВА¹, Р.К. БЛИЕВА¹, Н.А. БИСЬКО², А.С. ЖАКИПБЕКОВА^{1*},
Ж.Б. НАРМУРАТОВА³, М.Н. АХМЕТЖАНОВА⁴, А.К. КАЛИЕВА⁵

¹Научно-производственный центр микробиологии и вирусологии, Алматы, Казахстан

²Институт ботаники имени Н.Г. Холодного, Киев, Украина

³Казахский национальный технический университет им. К. Сатпаева, Алматы, Казахстан

⁴Казахский Национальный Аграрный Исследовательский Университет, Алматы,
Казахстан

⁵Актюбинский региональный университет имени К. Жубанова, Актобе, Казахстан

*e-mail: aika90aiko@mail.ru

СКРИНИНГ МИКРОМИЦЕТА РОДА *ASPERGILLUS* ПО СПОСОБНОСТИ К БИОСИНТЕЗУ ЦЕЛЛЮЛАЗЫ

doi:10.53729/MV-AS.2022.03.06

Аннотация

В статье приведены результаты исследования скрининга высокоактивного штамма *Aspergillus niger* 355 для дальнейшего использования в кормопроизводстве. Культуру выращивали в течение 45 суток при температуре 26-28°C на оптимизированной ранее питательной среде. Установлено, что после 6-9 суток культивирования наблюдается стабилизация биосинтеза фермента. Наибольшая целлюлазная активность наблюдалась на 9, 18 и 45 сутки культивирования. Активность целлюлазы варьировала от 1,63 до 3,5 ед/мл.

При периодическом же культивировании *Aspergillus niger* 355 максимум образования фермента наблюдался на 3 сутки и составил 1.63 ед/мл с последующим падением ферментативной активности.

Ключевые слова: комбикорм, целлюлаза, *Aspergillus*, селекция, биосинтез

Основу комбикормов для птицы составляют семена зерновых и зернобобовых культур, являющиеся основными источниками питательных веществ и энергии [1]. Однако зерновые корма, наряду с питательными и биологически активными соединениями, содержат антипитательные вещества: некрахмалистые полисахариды, фитаты, ингибиторы пищеварительных ферментов, гликозиды, алкалоиды, танины и др. Эти вещества ухудшают перевариваемость корма, снижают его конверсию.

В желудочно-кишечном тракте сельскохозяйственных животных отсутствуют ферменты, катализирующие деградацию клетчатки – основного некрахмалистого полисахарида входящего в состав корма и являющегося антипитательным фактором. В кишечнике растворимая клетчатка может образовывать высоковязкие гели, увеличивающие объем и массу химуса и замедляющие скорость его прохождения, проникновение ферментов и переваривание, что приводит к затруднению процессов всасывания питательных веществ, [2-4].

Наиболее эффективным решением проблемы деградации трудногидролизуемых растительных остатков, поднятия перевариваемости и обогащения кормов легкоусвояемыми источниками углерода является применение в качестве добавок к корму экзогенных ферментов микробного происхождения, которые способствуют разрушению клеточных стенок растений, гидролизуя крупные молекулы некрахмалистых полисахаридов, что, в конечном счете, обеспечивает улучшение переваримости питательных веществ.

Наиболее перспективными продуцентами целлюлозоразрушающих ферментов являются мицелиальные грибы *Aspergillus*, *Penicillium* и *Trichoderma* [5-7]. Долгое время рост производства ферментных препаратов сдерживался из-за отсутствия активных

штаммов микроорганизмов. Поэтому задача получения высокоактивных штаммов продуцентов ферментов является первоочередной и актуальной.

Целью данного исследования было селекционное улучшение ферментативных свойств микроскопического гриба *Aspergillus niger* 355 – продуцента целлюлазы.

Объекты и методы исследования

Объектом исследований служил штамм *A. niger* 355 из коллекции ТОО «НПЦ микробиологии и вирусологии». В работе использовались общепринятые микробиологические и биохимические методы исследований. Исходную культуру выращивали на оптимизированной ранее питательной среде Чапека, содержащую (в г/л): сахарозу – 10; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (0,15%) – 9; KCl – 0,5; MgSO_4 – 0,5; KH_2PO_4 – 1; FeSO_4 – 0,001; пектин – 1 г/100 мл.

Для выявления активного варианта, сформированного на подложке, проводили отбор изолятов в разные периоды длительного культивирования, для чего отбирали изоляты на I, II и последующих этапах культивирования, связанных с периодичностью снятия мицелия с подложки. Пробы отбирали путем выщипывания мицелия с поверхности и из глубины иммобилизованной структуры. Готовили суспензию клеток в концентрации 170 000 конидий в 1 мл для посева на агаризованную питательную среду. Полученную взвесь – обрывки мицелия, одиночные клетки и клетки, собранные в цепочки, фильтровали через стеклянный фильтр с многослойной стерильной фильтровальной бумагой в стерильную пробирку. Фильтрованную взвесь разводили стерильной водой до нужной концентрации в соотношении 1:1000, 1:10000, 1:100000, 1:1000000 и высевали на агаризованную среду в чашки Петри. В каждую чашку вносили по 0,1 мл разведенной взвеси, которую растирали на поверхности агаризованной среды с помощью стерильного шпателя. Засеянные чашки инкубировали в течение 3-6 суток при 28-30°C. После инкубации проводили подсчет выросших на чашках колоний. Полученные варианты выделяли в чистую культуру, которые затем выращивали в периодических условиях в течение 3-4 суток в жидкой питательной среде. В полученной культуральной жидкости определяли активность целлюлазы.

Определение активности целлюлозоразрушающих ферментов проводили по ГОСТу 31662-2012 [8]. Метод основан на количественном определении восстанавливающих сахаров, образующихся при действии ферментов целлюлолитического комплекса на натриевую соль карбоксиметилцеллюлозы (Na-КМЦ). Содержание восстанавливающих сахаров, образующихся в результате ферментативной реакции, определяли спектрофотометрическим методом с реактивом денитросалициловой кислоты (ДНС). Расчет ферментативной активности проводили по градуировочному графику, построенному для глюкозы.

Реактив Динитросалициловая кислота (ДНС) с массовой долей 1% готовили следующим образом: в стакан вместимостью 1000 мл вносили 10,0 г ДНС, добавляли 400 мл дистиллированной воды и перемешивали на магнитной мешалке в течение 25-30 мин, при комнатной температуре. Затем постепенно, при постоянном перемешивании, добавляли 150 мл раствора гидроксида натрия (10,7%-й NaOH). При этом окраска раствора менялась от светло-желтой до ярко-зеленой. Стакан с полученным раствором помещали в водяную баню с температурой $47 \pm 1^\circ\text{C}$ и постепенно, небольшими порциями добавляли 300 г виннокислого калия-натрия. Перемешивание продолжали до полного растворения реактива. Раствор охлаждали холодной водой до комнатной температуры и доводили объем до 1000 мл дистиллированной водой.

Анализ проводили в двух параллельных определениях. Для определения целлюлазной активности одного варианта использовали три пробирки (2 опытные и одну контрольную), в которые вносили по 1 мл субстрата и термостатировали при $50 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 5 минут. В две опытные пробирки вносили по 1 мл рабочего раствора ферментного препарата. Содержимое пробирок тщательно перемешивали и выдерживали

при температуре $50 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 10 минут. После проведения гидролиза в две опытные пробирки вносили по 3 мл реактива ДНС, в третью пробирку (контрольную) добавляли 3 мл реактива ДНС и 1 мл рабочего раствора препарата. Затем смеси тщательно перемешивали и помещали в кипящую водяную баню на 5 мин, после чего охлаждали до комнатной температуры. Оптические плотности опытных и контрольных проб измеряли на спектрофотометре PD-303 UV (фирмы Arcl, Япония) при длине волны 540 нм против контрольной пробы на реактивы. Целлюлолитическую активность КМЦЛА, ед/г, в ферментном препарате вычисляли по формуле:

$$\text{КМЦЛА} = \frac{C_0 + C_K}{t \cdot c}$$

где C_0 – молярная концентрация глюкозы в опытной пробе, найденная по градуировочному графику, мкмоль/см³;

C_K – молярная концентрация глюкозы в контрольной пробе, найденная по градуировочному графику, мкмоль/см³;

t – продолжительность гидролиза, мин (10 мин);

c – массовая концентрация ферментного препарата в реакционной смеси, г/см³.

Статистическую обработку результатов исследований проводили по общепринятым критериям вариационно-статистического анализа с вычислением средних величин (M), ошибки средней арифметической (m) с помощью пакета компьютерных программ Microsoft Excel, 2010. Оценку статистической значимости различий средних величин проводили по стандартной методике, описанной С. Гланцом [9]. Статистически значимыми считали различия с $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

С целью изучения ферментообразующей способности *A. niger* 355 на разных этапах длительного культивирования продуцент выращивали в течение 45 суток при температуре $26-28^\circ\text{C}$ на оптимизированной ранее питательной среде (рисунок 1).

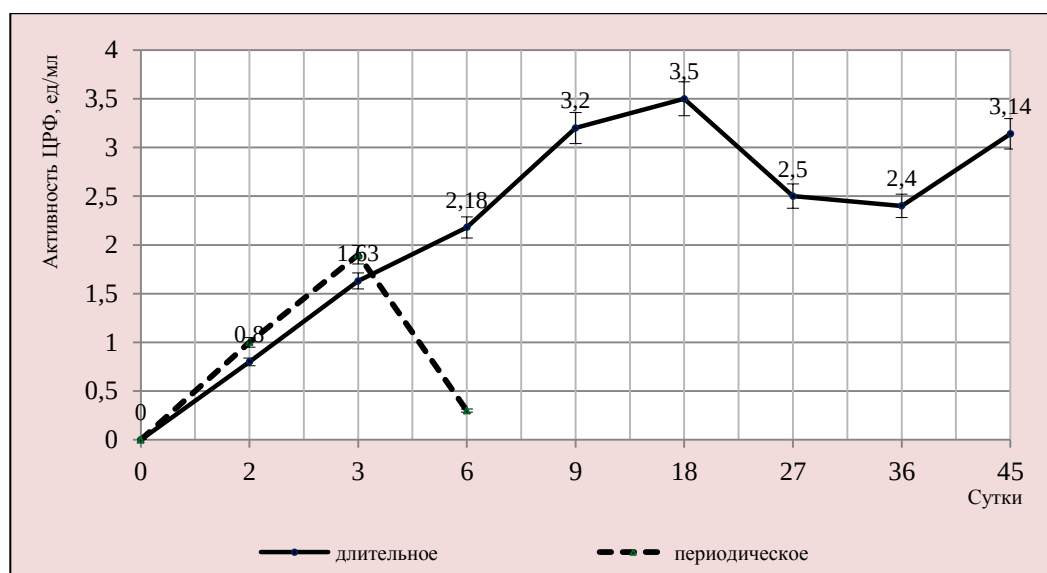


Рисунок 1 – Активность целлюлазы при длительном и периодическом культивировании *Aspergillus niger* 355

Иммобилизация культуры на подложке создает условия для непрерывного и длительного, на протяжении 45 суток, получения целевых ферментов. При проведении длительного культивирования установлено, что после 6-9 суток культивирования

наблюдается стабилизация в образовании ферментов. Наибольший биосинтез целлюлозоразрушающих ферментов наблюдается на 9, 18 и 45 сутки культивирования. Активность целлюлазы варьировала от 1,63 до 3,5 ед/мл (рисунок 1). При периодическом же культивировании полученной ассоциации максимум образования ферментов наблюдается на 3 сутки (1,63 ед/мл) с последующим падением активности к 5-6 суткам культивирования.

При длительном выращивании иммобилизованных микроорганизмов на подложке формируется множество различных вариантов, среди которых образуется и высокоактивный. Предпосылкой для формирования активного варианта являются стрессы, которые испытывает культура в процессе длительного культивирования. Это механическое повреждение гиф при удалении скапливающегося мицелия с подложки, условия смены питательной среды – с обедненной на полноценную, и сам процесс длительного культивирования. С ростом продуктивности иммобилизованной культуры появляется возможность выделения активных вариантов, обладающих повышенной ферментативной активностью.

Для выявления активного варианта *A. niger* 355 пробы исследовались на I этапе (6 сутки), II этапе (18 сутки) и III этапе (45 сутки) длительного культивирования. Пробы отбирались путем выщипывания клеток с иммобилизованной на подложке культуры. Всего отобрано 14 изолятов: на I этапе длительного культивирования отобрано 5, на II этапе – 4 и на III этапе – 5 изолятов. Ферментативная активность изолятов, выделенных на I этапе длительного культивирования составила $2,9 \pm 0,7$ - $3,3 \pm 1,2$ ед/мл. Ферментативная активность изолятов, выделенных на II этапе длительного культивирования составила $3,4 \pm 0,9$ - $3,7 \pm 1,1$ ед/мл и на III этапе - $2,2 \pm 0,5$ - $2,8 \pm 0,6$ ед/мл (таблица 1).

Таблица 1 – Ферментативная активность изолятов, полученных на разных этапах длительного культивирования *A. niger* 355

Изоляты		ЦРФ (ед/мл)
I этап	1-1	$3,1 \pm 1,2$
	1-2	$2,9 \pm 0,7$
	1-3	$3,0 \pm 0,6$
	1-4	$3,3 \pm 1,2$
	1-5	$3,1 \pm 0,7$
II этап	2-6	$3,4 \pm 0,9$
	2-7	$3,7 \pm 1,1$
	2-8	$3,6 \pm 0,6$
	2-9	$3,5 \pm 1,1$
III этап	5-10	$2,6 \pm 1,0$
	5-11	$2,8 \pm 0,6$
	5-12	$2,7 \pm 0,8$
	5-13	$2,2 \pm 0,5$
	5-14	$2,0 \pm 0,7$

Самую высокую ферментативную активность обнаружил изолят *A. niger* 355 2-7, выделенный во втором этапе длительного культивирования, ферментативная активность которого составила $3,7 \pm 1,1$ ед/мл.

Таким образом, в ходе селекции штамма *A. niger* 355 получен активный изолят *A. niger* 355 2-7, целлюлазная активность которого выше исходной культуры в 10,9 раз. В целом, хочется отметить, что примененный в данной работе метод иммобилизации прост и доступен. При его реализации отсутствуют факторы, повреждающие микробные клетки

и ингибирующие ферментативную активность, не затрудняется массообмен. Он даёт возможность разработки непрерывных биокаталитических технологий. Иммобилизация клеток интересна еще и тем, что микроорганизмы возвращаются в свое естественное прикрепленное состояние, изучение которого позволяет приблизиться к пониманию процессов, происходящих в природе.

Литература:

- 1 Н.В. Феоктистова, А.М. Марданова, М.Т. Лутфуллин, Л.М. Богомольная, М.Р. Шарипова Биопрепараты микробного происхождения в птицеводстве. *Ученые записки казанского университета*, 2018, 160: 395-418 (<https://cyberleninka.ru/article/n/biopreparaty-mikrobnogo-proishozhdeniya-v-ptitsevodstve>).
- 2 Knudsen K.E. Fiber and nonstarch polysaccharide content and variation in common crops used in broiler diets. *Poultry Science*, 2014, 93(9): 2380–2393 (doi.org/10.3382/ps.2014-03902).
- 3 Ravindran V., Son J.-H. Feed enzyme technology: Present status and future developments. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture*, 2011, 3(2): P. 102–109 (doi: 10.2174/2212798411103020102).
- 4 Adeola O., Cowieson A.J. Board-invited review: Opportunities and challenges in using exogenous enzymes to improve non-ruminant animal production. *Journal of Animal Sciences*, 2011, 89(10): P. 3189–3218 (doi: 10.2527/jas.2010-3715).
- 5 Manish P., Sonali M., Pradeep K., Hrudayanath T., Microbial cellulases – An update towards its surface chemistry, genetic engineering and recovery for its biotechnological potential. *Bioresource Technology*, 2021, 340: 125710 (doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125710).
- 6 Vaishnav N., Singh A., Adsul M., Dixit P. Penicillium: The next emerging champion for cellulase production. *Bioresource Technology Reports*, 2018, 2: P. 131-140 (doi.org/10.1016/j.biteb.2018.04.003).
- 7 Kubicek C., Messner R., Gruber F. The *Trichoderma* cellulase regulatory puzzle: From the interior life of a secretory fungus. *Enzyme and Microbial Technology*, 1993, 15(2): 90-99 (doi.org/10.1016/0141-0229(93)90030-6).
- 8 ГОСТ 32662-2012. Методы определения ферментной активности целлюлазы. Введ. 2014–01–01. М.: Межгос. совет по стандартизации, метрологии и сертификации. III, 9 с.
- 9 Гланц С. Медико-биологическая статистика. М., 1998.

Ж.Б. СУЛЕЙМЕНОВА¹, Р.К. БЛИЕВА¹, Н.А. БИСЬКО², А.С. ЖАКИПБЕКОВА^{1*},
Ж.Б. НАРМУРАТОВА³, М.Н. АХМЕТЖАНОВА⁴, А.К. КАЛИЕВА⁵

¹Микробиология және вирусология ғылыми – өндірістік орталығы, Алматы,
Қазақстан

²Н.Г. Холодный атындағы Ботаника институты, Киев, Украина

³Қ. Сәтбаев атындағы Қазақ ұлттық техникалық университеті, Алматы, Қазақстан

⁴Қазақ Ұлттық Аграрлық Зерттеу Университеті, Алматы, Қазақстан

⁵Қ.Жұбанов атындағы Ақтөбе өңірлік университеті, Ақтөбе, Қазақстан

*e-mail: aika90aiko@mail.ru

ASPERGILLUS ТЕКТЕС МИКРОМИЦЕТТЕРДІҢ ЦЕЛЛЮЛОЗА БИОСИНТЕЗІНЕ ҚАБІЛЕТТІЛІГІ БОЙЫНША СКРИНИНГІ

Түйін

Мақалада жем өндірісінде одан әрі пайдалану үшін *Aspergillus niger* 355 жоғары белсенді штаммының скринингі бойынша зерттеу нәтижелері берілген. Дақылды 45 күн бойы 26-28°C температурада бұрын оңтайландырылған коректік ортада өсірді. Өсіргеннен кейін 6-9 күннен кейін ферменттердің түзілуінің тұрақтануы байқалатыны анықталды. Целлюлозаны ыдырататын ферменттердің ең үлкен биосинтезі өсірудің 9, 18 және 45-ші күндерінде байқалады. Целлюлаза белсенділігі 1,63-тен 3,5 U/мл-ге дейін өзгерді.

Aspergillus niger 355-ті кезеңді түрде өсіру кезінде ферменттің максималды түзілуі 3-ші күні байқалды және 1,63 U/мл құрады, содан кейін белсенділіктің төмендеуі байқалады.

Кілтті сөздер: құрама жем, целлюлоза, *Aspergillus*, селекция, биосинтез

IRSTI: 62.09.39

ZH.B. SULEIMENOVA¹, R.K. BLIEVA¹, N.A. BISCO², A.S. ZHAKIPBEKOVA^{1*},
ZH.B. NARMURATOVA³, M.N. AKHMETZHANOVA⁴, A.K. KALIEVA⁵

¹Research and Production Center for Microbiology and Virology, Almaty, Kazakhstan

²N.G. Kholodny Institute of Botany, Kiev, Ukraine

³Satbayev University, Almaty, Kazakhstan

⁴Kazakh National Agrarian Research University, Almaty, Kazakhstan

⁵K. Zhubanov Aktobe Regional University, Aktobe, Kazakhstan

*e-mail: aika90aiko@mail.ru

SCREENING OF ASPERGILLUS FUNGUS FOR CELLULASE BIOSYNTHESIS

doi:10.53729/MV-AS.2022.03.06

Abstract

The article presents the results of a study on the screening of a highly active strain of *Aspergillus niger* 355 for further application in feed production. The culture was grown for 45 days at a temperature of 26-28°C on a previously optimized nutrient medium. It was found that after 6-9 days of cultivation, stabilization in enzymes biosynthesis was observed. The highest cellulase activity has been observed on the 9th, 18th and 45th days of fungal cultivation. Enzymatic activity varied from 1.63 to 3.5 U/ml.

In periodic cultivation of *Aspergillus niger* 355, the maximum enzymatic activity was observed on the 3rd day and was 1.63 U/ml, followed by a decrease in activity.

Key words: feed, cellulase, *Aspergillus*, selection, biosynthesis

The basis of feed for poultry is the seeds of grain and leguminous crops, which are the main sources of nutrients and energy [1]. However, grain feeds, along with nutritious and biologically active compounds, contain anti-nutritional substances: non-starchy polysaccharides,

phytates, inhibitors of digestive enzymes, glycosides, alkaloids, tannins, etc. These substances impair feed digestibility and reduce its conversion.

In the gastrointestinal tract of farm animals there are no enzymes that catalyze the degradation of fiber - the main non-starchy polysaccharide that is part of the feed and is an anti-nutritional factor. In the intestine, soluble fiber can form highly viscous gels that increase the volume and mass of chyme and slow down the rate of its passage, the penetration of enzymes and digestion, which leads to difficulty in the absorption of nutrients [2-4].

The most effective solution of the problem of degradation of plant residues that are difficult to hydrolyze and increasing digestibility and enriching feed with easily digestible carbon sources is the use of exogenous microbial enzymes. This contributes to the destruction of plant cell walls by hydrolyzing large molecules of non-starchy polysaccharides, which ultimately provides improving the digestibility of nutrients.

The most promising producers of cellulose-degrading enzymes are filamentous fungi *Aspergillus*, *Penicillium* and *Trichoderma* [5-7]. For a long time, the growth in the production of enzyme preparations was held back due to the lack of active strains of microorganisms. Therefore, the task of obtaining highly active strains of enzyme producers is a very important problem.

The aim of this study was to improve the enzymatic activity of microscopic fungus *Aspergillus niger* 355 - cellulase producer.

Materials and methods

The objects of research were the *A. niger* 355 strain from the collection of Research and Production Center for Microbiology and Virology. The work used standard microbiological and biochemical research methods. The initial culture was grown on an optimized Czapek medium containing (in g/l): sucrose – 10; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (0,15%) – 9; KCl – 0,5; MgSO_4 – 0,5; KH_2PO_4 – 1; FeSO_4 – 0,001; pectin - 1g / 100ml.

To identify the active variant formed on the substrate, isolates were selected at different periods of long-term cultivation, for which isolates were selected at stages I, II, and subsequent stages of cultivation associated with the frequency of removal of the mycelium from the substrate. Samples were taken by plucking mycelium from the surface and from the depth of the immobilized structure.

A cell suspension was prepared at a concentration of 170,000 conidia per 1ml for seeding on agar nutrient medium. The resulting suspension - fragments of mycelium, single cells and cells collected in chains, was filtered through a glass filter with multilayer sterile filter paper into a sterile test tube. The filtered suspension was diluted with sterile water to the required concentration in the ratio of 1:1000, 1:10000, 1:100000, 1:1000000 and sown on the agar medium in Petri dishes. 0.1 ml of a diluted suspension was added to each dish, which was triturated on the surface of the agar medium using a sterile spatula. Seeded cups were incubated for 3-6 days at 28-30°C. After incubation, the colonies grown on the plates were counted. The resulting variants were isolated in pure culture, which were then grown under periodic conditions for 3-4 days in a liquid nutrient medium. Cellulase activity was determined in the obtained culture liquid.

Determination of the activity of cellulose-degrading enzymes was carried out according to GOST 31662-2012 [8]. The method is based on the quantitative determination of reducing sugars formed by the action of enzymes of the cellulolytic complex on the sodium salt of carboxymethyl cellulose (Na-CMC). The content of reducing sugars formed as a result of the enzymatic reaction was determined by the spectrophotometric method with the dinitrosalicylic acid (DNS) reagent. Calculation of enzymatic activity was carried out according to the calibration curve constructed for glucose.

The DNS reagent with a mass fraction of 1% was prepared as follows: 10.0g of DNS was added to a beaker with a capacity of 1000 ml, 400 ml of distilled water was added and stirred on a magnetic stirrer for 25–30 min at room temperature. Then gradually, with constant stirring, 150

ml of sodium hydroxide solution (10.7% NaOH) was added. The color of the solution changes from light yellow to bright green. A beaker with the resulting solution was placed in a water bath at a temperature of $47 \pm 1^\circ\text{C}$ and gradually, in small portions, 300 g of potassium sodium tartrate was added. Stirring was continued until complete dissolution of the reagent. The solution was cooled with cold water to room temperature and made up to 1000 ml with distilled water.

The analysis was carried out in two parallel determinations. To determine the cellulase activity of one variant, three test tubes (2 experimental and one control) were taken, 1 ml of the substrate was added and thermostated at $50 \pm 1^\circ\text{C}$ for 5 minutes. Two test tubes were filled with 1 ml of the working solution of the enzyme preparation. The contents of the tubes were thoroughly mixed and all three tubes were kept at a temperature of $50 \pm 1^\circ\text{C}$ for 10 minutes. After hydrolysis, 3 ml of the DNS reagent were added to two test tubes, and 3 ml of the DNS reagent and 1 ml of the working solution of the preparation were added to the third test tube (control). The mixtures were then thoroughly mixed and placed in a boiling water bath for 5 min, after which they were cooled to room temperature. Optical densities of experimental and control samples were measured on a PD-303 UV spectrophotometer (Apel, Japan) at a wavelength of 540 nm against a control sample for reagents. The cellulolytic activity in the enzyme preparation was calculated by the formula:

$$CMCIA = \frac{C_0 + C_K}{t \cdot c}$$

where C_0 - is the molar concentration of glucose in the test sample, found from the calibration curve, $\mu\text{mol}/\text{cm}^3$;

C_K - is the molar concentration of glucose in the control sample, found from the calibration curve, $\mu\text{mol}/\text{cm}^3$;

T - is the duration of hydrolysis, min (10 min);

c - is the mass concentration of the enzyme preparation in the reaction mixture, g/cm^3 .

Statistical analysis was carried out according to the generally accepted criteria of variance-statistical analysis with the calculation of mean values (M), arithmetic mean error (m) using the Microsoft Excel, 2010 software package. The statistical significance of differences in mean values was assessed according to the standard method described by Glants [9]. Differences with $p < 0.05$ were considered statistically significant.

Results and discussion

In order to study the enzyme production ability of *A. niger* 355 at different stages of long-term cultivation, the producer was grown for 45 days at a temperature of $26-28^\circ\text{C}$ on a previously optimized nutrient medium (Figure 1).

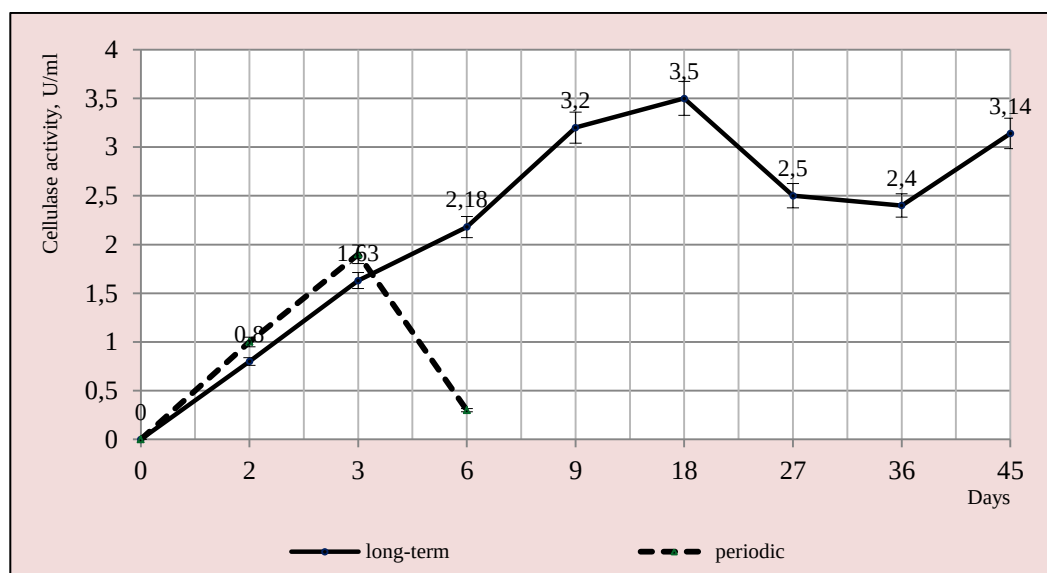


Figure 1 - Cellulase activity during long-term and periodic cultivation of *Aspergillus niger* 355

Immobilization of the culture on a substrate creates conditions for multiple production of target enzymes. During long-term cultivation, it was found that after 6-9 days stabilization in the enzyme biosynthesis was observed. The greatest enzymatic activity was observed on the 9th, 18th and 45th days of cultivation. Cellulase activity varied from 1.63 to 3.5 Units/ml (Figure 1). However, in periodic conditions, the maximum of enzyme biosynthesis was observed on the 3d day (1.63 U/ml), followed by a decrease in activity.

During long-term cultivation of immobilized microorganisms, many different variants are formed, among which a highly active one is formed. A prerequisite for the active variant formation is the stress experienced by the culture during long-term cultivation. These are mechanical damage to hyphae when the accumulating mycelium is removed from the substrate, the conditions for changing the nutrient medium. With an increase in the productivity of the immobilized culture, it becomes possible to select active variants with increased enzymatic activity.

To identify the active variant of *A. niger* 355, samples were taken at stage I (day 6), stage II (day 18) and stage III (day 45) of long-term cultivation. All samples were taken by plucking cells from a culture immobilized on a substrate. A total of 14 isolates were selected: 5 isolates were selected at the 1st stage of long-term cultivation, 4 at the 2nd stage, and 5 isolates at the 3rd stage. The enzymatic activity of the isolates isolated at the 1st stage of long-term cultivation was 2.9 ± 0.7 - 3.3 ± 1.2 U/ml. The enzymatic activity of isolates isolated at stage I of long-term cultivation was 3.4 ± 0.9 - 3.7 ± 1.1 U/ml, and at stage III cellulase activity was 2.2 ± 0.5 - 2.8 ± 0.6 Units/ml (Table).

Table 1 - Enzymatic activity of isolates obtained at different stages of long-term cultivation of *A. niger* 355

Isolates		Cellulase (U/ml)
1		2
I stage	1-1	3.1 ± 1.2
	1-2	2.9 ± 0.7
	1-3	3.0 ± 0.6
	1-4	3.3 ± 1.2
	1-5	3.1 ± 0.7

Table 1 continuation

	1	2
II stage	2-6	3,4±0,9
	2-7	3,7±1,1
	2-8	3,6±0,6
	2-9	3,5±1,1
III stage	5-10	2,6±1,0
	5-11	2,8±0,6
	5-12	2,7±0,8
	5-13	2,2±0,5
	5-14	2,0±0,7

The highest enzymatic activity was found by the *A. niger* 355 2-7 isolate, selected in the second stage of long-term cultivation 3.7±1.1 U/ml.

Thus, during the selection of the strain *A. niger* 355, an active isolate of *A. niger* 355 2-7 was obtained. The cellulase activity of obtained isolate was 10.9 times higher than the parental culture. In fact, immobilization method presented in this work is simple and affordable. During its implementation, there are no factors that damage microbial cells and inhibit enzymatic activity, mass transfer is not hindered. It enables the development of continuous biocatalytic technologies. Immobilization of cells is also interesting in that microorganisms return to their natural attached state, the study of which allows one to get closer to understanding the processes occurring in nature.

References:

- 1 N.V. Feoktistova, A.M. Mardanov, M.T. Lutfullin, L.M. Bogomolnaya, M.R. Sharipova Biopreparaty mikrobnogo proiskhozhdeniya v pticzevodstve. *Uchenye zapiski kazanskogo universiteta*, 2018, 160: 395-418 (<https://cyberleninka.ru/article/n/biopreparaty-mikrobnogo-proishozhdeniya-v-ptitsevodstve>).
- 2 Knudsen K.E. Fiber and nonstarch polysaccharide content and variation in common crops used in broiler diets. *Poultry Science*, 2014, 93(9): 2380–2393 (doi.org/10.3382/ps.2014-03902).
- 3 Ravindran V., Son J.-H. Feed enzyme technology: Present status and future developments. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture*, 2011, 3(2): P. 102–109 (doi: 10.2174/2212798411103020102).
- 4 Adeola O., Cowieson A.J. Board-invited review: Opportunities and challenges in using exogenous enzymes to improve non-ruminant animal production. *Journal of Animal Sciences*, 2011, 89(10): P. 3189–3218 (doi: 10.2527/jas.2010-3715).
- 5 Manish P., Sonali M., Pradeep K., Hrudayanath T., Microbial cellulases – An update towards its surface chemistry, genetic engineering and recovery for its biotechnological potential. *Bioresource Technology*, 2021, 340: 125710 (doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125710).
- 6 Vaishnav N., Singh A., Adsul M., Dixit P. Penicillium: The next emerging champion for cellulase production. *Bioresource Technology Reports*, 2018, 2: P. 131-140 (doi.org/10.1016/j.biteb.2018.04.003).
- 7 Kubicek C., Messner R., Gruber F. The *Trichoderma* cellulase regulatory puzzle: From the interior life of a secretory fungus. *Enzyme and Microbial Technology*, 1993, 15(2): 90-99 (doi.org/10.1016/0141-0229(93)90030-6).
- 8 GOST 32662-2012. Metody opredeleniya fermentnoj aktivnosti czellyulazy. Vved. 2014–01–01. M.: Mezghos. sovet po standartizaczii, metrologii i sertifikaczii. III, 9s.
- 9 Glancz S. Mediko-biologicheskaya statistika. M., 1998.