

Biosinteza komponenti antifungalnog delovanja prema *Aspergillus* spp. primenom *Streptomyces hygroscopicus*

Jelena M. Dodić¹, Zorana Z. Rončević¹, Jovana A. Grahovac¹, Bojana Ž. Bajić¹, Olivera S. Korolija²

¹Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet, Novi Sad, Srbija

²Hemofarm a.d., Vršac, Srbija

Izvod

Tokom skladištenja jabuka dolazi do njihovog propadanja usled infekcija izazvanih fitopatogenim gljivama. U zaštiti bilja sve više se koriste biološki preparati kako bi se smanjili štetni efekti primene hemijskih sredstava. Cilj ovog rada je optimizacija sastava podloge za proizvodnju antifungalnih agenasa primenom soja *Streptomyces hygroscopicus*. Antifungalno delovanje kultivacione tečnosti prema *Aspergillus* spp. procenjeno je, *in vitro*, difuzionom disk metodom. Izvršena je optimizacija sastava hranljive podloge i definisano je da pri početnim sadržajima glukoze, sojinog brašna i fosfata od 47,77, 24,54 i 0,98 g/l, redom, kultivaciona tečnost formira najveću zonu prosvetljenja (40,93 mm). Pored toga, urađena je i optimizacija sa dodatnim ciljem minimizacije utroška sastojaka hranljive podloge što omogućava dalju tehnno-ekonomsku analizu procesa u industrijskim uslovima.

Ključne reči: *Aspergillus* spp., antifungalna jedinjenja, *Streptomyces hygroscopicus*, optimizacija podloge.

Dostupno na Internetu sa adrese časopisa: <http://www.ache.org.rs/HI/>

Jabuka je jedna od najzastupljenijih voćnih vrsta u svetu i njeni plodovi su dostupni na tržištu tokom cele godine. Zaštita plodova jabuke od prouzrokovaca truleži, obavlja se u voćnjaku, najkasnije dve nedelje pre berbe, dok se tretiranja prilikom i u toku skladištenja ne primenjuju zbog karence i nedostatka zdravstveno bezbednih preparata. Razvoj novih biofungicida omogućio bi zaštitu plodova jabuke i tokom skladištenja što bi imalo pozitivan efekat kako sa zdravstvenog tako i sa ekonomskog aspekta [1,2].

Vrste roda *Aspergillus*, pored vrsta rodova *Alternaria*, *Fusarium*, *Colletotrichum* i *Penicillium*, predstavljaju izazivače bolesti jabuka [3]. Posledice inficiranja jabuka ovim fitopatogenima su truljenje, pigmentacija, promena boje, mirisa i ukusa. S obzirom da tokom patogeneze *Aspergillus* vrste proizvode različite mikotoksine, najveći problem infekcije je akumulacija toksičnih proizvoda njihovog metabolizma u plodovima jabuke. Proizvodi dobijeni preradom kontaminiranih jabuka su, takođe, izvor mikotoksina jer je veliki broj njih stabilan u ovim procesima [4,5]. Zbog toga je veoma značajno zaštititi jabuke od infekcija izazvanih *Aspergillus* vrstama.

U zaštiti bilja dominiraju hemijske mere borbe, odnosno korišćenje hemijskih sredstava ili pesticida. Primene klasičnih pesticida imaju za posledicu kontaminaciju proizvoda, zagađenje životne sredine, poremećaj prirodne ravnoteže i izumiranje nekih živih orga-

nizama u ekosistemu. U cilju očuvanja prirodne ravnoteže i proizvodnje zdravije hrane, vrši se supstitucija klasičnih agrohemijskih sa prirodnim proizvodima koji su ekološki prihvatljivi, a poseduju pesticidne osobine [6,7]. Mikroorganizmi su glavni izvori bioaktivnih agenasa. Proizvodi njihovog metabolizma štite biljke delujući antagonistički na izazivače bolesti pri čemu su bezopasni za ljude i ekološki bezbedni [8]. Poznati biotehnološki procesi imaju veliki potencijal za proizvodnju jedinjenja sa antifungalnim delovanjem. U dosadašnjim istraživanjima kao proizvodni mikroorganizam često su primenjivane bakterije roda *Streptomyces* [9]. One mogu da sintetišu veliki broj agenasa sa antagonističkim delovanjem prema fitopatogenim *Aspergillus* vrstama [9–14]. S obzirom na to da su pomenute komponente sekundarni proizvodi metabolizma streptomoceta, veoma je važno formulisati sastav hranljive podloge tako da se favorizuje njihova sinteza uz ograničen rast biomase. Varijacije u sastavu hranljive podloge i procesnih uslova značajno utiču na to koja će antifungalna komponenta biti sintetisana, ali i na njen prinos. Stoga su pravilan izbor izvora ugljenika, azota, fosfata i mineralnih soli i tačno definisanje njihovih koncentracija, kao i vrednosti pH, temperature i trajanja procesa veoma bitni za povećanje prinosa željenog biofungicida [15,16].

Klasičan pristup eksperimentalnom radu podrazumeva ispitivanje uticaja pojedinačnih faktora na neki proces. Iako ova tehnika zahteva dosta napora i vremena, najveći nedostatak njene primene je što ne obuhvata interakcije faktora te stoga ne prikazuje ukupan uticaj faktora na proces. Navedeni nedostaci mogu se eliminisati statističkim planiranjem eksperimenata [17].

NAUČNI RAD

UDK 634.11–156.3:66

Hem. Ind. 69 (2) 201–208 (2015)

doi: 10.2298/HEMIND130416009D

Prepiska: Z. Rončević, Tehnološki fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Bulevar cara Lazara 1, 21000 Novi Sad, Srbija.

E-pošta: ron@uns.ac.rs

Rad primljen: 16. april, 2013

Rad prihvaćen: 5. februar, 2014

Postupak odzivne površine (RSM – *response surface methodology*) je poslednjih godina postao najpopularnija tehnika za kreiranje eksperimentalnog plana, modelovanje i opisivanje interakcija velikog broja faktora zbog čega je posebno pogodan za rešavanje optimizacionih problema. Budući da na mikrobiološku proizvodnju antifungalnih komponenti utiče veliki broj faktora, obično je veoma teško utvrditi koji od njih ima najveći uticaj. Stoga se RSM sve više primenjuje za optimizaciju biotehnoloških procesa proizvodnje ovih komponenti [18,19].

Cilj ovog rada je optimizacija sastava hranljive podloge, u pogledu sadržaja glukoze, sojinog brašna i fosfata, za proizvodnju agenasa sa antifungalnim delovanjem prema *Aspergillus* spp. Za biosintezu upotrebljen je soj *Streptomyces hygroscopicus* izolovan iz prirodnog okruženja.

EKSPERIMENTALNI DEO

Mikroorganizmi

Za ispitivanje antifungalne aktivnosti, kao test mikroorganizmi, primenjene su dve vrste fitopatogenih gljiva, *Aspergillus oryzae* i *Aspergillus niger*, koje su izolovane sa plodova jabuka sa simptomima truljenja. Za biosintezu antifungalnih komponenti upotrebljen je soj *Streptomyces hygroscopicus* izolovan iz uzorka zemljišta sa područja Novog Sada, Srbija, koji je identifikovan na osnovu morfoloških i fizioloških karakteristika [20,21]. Svi korišćeni mikroorganizmi čuvaju se u zbirci kultura laboratorije za biohemijsko inženjerstvo, Tehnološkog fakulteta, Novi Sad, Srbija.

Hranljive podloge

Za umnožavanje proizvodnog mikroorganizma koriste se hranljive podloge čiji sastav omogućava maksimalan rast biomase. U okviru ovog istraživanja za pripremu inokuluma korišćena je hranljiva podloga sledećeg sastava (g/l): glukoza (15,0), sojino brašno (10,0), CaCO₃ (3,0), NaCl (3,0), MgSO₄ (0,5), (NH₄)₂HPO₄ (0,5) i K₂HPO₄ (1,0).

U skladu sa definisanim ciljem rada i eksperimentalnim planom za biosintezu antifungalnih komponenti korišćeno je više podloga u kojima su varirani sadržaji glukoze (10, 30 i 50 g/l), sojinog brašna (5, 15 i 25 g/l) i fosfata (0,5, 1,5 i 2,5 g/l). Fosfati su dodati u obliku (NH₄)₂HPO₄ i K₂HPO₄ u odnosu 1:2. Ostale komponente podloge su (g/l): CaCO₃ (3,0), NaCl (3,0) i MgSO₄ (0,5).

Vrednost pH hranljivih podloga korigovana je na 7,2 ± 0,1. Sterilizacija pripremljenih podloga je izvedena u autoklavu pri temperaturi od 121 °C i pritisku od 2,1 bar u trajanju od 20 min.

Priprema inokuluma

Proizvodni mikroorganizam iz zbirke kultura osvežen je na agarizovanoj podlozi odgovarajućeg sastava, u aerobnim uslovima, stacionarnom kultivacijom, na temperaturi od 27 °C (mikrobiološki laboratorijski termostat), u toku 48 h. Osvežena kultura umnožena je postupkom dvostrukog pasažiranja u količini dovoljnoj za inokulaciju podloge za biosintezu. Druga pasaža zasejana je sa 10 zapr.% inokuluma proizvedenog prvim pasažiranjem. Inkubiranje svake pasaže izvedeno je u aerobnim uslovima, uz eksterno mešanje (laboratorijska tresilica, 150 o/min), na temperaturi od 27 °C u toku 48 h.

Uslovi biosinteze

Eksperimenti su izvedeni u erlenmajerima radne zapremine 100 ml. Hranljive podloge za biosintezu inokulisane su sa 10 zapr.% inokuluma pripremljenog po opisanom postupku. Biosinteza antifungalnih komponenti u trajanju od 7 dana izvedena je u aerobnim uslovima pri temperaturi od 27 °C i brzini mešanja 150 o/min, koja je obezbeđena postavljanjem erlenmajera na mikrobiološku laboratorijsku tresilicu u termostatu.

Analitičke metode

Po završenoj biosintezi kultivacione tečnosti su centrifugirane pri 10000g u trajanju od 10 min (Eppendorf Centrifuge 5804, Germany). U skladu sa zahtevima planiranih analiza u daljem radu korišćen je supernatant kultivacione tečnosti.

Sadržaj šećera određen je metodom po Mileru [22], dok je za određivanje sadržaja ukupnog azota korišćena metoda po Kjeldalu [23].

Ispitivanje antifungalnog delovanja

Biosinteza komponenti antifungalnog delovanja prema *Aspergillus oryzae* i *Aspergillus niger* ispitana je, *in vitro*, difuzionom disk metodom [24]. Test mikroorganizmi su osveženi na podlozi na kojoj se uobičajeno gaje *Aspergillus* vrste (Sabouraud maltozni agar), a zatim je nekoliko kolonija osveženih kultura suspendovano u 10 ml sterilnog fiziološkog rastvora. Ove suspenzije su razblaživane do postizanja koncentracije od 10⁵ spora/ml. Sterilna komercijalna podloga temperirana je na 50 °C nakon čega je u nju dodata suspenzija spora test mikroorganizma u odnosu 9:1. Nakon želiranja podloga u Petri pločama postavljeni su sterilni diskovi (HiMedia, India) na koje je nanošeno po 10 µl prethodno koncentrovanih uzoraka. Koncentrovanje uzoraka izvedeno je njihovim uparavanjem na deseti deo mase rotacionim vakuum uparivačem (Ika-werke, Staufen) na 45 °C. Inokulisane Petri ploče inkubirane su 48 h na 30 °C nakon čega je odgovarajućim lenjirom (HiAntibiotic ZoneScale, Himedia®) izmeren prečnik nastalih zona prosvetljenja.

Plan eksperimenta i obrada podataka

Izbor odgovarajućeg eksperimentalnog plana ključan je korak u primeni postupka odzivne površine [25]. U okviru ovih istraživanja korišćen je Box–Behnken eksperimentalni plan sa tri faktora na tri nivoa i tri ponavljanja u centralnoj tački. U tabeli 1 prikazan je Box–Behnken plan eksperimenta i varirane vrednosti sadržaja glukoze, sojinog brašna i fosfata koje su korišćene u ovom radu.

Za opis odzivne funkcije Y (prečnik zone prosvetljene prema *Aspergillus* spp. (mm), rezidualni sadržaj glukoze (g/l), rezidualni sadržaj ukupnog azota (g/l)) primenjen je polinom drugog reda:

$$Y = b_0 + \sum b_i X_i + \sum b_{ii}^2 X_{ii}^2 + \sum b_{ij} X_i X_j \quad (1)$$

gde je b_0 odsečak, b_i linearni koeficijent, b_{ii} kvadratni koeficijent, a b_{ij} koeficijent interakcije.

Vrednosti odziva prečnika zone prosvetljenja prema *Aspergillus* spp. koje su primenjene za modelovanje predstavljaju srednje vrednosti dobijene iz tri ponovljena eksperimenta za oba ispitivana test mikroorganizma.

Statistička obrada eksperimentalnih podataka i crtanje odzivnih površina urađeni su primenom softverskog paketa Statistica 12.0. Značajnost uticaja svakog od faktora kao i njihovih interakcija određivana je poređenjem p -vrednosti za svaki od koeficijenata u regresionoj jednačini. Odzivne površine su crtane tako što je jedan od faktora imao konstantnu vrednost iz centra plana, dok su preostala dva faktora varirana. Za optimizaciju faktora primenjena je metoda željene funkcije, a rađena je u softverskom paketu Design-Expert 8.1.

REZULTATI I DISKUSIJA

Statistička obrada podataka

U skladu sa definisanim ciljem rada i eksperimentalnim planom formulisane su podloge za biosintezu antifungalnih komponenti. Na osnovu podataka prikupljenih iz dostupne naučne literature odabrane su najveća, srednja i najmanja vrednost faktora X_1 , X_2 i X_3 , odnosno sadržaja glukoze (10, 30 i 50 g/l), sadržaja sojinog brašna (5, 15 i 25 g/l) i sadržaja fosfata (0,5, 1,0 i 2,5 g/l), redom. Rezultati eksperimenata baziranih na Box–Behnken dizajnu fitovani su polinomom drugog reda. Kao odzivi definisani su prečnik zone prosvetljenja prema *Aspergillus* spp. (Y_1), rezidualni sadržaj glukoze (Y_2) i rezidualni sadržaj ukupnog azota (Y_3). Rezultati fitovanih odabranih odziva polinomom drugog reda prikazani su u tabelama 2 i 3.

Za procenu statističke značajnosti svakog od koeficijenata regresione jednačine koristi se p -vrednost. Regresioni koeficijenti, pri nivou značajnosti od 95%, su značajni ukoliko je njihova p -vrednost manja od 0,05 i takvi su u tabeli 2 naglašeni masnim slovima.

U tabeli 3 prikazani su rezultati analize varijanse modelovanih odziva. Relativno visoke vrednosti (veće od 0,900) koeficijenta determinacije (R^2) ukazuju na veoma dobro fitovanje eksperimentalnih rezultata polinomom drugog reda. Modeli polinoma drugog reda svih posmatranih odziva su značajni pri nivou značajnosti od 95% što potvrđuju F -vrednosti od 53,24, 66,99 i 309,92 za prečnik zone prosvetljenja prema *Aspergillus* spp., rezidualni sadržaj šećera i rezidualni sadržaj ukupnog azota, redom.

Tabela 1. Box–Behnken plan eksperimenta i varirane vrednosti parametara

Table 1. Box–Behnken experimental plan and varied values of factors

Redni broj eksperimenta	Kodirane vrednosti			Varirane vrednosti, g/l, za:		
	X_1	X_2	X_3	Glukoza	Sojino brašno	Fosfati
1	–1	–1	0	10	5	1,5
2	1	–1	0	50	5	1,5
3	–1	1	0	10	25	1,5
4	1	1	0	50	25	1,5
5	–1	0	–1	10	15	0,5
6	1	0	–1	50	15	0,5
7	–1	0	1	10	15	2,5
8	1	0	1	50	15	2,5
9	0	–1	–1	30	5	0,5
10	0	1	–1	30	25	0,5
11	0	–1	1	30	5	2,5
12	0	1	1	30	25	2,5
13	0	0	0	30	15	1,5
14	0	0	0	30	15	1,5
15	0	0	0	30	15	1,5

Tabela 2. Koeficijenti regresione jednačine i njihova značajnost za prečnik zone prosvetljenja prema *Aspergillus* spp. (Y_1), rezidualni sadržaj glukoze (Y_2) i rezidualni sadržaj ukupnog azota (Y_3)Table 2. Regression equation coefficients and their significance for inhibition zone diameter for *Aspergillus* spp. (Y_1), residual glucose (Y_2) and residual nitrogen (Y_3)

Odzivi Efekti	Y_1		Y_2		Y_3	
	Koeficijent	<i>p</i> -vrednost	Koeficijent	<i>p</i> -vrednost	Koeficijent	<i>p</i> -vrednost
Odsečak						
b_0	-0,7812	0,9522	6,4287	0,4435	0,0536	0,5810
Linearni						
b_1	1,0688	0,0576	-0,1902	0,5149	0,0123	0,0121
b_2	-3,0625	0,5131	0,3469	0,5511	-0,0050	0,4678
b_3	27,6249	0,0247	-11,4653	0,0885	0,1292	0,0993
Kvadratni						
b_{11}	-0,0147	0,0551	0,0181	0,0044	-0,00019	0,0066
b_{22}	-0,5938	0,3603	-0,0016	0,9165	0,00099	0,0022
b_{33}	-7,6250	0,0232	3,3102	0,0744	-0,03457	0,1025
Interakcije						
b_{12}	0,1938	0,0189	-0,0223	0,0254	-0,00001	0,8786
b_{13}	-0,2750	0,0596	0,1700	0,0613	-0,00092	0,3192
b_{23}	0,2500	0,8341	-0,0899	0,5528	-0,00079	0,6540

Tabela 3. Analiza varijanse (ANOVA) modelovanih odziva: prečnik zone prosvetljenja prema *Aspergillus* spp. (Y_1), rezidualni sadržaj glukoze (Y_2) i rezidualni sadržaj ukupnog azota (Y_3); DF – stepen slobode; SS – suma kvadrata; MS – srednja vrednost kvadrataTable 3. Analysis of variance (ANOVA) of the modelled responses: inhibition zone diameter for *Aspergillus* spp. (Y_1), residual glucose (Y_2) and residual nitrogen (Y_3); DF – degree of freedom, SS – sum of squares, MS – mean squares

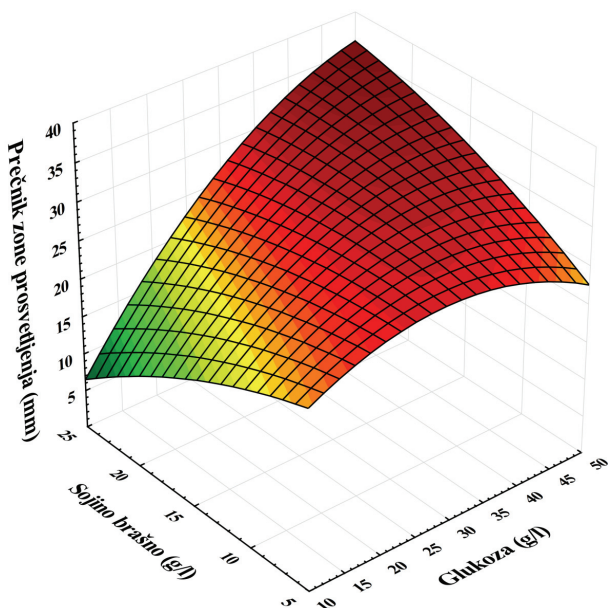
Odziv	Poreklo						F	<i>p</i> -vrednost	R^2
	Rezidual			Model					
	DF	SS	MS	DF	SS	MS			
Y_1	5	102,75	20,55	10	10940,25	1094,025	53,24	0,000191	0,919
Y_2	5	39,99	7,99	10	5358,29	535,829	66,99	0,000109	0,962
Y_3	5	0,0055	0,0011	10	3,43	0,343	309,92	0,000002	0,989

Kako bi se razumele interakcije faktora koji utiču na biosintezu antifungalnih komponenti nacrane su odzivne površine (slike 1–3). Svaka od njih prikazuje modelom predviđen uticaj dva faktora na proces pri konstantnoj vrednosti trećeg. Sa odzivnih površina moguće je proceniti optimalne vrednosti faktora pri kojima se sintetišu komponente sa najvećim antifungalnim delovanjem [18].

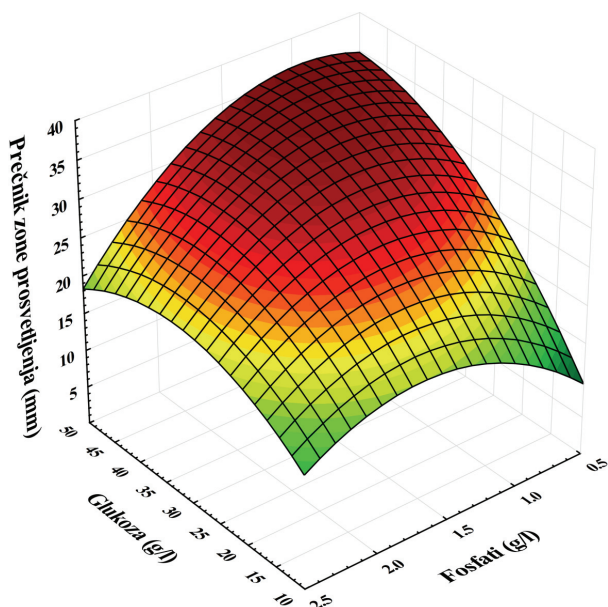
Slika 1 ilustruje modelom predviđen uticaj početnog sadržaja glukoze i sojinog brašna na prečnik zone prosvetljenja prema *Aspergillus* spp. pri konstantnom sadržaju fosfata (1,5 g/l). Analizom prikazanih rezultata se uočava da pri malom početnom sadržaju glukoze porast sadržaja sojinog brašna negativno utiče na sintezu antifungalnih agenasa. Razlog za to je usmeravanje metabolizma proizvodnog mikroorganizma ka sintezi biomase u slučaju prisustva veće količine izvora azota. Kada je rast biomase limitiran dodatkom malih količina sojinog brašna, dalje povećanje sadržaja glukoze nije pokazalo značajan uticaj na produkciju antifungalnih agenasa. Međutim, pri većim početnim sadržajima izvo-

ra azota (15–25 g/l) povećanje sadržaja glukoze značajno utiče na posmatrani odziv. Sinergistički efekat sadržaja glukoze i sojinog brašna, na koji ukazuje pozitivan koeficijent interakcije $b_{1,2}$ (tabela 2), ogleđa se u porastu prečnika zone prosvetljenja pri većim sadržajima obe komponente. U podlogama sa velikim početnim koncentracijama izvora ugljenika i azota za kratko vreme dostiže se maksimalan rast biomase, nakon čega se metabolizam mikroorganizma usmerava ka produkciji većih količina antifungalnih komponenti. Maksimalan prečnik zone prosvetljenja od oko 35 mm predviđen je u opsegu početnog sadržaja glukoze 45–50 g/l i sojinog brašna 20–25 g/l.

Na slici 2 prikazan je modelom predviđen uticaj početnog sadržaja glukoze i fosfata na prečnik zone prosvetljenja prema odabranom test mikroorganizmu pri sadržaju sojinog brašna od 15 g/l. Pri početnim koncentracijama fosfata 1,5–2,5 g/l, bez obzira na sadržaj šećera, ne dolazi do intenzivne produkcije antifungalnih komponenti jer se u podlogama sa visokim sadržajem fosfata intenzivira rast biomase. Na osnovu pri-



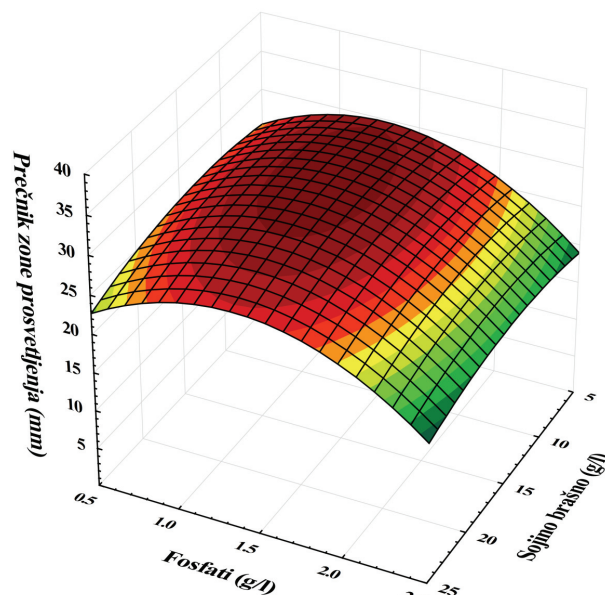
Slika 1. Uticaj početnog sadržaja glukoze i sojinog brašna na prečnik zone prosvetljenja prema *Aspergillus* spp. pri konstantnoj vrednosti sadržaja fosfata (1,5 g/l).
Figure 1. The effects of initial content of glucose and soybean meal on inhibition zone diameter for *Aspergillus* spp. at constant value of phosphates (1.5 g/l).



Slika 2. Uticaj početnog sadržaja glukoze i fosfata na prečnik zone prosvetljenja prema *Aspergillus* spp. pri konstantnoj vrednosti sadržaja sojinog brašna (15 g/l).
Figure 2. The effects of initial content of glucose and phosphates on inhibition zone diameter for *Aspergillus* spp. at constant value of soybean meal (15 g/l).

kazane odzivne površine uočava se da promena početnog sadržaja glukoze značajno utiče na biosintezu komponenti sa antifungalnim delovanjem ako je početni sadržaj fosfata u hranljivoj podlozi 0,5–1,5 g/l. Pri malim vrednostima sadržaja fosfata posmatrani odziv

se intenzivira sa porastom sadržaja glukoze. Antagonistički efekat posmatranih faktora potvrđuje i negativna vrednost koeficijenta interakcije $b_{1,3}$ (tabela 2). Maksimalan prečnik zone prosvetljenja od oko 35 mm modelom je predviđen u opsegu početnog sadržaja šećera 45–50 g/l i fosfata 0,5–1,5 g/l.



Slika 3. Uticaj početnog sadržaja sojinog brašna i fosfata na prečnik zone prosvetljenja prema *Aspergillus* spp. pri konstantnoj vrednosti sadržaja glukoze (30 g/l).
Figure 3. The effects of initial content of soybean meal and phosphates on inhibition zone diameter for *Aspergillus* spp. at constant value of glucose (30 g/l).

Slika 3 prikazuje predikciju prečnika zone prosvetljenja prema *Aspergillus* spp. pri konstantnom sadržaju glukoze (30 g/l) i variranim sadržajima sojinog brašna i fosfata. Na osnovu prikazanih rezultata jasno se zapaža da je posmatrani odziv ujednačen u celokupnom ispitanoj opsegu početnog sadržaja sojinog brašna, dok promena početnog sadržaja fosfata u manjoj meri utiče na sintezu komponenti antifungalnog dejstva. Dobijeni rezultati ukazuju da interakcija ova dva faktora, pri konstantnom sadržaju izvora ugljenika, nema veliki uticaj na sintezu antifungalnih agenasa. Maksimalan prečnik zone prosvetljenja od oko 30 mm prema predviđanjima modela je postignut pri početnom sadržaju sojinog brašna 5–15 g/l i fosfata 1,0–1,5 g/l.

Optimizacija sastava podloge

Krajnji cilj primene postupka odzivne površine je optimizacija željenog procesa tako da razvijeni modeli mogu biti korišćeni za simulaciju i optimizaciju. Za optimizaciju procesa sa dva ili više odziva najčešće se koristi koncept željene funkcije. Iako je ova metoda poznata više od dvadeset godina njena primena je bila ograničena usled nepostojanja softverskih paketa koji objedinjuju dizajn eksperimenta, regresionu analizu i

optimizaciju. Program Design-Expert objedinjuje ove korake u opšti nelinearni algoritam. Generalni pristup sastoji se u konvertovanju individualnih odziva u individualne željene funkcije čije vrednosti se kreću od 0 do 1. Vrednost individualne željene funkcije „0“ predstavlja najlošiju vrednost, dok vrednost „1“ predstavlja najbolju vrednost posmatranog odziva. Ukupna željena funkcija jednaka je geometrijskoj sredini pojedinačnih željenih funkcija [25].

Za određivanje optimalnog početnog sadržaja glukoze, sojinog obezmašćenog brašna i fosfata u podlozi za proizvodnju antifungalnih komponenti primenjena je metoda željene funkcije. U zavisnosti od posmatranih odziva kao rezultat optimizacije dobijene su najveće moguće vrednosti ukupne željene funkcije sa ograničenjima definisanih minimizacijom ili maksimizacijom nekih od faktora i odziva, kao što je prikazano u tabeli 4.

Ako se kao jedini cilj optimizacije definiše postizanje najvećeg mogućeg prečnika zone prosvetljenja prema *Aspergillus* spp. (prvi set), koji je direktni pokazatelj količine sintetisanih antifungalnih komponenti, vrednost željene funkcije ima najveću vrednost (1,00) pri početnim sadržajima glukoze, sojinog brašna i fosfata od 47,77, 24,54 i 0,98 g/l, redom. Primenom hranjive podloge sa ovako definisanim početnim sadržajima nutrijenata model predviđa formiranje zone prosvetljenja prečnika 40,93 mm. Značajna je činjenica da je pri ovim uslovima predviđeni rezidualni sadržaj glukoze izuzetno visok i iznosi 19,36 g/l, a rezidualni sadržaj ukupnog azota 0,69 g/l.

Neiskorišćeni nutrijenti predstavljaju gubitke u ekonomskom smislu. Pored toga, otpadne vode ovakvog sastava nose značajno organsko opterećenje te stoga moraju da prođu zahtevan postupak obrade pre nego

što se ispuste u životnu sredinu što poskupljuje proizvodni proces. Stoga su, pored postizanja najveće antifungalne aktivnosti kultivacione tečnosti, kao dodatne pojedinačne željene funkcije u drugom setu optimizacije zadate i minimizacija neiskorišćene glukoze i ukupnog azota. Pri ovim pojedinačnim željenim funkcijama, maksimalna vrednost ukupne željene funkcije iznosi 0,85 za početne sadržaje glukoze 24,11 g/l, sojinog brašna 5,00 g/l i fosfata 1,37 g/l. Pri navedenom sastavu hranjive podloge modelom predviđena zona prosvetljena, kao pokazatelj antifungalne aktivnosti, iznosi 32,26 mm, a rezidualni sadržaji glukoze i ukupnog azota 1,21 i 0,31 g/l, respektivno. Poređenjem rezultata prva dva seta optimizacije (tabela 4) zapaža se da se smanjenjem utroška glukoze za 49,53% i sojinog brašna za 79,62% i povećanjem utroška fosfata za 39,80% prečnik zone prosvetljenja smanji za 21,18%. Pri tome u kultivacionom medijumu zaostaju veoma male količine neu-trošenih nutrijenata.

Cena sastojaka hranjive podloge učestvuje u ukupnim troškovima izvođenja biotehnoške proizvodnje sa značajnim udelom. Stoga su u trećem setu optimizacije kao uslovi, pored postizanja maksimalne zone prosvetljenja, definisani minimalan početni sadržaj glukoze, sojinog brašna i fosfata. Maksimalna vrednost ukupne željene funkcije od 0,78, ostvaruje se pri početnom sadržaju glukoze od 18,05 g/l, sojinog brašna od 5,00 g/l i fosfata od 0,87 g/l. Nakon biosinteze u kultivacionoj tečnosti, koja stvara zonu prosvetljenja prema *Aspergillus* spp. prečnika 27,72 mm, zaostaje sadržaj glukoze od 2,59 g/l i ukupnog azota od 0,28 g/l. Ovako definisani uslovi podrazumevaju manji utrošak glukoze za 25,13%, isti utrošak sojinog brašna i manji utrošak fosfata za 36,50% u odnosu na drugi set optimizacije

Tabela 4. Optimalne vrednosti ispitivanih parametara i predviđeni odzivi
Table 4. Optimized values of examined factors and predicted responses

Promenljive i odzivi	Prvi set		Drugi set	
	Zadata ograničenja	Procenjene vrednosti	Zadata ograničenja	Procenjene vrednosti
Glukoza, g/l	U opsegu	47,77	u opsegu	24,11
Sojino brašno, g/l	U opsegu	24,54	u opsegu	5,00
Fosfati, g/l	U opsegu	0,98	u opsegu	1,37
Prečnik zone prosvetljenja, mm	Max	40,93	max	32,26
Rezidualna glukoza, g/l	U opsegu	19,36	min	1,21
Rezidualni ukupan azot, g/l	U opsegu	0,69	min	0,31
Ukupna željena funkcija		1,00		0,85
	Treći set		Četvrti set	
Glukoza, g/l	Min	18,05	min	13,56
Sojino brašno, g/l	Min	5,00	min	5,00
Fosfati, g/l	Min	0,87	min	1,02
Prečnik zone prosvetljenja, mm	Max	27,72	max	26,70
Rezidualna glukoza, g/l	U opsegu	2,59	min	1,08
Rezidualni ukupan azot, g/l	U opsegu	0,28	min	0,26
Ukupna željena funkcija		0,78		0,83

dok je predviđeni prečnik zone prosvetljenja manji za 14,07%.

Sa ciljem definisanja sastava hranljive podloge pri kojem bi se ostvarila najveća ekonomičnost procesa proizvodnje komponenti sa antifungalnim delovanjem prema *Aspergillus* spp. postavljeni su sledeći uslovi: minimalan početni i rezidualni sadržaj ispitivanih nutrijenata uz ostvarenje najvećeg mogućeg prečnika zone prosvetljenja (četvrti set). Vrednosti variranih faktora, pri kojima je ovako definisana željena funkcija maksimalna (0,83), su početni sadržaj glukoze od 13,56 g/l, početni sadržaj sojinog brašna od 5,00 g/l i početni sadržaj fosfata od 1,02 g/l. Pri ovim uslovima, predviđene vrednosti odziva su sledeće: prečnik zone prosvetljenja od 26,70 mm, rezidualni sadržaj glukoze od 1,08 g/l i rezidualan sadržaj ukupnog azota od 0,26 g/l.

Dobijeni rezultati ukazuju da se ušteda sastojaka hranljive podloge može ostvariti limitiranjem izvora azota (sadržaj sojinog brašna u drugom, trećem i četvrtom setu iznosi 5 g/l). Na ovaj način se sprečava prekomerno umnožavanje biomase pa su stoga potrebe proizvodnog mikroorganizma u pogledu svih nutrijenata smanjene značajno više u odnosu na smanjenje prinosa antifungalnih agenasa, kao produkata sekundarnog metabolizma.

ZAKLJUČAK

Istraživanja iz okvira ovog rada ukazuju na veliki potencijal izolovanog soja *Streptomyces hygroscopicus* za proizvodnju antifungalnih agenasa koji se mogu primenjivati u biološkim metodama borbe protiv fitopatogenih gljiva iz roda *Aspergillus*. Primenjeni postupak optimizacije sastava hranljive podloge pokazao se kao efikasan, relativno jednostavan i, što je najvažnije, omogućava uštedu vremena i materijala koji su potrebni kod izvođenja velikog broja eksperimenata. Dobijeni rezultati predstavljaju osnovu za dalju tehnokonomsku analizu procesa, koja bi razrešila opravdanost smanjenja količine produkovanih antifungalnih komponenti sa ciljem uštede sastojaka hranljive podloge kao i smanjenja organskog opterećenja otpadnih tokova.

Zahvalnica

Ovaj rad je rezultat istraživanja sprovedenih u okviru projekta pod brojem 114-451-3669/2012: "Optimizacija biotehnoškog postupka proizvodnje bioagenasa - antagonista skladišnih patogena jabuke" finansiranog od strane Pokrajinskog sekretarijata za nauku i tehnološki razvoj Autonomne Pokrajine Vojvodine.

LITERATURA

- [1] D. Nikolić, M. Fotirić, Oplemenjivanje jabuke u svetu, u Zborniku radova II Savetovanja "Inovacije u voćarstvu", Beograd, 2009, str. 5–22.
- [2] R.J. McLaughlin, C.L. Wilson, S. Droby, R. Ben-Arie, E. Chalutz, Biological control of postharvest diseases of grape, peach, and apple with the yeasts *Kloeckera apiculata* and *Candida guilliermondii*, *Plant Dis.* **76** (1992) 470–473.
- [3] R. Barkai-Golan, Species of *Aspergillus* causing post-harvest fruit decay in Israel, *Mycopathologia* **71** (1980) 13–16.
- [4] G. Perrone, A. Susca, G. Cozzi, K. Ehrlich, J. Varga, J.C. Frisvad, M. Meijer, P. Noonim, W. Mahakarnchanakul, R.A. Samson, Biodiversity of *Aspergillus* species in some important agricultural products, *Stud. Mycol.* **59** (2007) 53–66.
- [5] R. Barkai-Golan, N. Paster, Mouldy fruits and vegetables as a source of mycotoxins: part 1, *World Mycotoxin J.* **1** (2008) 147–159.
- [6] M. Grahovac, D. Inđić, S. Lazić, S. Vuković, Biofungicidi i mogućnosti primene u savremenoj poljoprivredi, *Pestic. fitomed.* **24** (2009) 245–258.
- [7] Ž. Čeković, Zaštita bilja pomoću prirodnih pesticida, *Hem. Ind.* **60** (2006) 113–119.
- [8] S. Khamna, A. Yokota, J.F. Peberdy, S. Lumyong, Antifungal activity of *Streptomyces* spp. isolated from rhizosphere of Thai medicinal plants, *Int. J. Integr. Biol.* **6** (2009) 143–147.
- [9] [9] M. Oskay, Antifungal and antibacterial compounds from *Streptomyces* strains, *Afr. J. Biotechnol.* **8** (2009) 3007–3017.
- [10] M. Thenmozhi, K. Kannabiran, Anti-*Aspergillus* activity of *Streptomyces* sp. VITSTK7 isolated from Bay of Bengal coast of Puducherry, India, *J. Nat. Env. Sci.* **2** (2011) 1–8.
- [11] A. Ayari, H. Morakchi, K.G. Djamilia, Identification and antifungal activity of *Streptomyces* sp. S72 isolated from Lake Oubeira sediments in North-East of Algeria, *Afr. J. Biotechnol.* **11** (2012) 305–311.
- [12] H.M. Rifaat, N.H. Abd El Naser, S.M. Helmy, A.M. Ali, Taxonomical studies on certain streptomycetes exhibiting antimicrobial activity isolated from Egyptian soils, *J. Cult. Collect.* **5** (2006–2007) 25–34.
- [13] M.A.M. Akhand, M.A.A. Al-Bari, M.A. Islam, P. Khondkar, Characterization and antimicrobial activities of a metabolite from new *Streptomyces* species from Bangladeshi soil, *J. Sci. Res.* **2** (2010) 178–185.
- [14] M.M. Muharram, M.S. Abdelkader, S.I. Alqasoumi, Antimicrobial activity of soil actinomycetes isolated from Alkharj, KSA, *Int. Res. J. Microbiol.* **4** (2013) 12–20.
- [15] N. Singh, V. Rai, Optimization of cultural parameters for antifungal and antibacterial metabolite from microbial isolate; *Streptomyces rimosus* MTCC 10792 from soil of Chhattisgarh, *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* **4** (2012) 94–101.
- [16] A.A. Al-Askar, W.M. Abdul Khair, Y.M. Rashad, *In vitro* antifungal activity of *Streptomyces spororaveus* RDS28 against some phytopathogenic fungi, *Afr. J. Agric. Res.* **6** (2011) 2835–2842.

- [17] M. Elibol, Optimization of medium composition for actinorhodin production by *Streptomyces coelicolor* A3(2) with response surface methodology, *Process Biochem.* **39** (2004) 1057–1062.
- [18] N. Zhang, Z. Qi, H. Duan, Y. Xie, J. Yu, C. Lu, X. Liu, Optimization of medium composition for production of antifungal active substance from *Streptomyces hygroscopicus* BS-112, *Afr. J. Microbiol. Res.* **6** (2012) 71–80.
- [19] X. Wang, L. Huang, Z. Kang, H. Buchenauer, X. Gao, Optimization of the fermentation process of actinomycete strain Hhs.015¹, *J. Biomed. Biotechnol.* **1** (2010) 1–10.
- [20] S.T. Williams, M. Goodfellow, G. Alderson, E.M.H. Wellington, P.H.A. Sneath, M.J. Sackin, Numerical classification of *Streptomyces* and related genera, *J. General Microbiol.* **129** (1983) 1743–1813.
- [21] T. Cross, in: S.T. Williams, M.E. Sharpe, J.G. Holt (Eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* Vol. 4: Growth and Examination of Actinomycetes—Some Guidelines, Williams & Wilkins Company, Baltimore, MD, 1989, pp. 2340–2343.
- [22] G.L. Miller, Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Anal. Chem.* **31** (1959) 426–428.
- [23] K. Herlich, *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*, 5th edn., Association of Official Analytical Chemists, Arlington, 1990, pp. 758–759.
- [24] A.W. Bauer, W.M.M. Kirby, J.C. Sherris, M. Turck, Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method, *Am. J. Clin. Pathol.* **45** (1966) 493–496.
- [25] S.L.C. Ferreira, R.E. Bruns, H.S. Ferreira, G.D. Matos, J.M. David, G.C. Brandão, E.G.P. da Silva, L.A. Portugal, P.S. dos Reis, A.S. Souza, W.N.L. dos Santos, Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods, *Anal. Chim. Acta* **597** (2007) 179–186.

SUMMARY

BIOSYNTHESIS OF COMPONENTS WITH ANTIFUNGAL ACTIVITY AGAINST *Aspergillus* spp. USING *Streptomyces hygroscopicus*

Jelena M. Dodić¹, Zorana Z. Rončević¹, Jovana A. Grahovac¹, Bojana Ž. Bajić¹, Olivera S. Korolija²

¹University of Novi Sad, Faculty of Technology, Novi Sad, Serbia

²Hemofarm a.d., Vršac, Serbia

(Scientific paper)

Losses of apple fruit during storage are mainly caused by fungal phytopathogens. Traditionally, postharvest fungal disease is controlled by the application of synthetic fungicides. However, the harmful impact on environment as well as human health largely limits their application. To reduce these problems in agrochemicals usage, new compounds for plant protection, which are eco-friendly, should be developed. The aim of this study is optimization of medium composition in terms of glucose, soybean meal and phosphates content, by applying response surface methodology, for the production of agents with antifungal activity against *Aspergillus* spp. For biosynthesis was used strain of *Streptomyces hygroscopicus* isolated from the environment. Experiments were carried out in accordance with Box-Behnken design with three factors on three levels and three repetitions in the central point. Antifungal activity of the obtained cultivation mediums against *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus niger* was determined, *in vitro*, using the diffusion – disc method. The desirability function was used for determination of optimal medium components. Achieved model predicts that the maximum inhibition zone diameter (40.93 mm) against test microorganisms is produced when the initial content of glucose, soybean meal and phosphates are 47.77, 24.54 and 0.98 g/l, respectively. To minimize the consumption of medium components and costs of effluents processing, additional three sets of optimization were made. The chosen method for optimization of medium components was efficient, relatively simple and time and material saving. Obtained results can be used for the further techno-economic analysis of the process to select optimal medium composition for industrial application.

Keywords: *Aspergillus* spp. • Antifungal compounds • *Streptomyces hygroscopicus* • Medium optimization