

Ю. А. Морозова, Е. В. Скворцов, Ф. К. Алимова,
А. В. Канарский

БИОСИНТЕЗ КСИЛАНАЗ И ЦЕЛЛЮЛАЗ ГРИБАМИ РОДА *TRICHODERMA* НА ПОСЛЕСПИРТОВОЙ БАРДЕ

Ключевые слова: ксиланаза, целлюлаза, зерновая спиртовая барда, *Trichoderma*.

Показана возможность использования в качестве питательной среды для эффективного биосинтеза ксиланаз и целлюлаз грибами рода *Trichoderma* спиртовой зерновой барды без биогенных добавок и с биогенными добавками. Установлен характер изменения редуцирующих сахаров в культуральной жидкости при ферментации продуцента. Полученные результаты подтверждают влияние потребления редуцирующих сахаров на синтез гидролитических ферментов.

Keywords: xylanase, cellulase, waste of alcohol production, *Trichoderma*

In this work demonstrates the use of waste of alcohol production with additives as a medium for the efficient biosynthesis of xylanases and cellulase fungi Trichoderma. We conducted a study of how changes reducing sugars in the culture fluid in the fermentation process of the producer. The results obtained confirm effect of consumption of reducing sugars on the synthesis of hydrolytic enzymes.

Введение

Анализ публикаций, связанных с производством ферментных препаратов, показывает, что в настоящее время одним из наиболее привлекательных продуцентов ферментов являются грибы рода *Trichoderma*. Этот продуцент ферментов используется при получении целлюлаз, пектиназ, ксиланаз и многих других ферментов, применяемых в целлюлозно-бумажной и пищевой промышленности, в производстве моющих средств, в производстве спиртов и органических кислот, в получении кормовых добавок [1], при переработке целлюлозосодержащего сырья в глюкозу [2, 3, 4, 5, 6].

Следует заметить, что культивирование продуцентов гидролитических ферментов, как правило, проводят на питательных средах, полученных из зерновых культур. Подготовка питательных сред на зерновых культурах является достаточно сложным и дорогостоящим технологическим процессом.

В этой связи поиск более доступного сырья для получения питательной среды, используемой при культивировании продуцентов гидролитических ферментов, является весьма актуальным и своевременным.

Известно, что при микробиологическом синтезе этанола образуется значительное количество отходов [7]. Это спиртовая зерновая барда, которая содержит различные питательные компоненты потенциально пригодные для культивирования гриба *Trichoderma* и синтеза им гидролитических ферментов.

Целью данной работы являлось определение возможности применения спиртовой зерновой барды в качестве питательной среды при биосинтезе ксиланаз (К.Ф. 3.2.1.8) и целлюлаз (К.Ф. 3.2.1.4) грибами рода *Trichoderma* на послеспиртовой барде.

Исходя из поставленной цели, решались следующие задачи:

1) Определение ксиланазной и целлюлазной активности грибов рода *Trichoderma* при культивировании на питательной среде, приготовленной на исходной спиртовой зерновой барде;

2) Определение ксиланазной и целлюлазной активности грибов рода *Trichoderma* при культивировании на питательной среде, приготовленной на спиртовой зерновой барде с биогенными добавками.

Экспериментальная часть

Микроорганизмы. В работе использован штамм гриба рода *Trichoderma asperellum* R2 из музея кафедры биохимии ФГАОУВПО «Казанский (Приволжский) федеральный университет». Данный штамм выделен из почвы Мурзихинского II могильника Алексеевского района РТ. Штамм *Trichoderma asperellum* R2 депонирован во Всероссийской Коллекции Промышленных Микроорганизмов и имеет регистрационный номер F-1087.

Питательные среды для культивирования микроорганизмов. Для наращивания инокулята гриба использовался картофельно-глюкозный агар [3].

В качестве питательной среды применяли – послеспиртовую барду с биогенными добавками и без их использования. Для исследований использовали осажденную и неосажденную барду. Осаждение проводили центрифугированием на центрифуге К23Д при 3000 об/мин. 10 минут. В качестве биогенных добавок использовали: KH_2PO_4 - 15 г/л, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 4.8 г/л, CaCl_2 - 0.3 г/л, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0.3 г/л, карбамид - 15 г/л. Корректировку pH в диапазоне 5.0 - 6.5 проводили фосфорной кислотой или раствором аммиака.

Культивирование микроорганизмов. Культуру гриба для инокуляции выращивали на скошенном картофельно-глюкозном агаре в 20 мл пробирках.

Ферментацию проводили в колбах объемом 250 мл, в каждую наливали по 50 мл среды. Затем в каждую колбу добавляли в качестве индуктора микрорекристаллическую целлюлозу - 5 г/л и в качестве эмульгатора Tween 80 - 2 г/л. Затем питательную среду стерилизовали в автоклаве при 120 °С 30 минут.

Для получения инокулята со скошенного агара делали смыв стерильной водой. В каждую колбу добавляли инокулят из расчета 25 мл на литр барды. Культивирование осуществлялось при 30 °С, 130 об/мин на шейкере - инкубаторе INNOVA 43R. Отбор проб проводили каждые 24 часа. Длительность первого этапа составляла 5 - 8 суток.

По окончании первого этапа ферментации, в культуральную жидкость, объём, которой составлял 45 - 50 мл, добавляли 50 мл свежей питательной среды. Последующее культивирование гриба проводили в течение 5 - 8 суток, при тех же условиях. Отбор проб проводили каждые 24 часа.

Определение ксиланазной активности.

Исследование ксиланазной активности проводили в трех повторностях по методу König [8].

Определение целлюлазной активности.

Исследование целлюлазной активности проводили в трех повторностях по методу IUPAC [9].

Определение концентрации белка по Лорури [6]. Оптическое поглощение измеряли при 750 нм.

Анализ редуцирующих сахаров. К 120 мкл исследуемой пробы добавляли 1200 мкл дистиллированной воды и 600 мкл DNSA. Выдерживали пробы 10 минут при 100 °С, затем 5 мин. при 0 °С. После этого добавляли во все пробы по 6 мл дистиллированной воды и измеряли оптическую плотность при 540 нм. В качестве контроля использовали дистиллированную воду.

Определение биомассы продуцента. 1 мл культуральной жидкости высушивали при 105°С и замеряли сухую биомассу.

Статистическая обработка результатов.

Для статистической обработки данных использовали программу Excel. Для сравнения применяли интервальные оценки. Уровень значимости $p < 0,05$. Данные на рисунках представлены как среднее \pm стандартное отклонение.

Результаты и обсуждение

Культивирование проводили в течение семи суток. Исследования показали, что максимальное накопление ксиланаз и целлюлаз при синтезе гриба *Trichoderma asperellum* R2 происходило на четвертые сутки ферментации. На осажённой барде активность синтеза ферментов установлена выше, чем на неосажённой. Видимо, это связано с более доступными процессами диффузии растворенных веществ фильтрата барды в клетки продуцента и обеспечения его питательными веществами. Ксиланазная активность составляла 18,1 IU/мл, целлюлазная – 1,24 FPU/ml, результаты в 9 и 3 раза выше соответственно, чем на неосажённой среде.

Использование биогенных добавок позволило увеличить скорость синтеза и достичь максимальной ферментативной активности. Следует заметить, что активность целлюлаз повышалась не значительно, что можно отнести к особенности данного штамма *Trichoderma asperellum* R2.

Основное потребление редуцирующих сахаров происходило в первые 4 дня и снижалось с 6,5 г/л до 1,5 г/л, в это же время начинался и активный прирост биомассы (см. рис. 1). Чуть позже, на-

чиная с 3 суток, наблюдался резкий прирост активности ксиланаз в среде роста культуры. Это свидетельствовало о том что, редуцирующие сахара среды потреблялись микромицетом и использовались для роста биомассы и синтеза экзоферментов.

Таблица 1 - Ксиланазная (IU/ml) и целлюлазная (FPU/ml) активности *Trichoderma asperellum* R2

Активность	Неосажденная барда		Осажденная барда	
	Без добавок	С добавками	Без добавок	С добавками
Ксиланазная	1,7	18,1	21,4	25,4
Целлюлазная	0,41	1,24	0,52	0,9

Исследование изменения редуцирующих сахаров в культуральной жидкости в процессе ферментации продуцента показало, что содержание редуцирующих сахаров снижается на протяжении всего процесса. Как видно из результатов, представленных на рис. 1, начальная концентрация сахаров снижается с 6,5 г/л до 1,1 г/л к концу процесса.

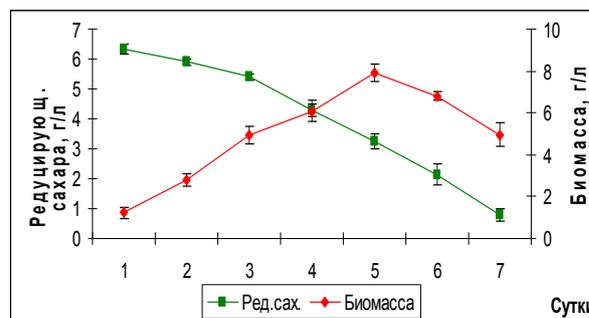


Рис. 1 – Динамика снижения редуцирующих сахаров культуральной среды *Trichoderma asperellum* R2. в течение 8 суток роста

Начальное содержание белка в среде составило 10 г/л. Это белки, оставшиеся в растворе после спиртового брожения и отгонки этанола. В процессе синтеза ферментов гриб *Trichoderma* гидролизует и потребляет растворённый белок, используя его в качестве источника азота, а также выделяет в раствор гидролитические экзоферменты, которые также являются белками. Таким образом, в среде устанавливается баланс потребления и синтеза белка (рис. 2).

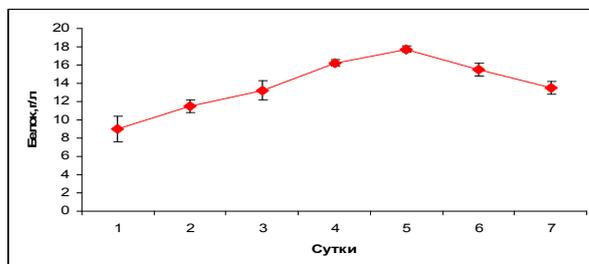


Рис. 2 – Динамика изменения концентрации белка в культуральной жидкости

Как показали проведённые исследования, синтез белка продуцентом превосходит его потребление. Заметный прирост белка в растворе происходит с 1 по 4 сутки культивирования, что по срокам

совпадает с активной фазой синтеза гидролитических ферментов.

Выход синтеза фермента на стационарную фазу начинается в момент прекращения потребления редуцирующих сахаров из среды культивирования. Остаточные редуцирующие сахара, видимо, не могут быть гидролизваны ферментным комплексом *Trichoderma*. К концу культивирования продуцента среда обедняется доступными источниками углеводов, при этом концентрация клеток продуцента в среде высокая (рис. 1). Вследствие дефицита углеводов клетка испытывает дефицит энергии, в результате этого в ней повышается содержание цАМФ (циклический аденозинмонофосфат), которое является сигнальным веществом дефицита энергии. При высоком уровне цАМФ снимается репрессия генов, кодирующих гидролитические ферменты [10]. В этой связи целесообразно ликвидировать дефицит редуцирующих сахаров, который является причиной прекращения синтеза экзоферментов и перехода продуцента в стационарную фазу. В дальнейших экспериментах на стадии выхода продуцента на стационарную фазу роста в питательную среду дополнительно вводились редуцирующие сахара.

Для исследования влияния добавки новой порции среды на стадии стационарной фазы процесса проводили культивирование гриба штамма *Trichoderma asperellum* R2 в течение 15 дней (рис. 2) и анализ динамики ксиланазной активности. Достижение стационарной фазы культурой достигается на пятые сутки. При этом активность ксиланазы составила 26,9 IU/ml и оставалась практически постоянной с 5 по 8 сутки. Интенсивное потребление редуцирующих сахаров культурой происходило в первые 4 суток культивирования - с 5,5 г/л до 1,8 г/л и достигло локального минимума 1,1 г/л к восьмым суткам. Таким образом, стационарная фаза накопления фермента наступила одновременно с точкой снижения динамики потребления редуцирующих сахаров - на 4 сутки. На 8 сутки добавили свежую порцию среды, что привело к росту редуцирующих сахаров в культуральной жидкости и соответственно к увеличению синтеза ксиланазы продуцентом (рис. 3).

Максимальная суммарная ксиланазная активность составила 126,9 IU/ml на 14 сутки культивирования. Полученные результаты исследования подтверждают влияние потребления редуцирующих сахаров на синтез гидролитических ферментов.

Таким образом, результаты исследования показали, что осажденная послеспиртовая барда с добавками является наиболее эффективной средой для биосинтеза ксиланаз грибом *Trichoderma asperellum* R2, в которой максимальная ксиланазная активность достигается 25,17 IU/ml. Для биосинтеза целлюлаз *Trichoderma asperellum* R2 очевидно эф-

фективной средой является неосажденная послеспиртовая барда, где максимальная целлюлазная активность достигает 1,13 FPU.



Рис. 3 – Динамика редуцирующих сахаров и ксиланазной активности культуральной среды *Trichoderma asperellum* R2. на послеспиртовой барде с добавлением новой порции среды

Исследования показали, что, дефицит редуцирующих сахаров является причиной прекращения синтеза экзоферментов *Trichoderma asperellum* R2 и причиной перехода продуцента в стационарную фазу. В связи с этим при достижении стационарной фазы культивирования рекомендуется добавлять в культуральную жидкость дополнительное количество питательной среды, в соотношении приблизительно 1:1, что позволит увеличить ферментативную активность гриба *Trichoderma*.

Литература

1. Е. В. Скворцов, Ф.К. Алимова, Д. М. Абуязрова, Вестник Казанского технологического университета, 4, 1, 251-255 (2005).
2. А.С. Селиванов, Биотехнология на рубеже веков: проблемы и перспективы (Киров, Россия Ноябрь 2-4, 2001), 89-91.
3. Ф. К. Алимова, Д. И. Тазетдинова, Р. И. Тухбатова, Биотехнология. Промышленное применение грибов рода *Trichoderma*. Казань, 2007. 229 с.
4. И. А. Хусаинов, З. А. Канарская, А. В. Канарский, Вестник Казан. технол. ун-та, 12, 128 -136 (2012).
5. Т.А. Скотникова, Л.А. Неминущая, Н.К. Еремец, О.В. Провоторова, И.В. Бобровская, М.А. Малышева, З.А. Канарская, Вестник Казанского технологического университета, 4, 82 – 87 (2012).
6. Л.А. Неминущая, Т.А. Скотникова, Е.И. Тутова, О.В. Провоторова, Н.К. Еремец, И.В. Бобровская, З.А. Канарская, Вестник Казан. технол. ун-та, 4, 69 – 74 (2012).
7. Г.Н. Ненайденко, О.С.Журба, В.Д.Шереверов. Ликёроводочное производство и виноделие, 9, 15-19 (2008).
8. J. König., R. Grasser, H. Pikor, K. Vogel, Anal Bioanal Chem., 5, 8, 80–87 (2002).
9. Measurement of cellulose activities, Pure & Appl. Chem International Union of Pure and applied Chemistry. 1987. № 2. P. 257—268.
10. С. P. Kubicek, M. Mikus, A. Shuster. Biotechnology for Biofuels, 2009. 2:19, 1 -14.