

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 инакулята гриба использовался картофельно-глюкозный агар [3]. В качестве питательной среды применяли – послеспиртовую барду с биогенными добавками и без их использования. Для исследований использовали осаждённую и неосаждённую 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 объёмом 250 мл, в каждую наливали по 50 мл среды. Затем в каждую колбу добавляли в качестве индуктора микрокристаллическую целлюлозу - 5 г/л и в качестве эмульгатора Tween 80 - 2 г/л. Затем питательную среду стерилизовали в автоклаве при 120 °C 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 °C, 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 Лоури [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 °C, затем 5 мин. при 0 °C. 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°C и измеряли 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 четвёртые сутки ферментации. На осаждённой барде активность синтеза ферментов установлена выше, чем на неосаждённой. 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 неосаждённой 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 понижалось с 6,5 г/л до 1,5 г/л, в это же время начинался и активный прирост биомассы (см. рис. 1). Чуть позже, начиная 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	0,41	1,24
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 эффективной средой является неосаждённая 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*.