

Е. В. Скворцов, Ю. А. Морозова, А. В. Пушик,
Ф. К. Алимова, С. В. Гаврилов

РОЛЬ КСИЛОЗЫ – КАК ИНДУКТОРА СИНТЕЗА КСИЛАНАЗ ГРИБОМ РОДА *TRICHODERMA*

Ключевые слова: ксилоза, грибы р. *Trichoderma*, ксиланаза.

*Проведено исследование динамики синтеза ксиланаз грибом *Trichoderma* в среде на основе осажденной послеспиртовой барды. Исследования показали, что скорость прироста активности ксиланаз находится в прямой зависимости от содержания ксилозы в культуральной среде.*

Keywords: xylose, fungus *Trichoderma*, xylanase.

*A study of the dynamics xylanase synthesis by the fungus *Trichoderma* made in medium based on the besieged distillery grain with solubles. Study have shown that the rate of xylanase activity increase to be in proportion to the xylose content in the culture medium.*

Актуальность. Одними из наиболее изучаемых микроорганизмов во всём мире считаются грибы рода *Trichoderma*, которые являются продуцентами комплекса гидролитических ферментов – эндо-1,4- β -ксиланаз, целлюлаз, эндо-1,3(4)- β -глюканаз – и обладают высокой секреторной способностью [1]. Указанные свойства делают ферментные препараты на основе штаммов р. *Trichoderma* универсальными для применения во многих биотехнологических процессах. Интерес к этим ферментам растёт благодаря огромному потенциалу их использования в сельскохозяйственном производстве и ряде отраслей промышленности, ориентированных на переработку растительного сырья [2, 3, 4]. Существует, по крайней мере, 100 естественных видов р. *Trichoderma*, однако считают, что их ещё больше, поскольку клоны, потерявшие способность к половому размножению, могут эволюционировать самостоятельно [5].

Микроорганизмы, в том числе микроскопические грибы, обладают высокой адаптивностью к изменению внешних факторов – источников питания и условий роста, что обусловлено гибкой регуляцией обменных процессов, включая синтез ферментов.

Реализация способности к сверхсинтезу ксиланаз, т.е. образованию продукта в количествах, превосходящих физиологические потребности микроорганизма, зависит, прежде всего, от факторов питания, компонентов питательной среды, содержащих индуцирующие ксиланазы вещества. Гриб – продуцент ксиланаз значительно увеличивает синтез ферментов при наличии в среде специфических веществ-индукторов, как правило, являющихся продуктами неполного гидролиза субстрата [6]. Благодаря наличию такого специфического биохимического механизма регулирования, генетический аппарат клетки настраивается на синтез такого ферментного комплекса, который, поступая во внешнюю среду, способствует максимальному гидролизу субстрата.

Однако до настоящего времени не проводились исследования, однозначно определившие оптимальный состав питательной среды для синтеза ксиланаз грибом р. *Trichoderma*.

Обычно исследователи культивируют этот продуцент ферментов на разных питательных средах, что не позволяет дать соответствующие рекомендации по организации эффективного производства ферментов, используя гриб р. *Trichoderma*. В связи с этим актуальны исследования, направленные на поиск более эффективных питательных сред для биосинтеза ксиланаз грибом р. *Trichoderma*.

При производстве спирта из зерна (например, пшеницы, кукурузы или ржи) образуется значительное количество отработанной послеспиртовой барды. Зерновая барда, получаемая на спиртовых заводах, содержит различные питательные компоненты и является потенциально пригодной средой для культивирования штаммов грибов р. *Trichoderma*.

Ферменты грибов рода р. *Trichoderma* имеют практическое значение при применении в кормах сельскохозяйственных животных, содержащих рожь и ячмень. В частности, в составе ржи негативную роль играют пентозаны, которые снижают переваримость и усвоение кормов и, как следствие, привес животных. У цыплят и поросят, наиболее чувствительных групп животных, ксиланы набухают в пищеварительном тракте, замедляют скорость прохождения химуса, приводят к брожению. Высоковязкие слизи затрудняют воздействие амилолитических ферментов. При скормливания ржи птице выделяется жидкий, липкий помет, что приводит к обезвоживанию организма и в результате к потере живой массы вместо увеличения привеса. Одним из важнейших биохимических компонентов зерна ячменя являются также β -глюканы, или растворимая клетчатка. Высокое содержание β -глюканов в зерне ячменя негативно влияет на его применение в кормах – увеличивает вязкость химуса и снижает его переваримость. Ксиланазы и целлюлазы грибов р. *Trichoderma* в составе зерновых кормосмесей осуществляют гидролиз антипитательных биополимеров и позволяют снизить их негативное влияние на физиологию животных, что имеет большое практическое значение.

Цель настоящей работы – установление закономерностей биосинтеза ксиланаз грибами р. *Trichoderma*.

Исходя из цели работы, были поставлены следующие задачи:

Оценить динамику активности гидролитических ферментов при культивировании грибов *Trichoderma reesei* - M18.2 на послеспиртовой барде.

Провести хроматографическое исследование содержания ксилозы в культуральной жидкости.

Определить роль ксилозы в индукции биосинтеза ксиланаз *Trichoderma reesei* - M18.2.

Материалы и методы

Объект исследования. Микроскопический гриб *Trichoderma reesei* - M18.2, предоставленный Саксонским институтом прикладной биотехнологии (Лейпциг, Германия), полученный путём селекции штаммов, подвергнутых воздействию мутагенных факторов.

Культуральные среды.

1. Картофельно-глюкозный агар.

Состав картофельно-глюкозного агара (КГА): в отвар картофеля – 200 г/л добавляли агар – 20 г/л, глюкоза – 20 г/л, стрептомицин -1 г/л.

2. Осажденная послеспиртовая барда [7].

Послеспиртовая барда была предоставлена Усадским спиртовым заводом республики Татарстан Российской федерации. Культивирование *T. reesei* - M18.2 проводили в осаждённой на центрифуге (4000 об/мин.) «Eppendorf 5810R» (Германия) барде. В осажденную барду добавляли: 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), микрокристаллическая целлюлоза (5 г/л), Tween (2 г/л), pH среды - 5,9. Стерилизацию осуществляли в автоклаве ГК – 100 (Россия) при 120°C 30 минут.

Культивирование продуцентов.

Культивирование *T. reesei* - M18.2 проводили глубинным способом в колбах ёмкостью 250 мл с объёмом питательной среды 50 мл. Эксперимент по культивированию *T. reesei* - M18.2 проведен с использованием 100% и разбавленной водой на 50 % послеспиртовой барды добавками, согласно таблице 1.

Таблица 1 - Состав сред на послеспиртовой барде

Состав среды 1	Состав среды 2
Барда послеспиртовая, 100%	Барда послеспиртовая, 50%
Вода, 0%	Вода, 50%
KH_2PO_4 - 15 г/л	KH_2PO_4 - 15 г/л
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 4,8 г/л	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 4,8 г/л
CaCl_2 - 0,3 г/л	CaCl_2 - 0,3 г/л
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,3 г/л	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,3 г/л
Микрокристаллическая целлюлоза – 5 г/л	Микрокристаллическая целлюлоза – 5 г/л
Tween - 2 г/л	Tween - 2 г/л

Культуры грибов для инокуляции выращивали на скошенном КГА в 20 мл пробирках в течение 5 суток при температуре 28 °С. Для

получения инокулята делали смыв со скошенного КГА 8 мл стерильной воды. В каждую колбу добавляли инокулят из расчета 25 мл на литр барды. Культивирование осуществлялось при 30 °С, 130 об/мин в темноте на шейкере – инкубаторе «INNOVA 43R» (USA). Отбор проб проводили каждые 24 часа. Длительность культивирования составляла 9 суток.

Определение ксиланазной активности [8].

Субстрат для исследования активности ксиланаз готовили следующим образом, 750 мг ксилана (Sigma X4252) помещали в 40 мл ацетатного буфера. Растворяли ксилан перемешиванием на кипящей водяной бане в течение 5 минут. После охлаждения до комнатной температуры pH раствора доводили 25 % HCl до 5,0. Объем раствора доводили до 50 мл ацетатным буфером.

Для построения калибровочного графика стандарты ксилозы помещали в 0,06 мл ацетатного буфера в пробирке. К образцам добавляли 0,3 мл раствора динитросалициловой кислоты (DNSA). Полученный раствор инкубировали точно 10 минут в кипящей водяной бане, затем охлаждали в ледяной бане 5 минут, добавляли 3 мл воды и перемешивали. Абсорбцию измеряли при 540 нм на спектрофотометре «Shimadzu 1800» (Япония).

Исследуемые образцы в количестве 0,06 мл помещали в пробирки. Пробирки помещали на 5 минут в 50 °С на водяную баню. Добавляли 0,6 мл субстрата и перемешивали. Через 20 минут инкубация прерывалась добавлением 0,3 мл раствора динитросалициловой кислоты (DNSA).

Выход восстанавливающих сахаров определяли по калибровочным графикам, построенным по ксилозе.

Одна единица активности энзима (IU) соответствует количеству фермента, вызывающего выход одного мкМоля восстанавливающих сахаров в минуту при гидролизе субстрата.

Определение концентрации ксилозы методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) [9]. К пробе в количестве 1 мл добавляли 4 мл ацетонитрила, затем центрифугировали смесь (14000 об/мин), 5 мин. После центрифугирования надосадочную жидкость отбирали в флаконы и применяли для хроматографического анализа.

Для анализа концентрации ксилозы методом жидкостной хроматографии был применен хроматограф Waters (США). Разделение моносахаридов проводилось на хроматографической колонке колонка Supelcosiltm LC-NH₂, 5 µm (Catalog#: 58338C30). В качестве элюента при проведении исследований использовали смесь ацетонитрила и воды. Для приготовления 1 л элюента смешивали 750 мл ацетонитрила с 250 мл особо чистой воды. Полученную смесь фильтровали через фильтр с диаметром пор 45 мкм с помощью вакуумного насоса и установки для вакуумной фильтрации.

Для регистрации выходящих фракций применялся рефракционный детектор Refractive Index Detector Waters, объем инъекции

анализируемого раствора- 20 мкл, скорость элюирования 0,3 мл/мин.

Калибровку проводили, используя в качестве стандартов раствор ксилозы. Приготовление стандартных растворов сахаров осуществляли следующим образом: 500 мг стандарта сахара растворяли в мерной колбе вместимостью 500 мл в растворе ацетонитрил:вода (4:1). Концентрация сахаров в данном растворе 1 г/л (0.1 %). Вычисление концентраций ксилозы в исследуемом растворе проводили по площади пиков компонентов, пользуясь программным обеспечением хроматографа.

Статистическая обработка данных [10]. Исследование проводили в трех повторностях. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение.

Результаты и обсуждение

Динамика изменения активности ксиланаз в КЖ при культивировании приведена на рисунке 1. Активность фермента достигала максимума на 7 день и составляла на 100 % барде 510 ± 31 IU/ml, на разведенной 50:50 % водой – 370 ± 23 IU/ml. Затем ксиланазная активность снижалась.

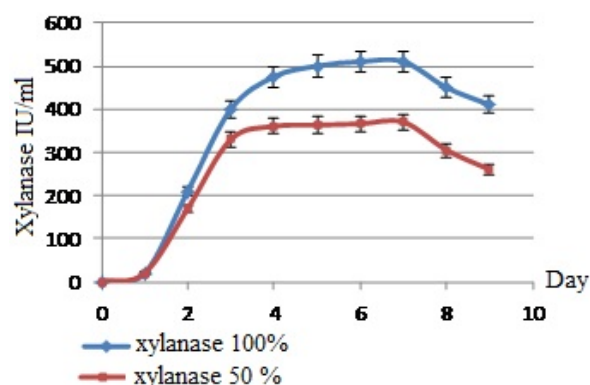


Рис. 1 - Ксиланазная активность КЖ изолята *T. reesei* - M18.2 на осажённой 100% барде и разведенной на 50% водой барде за 9 суток роста

На рисунке 2 приведены графики показывающие скорость прироста активности ксиланаз в течении рассматриваемого периода. Из представленных результатов видно, что наиболее интенсивный прирост активности ксиланаз наблюдается в промежутке 2 - 3 дня культивирования.

Результаты хроматографического определения содержания ксилозы при синтезе ксиланаз продуцентом *T. reesei* - M18.2 приведены на рисунке 3.

На приведенных графиках наблюдается рост содержания ксилозы с начала культивирования до 3 суток. Затем на 4 сутки ксилоза ассимилируется растущей биомассой гриба и не обнаруживается в культуральной среде методом ВЭЖХ.

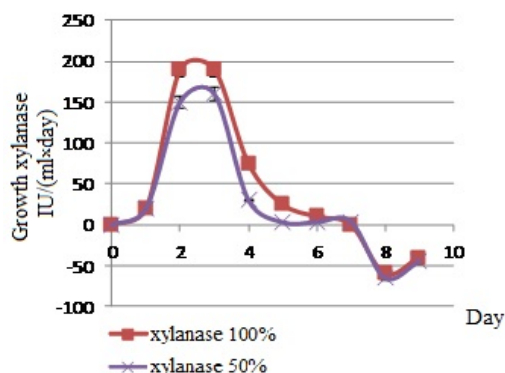


Рис. 2 - Скорость прироста активности ксиланазы при культивировании *T. reesei* - M18.2 на 100 % барде и разведенной на 50 % водой барде

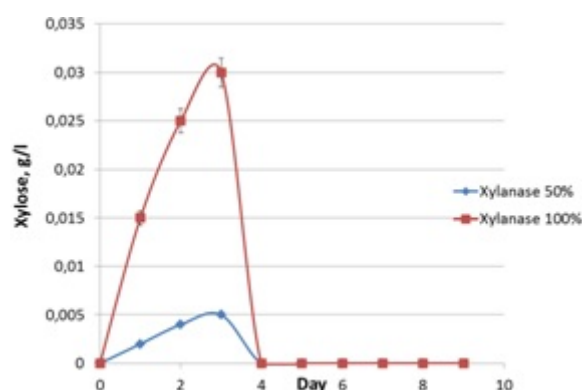


Рис. 3 - Изменение концентрации ксилозы при культивировании *T. reesei* - M18.2 на барде

Выводы

1. Максимальная ксиланазная активность в КЖ при культивировании на центрифугате спиртовой барды изолята *T. reesei* - M18.2 достигается на седьмые сутки. При этом ксиланазная активность на 100 % барде составляет 510 ± 31 IU/ml, на разведенной 50:50 % водой – 370 ± 23 IU/ml.
2. Содержание ксилозы при культивировании *T. reesei* - M18.2 на 100% барде достигает максимального значения на третьи сутки и составляет $0,030 \pm 0,011$ г/л. При культивировании *T. reesei* - M18.2 на барде разведенной водой 50:50% содержание ксилозы, так же, достигает максимального значения на третьи сутки - $0,005 \pm 0,002$ г/л.
3. Скорость прироста активности ксиланаз при культивировании *T. reesei* - M18.2 на барде находится в прямой зависимости от содержания ксилозы в культуральной среде. При культивировании *T. reesei* - M18.2 максимальная скорость синтеза ксиланаз и максимум концентрации ксилозы в культуральной жидкости совпадают и наоборот низкое содержание в культуральной жидкости ксилозы приводит к остановке прироста активности ксиланаз.
4. Показана роль ксилозы – как индуктора синтеза ксиланаз *T. reesei* - M18.2.

Литература

1. Д.А. Горячев, А.В. Кошелев, А.О. Беккаревич, О.Н. Окунев, А.П. Сеницын, В. сб. *Перспективные ферментные препараты и биотехнологические процессы в технологиях продуктов питания и кормов*, М., 2012. С.36 - 41.
2. Е.В. Скворцов, Ф.К. Алимова, Д.М. Абузярова *Вестн. Казан. технол ун-та*, 1, С. 251-256 (2004).
3. Ю.А. Морозова, Е.В. Скворцов, Ф.К. Алимова, А. В. Канарский, *Вестн. Казан. технол ун-та* 15, 19, 120-122 (2012).
4. Е.В. Скворцов, Ф.Г. Каримова, Ф.К. Алимова, А. Энтор Фуентос Кабрера, *Вестн. Казан. технол ун-та*, 1, 123-130 (2006).
5. G. J. Samuels, *Mycol. Res.*, 2003, 104, 760-764 (2003).
6. Т.М. Околедов, *Корма и фермент*. ВНИТИП, Сергиев Посад, 2001, С. 9-45.
7. Л.В. Римарева, М.Б. Оверченко, Н.И. Игнатова, Е.М. Серба, В. сб. *Перспективные ферментные препараты и биотехнологические процессы в технологиях продуктов питания и кормов*, М., 2012. С.297 - 308.
8. J. König, R. Grasser, H. Pikor, K. Vogel, *Anal Bioanal Chem.*, **5**, 374, 80-87 (2002).
9. B. Bartolome, M. Santos, J.J. Jimenez, *Journal of Cereal Science*, **3**, 36, 51-58 (2002).
10. Н.И. Акберова, *Описательная статистика. Интервальные оценки: Уч.-метод. рук-во и сб. задач к практическим занятиям по курсу «Математические методы в биохимии*. Казанский государственный университет, 2004, С. 40.

© **Е. В. Скворцов** – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. кафедры биохимии К(П)ФУ, директор ООО «Биотех», eskvortsov@rambler.ru; **Ю. А. Морозова** - мл. науч. сотр. каф. биохимии, К(П)ФУ, maroz_@mail.ru; **А. В. Пушик** – студ. К(П)ФУ; **Ф. К. Алимова** - д-р биол. наук, проф., зав. каф. биохимии К(П)ФУ, farida_alimova@hotmail.com; **С. В. Гаврилов** - асп. каф. ПИМП КНИТУ, ser_gavr@mail.ru.