

БИОХИМИЯ

УДК 577.154.004.4

DOI: 10.26456/vtbio382

ИЗУЧЕНИЕ УСЛОВИЙ ПОЛУЧЕНИЯ И ХРАНЕНИЯ ПРОДУЦЕНТА ЦЕЛЛЮЛОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ

Н.Е. Куликова, А.Г. Чернобровина, Н.Н. Роева, М.А. Волчецкая
Российский биотехнологический университет, Москва

Целлюлазы – это группа ферментов, которые в совокупности обладают способностью катализировать гидролиз целлюлозы, самого распространенного биополимера на Земле. В настоящее время они занимают центральное место в круговороте органического углерода и являются важнейшими промышленными ферментами на мировом рынке. Расширение специфичности и диапазона действия целлюлолитических ферментов существенно повышает интерес к биокатализаторам как технологическим реагентам в различных отраслях промышленности, а биоразлагаемость на этапе утилизации отсутствие токсичности улучшает экологическую безопасность производства. Поэтому разработки, направленные на поиск и получение новых штаммов продуцентов целлюлаз, и условий их хранения являются актуальными и позволят в значительной степени снизить себестоимость промышленных ферментных препаратов и тем самым способствовать увеличению эффективности крупномасштабной переработки целлюлозосодержащих материалов. В связи с этим, настоящие исследования были направлены на изучение условий получения и физико-химических параметров режима хранения нового штамма продуцента целлюлолитических ферментов – культуры гриба *Trichoderma koningii* Т. Установлено: оптимальное количество посевного материала (в виде водной споровой суспензии) – $5 \cdot 10^5$ – $4 \cdot 10^6$ спор на 1 г абсолютно сухой массы среды или по массе 0,15–0,2% возможно получить при посеве на твердой питательной среде, состоящей из 45% пшеничных отрубей, 25% свекловичного жома, 25% солодовых ростков и 5% опилок при исходной влажности среды 50–65%. Для сохранения свойств посевного материала рекомендуются следующие способы хранения: лиофильное высушивание, на песке, высушенном твердом субстрате, в зависимости от необходимого периода сохранения объекта исследований.

Ключевые слова: целлюлазы, гидролиз, ферментные препараты.

Введение. Биоконверсия возобновляемого растительного сырья в кормовые и пищевые продукты является одной из ключевых отраслей биотехнологии. Одно из направлений этой отрасли

предусматривает способы превращения непищевого сырья, представляющего собой, в основном отходы целлюлозно-бумажной промышленности и сельского хозяйства, с помощью целлюлозоразрушающих микроорганизмов. Именно применение целлюлаз, синтезируемых и секретируемых микроскопическими грибами, как правило содержащих эндоглюканиду, экзоглюканиду и β -глюкозидазу, для обработки целлюлозосодержащего сырья позволяет достигать максимальной степени декструкции исходного сырья (Маслак и др., 2015; Лаврентьев, Шерне, 2020). Но высокая стоимость производства ферментных препаратов целлюлаз является основным ограничением масштабного применения их в промышленности. Поэтому исследования, направленные на изучение условий получения и режимов хранения продуцентов целлюлолитических ферментов, осуществляющие биоконверсию возобновляемого растительного сырья, содержащего преимущественно целлюлозу, самого распространенного биополимера на Земле, является одним из приоритетных направлений современной биотехнологии. Основными микроорганизмами, продуцирующими целлюлазы, гемицеллюлазы, ксилоназы, являются микроскопические грибы – возбудители мягкой, белой и бурой гнили, а также различные виды аэробных и анаэробных бактерий (Ефременко и др., 2014; Маслак и др., 2015; Лаврентьев, Шерне, 2020).

С одной стороны, центральное место занимают фундаментальные исследования, направленные на выяснение физико-химических закономерностей биоразложения целлюлозы в природе, механизмов действия грибных и бактериальных ферментов, а также разработки, направленные на поиск и получение новых штаммов.

Одним из наиболее изучаемых грибов, являющимся продуцентами целлюлолитических ферментов в настоящее время является род *Trichoderma* (Найдун и др., 2014; Макарова, Будаева, 2016). Виды *Trichoderma* используются для культивирования ферментных препаратов, используемых в целлюлозно-бумажной и пищевой промышленности, в производстве моющих средств, в получение спирта, преобразовании отходов, содержащих целлюлозу, в глюкозу (Зиновьева и др., 2018), получении кормовых добавок (Гнеушева и др., 2010; Зиновьева и др., 2018) и текстильной промышленности (Гнеушева и др., 2010; Макарова, Будаева, 2016; Зиновьева и др., 2018).

С другой стороны, возрастающая потребность различных отраслей народного хозяйства в целлюлолитических ферментов требует организации их промышленного выпуска.

Стандартную культуру в производстве можно получить при использовании качественного посевного материала. Он должен

содержать определенное для данной культуры количество спор (на единицу массы посевного материала) и ферментативную активность.

В качестве посевной культуры для засева производственных сред часто используют инокулят, полученный при выращивании на твердых питательных средах. Этот способ позволяет сократить его количество по сравнению с агаризованными средами в 1000 раз (Гнеушева и др., 2010; Зиновьева и др., 2018).

Для сохранения физиолого-биохимических свойств посевного материала применяют различные методы хранения: периодические пересевы на жидкие и твердые питательные среды, консервацию под вазелиновым маслом, в почве, песке, лиофильно-высушенном состоянии, стерильной водопроводной и дистиллированной воде и др. (Павловская и др., 2016; Зиганшин, Сироткин, 2017).

Цель – настоящие исследования были направлены на изучение условий получения и физико-химических параметров режима хранения продуцента целлюлолитических ферментов.

Материалы и методы исследования. Для выбора способов получения и хранения посевного материала использовали культуру гриба *Trichoderma koningii* T, отселекционированную во ВНИИПБТ.

Исходный штамм сохраняли на агаризованной среде, состоящей из 10% измельченной фильтровальной бумаги; 50% - 10%-ного экстракта пшеничных отрубей; 0,15% NaNO₃; 0,15% (NH₄)₂ SO₄; 0,1% N₂PO₄; 0,05% MgSO₄ * 2H₂O; 2% агара и водопроводной воды до 100 мл.

Для получения посевного материала на твердой питательной среде использовали следующую среду (в %): пшеничные отруби – 45; свекловичный жом – 25; солодовые ростки – 25; опилки – 5. Исходную влажность среды изменяли от 35 до 70% с интервалом 5%. Выращивание проводили в колбах объемом 250 мл в течение трех суток при температуре 30⁰С (встряхивание через 24 ч).

При выборе способа хранения культуры использовали следующие методы: на твердой питательной среде с различной исходной влажностью, песке, в лиофильно-высушенном состоянии, стерильной водопроводной и дистиллированной воде (Павловская и др., 2016; Зиганшин, Сироткин, 2017).

После проверки на микробиологическую чистоту (ГОСТ 26888-86) посевной материал хранили в холодильнике.

В готовой культуре определяли целлюлолитическую активность калориметрическим методом, основанным на определении восстанавливающих сахаров, образующихся при действии ферментов на фильтровальную бумагу (Watman №1) Павловская и др., 2016; Зиганшин, Сироткин, 2017). ГОСТ Р 55293-2012. Ферментные

препараты для пищевой промышленности. Методы определения целлюлазной активности.

Результаты и обсуждение. При хранении на песке и высушенной твердой питательной среде субстраты помещали в пробирки и после стерилизации засеивали 2 мл суспензии спор исходной чистой культуры. Пробирки выдерживали в термостате до полного высыхания субстратов при ежедневном интенсивном встряхивании.

Для лиофилизации споровую суспензию помещали в защитную среду – лошадиную сыворотку, замораживали при минус 40⁰С и затем лиофильно высушивали в течение 5 часов. Хранили в запаянных ампулах.

Для биохимической оценки посевного материала засеивали твердую питательную среду (состав указан выше) с исходной влажностью 60-62%. Выращивание проводили при 30⁰С в течение 64 ч в металлических кюветах с отверстиями.

Дозу посевного материала устанавливали экспериментально.

В таблице 1 представлены результаты опытов по изучению влияния исходной влажности питательной среды на споро- и ферментообразование при получении посевного материала на твердом субстрате с различной исходной влажностью, при продолжительности выращивания 10 суток.

Таблица 1

Влияния исходной влажности питательной среды на споро- и ферментообразование

Исходная влажность питательной среды, %	Количество спор на 1 г абсолютно сухой массы посевного материала	Целлюлолитическая активность, ед/г
35	-	-
40	-	-
45	$0,6 * 10^3$	$71 \pm 0,2$
50	$2,0 * 10^8$	$115 \pm 0,1$
55	$2,5 * 10^9$	$107 \pm 0,2$
60	$3,0 * 10^9$	$105 \pm 0,2$
65	$3,2 * 10^9$	$105 \pm 0,15$
70	$3,0 * 10^9$	$110 \pm 0,1$

Из данных таблицы 1 видно, что начальная влажность среды 35 – 40% недостаточна для роста гриба. При влажности 45% наблюдали слабый пристеночный рост и незначительное спорообразование даже при увеличении продолжительности культивирования до 10 суток. Повышение влажности с 50 до 65% способствовало быстрому росту культуры и обильному спорообразованию. Этот посевной материал

обеспечивал получение культуры с целлюлолитической активностью 150 – 170 ед/г. Таким образом, исходная влажность питательной среды для получения посевного материала должна быть 50 – 65%.

Известно, что скорость роста ферментов зависит от количества вносимого посевного материала (Зиганшин, Сироткин, 2017; Хамидова, 2021). В связи с этим, дальнейшие исследования были направлены на установление оптимальной дозы посевного материала (табл. 2).

Таблица 2

Зависимость целлюлолитической активности целлюлазы от дозы посевного материала

Доза посевного материала, спор на 1 г абсолютно сухой массы среды	Целлюлолитическая активность целлюлазы при различной продолжительности культивирования (в ч.) ед/г				
	30	36	42	48	64
$2,0 * 10^2$	Нет роста				
$1,0 * 10^3$	Нет роста		$15 \pm 0,15$	$28 \pm 0,10$	$54 \pm 0,15$
$1,5 * 10^4$	Нет роста		$31 \pm 0,14$	$57 \pm 0,14$	$72 \pm 0,15$
$1,3 * 10^5$	$10 \pm 0,15$	$34 \pm 0,16$	$68 \pm 0,14$	$82 \pm 0,14$	$114 \pm 0,13$
$5,3 * 10^5$	$51 \pm 0,14$	$106 \pm 0,15$	$157 \pm 0,15$	$151 \pm 0,12$	$165 \pm 0,02$
$1,0 * 10^5$	$45 \pm 0,15$	$145 \pm 0,14$	$156 \pm 0,15$	$164 \pm 0,15$	$174 \pm 0,01$
$3,8 * 10^6$	$39 \pm 0,10$	$145 \pm 0,15$	$172 \pm 0,12$	$176 \pm 0,11$	$173 \pm 0,14$
$9,4 * 10^6$	$41 \pm 0,13$	$97 \pm 0,13$	$108 \pm 0,11$	$117 \pm 0,05$	$125 \pm 0,15$
$1,0 * 10^9$	$35 \pm 0,13$	$88 \pm 0,10$	$108 \pm 0,10$	$100 \pm 0,10$	$110 \pm 0,13$
$1,1 * 10^9$	$32 \pm 0,15$	$82 \pm 0,11$	$97 \pm 0,14$	$101 \pm 0,12$	$111 \pm 0,15$

Экспериментальные данные показали, что максимальная целлюлолитическая активность наблюдается в культуре, полученной при засеве питательной среды инокулятом в количестве $5,3 * 10^5 - 3,8 * 10^6$ спор на 1 г. Уменьшение дозы посевного материала до $2,0 * 10^2 - 1,0 * 10^3$ спор на 1 г приводило к замедленному неравномерному росту культуры, в результате чего синтез целлюлазы практически не проходил. При дозе посевного материала $9,4 * 10^6 - 1,0 * 10^9$ спор на 1 г наблюдали ранее очень обильное спорообразование, что приводило к снижению биосинтетической способности гриба на 25 – 40%. Таким образом, оптимальным количеством посевного материала является $5,0 * 10^5 - 4,0 * 10^6$ спор на 1 г абсолютно сухой массы среды.

Определение целлюлолитической активности в динамике развития культуры показало, что биосинтез целлюлазы при использовании оптимальной дозы посевного материала практически заканчивается к 42 ч. Сокращение длительности культивирования

позволяет получать значительно менее спороносную культуру, что улучшает условия дальнейшей ее переработки в промышленности.

Влияние способа хранения культуры гриба *Trichoderma koningii* T – на биосинтез целлюлазы приведено в таблице 3. Контролем служила культура, хранящаяся на агаризованной среде, с частотой посева 1 раз в три месяца.

Таблица 3

Изменение целлюлолитической активности *Trichoderma koningii* T в процессе хранения

Способ хранения	Целлюлолитическая активность в зависимости от продолжительности хранения, %							
	10 дней	1 месяц	3 месяца	6 месяца	9 месяца	1 год	2 года	3,5 года
На песке	-	100	100	100	100	100	93	-
В лиофильно-высушенном состоянии	-	100	100	100	100	100	100	100
На высушенной твердой питательной среде	-	100	100	100	100	100	91	84
На твердой питательной среде с различной исходной влажностью, %								
45	100	100	100	100	100	82	-	-
50 – 55	100	100	96	78	-	-	-	-
60 - 65	32	-	-	-	-	-	-	-
В стерильной водопроводной или дистиллированной воде	97	96	43	-	-	-	-	-

Представленные данные (табл. 2) показали, что наиболее приемлемым для длительного хранения культуры гриба *Trichoderma koningii* T - продуцента целлюлолитических ферментов является способ лиофильного высушивания. Он позволяет сохранить культуру в активном состоянии в течение 3,5 лет, сохраняя при этом жизнеспособность клеток.

Длительность хранения на песке позволяет хранить споры в течение 1,5-2 лет без потери их активности, но при увеличении продолжительности хранения наблюдается резкий спад выживаемости клеток культуры. Способность гриба синтезировать активную целлюлазу не теряется в течение 2-х лет и при хранении на высушенном твердом субстрате.

Результаты опытов, в которых использовали инокулят, полученный на твердой питательной среде с различной исходной влажностью, показали, что при влажности 60-65% он не подлежит хранению. Высокая влажность приводит в процессе хранения к автолизу, что резко снижает качество посевного материала [8,10]; влажность 50-55% обеспечивает сохранение способности гриба образовывать активную целлюлазу в течение 3-х месяцев. Увеличение длительности хранения на влажном субстрате, очевидно, приводит к накоплению продуктов обмена, что отрицательно влияет на способность гриба к биосинтезу целлюлолитических ферментов. Посевная культура с влажностью 45% может храниться без изменения свойств до 6 месяцев.

Споры можно также хранить в стерильной водопроводной или дистиллированной воде до 1,5 месяцев.

Заключение. Таким образом, посевной материал гриба *Trichoderma koningii* T хорошего качества может быть получен на твердой питательной среде, состоящей из 45% пшеничных отрубей, 25% свекловичного жома, 25% солодовых ростков и 5% опилок при исходной влажности среды 50-65%.

Оптимальное количество посевного материала при этом (в виде водной споровой суспензии) – $5 \cdot 10^5$ – $4 \cdot 10^6$ спор на 1 г абсолютно сухой массы среды или по массе 0,15–0,2%.

Для сохранения свойств посевного материала рекомендуются следующие способы хранения: лиофильное высушивание, на песке, высушенном твердом субстрате, в зависимости от необходимого периода сохранения объекта исследований.

Посевной материал на твердом субстрате с влажностью 60 – 65% не подлежит хранению.

Список литературы

- Гнеушева И.А., Павловская Н.Е., Яковлева И.В. 2010. Биологическая активность грибов рода *Trichoderma* и их промышленное применение //Вестник аграрной науки. Т. 24. №. 3. С. 36-39.
- Ефременко Е.Н. и др. 2014. Имобилизованные грибные биокатализаторы для получения комплекса целлюлаз, гидролизующего возобновляемое растительное сырье //Катализ в промышленности. №. 1. С. 68-77.
- Зиганшин Д.Д., Сироткин А.С. 2017. Особенности глубинного и поверхностного культивирования грибов *Trichoderma* для получения биопрепаратов на основе клеток гриба // Вестник Казанского технологического университета. Т. 20. №. 10. С. 155-158.
- Зиновьева М.Е., Волкова Т.С., Шафигуллина Н.Ф. 2018. Особенности ферментативного гидролиза целлюлозосодержащего сырья ферментным препаратом «Целлолюкс-А» // Вестник технологического университета.

Т. 21. №. 3. С. 56-58.

Лаврентьев А.Ю., Шерне В.С. 2020. Выращивание молодняка крупного рогатого скота с использованием трепела и биостимулятора // Состояние, проблемы и перспективы развития аграрной науки на современном этапе. С. 289-297.

Макарова Е.И., Будаева В.В. 2016. Биоконверсия непищевого целлюлозосодержащего сырья часть 2 // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. №. 3 (18). С. 26-35.

Маслак Д.В. и др. 2015. Активность целлюлолитического комплекса индуцированных мутантов *Bacillus subtilis* // Труды Белорусского государственного университета. Серия: Физиологические, биохимические и молекулярные основы функционирования биосистем. Т. 10. №. 1. С. 82.

Найдун С.Н. и др. 2014. Использование ферментных препаратов на основе грибов рода *Trichoderma* для повышения биодоступности компонентов шротов масличных культур / Биотехнология: достижения и перспективы развития: сборник материалов I международной научно-практической конференции, УО «Полесский государственный университет», г. Пинск, 25–26 сентября 2014 г. / Министерство образования Республики Беларусь [и др.]; редкол.: К.К. Шебеко [и др.]. Пинск : ПолесГУ.

Павловская Н.Е. и др. 2016. Метаболиты грибов рода *Trichoderma* – перспективные компоненты микробиологических препаратов для агротехнологий // Вестник аграрной науки. Т. 59. №. 2. С. 60-64.

Хамидова С.Х. 2021. Создание таксономического положения грибов, относящихся к типу триходермий, выделенных из почвы // Интернаука. №. 2-1. С. 19-20.

STUDY OF CONDITIONS FOR THE PRODUCTION AND STORAGE OF CELLULOLYTIC ENZYME PRODUCER

N.E. Kulikova, A.G. Chernobrovina, N.N. Roeva, M.A. Volchetskaya
Russian University of Biotechnology, Moscow

Cellulases are a group of enzymes that collectively have the ability to catalyze the hydrolysis of cellulose, the most common biopolymer on Earth. Currently, they occupy a central place in the organic carbon cycle and are the most important industrial enzymes on the world market. The expansion of the specificity and range of action of cellulolytic enzymes significantly increases the interest in biocatalysts as technological reagents in various industries, and biodegradability at the disposal stage, the absence of toxicity improves the environmental safety of production. Therefore, the developments aimed at finding and obtaining new strains of cellulase producers and their storage conditions are relevant and will significantly reduce the cost of industrial enzyme preparations and thereby contribute to

increasing the efficiency of large-scale processing of cellulose-containing materials. In this regard, these studies were aimed at studying the conditions for obtaining and physico-chemical parameters of the storage regime of a new strain of the producer of cellulolytic enzymes - the culture of the fungus *Trichoderma koningii* T. It is established: the optimal amount of seed material (in the form of an aqueous spore suspension) – $5 \cdot 10^5$ – $4 \cdot 10^6$ a spore per 1 g of absolutely dry mass of the medium or by weight 0.15–0.2% can be obtained by sowing on a solid nutrient medium consisting of 45% wheat bran, 25% beet pulp, 25% malt sprouts and 5% sawdust at an initial humidity of 50-65%. To preserve the properties of the seed material, the following storage methods are recommended: freeze-drying, on sand, dried solid substrate, depending on the required period of preservation of the object of research.

Keywords: *cellulases, hydrolysis, enzyme preparations.*

Об авторах:

КУЛИКОВА Наталия Евгеньевна – кандидат технических наук, доцент, ФГБОУ ВО «Российский биотехнологический университет», 125080, Москва, Волоколамское ш., д. 11, e-mail: nataliyakulikova67@mail.ru.

ЧЕРНОБРОВИНА Антонина Григорьевна – кандидат технических наук, доцент, ФГБОУ ВО «Российский биотехнологический университет», 125080, Москва, Волоколамское ш., д. 11, e-mail: ag_61@list.ru.

РОЕВА Наталья Николаевна – доктор химических наук, профессор, ФГБОУ ВО «Российский биотехнологический университет», 125080, Москва, Волоколамское ш., д. 11, e-mail: roeva@mgupp.ru.

ВОЛЧЕЦКАЯ Мария Аллексеевна – студент, ФГБОУ ВО «Российский биотехнологический университет», 125080, Москва, Волоколамское ш., д. 11, e-mail: mgupp@mgupp.ru.

Куликова Н.Е. Изучение условий получения и хранения продуцента целлюлолитических ферментов / Н.Е. Куликова, А.Г. Чернобровина, Н.Н. Роева, М.А. Волчецкая // Вестн. ТвГУ. Сер. Биология и экология. 2024. № 4(76). С. 30-38.

Дата поступления рукописи в редакцию: 22.02.23

Дата подписания рукописи в печать: 01.12.24