

УДК 663.15

Использование препарата на основе низкомолекулярных веществ сои для повышения активности ксиланазы и эндоглюканазы мутантного штамма *Trichoderma reesei* Co-44

© 2019 А.С. СЕРЕДА¹, Е.В. КОСТЫЛЕВА^{1,*}, И.А. ВЕЛИКОРЕЦКАЯ¹, Н.В. ЦУРИКОВА¹, Н.В. ХАБИБУЛИНА², Т.М. БИКБОВ³, Т.В. БУБНОВА⁴, В.А. НЕМАШКАЛОВ⁴

¹Всероссийский научно-исследовательский институт пищевой биотехнологии (ВНИИПБТ) – филиал ФГБУН «ФИЦ питания и биотехнологии», Москва, 111033

²Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева (РХТУ им. Д.И. Менделеева), кафедра биотехнологии, Москва, 125480

³ЗАО «Партнер-М», Калужская обл., Малоярославец, 249096

⁴ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук (ИБФМ РАН), Московская обл., Пуцино, 142290

*e-mail: ekostyleva@list.ru

Поступила в редакцию 19.06.2019 г.

После доработки 22.08.2019 г.

Принята к публикации 15.09.2019 г.

Исследована возможность применения концентрата низкомолекулярных веществ сои – препарата «БиоАксель», получаемого в качестве побочного продукта при производстве соевого белкового продукта с использованием технологии 3Д-структурирования, в качестве компонента ферментационных сред при культивировании штамма *T. reesei* Co-44 – высокоактивного продуцента целлюлаз и гемицеллюлаз с увеличенным уровнем биосинтеза ксиланазы и эндоглюканазы. Введение в состав ферментационных сред 1–9% «БиоАкселя» способствовало значительному увеличению активности ксиланазы и эндоглюканазы и ускорению динамики их биосинтеза при культивировании *T. reesei* Co-44 в колбах, причем положительный эффект от применения препарата увеличивался с повышением его концентрации в среде. При внесении 5% и 7% «БиоАкселя» активность эндоглюканазы увеличилась в 1,8 раз, ксиланазы – на 40–50%. Максимальное увеличение активности ксиланазы и эндоглюканазы, в среднем, в 2 раза по отношению к контролю, было получено при добавлении 9% «БиоАкселя». Культивирование штамма *T. reesei* Co-44 в лабораторных ферментерах по производственной схеме в режиме с подпиткой показало перспективность применения «БиоАкселя» в составе ферментационных сред вместо дорогостоящего компонента – дрожжевого экстракта.

Ключевые слова: концентрат низкомолекулярных веществ сои, *Trichoderma reesei*, культивирование, ксиланаза, эндоглюканаза.

doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-5-70-79

Соя является одной из наиболее востребованных на российском рынке агрокультур: по данным Федерального центра оценки безопасности и качества зерна, на нее приходится 58% всего импорта зерновых и масличных. Посевные площади сои в России с каждым годом увеличиваются. По ито-

говым данным Росстата, в 2017 г. соей было занято свыше 2,6 млн га, урожай составил 3,6 млн т. [1, 2]. Отраслевая программа Российского соевого союза «Развитие производства и переработки сои в Российской Федерации на 2015–2020 годы» предусматривает развитие технологий глубокой

Список сокращений: ДЭ – дрожжевой экстракт; КЖ – культуральная жидкость; КНВС – концентрат низкомолекулярных веществ сои; НКП – некрахмальные полисахариды; рО₂ – парциальное давление кислорода; ФП – ферментные препараты.

переработки сои, обеспечивающей выработку импортозамещающих пищевых продуктов, прежде всего, соевых изолятов и концентратов [3].

Традиционно соевые продукты с повышенным содержанием белка получают с применением процессов экстракции растворами этилового спирта или слабыми щелочами, изофокусирования в кислой зоне рН, промывания водой; более современные технологии включают использование мембран [4, 5]. В качестве альтернативы данным методам, основными недостатками которых являются сложность аппаратных схем, использование реагентов (органические растворители, кислоты, щелочи), большие потери белка, была разработана технология 3Д-структурирования, которая заключается в переводе белков сои в единую трехмерную структуру – пористый гель, с последующей экстракцией водой низкомолекулярных веществ. В результате получают белковый продукт с содержанием сырого протеина 75%. Разработанный метод позволяет снизить потери белка, повысить эффективность экстракции, исключить использование химических реагентов [6].

При получении соевых белковых концентратов методом экстракции в качестве вторичного продукта образуется соевая меласса (концентрированные растворимые вещества сои) с высоким содержанием низкомолекулярных углеводов, аминокислот, минеральных веществ, витаминов, ростовых факторов. Соевую мелассу часто используют в качестве компонентов питательных сред для культивирования микроорганизмов, продуцирующих различные растворители (ацетон, этанол, бутанол), органические кислоты, в том числе молочную, полиэфир, гликолипиды и т.д. [4, 7–9]. В среднем при выделении безазотистых экстрактивных веществ из 1 т обезжиренных бобов сои образуется 260 кг соевой мелассы, утилизация которой представляет проблему для предприятий по переработке сои [10].

При использовании технологии 3Д-структурирования в качестве побочного продукта получают концентрат низкомолекулярных веществ сои (КНВС), содержащий 10–15% сырого протеина, 60–70% углеводов, 0,7–1,0% общего жира, а также минеральные и биологически активные вещества [6]. Исходя из успешного опыта применения соевой мелассы в процессах культивирования микробных штаммов, КНВС также может иметь перспективы в качестве компонента ферментационных сред, как источник углеводов и ростовых факторов, стимулирующих синтез целевых продуктов.

Востребованным продуктом микробного синтеза являются ферменты, широко используемые в раз-

личных отраслях промышленности и сельском хозяйстве. На рынке промышленных ферментов одну из доминирующих групп представляют карбогидразы, доля которых в 2018 г. составила 24% от общего рынка ферментов [11]. Промышленные карбогидразы включают, главным образом, амилазы, целлюлазы и гемицеллюлазы. Способность целлюлаз и гемицеллюлаз гидролизовать некрахмальные полисахариды (НКП) обуславливает их широкое применение в процессах биоконверсии растительного сырья в пищевой, текстильной, целлюлозно-бумажной промышленности, в кормовой отрасли, при производстве биотоплива и моющих средств [12–14]. Наиболее интенсивно растет спрос на ферментные препараты (ФП) целлюлаз и гемицеллюлаз в кормопроизводстве, где гидролиз НКП в зерновом сырье приводит к снижению вязкости кормовых смесей и перевариваемой массы, повышает доступность питательных компонентов для действия пищеварительных ферментов, способствует нормализации микрофлоры кишечника, увеличивает энергетическую ценность и усвояемость кормов, позволяет заменять дорогостоящие компоненты рационов более дешевыми зерновыми культурами [15, 16].

Высокую целлюлолитическую активность проявляют мицелиальные грибы родов *Trichoderma*, *Penicillium*, *Humicola* и *Aspergillus*, а также некоторые бактериальные штаммы родов *Pseudomonas*, *Bacillus* и др. [17]. Ксиланазы обнаружены у микроскопических грибов родов *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, бактерий родов *Clostridium*, *Bacillus*, *Streptomyces*, дрожжей *Aureobasidium*, *Cryptococcus* и *Trichosporon* [18, 19]. Получены рекомбинантные штаммы дрожжей и мицелиальных грибов – активные продуценты ксиланаз с улучшенными свойствами для производства препаратов кормового назначения [20, 21].

На российском рынке коммерческих целлюлаз и ксиланаз для кормопроизводства основную долю составляют ФП на основе штаммов *Trichoderma*, обладающих высокой секреторной способностью. Предпочтительно используются комплексные препараты, обеспечивающие универсальность действия на различные виды НКП в зерновом сырье. Моноферментные препараты могут быть использованы в качестве корректирующей добавки. Следует отметить, что на двух существующих на данный момент в РФ биотехнологических заводах по производству ферментных препаратов («Сиббиофарм» и «Агрофермент») отработана технология выращивания грибов рода *Trichoderma*, позволяющая получать конкурентоспособные комплексные препараты карбогидраз [16, 22–24].

Известно, что сою и продукты на ее основе часто применяют для культивирования мицелиальных грибов. Так штамм *T. reesei* WX-112 – продуцент целлюлаз выращивали поверхностным способом на среде, содержащей в качестве основных компонентов пшеничные отруби, авицел и муку из соевого жмыха [25]. Для индукции синтеза карбогидраз *T. reesei* при глубинном культивировании в ферментационные среды добавляют соевую шелуху [26, 27].

Во ВНИИПБТ совместно с НИЦ «Курчатовский институт» методом гамма-мутагенеза на кобальтовом источнике был получен штамм мицелиального гриба *Trichoderma reesei* Co-44 с увеличенной активностью ксиланазы и эндоглюканызы для получения ферментных препаратов кормового назначения [28]. Штамм депонирован во Всероссийской коллекции микроорганизмов под номером F-4789D. Дополнительным преимуществом штамма является высокая продуктивность при культивировании в условиях, принятых для промышленного культивирования штаммов *T. reesei*, без изменения технологической схемы.

Одним из способов повышения рентабельности производства ферментных препаратов является введение в состав ферментационных сред недорогих индукторов, способствующих повышению активности целевых ферментов. В качестве индуктора биосинтеза целевых ферментов в исследовании был использован концентрат низкомолекулярных веществ сои – препарат «БиоАксель», получаемый в качестве побочного продукта при производстве соевых белковых концентратов с применением технологии 3Д-структурирования.

Цель работы – исследование влияния препарата «БиоАксель» в составе ферментационных сред на активность эндоглюканызы и ксиланазы при культивировании высокоактивного промышленного штамма *T. reesei* Co-44 в колбах и лабораторных ферментерах.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Материалы

Препарат «БиоАксель» – концентрат низкомолекулярных веществ сои («Партнер-М», Россия) с содержанием белка $14,5 \pm 0,3\%$ а.с.в., общих сахаров – $53,1 \pm 1,5\%$ а.с.в., массовой долей влаги – $4,8\%$.

Для определения активности целевых ферментов использовали ксилан из древесины березы, Na-соль карбоксиметилцеллюлозы (Sigma, США).

Штамм микроорганизма

Объектом исследований был выбран штамм мицелиального гриба *Trichoderma reesei* Co-44 (F-4789D), полученный в результате индуцированного мутагенеза штамма *T. reesei* VCM 182/КК (ВГНКИ28) – промышленного продуцента целлюлолитических и гемицеллюлолитических ферментов (Патент РФ 2001949, С 12 N 9/42, 1993 г.). Штамм характеризуется увеличенной активностью ксиланазы и эндоглюканызы [28].

Культивирование штамма *T. reesei* Co-44 в колбах

Процесс культивирования проводили на термостатируемых качалках (250 об/мин) при $30\text{ }^\circ\text{C}$ в течение 72–120 ч в колбах Эрленмейера объемом 750 мл с 50 мл ферментационной среды следующего состава, %: лактоза – 2,0; дрожжевой экстракт – 1,0; солодовые ростки – 1,0; K_2HPO_4 – 0,2; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0,6; CaCl_2 – 0,06; водопроводная вода. Препарат «БиоАксель» вносили в среду в концентрации от 1 до 9% по вариантам опыта, pH ферментационной среды до стерилизации доводили до значения $5,0 \pm 0,2$, в процессе культивирования pH не корректировали. Стерильные питательные среды засеивали микробиологической петлей, используя в качестве инокулята культуру, выращенную на модифицированной среде SM следующего состава (%): K_2HPO_4 – 0,2; глюкоза – 1,0; дрожжевой экстракт – 0,4; пептон – 0,6; солодовое сусло – 2,0; агар-агар – 2,0. Биомассу культуры, выращенной глубинным способом, отделяли центрифугированием при 10750 g в течение 5 мин. Супернатант культуральной жидкости (КЖ) использовали для определения активности ксиланазы, эндоглюканызы и концентрации растворимого белка.

Культивирование штамма *T. reesei* Co-44 в лабораторных ферментерах

Использовали ферментеры КФ 108 («Проинтех», Россия) с общим объемом 3 л, рабочим – 1,5 л, оснащенных системами автоматического регулирования pH, $p\text{O}_2$ и температуры. Инокулят для засева ферментеров получали посредством культивирования гриба в качалочных колбах (250 об/мин) при $30\text{ }^\circ\text{C}$ в течение 48 ч в среде следующего состава (%): глюкоза – 2,5; кукурузный экстракт (40% СВ) – 2,0; K_2HPO_4 – 0,5, водопроводная вода. Колбы засеивали кусочком агара с мицелием с помощью микробиологической петли. Засев ферментера осуществляли внесением жидкого инокулята в количестве 7% от объема питательной среды

(650 мл среды + 50 мл инокулята). Ферментацию проводили при следующих условиях: температура – 30±2 °С, расход воздуха (аэрация) – 0,5 л/мин, парциальное давление кислорода (pO₂) – 30±5%; и регулиацию осуществляли изменением скорости перемешивающего устройства. рН среды поддерживали на уровне 5,5±0,1 с помощью подтитровки растворами 5% H₂SO₄ и 10% NH₄OH. Использовали ферментационную среду следующего состава (%): лактоза – 2,0; микрокристаллическая целлюлоза – 1,0; солодовые ростки – 1,0; дрожжевой экстракт (ДЭ) – 1,0; KH₂PO₄ – 0,2; (NH₄)₂SO₄ – 0,6; CaCl₂ – 0,06; пеногаситель Пропинол – 0,1; водопроводная вода. Препарат «БиоАксель» в опытных вариантах вносили в исходную ферментационную среду в концентрации 5%. Подпитку осуществляли после 48 ч культивирования согласно схеме, принятой для культивирования *T. reesei* в производственных условиях: в автоматическом режиме со скоростью 5 мл/ч 40%-ным водным раствором лактозы, глюкозы и ксилозы в соотношении 6:3:1. Продолжительность культивирования в ферментациях с подпиткой составляла 168 ч, без подпитки – 144 ч. По окончании культивирования биомассу культуры отделяли центрифугированием на центрифуге Beckman Coulter J6-MI (США) при 4600 об/мин в течение 40 мин. В супернатантах КЖ определяли активности целевых ферментов, а также общее содержание растворимого белка.

Активность ксиланазы и эндоглюканазы

Активность определяли по скорости образования восстанавливающих сахаров методом Шомоди–Нельсона при гидролизе ксилана из древеси-

ны березы и Na-соли карбоксиметилцеллюлозы, соответственно. За единицу активности принимали такое количество фермента, которое приводит к образованию 1 мкмоль ВС за 1 мин при рН 5,0, температуре 50 °С и концентрации субстрата в реакционной смеси 0,5% [29].

Содержание растворимого белка определяли по методу Лоури, используя в качестве стандарта бычий сывороточный альбумин.

Результаты получали не менее чем в трех повторностях.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние препарата «БиоАксель» на биосинтез ксиланазы и эндоглюканазы при культивировании *T. reesei* Co-44 в колбах

Штамм *T. reesei* Co-44 синтезирует большой спектр целлюлолитических и гемицеллюлолитических ферментов и характеризуется повышенной активностью карбогидраз эндодеполимеразного действия – ксиланазы и эндоглюканазы, которые являются ключевыми в составе кормовых ферментных препаратов, способствуя быстрому снижению вязкости зерновых смесей, повышению доступности питательных компонентов зернового сырья, увеличению энергетической ценности и усвояемости кормов [15].

Внесение соевого продукта «БиоАксель» в ферментационную среду при культивировании *T. reesei* Co-44 в колбах привело к значительному увеличению активности целевых ферментов и ускорению динамики их биосинтеза (рис. 1). Так эндоглюканазная активность штамма повысилась

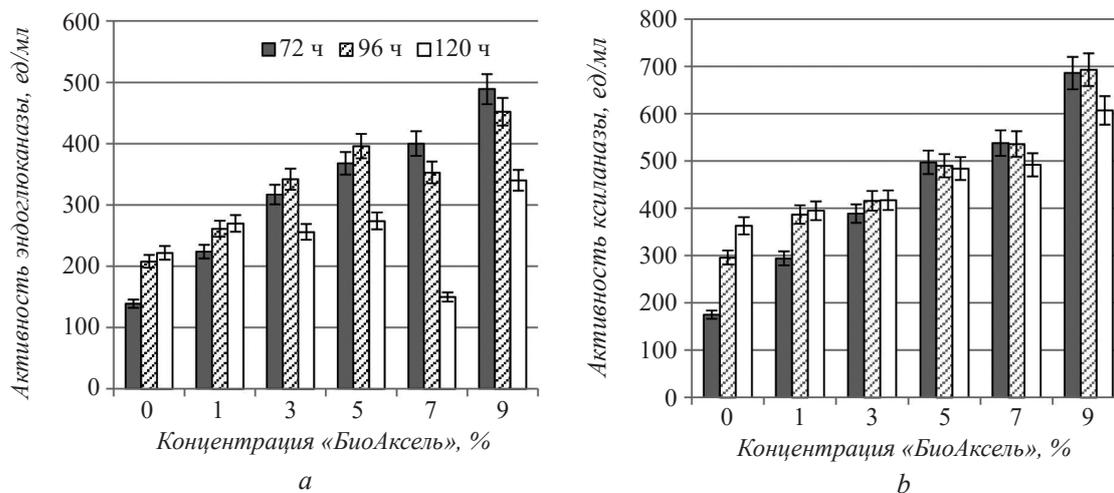


Рис. 1. Влияние концентрации «БиоАкселя» на биосинтез эндоглюканазы (a) и ксиланазы (b) штаммом *T. reesei* Co-44 при культивировании в колбах

Fig. 1. The effect of «BioAccel» concentration on endoglucanase (a) and xylanase (b) biosynthesis by *T. reesei* Co-44 strain when cultured in flasks

в среднем на 50 ед/мл при увеличении концентрации КНВС в среде на 2%, а максимум накопления фермента отмечен на 72-м ч культивирования. При концентрации КНВС 3% и выше наблюдалось снижение активности эндоглюканазы к 120-му ч роста, что, вероятно, связано с повышением рН КЖ при культивировании в колбах без корректировки рН до значений 7,0–7,3, при которых эндоглюканаза нестабильна и теряет часть активности, в то время как для экспрессии ксиланаз II и III *T. reesei* благоприятны значения рН в нейтральной зоне [30]. Максимальная активность эндоглюканазы – 489 ± 25 ед/мл (220% от максимальной активности эндоглюканазы в контроле) была получена на 72-м ч культивирования с 9% «БиоАкसेля».

Аналогичным образом внесение «БиоАкसेля» влияло на биосинтез ксиланазы. Наибольшее увеличение активности ксиланазы – почти в 2 раза по отношению к максимальной ксиланазной активности на исходной среде, наблюдалось на 72–96-м ч роста в варианте с 9% «БиоАкसेля».

При внесении 5 и 7% «БиоАкसेля» активность эндоглюканазы увеличивалась в 1,8 раз, ксиланазы – на 40–50%.

Следует отметить, что внесение «БиоАкसेля» приводило к заметному повышению концентрации растворимого белка в исходной среде (рис. 2). Из литературных данных известно, что увеличение концентрации органического источника азота стимулирует образование карбогидраз *T. reesei* [31, 32]. Однако в наибольшей степе-

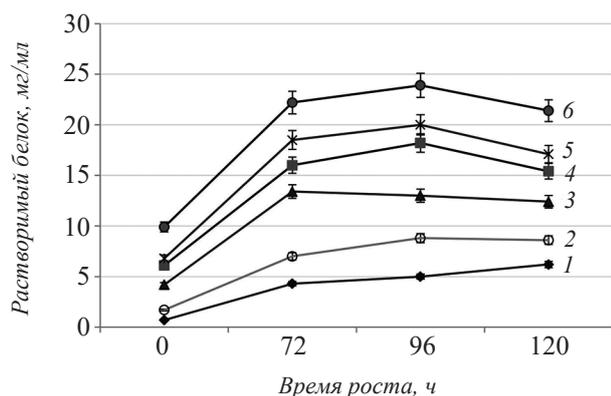


Рис. 2. Влияние концентрации «БиоАкसेля» на содержание растворимого белка в исходных средах и в культуральной жидкости. Концентрация органического источника азота: 1 – 0% (контроль); 2 – 1%; 3 – 3%; 4 – 5%; 5 – 7%; 6 – 9%

Fig. 2. The effect of «BioAccel» concentration on soluble protein content in fermentation media and culture liquid. Concentration of organic nitrogen source: 1 – 0% (control); 2 – 1%; 3 – 3%; 4 – 5%; 5 – 7%; 6 – 9%

ни синтез целлюлаз и ксиланаз *T. reesei* зависит от источника углерода и регулируется углеводными индукторами на уровне транскрипции [30–33]. Помимо соответствующих полимерных субстратов, сильное индуцирующее действие на биосинтез карбогидраз *T. reesei* оказывают такие сахара и их производные, как софороза, лактоза, D-ксилоза, целлобиоза, ксилобиоза, L-сорбоза, галактоза, причем большинство индукторов стимулирует синтез одновременно целлюлаз и ксиланаз. В процессах промышленного культивирования *T. reesei* предпочтительно используют лактозу, которая обеспечивает интенсивное накопление биомассы и эффективную индукцию экспрессии целлюлолитических генов [30–35].

К основным растворимым сахарам сои относятся сахароза и галактоолигосахариды – стахиоза и раффиноза, состоящие из сахарозы и галактозы. Их содержание в соевых бобах составляет около 15% а.с.в. [36, 37]. В препарате «БиоАксель» содержится 25–27% сахарозы, около 10% стахиозы, 3–4% раффинозы, 3–5% галактозы, 2–3% фруктозы и 0,5–1% глюкозы. Низкомолекулярные углеводы сои могут оказывать индуцирующее действие на синтез основных карбогидраз *T. reesei*.

Таким образом, при культивировании в колбах соевый продукт «БиоАксель» способствовал повышению ксиланазной и эндоглюканазной активности штамма *T. reesei* Co-44, кроме того наблюдалось ускорение динамики биосинтеза целевых ферментов, что позволяет сократить время культивирования в колбах до 72–96 ч вместо 120 ч.

Культивирование *T. reesei* в лабораторных ферментерах с внесением препарата «БиоАксель»

Основным источником углерода и индуктором биосинтеза целлюлаз при культивировании *T. reesei*, как правило, является целлюлоза. Однако повышение концентрации целлюлозы в ферментационной среде часто приводит к снижению продукции ферментов и возникновению ряда технологических проблем из-за увеличения вязкости и ограничения массопереноса в ферментере. Поэтому общепринятые схемы ферментаций *T. reesei* включают стадию подпитки низкомолекулярными углеводами и внесение сахаров, главным образом, лактозы, в состав исходной среды наряду с целлюлозными субстратами [35, 38]. Добавление подпитки при ведении процесса культивирования приводит к снижению вязкости культуральной жидкости, улучшению массообмена, а также увеличению

так называемого «урожая» или съема целевых ферментов, что является одним из основных параметров, определяющих эффективность технологии производства ферментных препаратов [35, 39]. От вида источников углерода в исходной среде и подпитке в большой степени зависит соотношение основных ферментов в карбогидразном комплексе *T. reesei* [40, 41]. Глубинное культивирование *T. reesei* Co-44 в лабораторных ферментерах проводили с подпиткой низкомолекулярными углеводами по схеме, используемой для промышленного культивирования грибов рода *Trichoderma* (рис. 3, варианты 3 и 4), а также в периодическом режиме без подпитки (рис. 3, варианты 1 и 2), чтобы определить степень влияния КНВС на биосинтез целевых ферментов мутантным штаммом с учетом внесения дополнительных индукторов карбогидраз в виде подпитки. Препарат «БиоАксель» добавляли в опытные среды в концентрации 5%, так как более высокие концентрации способствовали увеличению вязкости ферментационной среды, что усложняло процесс ферментации.

Полученные данные показали положительное действие «БиоАкселя» на накопление ксиланазы и эндоглюканазы штаммом *T. reesei* Co-44 в лабораторных ферментерах. При культивировании без подпитки (рис. 3, варианты 1 и 2) за счет до-

бавления «БиоАкселя» активность эндоглюканазы и ксиланазы увеличилась более чем в 2 раза. Максимум биосинтеза ферментов наблюдался на 120-м ч роста, активность ферментов сохранялась без существенных потерь до конца ферментации – 144 ч.

Промышленные ферментации *T. reesei* целесообразно проводить в режиме с подпиткой углеводами, что позволяет многократно увеличивать съём целевых ферментов с ферментера за счет индукции биосинтеза карбогидраз и увеличения объемов получаемой культуральной жидкости. Поэтому для определения реального экономического эффекта от введения в состав среды препарата «БиоАксель» мы проводили ферментации с подпиткой по схеме, принятой для культивирования продуцента в производственных условиях. В ферментациях с подпиткой (рис. 3, вар. 3 и 4) внесение раствора углеводов частично нивелировало эффект от использования КНВС: максимальная активность эндоглюканазы в варианте с «БиоАкселем» увеличивалась на 16%, ксиланазы – на 20%. При этом целевые ферменты в ферментациях с подпиткой наиболее интенсивно синтезировались до 144 ч роста, далее к 168-му ч прирост активности ксиланазы и эндоглюканазы был незначителен. За счет применения «БиоАкселя» суммарный съём эндоглюканазы с

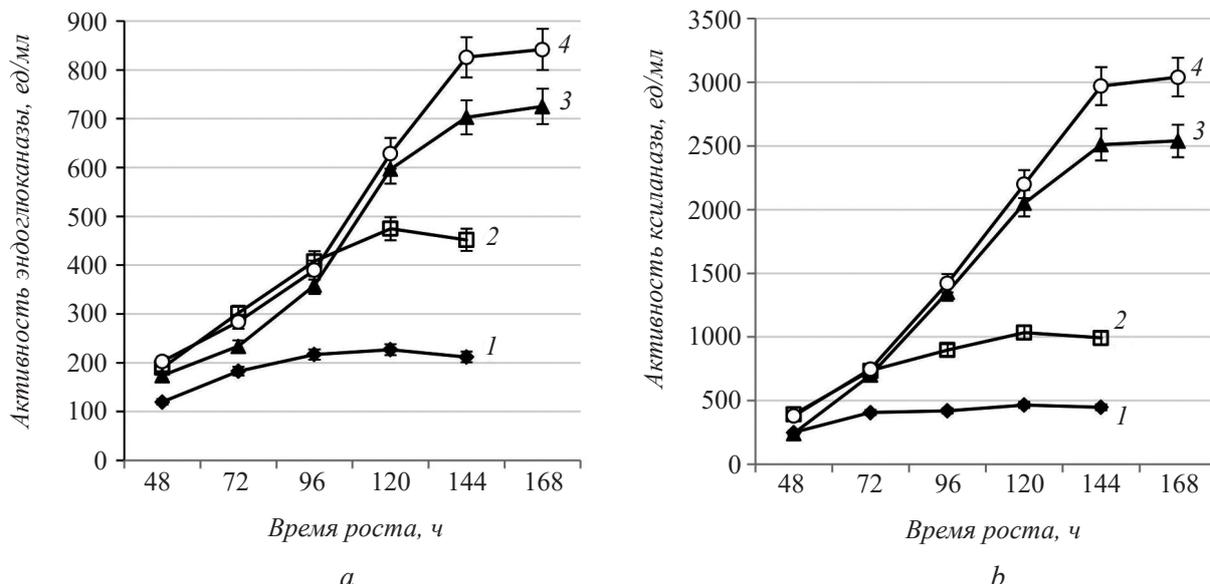


Рис. 3. Влияние «БиоАкселя» на накопление эндоглюканазы (а) и ксиланазы (б) при культивировании *T. reesei* Co-44 в лабораторных ферментерах: 1 – без подпитки; 2 – без подпитки и с 5% «БиоАкселя»; 3 – с подпиткой; 4 – с подпиткой и с 5% «БиоАкселя»

Fig. 3. The influence of «BioAccel» on accumulation of endoglucanase (a) and xylanase (b) during *T. reesei* Co-44 fed-batch and batch cultivation in laboratory fermenters. 1 – batch; 2 – batch, 5 «BioAccel»; 3 – fed-batch; 4 – fed-batch, 5% «BioAccel»

Основные показатели ферментаций *T. reesei* Co-44The main indicators of *T. reesei* Co-44 fermentations

Показатель	Ферментация с подпиткой				Ферментация без подпитки	
	Дрожжевой экстракт		Без дрожжевого экстракта		Контроль	+ 5% «БиоАксель»
	Контроль	+ 5% «БиоАксель»	Контроль	+ 5% «БиоАксель»		
Суммарный объем КЖ, мл	1220	1235	1180	1210	590	572
Объем супернатанта КЖ, мл	680	700	690	710	476	457
Количество растворимого белка, мг/мл	34±3	39±3	28±2	35±3	16±1	26±2
Финальная активность эндоглюканазы, ед/мл	725±44	842±51	540±34	808±47	212±14	452±26
Финальная активность ксиланазы, ед/мл	2539±148	3040±163	1720±96	2731±153	448±25	993±54
Суммарный съём эндоглюканазы с ферментера, ед.	493000	589400	372600	573680	100912	206564
Суммарный съём ксиланазы с ферментера, ед.	1726500	2128000	1186800	1939000	213248	453800

ферментера увеличился на 20% в варианте с подпиткой и на 105% при культивировании без подпитки; суммарный выход ксиланазы в варианте с подпиткой увеличился на 23%, без подпитки – на 113% (табл. 1).

Увеличение съема целевых активностей с ферментера на 20%, как правило, позволяет на 10% снизить себестоимость продукта. Однако с учетом стоимости «БиоАкселя» экономическая эффективность его применения в ферментаци-

ях *T. reesei* Co-44 с подпиткой менее значительна. Поэтому были проведены ферментации *T. reesei* Co-44 по производственной схеме (с подпиткой) с заменой самого дорогостоящего компонента среды – дрожжевого экстракта (900–1100 руб/кг), препаратом «БиоАксель» (рис. 4).

Следует отметить, что 5 кг «БиоАкселя» стоят, в среднем, в 2 раза дешевле, чем 1 кг дрожжевого экстракта. В результате исключения ДЭ из состава среды активность эндоглюканазы снизилась на

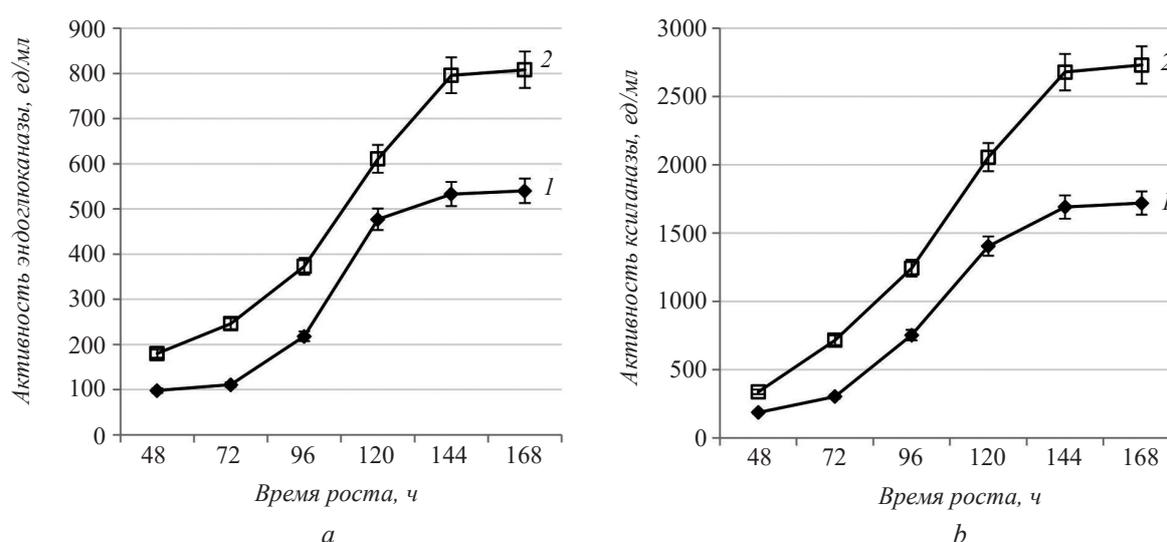


Рис. 4. Влияние «БиоАкселя» на накопление эндоглюканазы (a) и ксиланазы (b) при культивировании *T. reesei* Co-44 в лабораторных ферментерах без дрожжевого экстракта 1 – контроль; 2 – с 5% «БиоАкселя»

Fig. 4. The influence of «BioAccel» on accumulation of endoglucanase (a) and xylanase (b) accumulation during *T. reesei* Co-44 fed-batch cultivation without yeast extract; 1 – Control; 2 – 5% «BioAccel»

25%, ксиланазы – на 32%. Внесение 5% «БиоАкселя» позволило увеличить активность эндоглюканазы на 50% по отношению к контролю без ДЭ и на 11% – по отношению к контролю с ДЭ, активность ксиланазы – на 59 и 8%, соответственно.

Таким образом, введение в состав ферментационной среды 5% «БиоАкселя» вместо дрожжевого экстракта позволило увеличить выход эндоглюканазы с ферментера на 16%, ксиланазы – на 12%, что с учетом значительной разницы в стоимости данных компонентов, обуславливает экономическую эффективность применения препарата «БиоАксель», являющегося побочным продуктом получения соевых белковых концентратов, при промышленном культивировании нового мутантного штамма *T. reesei* Co-44 – продуцента карбогидраз для применения в кормопроизводстве.

Научно-исследовательская работа по подготовке рукописи проведена за счет средств субсидии на выполнение государственного задания в рамках Программы Фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2019–2021 годы (тема № 0529-2019-0066).

ЛИТЕРАТУРА

1. Линников П.И. Российский рынок сои: тенденции, перспективы развития. *Аграрный научный журн.*, 2018, 10, 81–86.
2. Дятловская Е. Россия нарастила импорт сои. *Агроинвестор*, 2018. <https://www.agroinvestor.ru/markets/news/30080-rossiya-narastila-import-soi/>
3. Отраслевая Программа Российского соевого союза «Развитие производства и переработки сои в российской федерации на 2015–2020 годы» <https://docplayer.ru/44983335-Rossiyskiy-soevyy-soyuz.html>
4. Long CC, Gibbons WR. Conversion of soy molasses, soy solubles, and dried soybean carbohydrates into ethanol. *Int J Agric & Biol Eng*, 2013, 6(1), 62–68. doi: 10.3965/j.ijabe.20130601.006
5. Ma, C.-Y. Soybean: soy concentrates and isolates. In: Wrigley C.W., Corke H., Seetharaman K., Faubion J, eds. *Encyclopedia of Food Grains*. New York, N.Y.: *Elsevier Sci.*, 2016, 3, 482–488. doi: 10.1016/B978-0-12-394437-5.00170-4
6. Хабибулина Н.В., Бикбов Т.М., Пономарев В.В. 3D-структурирование – инновационный подход к интенсификации биотехнологических процессов. *Проектная культура и качество жизни*, 2015, 1, 473–491.
7. Solaiman D, Ashby R, Hotchkiss A, Foglia T. Biosynthesis of Medium-chain-length Poly(hydroxyalkanoates) from Soy Molasses. *Biotechnol. Letters*, 28. 2006. 157–162. doi: 10.1007/s10529-005-5329-2.
8. Roberto De Oliveira M, Magri A, Baldo C, Camillos-Neto D, Minucelli T, Antonia M, Celligoi M.A. Review: Sophorolipids. A Promising biosurfactant and its applications. *Int. J. Adv. Biotechnol. Res. (IJBR)*, 2015, 6. 161–174.
9. Rodrigues M.S., Moreira F.S., Cardoso V.L., et al. Soy molasses as a fermentation substrate for the production of biosurfactant using *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145. *Environ Sci. Pollut Res.*, 2017, 24, 18699–18709. doi: 10.1007/s11356-017-9492-5
10. Смирнова В.Д. Отходы производства концентрированных белковых продуктов из сои как сырье для получения кормовых добавок. Автореф. дисс. ... канд. техн. наук. РХТУ. М., 2012, 19.
11. Enzymes market by type (protease, carbohydrase, lipase, polymerases and nucleases, and other types), by source, by reaction type, by formulation, by application, and segment forecasts, 2017–2026. <https://www.reportsanddata.com/report-detail/enzymes-market> (дата обращения 11.06.19)
12. Михайлова Р. В. Мацерирующие ферменты мицелиальных грибов в биотехнологии. Минск: *Белорус. наука*, 2007, 407.
13. Bhat M.K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnol. Advances*. 2000, 18, 355–383.
14. Kuhad R.C., R. Gupta, A. Singh. Microbial cellulases and their industrial applications. *Enzyme Res.*, 2011, 2011, 10. doi: 10.4061/2011/280696
15. Bedford M.R. Enzymes in farm animal nutrition. Ed. M.R. Bedford, G.G. Partridge. UK: *CAB Int.*, 2010, 319.
16. Лагутин В. Обзор рынка: кормовые ферменты. *Ценовик*, 2015, (6), 63–66.
17. Imran M., Anwar Z., Irshad M., Ashfaq H. Cellulase production from species of fungi and bacteria from agricultural wastes and its utilization in industry: A review. *Advances Enzyme Res.*, 2016, 4(2), 44.
18. Polizeli M.L., Rizzatti A.C., Monti R., et al. Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *Appl. Microbiol., Biotech.*, 2005, 67(5), 577–591.
19. Ahmed S., Riaz S., Jamil A. Molecular cloning of fungal xylanases: an overview. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2009, 84(1), 19–35.
20. Калинина А.Н., Борщевская Л.Н., Гордеева Т.Л., Синецкий С.П. Сравнение ксиланаз различного происхождения в экспрессионной системе *Pichia pastoris*: экспрессия, биохимическая характеристика и биотехнологический потенциал. *Биотехнология*, 2018, 34(4), 26–36.
21. Синицын А.П., Рубцова Е.А., Шашков И.А. и др. Получение и свойства новых биокатализаторов, предназначенных для разрушения некрахмальных растительных полисахаридов. *Катализ в промышленности*, 2017, 17(4), 331–338. doi: 10.18412/1816-0387-2017-4-331-338

22. Короткова О.Г., Сеницына А.О., Кондратьева Е.Г. и др. Активность ферментов, предназначенных для деградации некрахмальных полисахаридов. *Птицеводство*, 2016, (5), 8–13.
23. Толкачева А.А., Черенков Д.А., Корнеева О.С., Пономарев П.Г. Ферменты промышленного назначения – обзор рынка ферментных препаратов и перспективы его развития. *Вестник Воронежского государственного университета инженерных технологий*, 2017, 79(4), 197–203. <https://doi.org/10.20914/2310-1202-2017-4-197-203>
24. Борисова Л. Производство ферментов: возврат утраченных позиций. *Комбикорма*, 2015, (12), 23–26.
25. Hao X.-C., Yu X.-B., Yan Zh.-L. Optimization of the medium for the production of cellulase by the mutant *Trichoderma reesei* WX-112 using response surface methodology. *Food Technol. Biotechnol.*, 2006, 44(1), 89–94.
26. Ellilä S., Fonseca L.P., Uchima C., et al. Development of a low-cost cellulase production process using *Trichoderma reesei* for Brazilian biorefineries. *Biotechnol. Biofuels*, 2017, 10, 30, doi: 10.1186/s13068-017-0717-0
27. Coffman A. Production of carbohydrases by fungus *Trichoderma Reesei* grown on soy-based media. Electronic thesis or dissertation. *University Akron*, 2013. <https://etd.ohiolink.edu/>
28. Костылева Е.В., Цурикова Н.В., Середа А.С. и др. Повышение активности карбогидраз эндополимеразного действия в штамме *Trichoderma reesei* с помощью мутагенеза. *Микробиология*, 2018, 87(5), 530–540.
29. Сеницын А.В. Гусаков, В.А. Черноглазов А.П. Биоконверсия лигноцеллюлозных материалов. М.: МГУ. 1995, 144.
30. Jun H., Kieselbach T., Jönsson L. Enzyme production by filamentous fungi: Analysis of the secretome of *Trichoderma reesei* grown on unconventional carbon source. *Microbial Cell Factories*, 2011, 10(1), 68. doi: 10.1186/1475-2859-10-68
31. Jampala P., Tadikamalla S., Preethi M., et al. Concurrent production of cellulase and xylanase from *Trichoderma reesei* NCIM 1186: enhancement of production by desirability-based multi-objective method. *Biotech.*, 2017, 7, 1–14.
32. Seyis I., Aksoz N. Effect of carbon and nitrogen sources on xylanase production by *Trichoderma harzianum* 1073 D3. *Int. Biodeterioration Biodegradation*, 2005, 55, 115–119.
33. Haltrich D., Nidetzky B., Kulbe K.D., et al. Production of fungal xylanases. *Biores. Technol.*, 1996, 58, 137–161.
34. Foreman P.K., Brown D.M., Dankmeyer L., et al. Transcriptional regulation of biomass-degrading enzymes in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *J. Biological Chem.*, 2003, 278(34), 31988–31997.
35. Jourdier E., Ben Chaabane F., Poughon L., et al. Simple kinetic model of cellulase production by *Trichoderma reesei* for productivity or yield maximization. *Chem. Eng. Transactions*, 2012, 27, 313–318. doi: 10.3303/CET1227053.
36. Choct M., Dersjant-Li Y., McLeish J., Peisker M. Soy oligosaccharides and soluble non-starch polysaccharides: a review of digestion, nutritive and antinutritive effects in pigs and poultry. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, 2010, 23(10), 1386–1398.
37. Karr-Lilienthal L.K., Kadzere C.T., Grieshop C.M., Fahy Jr. G.C. Chemical and nutritional properties of soybean carbohydrates as related to nonruminants: A review. *Livestock Production Sci.*, 2005, 97, 1–12.
38. Ma L., Li C., Yang Z., et al. Kinetic studies on batch cultivation of *Trichoderma reesei* and application to enhance cellulase production by fed-batch fermentation. *J. Biotechnology*, 2013, 166(4), 192–197. doi:10.1016/j.jbiotec.2013.04.023.
39. Hardy N., Augier F., Nienow A.W., et al. Scale-up agitation criteria for *Trichoderma reesei* fermentation. *Chem. Eng. Sci.*, 2017, 172, 158–168. doi: 10.1016/j.ces.2017.06.034
40. Li Y., Zhang X., Zhang F., et al. Optimization of cellulolytic enzyme components through engineering *Trichoderma reesei* and on-site fermentation using the soluble inducer for cellulosic ethanol production from corn stover. *Biotechnology Biofuels*, 2018, 11, 49. doi: 10.1186/s13068-018-1048-5
41. Gong M.Z., Rui H., Guo L.J., et al. Study on process of xylanase by fed-batch fermentation. *Appl. Mechanics Materials*, 2015, 737, 381–387.

Use of a Preparation Based on Soybean Low-Molecular Compounds to Improve Xylanase and Endoglucanase Activities in the *Trichoderma reesei* Co-44 Mutant Strain

A.S. SEREDA¹, E.V. KOSTYLEVA^{1,*}, I.A. VELIKORETSKAYA¹, N.V. TSURIKOVA¹,
N.V. KHABIBULINA², T.M. BIKBOV³, T.V. BUBNOVA⁴, V.A. NEMASHKALOV⁴

¹All-Russian Research Institute of Food Biotechnology, Branch of Federal Research Center of Food, Biotechnology, and Food Safety, Moscow, 111033 Russia

²D. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, 125480 Russia

³«Partner-M» CJSC, Maloyaroslavets, 249096 Russia

⁴Skryabin Institute of Biochemistry and Physiology of Microorganisms (IBPM RAS), Pushchino, Moscow oblast, 142290 Russia

Received June 19, 2019

Revised August 22, 2019

Accepted September 15, 2019

Abstract—A possibility to use a concentrate of soybean low molecular substances, the BioAccel preparation, as a component of fermentation media for the cultivation of *T. reesei* Co-44 strain has been studied. BioAccel is a by-product of the soy protein concentrate production with 3D-structuring technology. *T. reesei* Co-44 is a highly active producer of cellulases and hemicellulases with an increased level of xylanase and endoglucanase biosynthesis. The addition of 1–9% BioAccel to the fermentation medium significantly improved the xylanase and endoglucanase activity and the dynamics of their biosynthesis during the *T. reesei* Co-44 cultivation in flasks. The positive effect of BioAccel grew with the increase in its concentration in the medium. The addition of 5% and 7% of the preparation improved the endoglucanase activity by 1.8 times and the xylanase activity by 40–50%. The maximum increase in the xylanase and endoglucanase activity (twice as compared to the control on average) was obtained with the introduction of 9% BioAccel. Fed-batch fermentation of *T. reesei* Co-44 in laboratory fermenters according to the industrial scheme showed the promise of using BioAccel as a component of the fermentation medium instead of the expensive yeast extract.

Key words: concentrate of low molecular soybean compounds, *Trichoderma reesei*, cultivation, xylanase, endoglucanase

Funding—This work was financially supported by the Basic Research Program of the Russian Academy of Sciences for 2019–2021 (Project no. 0529-2019-0066).

doi: 10.21519/0234-2758-2019-35-5-70-79