

УДК 663.15

ПОЛУЧЕНИЕ КОМПЛЕКСНОГО ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТА С УВЕЛИЧЕННОЙ ПЕКТИНАЗНОЙ АКТИВНОСТЬЮ НА ОСНОВЕ НОВОГО МУТАНТНОГО ШТАММА *T. reesei* Co-44

© 2021 г. Е. В. Костылева^{1, *}, А. С. Серeda¹, И. А. Великорецкая¹, А. М. Айсина¹, Н. В. Цурикова¹, Е. А. Рубцова², А. Д. Сатрутдинов², А. П. Сеницын^{2, 3}

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

²Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071 Россия

³Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, 119991 Россия

*e-mail: ekostyleva@list.ru

Поступила в редакцию 10.04.2020 г.

После доработки 03.07.2020 г.

Принята к публикации 02.09.2020 г.

Для создания комплексных ферментных препаратов сбалансированного состава, обеспечивающих эффективный гидролиз основных некрахмальных полисахаридов растительного сырья (целлюлозы, ксиланов, пектина) проведены исследования по оптимизации состава ферментационной среды для глубинного культивирования нового мутантного штамма *Trichoderma reesei* Co-44 – высокоактивного продуцента карбогидраз эндополимеразного действия. Показано, что концентрат низкомолекулярных веществ сои обеспечивал максимальное – более, чем в 8 раз, увеличение активности полигалактуроназы при увеличенном уровне биосинтеза эндоглюканазы и ксиланазы. Получен комплексный ферментный препарат ксилоризин К4, изучены его физико-химические свойства. С помощью масс-спектрометрического анализа подтверждено присутствие в составе ксилоризина К4 эндополигалактуроназы (GH28) *T. reesei*. Показана перспективность применения ксилоризина К4 для удаления основных некрахмальных полисахаридов соевого шрота в процессе получения соевых белковых концентратов.

Ключевые слова: *Trichoderma reesei*, полигалактуроназа, эндоглюканаза, ксиланаза, некрахмальные полисахариды, ферментационная среда

DOI: 10.31857/S055510992101030X

В основе многих технологий в пищевой и кормовой промышленности лежит переработка растительного сырья с использованием ферментных препаратов (ФП) карбогидраз. Ферментативный гидролиз основных некрахмальных полисахаридов (НКП) растительных тканей – целлюлозы, гемицеллюлозы и пектиновых веществ, позволяет повышать пищевую и кормовую ценность сырья, получать специализированные продукты с требуемыми характеристиками, улучшать параметры технологических процессов и качество готовой продукции [1, 2].

Штаммы мицелиальных грибов отличаются высокой продуктивностью и способностью синтезировать широкий спектр ферментов, что дает возможность рассматривать их как перспективные источники карбогидраз для создания комплекс-

ных препаратов сбалансированного состава, обеспечивающих эффективный гидролиз основных НКП различных видов растительного сырья [2, 3]. Наиболее известным промышленным продуцентом целлюлаз и гемицеллюлаз является гриб *Trichoderma reesei*, секретирующий более 15 различных карбогидраз. Основные компоненты ферментного комплекса штаммов *T. reesei* – целлобиогидролазы, эндоглюканазы (ЭГ), ксиланазы (КС), β-глюкозидазы. В меньшем количестве *T. reesei* синтезирует маннаназу, арабинофуранозидазу, ксилоглюканазу и некоторые другие ферменты, участвующие в гидролизе полимеров растительного сырья [4–6]. Известно, что некоторые штаммы *T. reesei* при культивировании в присутствии индукторов синтезируют в небольшом количестве внеклеточную полигалактуроназу (ПГ)

[7–10]. ПГ катализирует гидролиз α -1,4-гликозидных связей в полигалактуроновой кислоте и относится к ключевым ферментам при гидролизе пектиновых веществ [1, 11, 12].

В ходе ранее проведенных исследований нами был получен мутантный штамм *T. reesei* Co-44 с увеличенной продукцией КС и ЭГ – ключевых ферментов при гидролизе основных НКП зернового сырья в кормопроизводстве [13]. Кроме того, показано повышение уровня биосинтеза ряда сопутствующих ферментов, в том числе ПГ. На основании литературных данных, указывающих на высокое содержание пектиновых веществ в основных видах растительного сырья для пищевой и кормовой отрасли [1, 2, 14], сделано предположение, что увеличение продуктивности штамма *T. reesei* Co-44 по ПГ повысит эффективность получаемых на его основе ФП в различных технологических процессах.

Цель работы – получение комплексного ФП сбалансированного состава с увеличенной продукцией ПГ при высоком уровне синтеза ЭГ и КС на основе *T. reesei* Co-44.

МЕТОДИКА

Штамм микроорганизма. Объект исследования – штамм *T. reesei* Co-44 (ВКМ F-4789D), полученный с использованием гамма-мутагенеза из штамма *T. reesei* ВСМ 18.2/КК – промышленного продуцента целлюлолитических и гемицеллюлолитических ферментов [13].

Подготовка посевного материала. Для получения посевного материала использовали модифицированную среду 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. Штамм выращивали на агаризованной среде в течение 7 сут при 30°C и 7 сут при комнатной температуре на свету. Споры посевной материал на агаризованной среде хранили при температуре 5°C не более 3 мес.

Глубинное культивирование в колбах. Продуцент выращивали на термостатируемых качалках (250 об./мин) при 30°C в течение 120 ч в колбах объемом 750 мл с 50 мл ферментационной среды следующего состава (%): лактоза – 2.0, аморфная целлюлоза – 1.0, солодовые ростки – 1.0, дрожжевой экстракт – 1.0, K_2HPO_4 – 0.2, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 0.6, CaCl_2 – 0.06, водопроводная вода, pH среды 4.8–5.0. В опытные ферментационные среды вместо аморфной целлюлозы вносили различные индукторы биосинтеза карбогидраз. Среды засеивали 2 мл суспензии спорового посевного материала с титром 10^6 спор/мл.

Биомассу гриба после выращивания отделяли центрифугированием при 10750 g в течение 5 мин. Культуральную жидкость (КЖ) использовали для определения активности целевых ферментов.

Получение сухих ФП. Продуцент выращивали в качалочных колбах объемом 750 мл с 50 мл исходной ферментационной среды или среды с выбранным индуктором синтеза карбогидраз на термостатируемых качалках (250 об./мин) при 30°C в течение 96–120 ч. Биомассу выращенной глубинно культуры отделяли центрифугированием на ЦЛС-3 с ротором РУ 8-90 (фактор разделения 6000) в течение 20 мин. Сухой ФП получали осаждением супернатанта КЖ этиловым спиртом в соотношении 1:5 с последующим центрифугированием в течение 15 мин и высушиванием образовавшегося осадка при комнатной температуре.

Определение активности ПГ, КС и ЭГ. Активность определяли по начальной скорости образования восстанавливающих сахаров (ВС) при гидролизе К-соли полигалактуроновой кислоты, ксилана из древесины березы и Na-карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ) соответственно. ВС определяли по методу Шомоди–Нельсона. За 1 ед. активности принимали такое количество фермента, которое катализирует образование 1 мкмоль ВС эквивалентных 1 мкмолью глюкозы за 1 мин при 50°C, pH 5.0, и концентрации соответствующих субстратов в реакционной смеси 1% [15, 16]. Содержание растворимого белка определяли по методу Лоури.

Результаты получали не менее чем в трех повторностях.

Определение pH-оптимума. Оптимальный pH для действия КС, ЭГ и ПГ определяли при 30°C в диапазоне значений pH 3.0–9.0. Для получения растворов с заданным значением pH использовали 0.1 М универсальный буфер.

Определение температурного оптимума. Активности КС, ЭГ и ПГ определяли при pH 5.0 в диапазоне температур 30–80°C.

Электрофорез белков в полиакриламидном геле. Электрофорез в денатурирующих условиях проводили при концентрации геля 12% в 25 мМ трис-глициновом буфере, pH 8.3, с ДДС-Na в концентрации 1 мг/мл в ячейке для электрофореза “Mini Protein Cell system” (“Bio-Rad”, США). Гель окрашивали кумасси бриллиантовым синим G-250 (“Amresco”, США). В качестве белков-маркеров молекулярной массы использовали: β -галактозидазу (116.0 кДа), бычий сывороточный альбумин (66.2 кДа), овальбумин (45.0 кДа), лактатдегидрогеназу (35.0 кДа), REase Bsp981 *E.coli* (25.0 кДа), β -лактоглобулин (18.4 кДа), лизоцим (14.4 кДа)

Масс-спектрометрический анализ. Анализ проводили в ЦКП “Промышленной биотехнологии”

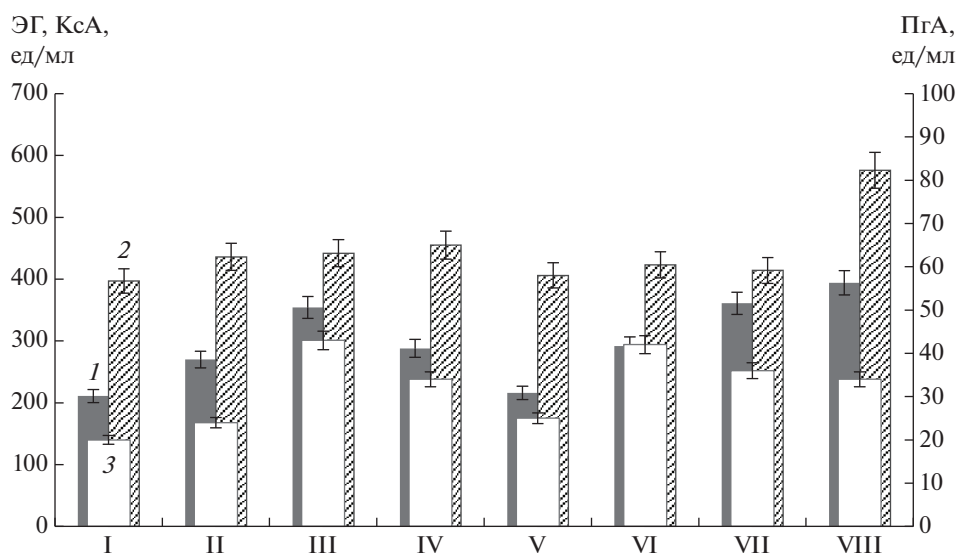


Рис. 1. Влияние различных добавок на синтез внеклеточных ЭГ (1), КС (2) и ПГ (3) штаммом *T. reesei* Co-44: I – аморфная целлюлоза (АЦ), контроль, II – яблочный пектин н/э (ЯП), III – пектиновые волокна (ПВ), IV – свекловичный жом (СЖ), V – соевая шелуха (СШ), VI – КНВС, VII – соевая мука (СМ), VIII – овсяная мука (ОМ).

ФИЦ “Фундаментальные основы биотехнологии” РАН на масс-спектрометре “UltraflexXtreme” (“Bruker Daltonik GmbH”, Германия). Исследуемый белок вырезали из полиакриламидного геля, обрабатывали трипсином, гидролизат анализировали методом MALDI-TOF-масс-спектрометрии. Обработку полученных данных проводили с использованием программы “Bruker Data Analysis” (“Bruker Corporation”, США). Поиск исследуемого фермента по масс-спектрам баз данных белков NCBI и SWISS-PROT осуществляли по программе “Peptide Mass Fingerprint” (“Matrix Science Inc.”, США).

Гидролиз НКП. Для оценки эффективности гидролиза в качестве субстрата использовали тостированный соевый шрот, экструдированный с использованием двухшнекового экструдера (“Werner & Pfleiderer Continua 37”, Германия) при температуре 120–130°C. В качестве коммерческих аналогов использовали ФП Целлолюкс F (“Сиббиофарм”, Россия) и ФП Ладозим Респект Оптима (“Микробиопром”, Россия). ФП дозировали по активности ЭГ из расчета 5 ед. на 1 г сырья. Гидролиз проводили в течение 5 ч при температуре 40°C при естественном pH водной суспензии экструдированного соевого шрота (ЭСШ) в диапазоне pH 6.0–6.2, при гидромодуле 1:6. Полученный гидролизат центрифугировали в течение 20 мин, осадок высушивали до постоянной влажности и определяли содержание сырого протеина по ГОСТ 13496.4-93. Контрольный вариант инкубировали в аналогичных условиях (5 ч, 40°C, 220 об./мин) без внесения ФП.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор индуктора биосинтеза целевых карбогидраз *T. reesei*. Из данных литературы известно, что при культивировании на ферментационных средах, содержащих индукторы экспрессии генов КС и ЭГ (лактозу, целлюлозу), *T. reesei* синтезирует ПГ конститутивно, в минимальных количествах [7–10]. Внесение различных источников пектина существенно увеличивало продукцию ПГ [8]. На первом этапе исследований был модифицирован состав исходной ферментационной среды для индукции синтеза карбогидраз в сторону увеличения пектиназной активности. Для оценки влияния различных источников углерода на уровень биосинтеза ПГ, КС и ЭГ штаммом *T. reesei* Co-44 в исходную среду вместо 1%-ной аморфной целлюлозы в качестве индукторов биосинтеза карбогидраз вносили 1.0% яблочного пектина с низкой степенью этерификации, пектиновые волокна, свекловичный жом, соевую шелуху, концентрат низкомолекулярных веществ сои (КНВС), соевую и овсяную муку (рис. 1).

Наиболее сбалансированный состав карбогидраз (максимальная активность ПГ при высоком уровне ЭГ и КС) был получен при использовании пектиновых волокон в качестве индуктора. Активность ЭГ, КС и ПГ при этом составила 354 ± 17 , 442 ± 21 и 43 ± 2 ед./мл соответственно. Почти такой же результат был получен при использовании соевой муки, активность тех же ферментов составила 361 ± 18 , 414 ± 20 и 36 ± 2 ед./мл соответственно. Свекловичный жом обеспечивал высокий уровень активности КС – 455 ± 22 ед./мл, од-

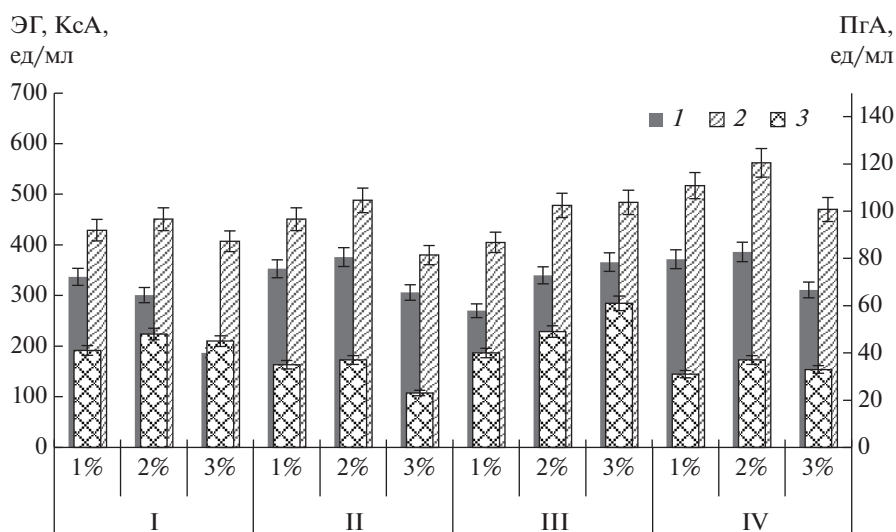


Рис. 2. Зависимость синтеза ЭГ (1), КС (2) и ПГ (3) штаммом *T. reesei* Co-44 от концентрации индукторов: I – ПВ, II – СМ, III – КНВС, IV – ОМ.

нако активность ЭГ и ПГ была ниже, чем в варианте с пектиновыми волокнами – 288 ± 15 и 34 ± 2 ед./мл соответственно. Использование овсяной муки позволяло получить высокий уровень активности ЭГ – 394 ± 19 ед./мл, повышенную активность КС – 576 ± 29 ед./мл, при несколько пониженной активности ПГ – 34 ± 2 ед./мл. Положительный эффект соевой муки и КНВС на синтез целевых ферментов штаммом *T. reesei* Co-44 согласуется с литературными данными об индуцирующем действии компонентов сои на биосинтез карбогидраз *T. reesei* [17, 18]. Внесение в ферментационную среду КНВС – побочного продукта получения соевых белковых концентратов, содержащего низкомолекулярные углеводы, растворимые азотсодержащие вещества и ростовые факторы сои (витамины, нуклеиновые кислоты и др.) [19], позволило получить высокое значение активности ПГ – 42 ± 2 ед./мл при среднем уровне активности ЭГ и КС – 292 ± 15 и 423 ± 24 ед./мл соответственно.

Далее штамм *T. reesei* Co-44 культивировали с добавлением компонентов, обеспечивших индукцию целевых ферментов: пектиновые волокна, КНВС, соевая и овсяная мука, в концентрации от 1 до 3% (рис. 2).

Из полученных результатов (рис. 2) следует, что 2% пектиновых волокон обеспечивало повышение активности ПГ до 48 ± 2 ед./мл, добавление к среде 3% КНВС – до 61 ± 3 ед./мл. Низкомолекулярные олигосахариды, входящие в состав соевой и овсяной муки, преимущественно индуцировали биосинтез ксиланазы и эндоглюканазы. При увеличении концентрации пектиновых воло-

кон, соевой и овсяной муки до 3% наблюдалось повышение вязкости ферментационных сред, что, по-видимому, приводило к ухудшению массообмена в среде при культивировании в колбах и снижению синтеза карбогидраз штаммом-продуцентом. При этом КНВС в концентрации 3% в меньшей степени влиял на вязкость среды и позволял получить наиболее сбалансированный комплекс ферментов: активность ЭГ, КС и ПГ составила 366 ± 18 , 484 ± 23 и 61 ± 3 ед./мл соответственно.

Результаты серии последующих экспериментов с увеличением концентрации КНВС от 3 до 9% (рис. 3) позволяют окончательно показать перспективность использования этого компонента в ферментационной среде для увеличения био-

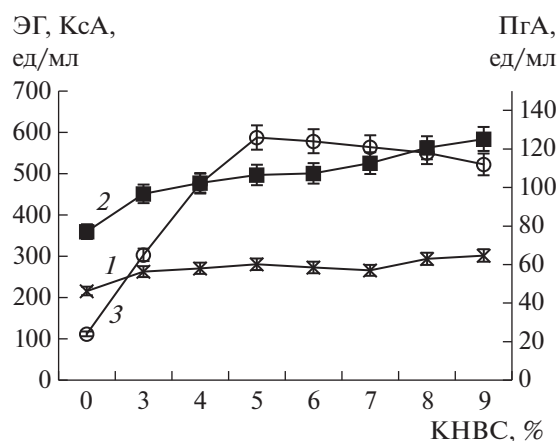


Рис. 3. Зависимость активности ЭГ (1), КС (2) и ПГ (3) от концентрации в ферментационной среде КНВС при культивировании *T. reesei* Co-44.

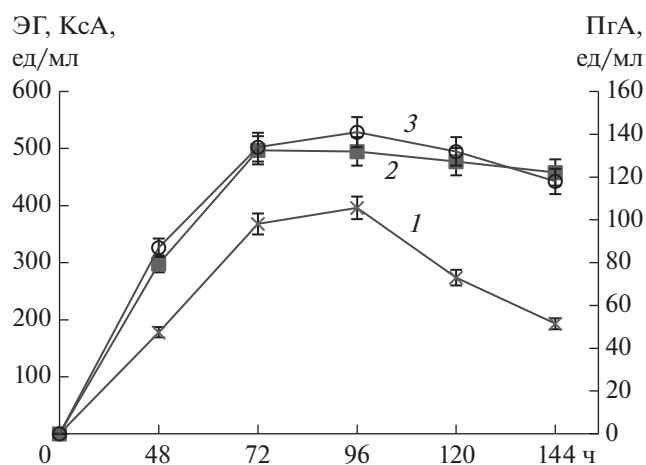


Рис. 4. Динамика накопления ЭГ (1), КС (2) и ПГ (3) при культивировании *T. reesei* Co-44 на среде с 5% КНВС.

синтеза комплекса карбогидраз штаммом *T. reesei* Co-44. При увеличении концентрации КНВС до 5% наблюдалось существенное повышение активности ПГ — практически в 6 раз по сравнению с контролем, без КНВС. Дальнейшее увеличение концентрации КНВС до 9% приводило к небольшому снижению активности ПГ. Активности КС и ЭГ возрастали более умеренно при повышении содержания в среде КНВС до 5% — на 38 и 30% соответственно по сравнению с контролем без КНВС. При дальнейшем повышении концентрации КНВС от 5 до 9% продуктивность штамма по биосинтезу КС увеличивалась на 17.5%, а ЭГ — на 7.5% по сравнению с вариантом с 5% КНВС.

Оптимальное соотношение активностей целевых ферментов для получения ФП сбалансированного состава было достигнуто при культивировании *T. reesei* Co-44 на среде с 5% КНВС: активность ПГ составила 126 ± 7 ед./мл, ЭГ — 281 ± 14 ед./мл, КС — 497 ± 26 ед./мл (рис. 3).

Таким образом, оптимизация состава ферментационной среды позволила увеличить продукцию ПГ мутантным штаммом более чем в 5 раз

при сохранении высокого уровня биосинтеза и сбалансированном соотношении ЭГ и КС.

На среде с 5% КНВС была изучена динамика биосинтеза целевых карбогидраз штаммом *T. reesei* Co-44 (рис. 4). Установлено, что максимальное накопление ЭГ и ПГ наблюдалось на 96 ч роста, КС — на 72 ч. После 96 ч культивирования резко снижалась продукция ЭГ: на 120 ч роста на 30%, на 144 ч — более чем на 50%. Снижение активности ПГ и КС к 144 ч было менее существенно — 16.3 и 7.5% соответственно.

Таким образом, выбор добавок, содержащих индукторы биосинтеза карбогидраз, и времени культивирования мутантного штамма *T. reesei* Co-44 позволил получить в КЖ сбалансированный комплекс карбогидраз эндополимеразного действия с увеличенным содержанием необходимых компонентов: активность ПГ после 96 ч культивирования на среде с 5% КНВС составила 141 ± 6 ед./мл, КС и ЭГ — 495 ± 26 и 396 ± 21 ед./мл соответственно.

Свойства ФП, полученного на основе штамма *T. reesei* Co-44 при культивировании в оптимизированных условиях. Сухой ФП сбалансированного состава (далее Ксилоризин К4) был получен, как описано в разделе “Методика”, осаждением этиловым спиртом из КЖ, полученной в результате выращивания мутантного штамма *T. reesei* Co-44 в качалочных колбах в течение 96 ч на среде с 5% КНВС. В качестве контроля аналогичным способом был получен сухой ФП1 из КЖ, полученной при культивировании *T. reesei* Co-44 на исходной среде в течение 120 ч. В полученных ФП были определены активности целевых карбогидраз, а также содержание белка.

Как показали результаты табл. 1 активность ПГ в препарате Ксилоризин К4 была увеличена в 7.8 раз по сравнению с контрольным ФП, полученным на исходной среде, ЭГ — почти в 2 раза; активность КС была увеличена незначительно.

Известно, что в растительном сырье пектин часто может быть одним из основных компонентов клеточной стенки, связанным с волокнами целлюлозы и гемицеллюлозы [2, 20], поэтому для эффек-

Таблица 1. Содержание белка и активность полигалактуроназы, ксиланазы и эндоглюканызы в ФП на основе штамма *T. reesei* Co-44

ФП	Содержание белка, мг/г	Активность карбогидраз, ед./г		
		ПГ	КС	ЭГ
ФП1, контроль (120 ч на исходной среде)	323 ± 15	360 ± 19	11500 ± 590	6900 ± 350
Ксилоризин К4 (96 ч на среде с 5% КНВС)	376 ± 18	2800 ± 125	12250 ± 620	13580 ± 670

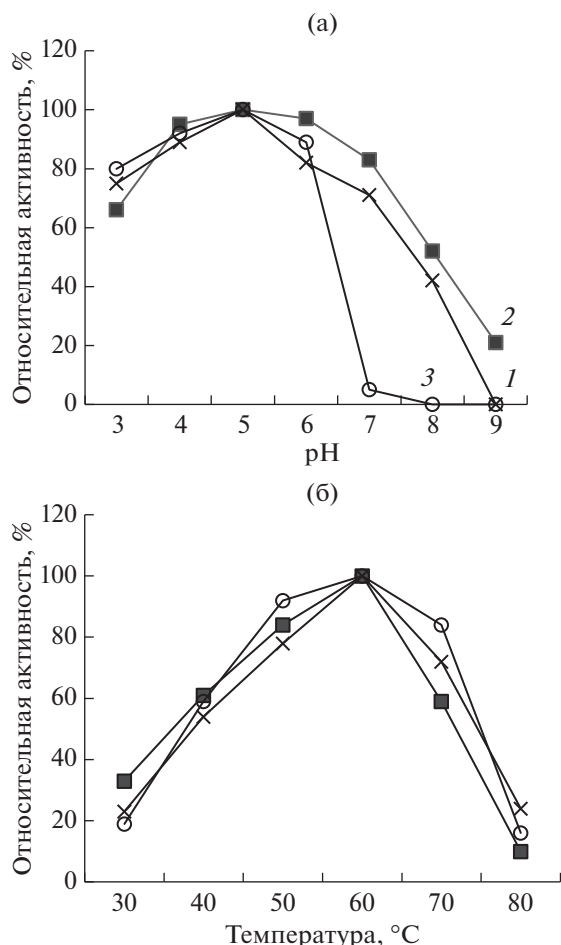


Рис. 5. Зависимость активности ЭГ (1), КС (2) и ПГ (3) в ФП Ксилоризин К4 от рН (а) и температуры (б).

тивного гидролиза требуется высокая активность всех ключевых карбогидраз: эндоглюканазы, ксиланазы, пектиназы. ФП Ксилоризин К4, полученный в оптимизированных условиях, в значительной степени соответствовал такому требованию.

Изучение влияния рН и температуры на активность ФП, позволило найти оптимальные условия для его практического применения. Карбогидразы ФП Ксилоризин К4 проявляли высокую активность в пределах рН от 3 до 6 и температуры от 40 до 70°C (рис. 5), что позволило проводить обработку растительного сырья без предварительной коррекции рН реакционной смеси при температурах от 40 до 60°C, принятых в большинстве технологических процессов в пищевой и кормовой промышленности [1, 2].

Для определения состава ФП Ксилоризин К4 был проведен электрофорез в присутствии ДДС-На (рис. 6а), при этом была обнаружена полоса с молекулярной массой ~40–41 кДа, которая предположительно соответствовала ПГ *T. reesei*. В контрольном ФП1, полученном при культивировании *T. reesei* Co-44 на исходной среде с 1% аморфной целлюлозы, эта полоса практически не видна. Результаты масс-спектрометрического анализа трипсиновых гидролизатов этой полосы подтвердили соответствие белка эндо-полигалактуроназе (GH28) *T. reesei* (рис. 6б).

Исследование эффективности использования ФП Ксилоризин К4 для получения белковых концентратов из соевого шрота. В связи с дефицитом животного белка, в качестве белковых пищевых и кормовых

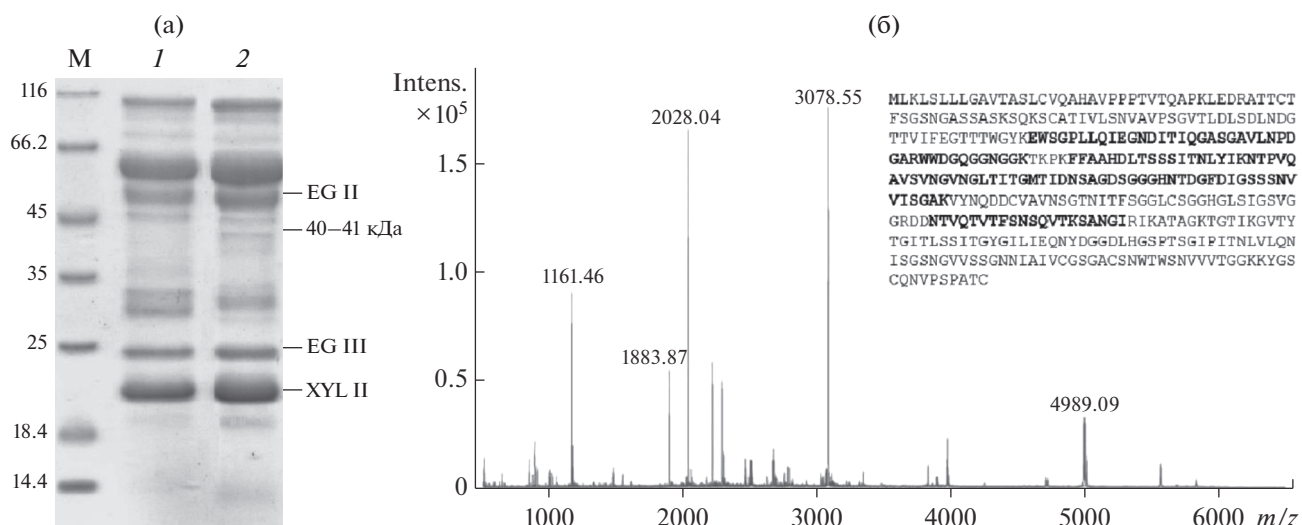


Рис. 6. Электрофореграмма ФП, полученных из КЖ *T. reesei* Co-44 при культивировании в колбах на исходной ферментационной среде в течение 120 ч (ФП1, дорожка 1) и на среде с 5% КНВС в течение 96 ч (Ксилоризин К4, дорожка 2): а – MALDI-TOF-масс-спектр трипсинового гидролизата белковой полосы, соответствующей ЭГ *T. reesei*. Полу жирным шрифтом выделены пептиды, совпадающие с аминокислотной последовательностью ЭГ GH28 *T. reesei* QM6a (б). М – белки-маркеры молекулярной массы.

Таблица 2. Активность полигалактуроназы, ксиланазы и эндоглюканызы в ФП, использованных для обработки экструдированного соевого шрота

ФП	Активность карбогидраз, ед/г		
	ПГ	КС	ЭГ
Ксилоризин К4	2800 ± 125	12250 ± 620	13580 ± 670
Целлолюкс F	—	1440 ± 75	3500 ± 180
Ладозим Респект Оптима	340 ± 18	240 ± 15	350 ± 20

добавок широко используют продукты на основе сои и соевого шрота. Одним из способов повышения содержания белка в соевых продуктах является обработка экструдированных шротов ферментами, способными переводить основные НКП сои в растворимое состояние, с последующим “вымыванием” водорастворимых продуктов гидролиза. Такая технология наиболее актуальна при производстве кормов для аквакультуры, где частичное устранение углеводных компонентов позволяет получать концентраты с высоким содержанием сырого протеина. Соевые белковые продукты способны полноценно заменить в рационах плотоядных рыб наиболее дорогой и труднодоступный компонент — рыбную муку, содержание которой в кормах стараются снизить за счет использования альтернативных источников белка [21, 22].

Соя характеризуется высоким содержанием пектиновых веществ, и для ее ферментативной

обработки целесообразно использовать ФП, обладающие помимо активности КС и ЭГ активностью ПГ [23]. Большинство ФП карбогидраз кормового назначения, полученных на основе одного штамма-продуцента, в качестве основных компонентов содержат целлюлазы и/или гемицеллюлазы. Препараты, обладающие дополнительно пектиновой активностью, как правило, получают смешиванием ферментов, произведенных несколькими продуцентами, что существенно повышает себестоимость конечного продукта [2].

Эффективность использования Ксилоризина К4 при получении соевых белковых концентратов определяли в сравнении с коммерческими препаратами: Целлолюксом F (“Сиббиофарм”, Россия) с высокой активностью ЭГ и КС и Ладозимом Респект Оптима (“Микробиопром”, Россия), состоящим из смеси препаратов со сбалансированным содержанием ЭГ, ПГ и КС (табл. 2). ФП дозировали, уравнивая по активности эндоглюканызы. Соевый шрот предварительно экструдировали, чтобы перевести белок сои в нерастворимое денатурированное состояние с целью снижения его потерь при последующем смешивании с водой.

Критерием эффективности действия исследуемых препаратов было содержание сырого протеина в полученных белковых соевых концентратах.

В результате обработки экструдированного соевого шрота Ксилоризином К4 содержание сырого протеина в белковом продукте увеличилось на 44% по сравнению с вариантом без применения ФП и на 17% по сравнению с обработкой Целлолюксом F, не содержащим пектиназ (рис. 7). Эффективность применения ФП на основе нового мутантного штамма была сопоставима с эффективностью препарата Ладозим Респект Оптима, полученного с использованием двух продуцентов и имеющего полный комплекс карбогидраз, необходимый для гидролиза основных НКП сои. Учитывая влияние содержания сырого протеина на стоимость кормовых продуктов, можно сделать вывод о перспективности применения Кси-

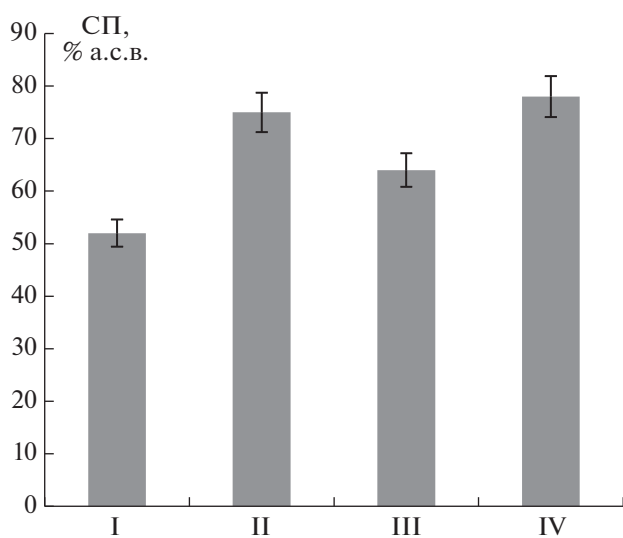


Рис. 7. Содержание сырого протеина (СП) в соевых продуктах после обработки экструдированного соевого шрота ферментными препаратами карбогидраз: I — без ФП (контроль), II — Ксилоризин К4, III — Целлолюкс F, IV — Ладозим Респект Оптима.

лоризина К4 для обработки экструдированного соевого шрота в процессе получения кормовых добавок с повышенным содержанием белка за счет разрушения и устранения антипитательных НКП. Применение комплексного ФП Ксилоризин К4 позволит ввести в кормовые рационы альтернативные источники белка и снизить себестоимость конечной продукции.

Следует отметить, что в настоящее время все представленные на рынке кормовые ФП, эффективно гидролизующие НКП растительного сырья, являются смесями, полученными на основе препаратов нескольких производителей. Кроме того, учитывая резкое подорожание импортных ФП, применение отечественного комплексного препарата с уникальными свойствами – полным набором карбогидраз для обработки сырья с высоким содержанием целлюлозы, гемицеллюлоз и пектиновых веществ, существенно увеличит экономическую эффективность производства кормов на основе растительного сырья.

Таким образом, в результате проведенной работы синтез полигалактуроназы штаммом *T. reesei* Co-44 был увеличен более чем в 8 раз при высоком уровне активности КС и ЭГ, что позволило получить комплексный ФП сбалансированного состава, высокоэффективный при обработке экструдированного соевого шрота в процессе промышленного получения белковых кормовых добавок.

При проведении работы было использовано оборудование ЦКП “Промышленной биотехнологии” ФИЦ “Фундаментальные основы биотехнологии” РАН.

Работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2019–2021 гг. (тема № 0529-2019-0066).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Михайлова П.В. Мацерирующие ферменты мицелиальных грибов в биотехнологии. Минск: Белорусская наука, 2007. 407 с.
2. Bedford M.R., Partridge G.G. Enzymes in Farm Animal Nutrition. Wallingford, Oxfordshire, UK: Cambridge, MA: CAB International, 2010. 319 p.
3. Sajith S., Priji P., Sreedevi S., Benjamin S. // J. Nutr. Food Sci. 2016. V. 6. P. 461. <https://doi.org/10.4172/2155-9600.1000461>
4. Herpoël-Gimbert I., Margeot A., Dolla A., Jan G., Mollé D., Lignon S., Mathis H., Sigoillot J.-C., Monot F., Asther M. // Biotechnol. Biofuels. 2008. V. 1. P. 18 <https://doi.org/10.1186/1754-6834-1-1>
5. Druzhinina I.S., Kubicek C.P. // Microb. Biotechnol. 2017. V. 10. № 6. P. 1485–1499. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12726>
6. Payne C.M., Knott B.C., Mayes H.B., Hansson H., Himmel M.E., Sandgren M., Ståhlberg J., Beckham G.T. // Chem Rev. 2015. V. 115. № 3. P. 1308–448. <https://doi.org/10.1021/cr500351c>
7. Markovič O., Slezárik A., Labudová I. // FEMS Microbiol. Letters. 1985. V. 27. № 3. P. 267–271. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1985.tb00680.x>
8. Olsson L., Christensen T.M.I.E., Hansen K.P., Palmqvist E.A. // Enzyme Microbial Technol. 2003. V. 33. № 5. P. 612–619. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(03\)00181-9](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(03)00181-9)
9. Mohamed S.A., Christensen T.M.I.E., Mikkelsen J.D. // Carbohydr. Res. 2003. V. 338. № 6. P. 515–524.
10. Saloheimo M., Pakula T. // Microbiology. 2012. V. 158. № 1. 46–57. <https://doi.org/10.1099/mic.0.053132-0>
11. Pedrolli D.B., Monteiro A.P., Gomes E.L., Carmona E.C. // The Open Biotechnol. J. 2009. V. 3. P. 9–18. <https://doi.org/10.2174/1874070700903010009>
12. Tapre A., Jain R.K. // International Food Research Journal. 2014. V. 21. № 2. P. 447–453.
13. Kostyleva E.V., Tsurikova N.V., Sereda A.S., Velikoretskaya I.A., Veselkina T.N., Lobanov N.S., Shashkov I.A., Sinitsyn A.P. // Microbiology. 2018. V. 87. P. 652–661. <https://doi.org/10.1134/S0026261718050120>
14. Vanitha T., Khan M. Role of Pectin in Food Processing and Food Packaging. In: Pectins – Extraction, Purification, Characterization and Applications. 2019. <https://doi.org/10.5772/intechopen.83677>
15. Collmer A., Reid J., Mount M. // Methods Enzymol. 1988. V. 161. P. 329–335.
16. Синуцын А.П., Гусаков А.В., Черноглазов В.А. Биоконверсия лигноцеллюлозных материалов. М.: МГУ, 1995. 144 с.
17. Hao X.-C., Yu X.-B., Yan Zh.-L. // Food Technol. Biotechnol. 2006. V. 44. № 1. P. 89–94.
18. Saravanan P., Muthuvelayudham R., Viruthagiri T. // Enzyme Research. 2012. V. 2012. P. 7. <https://doi.org/10.1155/2012/157643>
19. Хабибулина Н.В., Бикбов Т.М., Пономарев В.В. // Проектная культура и качество жизни. 2015. № 1. С. 473–491.
20. Sundarraj A.A., Ranganathan T.V. // International J. Applied Environmental Sciences. 2017. V. 12. № 10. P. 1777–1801.
21. Barnes M., Brown M., Rosentrater K., Sewell J. // Open J. Animal Sciences. 2012. V. 2. № 4. P. 234–243. <https://doi.org/10.4236/ojas.2012.24033>
22. Delgado E., Reyes-Jaquez D. // Extrusion of Metals, Polymers and Food Products. 2017. <https://doi.org/10.5772/65577>
23. Karr-Lilienthal L.K., Kadzere C.T., Grieshop C.M., Fahy G.C. // Livestock Production Science. V. 97. № 1. 2005. P. 1–12.

Obtaining of the Complex Enzyme Preparation with Enhanced Pectinase Activity Using a New Mutant Strain *T. reesei* Co-44

E. V. Kostyleva^{a,*}, A. S. Sereda^a, I. A. Velikoretskaya^a, A. M. Aisina^a, N. V. Tsurikova^a, E. A. Rubtsova^b, A. D. Satrutdinov^b, and A. P. Sinitsyn^{b,c}

^aAll-Russian Research Institute of Food Biotechnology – a branch of FRC of food, biotechnology, and food safety, Moscow, 111033 Russia

^bResearch Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

^cChemical Faculty, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: ekostyleva@list.ru

In order to obtain a complex enzyme preparation providing efficient hydrolysis of the main plant non-starch polysaccharides — cellulose, xylans, and pectin, studies were conducted to optimize a fermentation medium composition for submerged cultivation of a new mutant strain *T. reesei* Co-44 — a highly active producer of endo-carbohydrases. A concentrate of soy low molecular components was chosen as the inducer of the key carbohydrases biosynthesis by the strain. The concentrate provided the maximum increase in polygalacturonase activity — more than 8 times, and an increased level of endoglucanase and xylanase biosynthesis. After cultivation of *T. reesei* Co-44 under optimized conditions, a complex enzyme preparation Xylorizin K4 was obtained, its physicochemical properties were studied. Using electrophoresis and MALDI-TOF mass spectrometry, the presence of endopolygalacturonase (GH28) *T. reesei* in Xylorizin K4 was confirmed. The studies have shown the potential of Xylorizin K4 application in production of soy protein concentrates to eliminate the main soybean non-starch polysaccharides.

Key words: *Trichoderma reesei*, polygalacturonase, endoglucanase, xylanase, non-starch polysaccharides, fermentation medium