

На правах рукописи

НЕМАШКАЛОВ ВИТАЛИЙ АЛЕКСЕЕВИЧ

**БИОСИНТЕЗ КАРБОГИДРАЗ ГРИБА *PENICILLIUM VERRUCULOSUM* ПРИ
КУЛЬТИВИРОВАНИИ НА РАЗЛИЧНЫХ ЦЕЛЛЮЛОЗОСОДЕРЖАЩИХ
СУБСТРАТАХ**

03.01.06 Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Пушино - 2012

Работа выполнена в лаборатории биосинтеза и получения ферментов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук

Научный руководитель:

Окунев Олег Николаевич
кандидат биологических наук

Официальные оппоненты:

Ефременко Елена Николаевна
доктор биологических наук, профессор
Московский Государственный Университет
им. М.В. Ломоносова
заведующая лабораторией

Солонин Александр Сергеевич
кандидат биологических наук
Институт биохимии и физиологии
микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН
заведующий лабораторией

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Институт биохимии
им. А.Н.Баха РАН, г. Москва

Защита диссертации состоится «29» июня 2012 г. в 10 часов 00 мин на заседании Диссертационного совета Д 002.121.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук по адресу: 142290, Московская область, г. Пущино, проспект Науки, 5.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук, Пущино.

Автореферат размещен на сайтах <http://vak.ed.gov.ru> и <http://www.ibpm.ru>
Автореферат разослан «25» мая 2012 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета,
доктор биологических наук



Н.В. Доронина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Микробная деградация целлюлозы и гемицеллюлозы, являющихся самыми распространенными биополимерами на Земле, в настоящее время предоставляет растущему человечеству способы решения экологических проблем, освоения новых источников сырья, энергии и пищи. Природная древесина, отходы ее переработки, отходы целлюлозно-бумажного и пергаментного производств являются дешевым и возобновляемым сырьем для получения моно- и олигосахаридов, спиртов, а также промышленных ферментов, в частности, карбогидраз (Berlin, Gilkes, 2005).

Основными продуцентами промышленных карбогидраз являются мицелиальные грибы рода *Trichoderma*, обладающие высокой секреторной способностью (Godfrey, West, 1996). Однако грибы рода *Penicillium* также по праву занимают одно из главных мест в списке промышленно важных продуцентов, поскольку способны синтезировать ферментные комплексы целлюлаз и гемицеллюлаз (эндоглюканаз, целлобиогидролаз, ксиланаз и β -глюкозидаз) более сбалансированного состава, чем у *Trichoderma*, и эффективнее расщеплять целлюлозные субстраты; кроме того, индивидуальные ферменты обладают более высокой удельной активностью и операционной стабильностью (Кастельянос, 1995).

Одним из важнейших факторов рентабельности процессов биоконверсии лигноцеллюлозных материалов, наряду со стоимостью самого сырья, является эффективность гидролитического действия целлюлазных полиферментных комплексов, которая, в свою очередь, определяется как свойствами индивидуальных ферментов, так и их взаимодействием в составе этого комплекса, а также стоимость ферментационного процесса. С целью снижения затрат на получение конечного продукта (целлюлазного ферментного препарата) в лаборатории биосинтеза ферментов ИБФМ РАН вот уже более 15 лет активно ведется работа по созданию новых штаммов – суперпродуцентов внеклеточных карбогидраз в том числе и с помощью методов генетической инженерии, а также проводится оптимизация ферментационных сред и условий культивирования. На сегодняшний день наиболее известными и широко используемыми являются высокопродуктивный мутант *P.verruculosum* B221-151 и рекомбинантный штамм, полученный на его основе, *P.verruculosum* F10 – продуцент гетерологичной β -глюкозидазы из *A.niger*. Были предприняты попытки клонирования и экспрессии самых разных генов целевых ферментов, наиболее успешными из которых оказались в отношении гомологичной эндо- β -1,4-глюканазы II (ЭГЗ6II) *P.verruculosum* – одного из ключевых компонентов мультиферментного комплекса, продуцируемого этим грибом.

Цели и задачи исследования. Целью настоящей работы являлось изучение особенностей биосинтеза внеклеточных карбогидраз как новыми, так и ранее полученными рекомбинантными штаммами, созданными на основе мицелиального гриба *P.verruculosum*. В соответствии с этой целью были сформулированы следующие задачи:

- Создать на основе штамма *P.verruculosum* B1-221-151 новый рекомбинантный штамм-продуцент с повышенным уровнем экспрессии гомологичной эндоглюканазы II.
- Оптимизировать условия культивирования и состав питательной среды для нового рекомбинантного штамма-продуцента ЭГП *P.verruculosum* ЭГП-40 и ранее полученного рекомбинантного штамма-продуцента β -глюкозидазы (БГЛ) *P.verruculosum* F10.
- Исследовать индуцирующее действие продуктов реакции поликонденсации глюкозы (целлобиозы, гентиобиозы, софорозы) на биосинтез целлюлаз новым рекомбинантным штаммом *P.verruculosum* ЭГП-40.
- Исследовать биосинтез целлюлаз штаммом *P.verruculosum* ЭГП-40 при культивировании на различных целлюлозосодержащих материалах (ЦСМ).
- Исследовать гидролитическую способность ферментных препаратов, полученных с помощью рекомбинантных штаммов *P.verruculosum* – продуцентов ЭГП.
- Исследовать способность ферментных препаратов, полученных с помощью рекомбинантных штаммов *P.verruculosum* – продуцентов ЭГП, к увеличению питательной ценности кормов.

Научная новизна работы. Впервые созданы рекомбинантные штаммы-продуценты эндоглюканазы II *P.verruculosum* ЭГП-40 и ЭГП-34 на основе штамма-реципиента *P.verruculosum* B537 с помощью новой плазмидной конструкции, содержащей соответствующий ген целевого фермента под контролем собственного индуцибельного промотера *cbhl* гена мажорного секреторного белка целлобиогидролазы I (ЦБГ). В ходе оптимизации условий культивирования в 1-литровых ферментерах трансформантов *P.verruculosum* ЭГП-40 и F10 впервые установлено, что рН-оптимумы синтеза целевых ферментов находятся в интервале значений 4,5-5,5, температурный оптимум - 32°C, оптимальным способом подачи подпитывающего раствора является дробный способ. Впервые установлено, что 2% МКЦ в составе исходной питательной среды достаточно для обеспечения высоко уровня синтеза основных ферментов трансформантами *P.verruculosum* ЭГП-40 и F10. Впервые исследовано индуцирующее влияние различных дисахаридов (целлобиозы, софорозы, гентиобиозы) на биосинтез внеклеточных карбогидраз рекомбинантным штаммом *P.verruculosum* ЭГП-40 и установлено, что наиболее сильным индуктором целевых ферментов является гентиобиоза. Впервые показана возможность полной замены дорогостоящей микрокристаллической целлюлозы (МКЦ) в составе ферментационной среды на пергамент при

культивировании штамма *P.verruculosum* ЭГП-40 в 1-литровых ферментерах. На основе штаммов *P.verruculosum* ЭГП-40 и ЭГП-34 впервые получены новые ферментные препараты, обладающие повышенной гидролитической способностью по отношению к различным природным целлюлозным субстратам, а также некрахмальным полисахаридам сельскохозяйственных кормов по сравнению с коммерческими аналогами.

Практическая значимость работы. В ходе проведенных исследований удалось снизить количество основного дорогостоящего компонента питательной среды (МКЦ) с 6 до 2% без существенных потерь в активностях ферментов при культивировании рекомбинантных штаммов *P.verruculosum* ЭГП-40 и F10, что позволит значительно уменьшить стоимость получаемых ферментных препаратов. Выявлена возможность замены дорогостоящей МКЦ в составе исходной ферментационной среды для *P.verruculosum* ЭГП-40 на более дешевый целлюлозосодержащий субстрат (пергамент). Показана возможность частичной замены МКЦ в составе исходной питательной среды на смесь дисахаридов, что также может привести к положительному экономическому эффекту. Применение нового ферментного препарата ЭГП-40 при гидролизе различных видов ЦСМ (измельченной осинового древесины, измельченной сосновой древесины, измельченной багассы) позволяет увеличить выход сбраживаемых сахаров на 10-15% по сравнению с существующими лабораторными и коммерческими ферментными препаратами. Показана более высокая эффективность действия нового ферментного препарата ЭГП-40 на некрахмальные полисахариды кормов по сравнению с коммерческими аналогами, что, вероятно, позволит значительно снизить дозировки добавляемого на практике ферментного препарата.

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены на школах-конференциях молодых ученых «Биология – наука 21-го века» (Пушино, 2009, 2010 гг.); на международных конференциях: «BIOCATALYSIS 2007, 2009: Fundamental&Applications» (Санкт-Петербург 2007, Архангельск 2009), московской международной научно-практической конференции «БИОТЕХНОЛОГИЯ: экология крупных городов» (Москва 2010), втором международном конгресс-партнеринге и выставке по биотехнологии, биоэнергетике и биоэкономике «EURASIABIO» (Москва 2010).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 10 печатных работ, в том числе, 3 статьи в журналах из списка ВАК и 7 тезисов.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов исследования и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 119 страницах, иллюстрирована 16 таблицами и 54 рисунками. Библиографический указатель содержит 211 источников литературы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Создание рекомбинантных штаммов-продуцентов на основе штамма *P.verruculosum* B221-151

Получение штамма-реципиента для последующей трансформации генетической конструкцией, несущей целевой ген эндоглюканазы (*egIII*) *P.verruculosum*. Из исходного штамма *P.verruculosum* B221-151 (из коллекции лаборатории биосинтеза и получения ферментов ИБФМ РАН) посредством УФ-облучения и последующей селекции на питательных средах, содержащих в качестве источника азота нитрат натрия, нитрит натрия, гипоксантин, глутаминовую кислоту и хлорид аммония, а также биохимического тестирования при культивировании облученных клонов в колбах (табл.1), был получен мутантный штамм *P.verruculosum*, обладающий селективным маркерным признаком *NiaD*⁽⁻⁾.

Из 5 протестированных клонов был отобран мутант №5, который использовался как штамм-реципиент для последующей трансформации целевой плазмидой (в дальнейшем обозначается как штамм *P.verruculosum* B537).

Таблица 1. Значения удельных активностей и содержание белка в КЖ *niaD*⁽⁻⁾ мутантов *P.verruculosum* B221-151 при культивировании в колбах.

№ мутанта	Белок, мг/мл	КМЦ-аза, ед/мг	Ксиланаза, ед/мг
4	5,4±0,3	12,1±0,5	27,4±1,3
5	5,4±0,2	11,9±0,7	27,1±2,1
9	5,1±0,2	12,0±1,1	26,8±1,7
14	5,3±0,1	11,7±0,5	27,2±0,8
19	5,2±0,1	11,3±0,7	26,4±1,2
B221-151	5,4±0,2	12,1±0,6	27,3±1,5

Трансформация штамма-реципиента *P.verruculosum* B537. Проведена котрансформация штамма-реципиента *P.verruculosum* B537 *niaD*⁽⁻⁾ плазмидой pPrCBHI-EGII_B1 (рис.1), несущей целевой ген гомологичной эндоглюканазы (*egIII*) *P.verruculosum* совместно с плазмидой pSTA 10, несущей ген нитратредуктазы (*niaD*), обеспечивающей комплементацию дефектного гена нитратредуктазы в штамме-реципиенте для позитивной селекции трансформантов на средах с нитратом натрия.

Плазмидная конструкция была получена и любезно предоставлена нашими коллегами из ИНБИ РАН им. А.Н. Баха. Далее проводили тест на стабильность трансформантов, состоящий в 4-х последовательных пересевах на селекционную среду, содержащую нитрат натрия в качестве источника азота. Стабильные трансформанты подвергали дальнейшему скринингу.

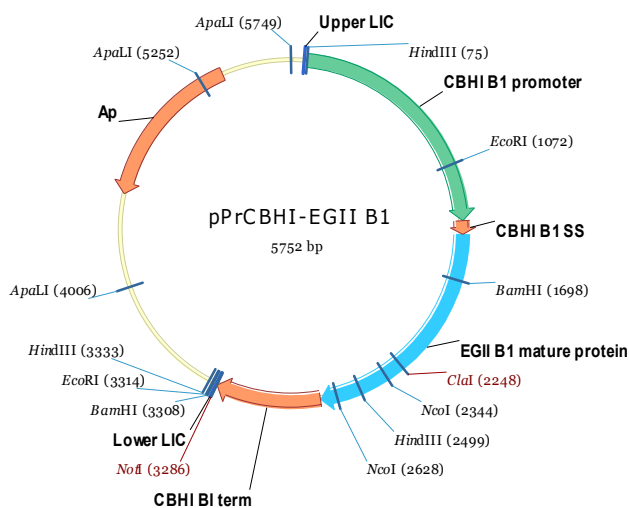


Рисунок 1. Схематическое изображение экспрессионной плазмиды, несущей ген *egIII*.

Первичный скрининг и анализ трансформантов, содержащих гомологичный ген эндоглюканазы II *P.verruculosum*. Полученные трансформанты культивировали в колбах Эрленмейера объемом 750 мл на стандартной ферментационной среде КС-среде для *P.verruculosum*. Объем питательной среды для культивирования составлял 100 мл. Условия культивирования: 32°C, pH 5, 220 об/мин, 144 час. По окончании ферментации были отобраны пробы КЖ, в которых были измерены целевая (КМЦ-аза) и базовые (ксиланаза, авицелаза, β-глюкозидаза) активности ферментов (табл.2). В качестве контроля использовали КЖ, полученную с помощью исходного штамма *P.verruculosum* B537.

Таблица 2. Значения активностей и содержания белка в культуральной жидкости трансформантов, полученных с помощью конструкции pPrCBHI-EGII B1.

№ мутанта	Белок, мг/мл	КМЦ-аза, ед/мл	Ксиланаза, ед/мл	Авицелаза, ед/мл	β-глюкозидаза, ед/мл
1	2,6±0,1	104±12	68±4	3,0±0,2	1,1±0,1
2	2,0±0,1	141±12	55±4	2,9±0,2	1,7±0,1
3	1,4±,02	100±9	20±1	0,6±0,1	0,9±0,1
4	2,5±0,1	132±11	54±5	4,4±0,2	1,9±0,1
5	1,3±0,1	85±8	12±1	0,3±0,1	1,0±0,1
6	2,1±0,1	158±11	9±1	0,5±0,1	1,0±0,1
7	1,6±0,3	88±9	6±1	0,3±0,1	0,8±0,1
8	2,5±0,2	109±10	69±3	2,5±0,2	1,9±0,1
9	1,5±0,3	60±8	18±2	0,5±0,1	1,2±0,1
10	1,8±0,1	97±8	23±2	1,4±0,1	1,1±0,1
11	1,5±0,1	86±7	48±4	1,3±0,1	1,5±0,1
12	1,1±0,2	128±14	25±2	0,9±0,1	1,6±0,1
13	2,9±0,2	132±17	59±3	1,0±0,1	1,7±0,1
14	1,0±0,1	51±4	12±2	0,4±0,1	0,7±0,1
15	1,3±0,1	77±8	10±2	0,4±0,1	0,9±0,1
16	4,1±0,4	168±15	114±4	4,2±0,2	2,4±0,1
17	2,3±0,3	149±13	48±3	5,9±0,3	1,4±0,1

18	1,2±0,1	92±10	10±2	0,5±0,1	0,9±0,1
19	4,2±0,3	135±12	24±2	3,0±0,1	1,3±0,1
20	2,6±0,2	133±18	137±5	4,4±0,2	2,4±0,1
21	3,1±0,1	133±16	205±16	4,3±0,2	2,7±0,1
22	2,8±0,2	180±21	190±15	4,1±0,2	2,3±0,1
23	3,0±0,3	44±7	30±2	1,0±0,1	0,5±0,1
24	3,2±0,2	137±17	117±12	3,1±0,1	2,0±0,1
25	4,4±0,2	150±8	134±1	3,8±0,1	2,4±0,1
26	1,7±0,1	93±10	17±3	0,2±0,1	0,4±0,1
27	4,1±0,2	158±18	285±2	4,8±0,2	3,8±0,1
28	2,4±0,1	174±13	35±4	1,4±0,1	1,6±0,1
29	4,1±0,3	172±12	90±5	2,1±0,1	2,0±0,1
30	2,7±0,2	114±11	8±2	0,3±0,1	0,6±0,1
31	4,4±0,1	123±18	95±17	4,5±0,1	3,3±0,1
32	6,2±0,1	123±19	135±9	2,3±0,1	1,2±0,1
33	5,9±0,3	129±10	158±13	2,6±0,1	0,9±0,1
34	3,5±0,2	141±12	25±2	1,2±0,1	1,5±0,1
35	6,3±0,3	104±16	85±10	1,2±0,1	1,8±0,1
36	4,0±0,1	92±10	47±4	3,7±0,1	1,8±0,1
37	4,5±0,1	90±8	147±9	3,5±0,2	2,5±0,1
38	2,5±0,2	97±16	27±3	1,6±0,1	1,5±0,1
39	4,0±0,1	104±9	14±1	1,1±0,1	1,2±0,1
40	5,4±0,1	148±11	165±10	3,4±0,1	2,4±0,1
41	3,2±0,1	90±15	37±2	3,4±0,1	2,1±0,1
42	3,5±0,4	89±13	143±21	4,2±0,2	2,4±0,1
43	3,5±0,2	104±11	94±11	3,7±0,1	2,6±0,1
44	3,2±0,1	136±17	42±3	1,7±0,1	1,3±0,1
45	3,1±0,1	101±11	36±4	1,8±0,1	2,0±0,1
46	4,6±0,1	99±13	14±1	1,3±0,1	1,4±0,1
47	2,8±0,2	60±9	23±2	1,2±0,1	0,8±0,1
48	2,8±0,2	138±18	102±10	2,1±0,1	2,1±0,1
49	4,4±0,3	137±12	144±10	3,0±0,2	2,6±0,1
50	3,3±0,2	120±18	44±6	2,7±0,1	2,5±0,1
51	5,7±0,2	79±7	150±6	2,7±0,1	2,4±0,1
52	5,8±0,3	103±10	117±13	3,0±0,1	2,8±0,1
53	4,9±0,2	114±12	33±3	2,5±0,1	2,0±0,1
B537	5,7±0,2	61±8	150±8	2,7±0,2	2,4±0,1

Сопоставляя значения целевой (КМЦ-азной) и базовых (ксилазазной, авицелазной и β-глюкозидазной) активностей, полученные трансформанты можно условно разделить на 2 группы. В первую группу следует отнести трансформанты № 16, 33, 40, 48 (в табл. 2 отмечены **жирным** шрифтом, на рис. 2 обозначены сплошной стрелкой), у которых наблюдается повышение активности КМЦ-азы без существенного снижения активностей базовых ферментов; во вторую группу - трансформанты № 6, 28, 34, 53 (в табл. 2 отмечены **жирным курсивом**, на рис. 2 обозначены пунктирной стрелкой), являющиеся наиболее удачными с точки зрения экспрессии только одной КМЦ-азы.

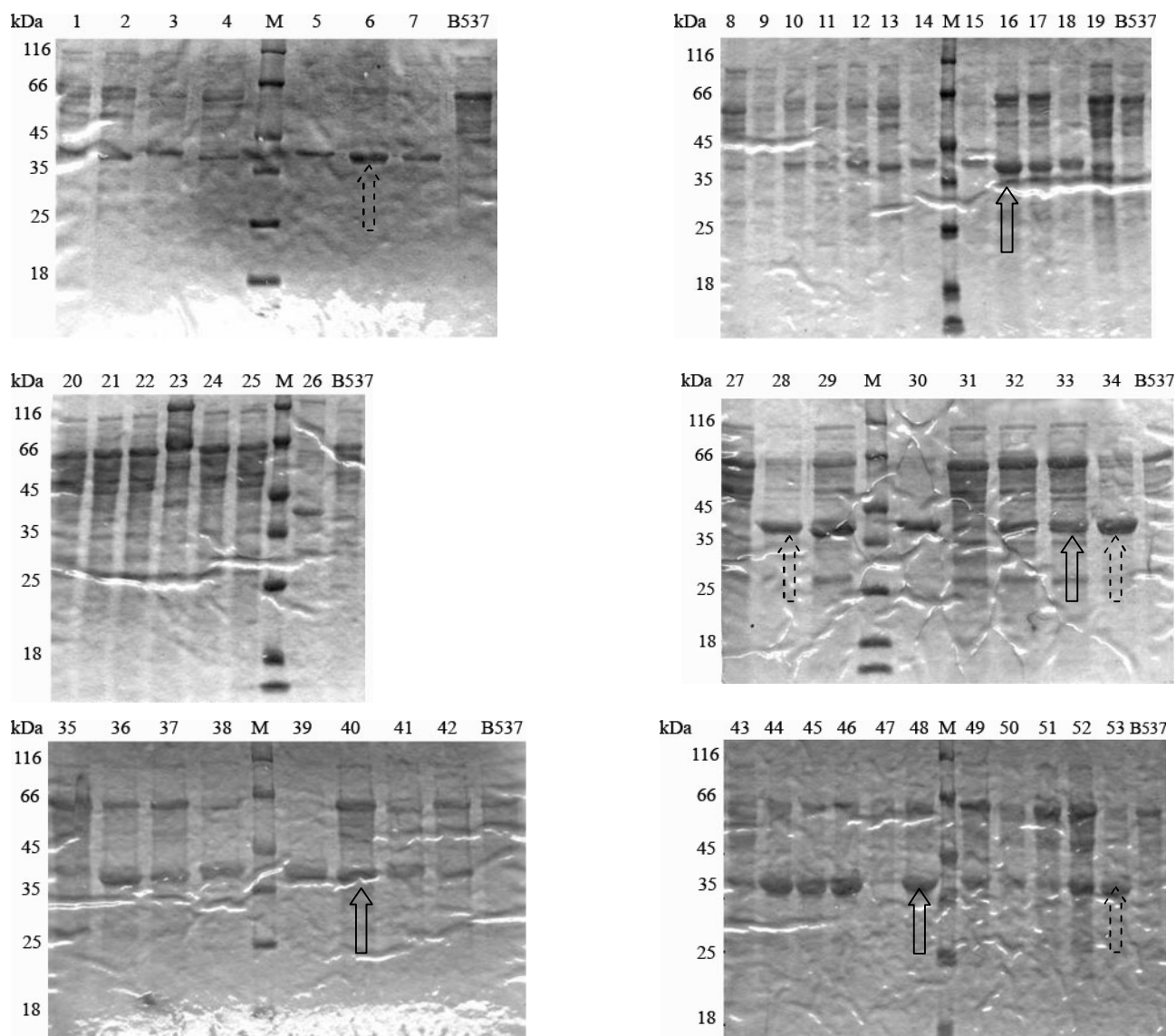


Рисунок 2. Электрофореграмма образцов культуральной жидкости трансформантов, полученных с помощью конструкции rPrCBHI-EGII_B1.

Совместно с коллегами из лаборатории биотехнологии ферментов ИНБИ РАН им. А.Н. Баха с помощью метода MALDI-TOF масс-спектрометрии были проанализированы трипсиновые гидролизаты белковых полос, соответствующих ЭГII из *P.verruculosum*. Основываясь на данных масс-спектрометрии можно утверждать, что в КЖ трансформантов, полученных с помощью плазмиды rPrCBHI-EGII_B1, содержится ЭГII из *P.verruculosum*.

2. Оптимизация условий глубинного культивирования рекомбинантных штаммов *P.verruculosum* в 1-литровых ферментерах (на примере штамма ЭГII-40)

Оптимизация процесса подачи подпитывающего раствора при культивировании штамма *P.verruculosum* ЭГII-40. Проводили серию ферментаций трансформанта *P.verruculosum* ЭГII-40 на стандартной ферментационной среде для *P.verruculosum* с

различными способами подачи подпитки (50%-ный раствор глюкозы) в 1-литровых ферментерах. Подпитку осуществляли: 1 – по парциальному давлению pO_2 ; 2 – дробно, 3 – с постоянной скоростью. Результаты ферментаций представлены на рис.3.

Показано, что оптимальным способом подачи подпитывающего раствора, при котором достигаются максимальные значения активности исследуемых ферментов и общего содержания внеклеточного белка в КЖ, является дробный способ.

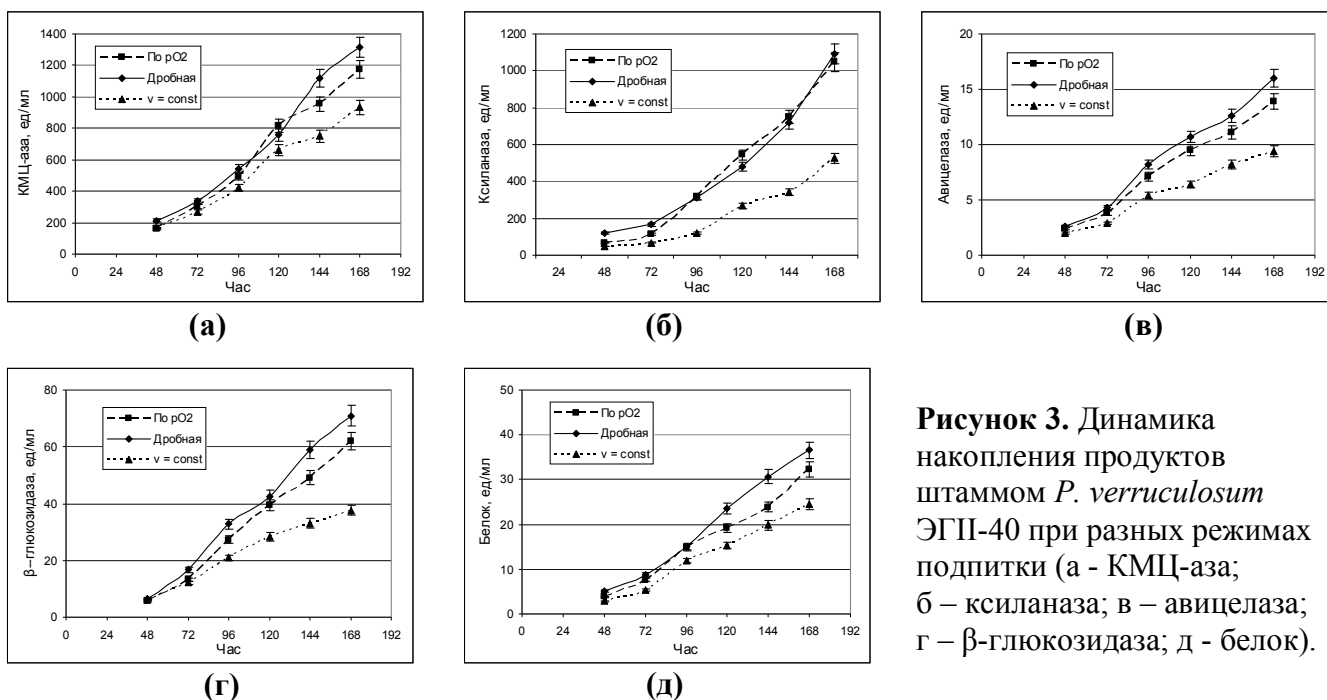


Рисунок 3. Динамика накопления продуктов штаммом *P. verruculosum* ЭГП-40 при разных режимах подпитки (а - КМЦ-аза; б – ксиланаза; в – авицелаза; г – β -глюкозидаза; д - белок).

Влияние температуры и pH среды на биосинтез ферментов штаммом *P. verruculosum* ЭГП-40 при культивировании в 1-литровых ферментерах.

На уровень биосинтеза ферментов в значительной степени оказывает влияние температура культивирования продуцента и значение pH ферментационной среды (Грacheва И.М., Кривова А.Ю., 2000). В связи с этим было проведено культивирование рекомбинантного штамма *P. verruculosum* ЭГП-40 при различных температурах, а также значениях pH питательной среды, поддерживаемых в процессе ферментации.

Из полученных данных (табл.3) видно, что оптимальная температура для синтеза целевых ферментов штаммом *P. verruculosum* ЭГП-40 - 32°C. При снижении температуры до 30 и 28°C уровень синтеза карбогидраз снижался, в среднем, на 15-30 и 25-40%, соответственно. Повышение температуры культивирования до 34°C значительного влияния на активность и продуктивность штамма не оказало. pH-оптимум ферментационной среды при культивировании полученного продуцента находится в широком диапазоне значения 4,5 – 5,5.

Таблица 3. Влияние температуры и pH ферментационной среды на биосинтез ферментов штаммом *P. verruculosum* ЭГП-40.

Условия культивирования		Белок, %	КМЦ-аза, %	Авицелаза, %
Т, °С	pH			
28	4	75	76	68
	5	76	77	69
	6	61	63	59
30	4	83	84	82
	5	83	83	80
	6	71	73	69
32	4	100	100	100
	5	100	100	100
	6	97	95	98
34	4	100	100	100
	5	100	99	100
	6	94	92	96

Оптимизация питательной среды при культивировании штамма *P. verruculosum* ЭГП-40. Были исследованы четыре варианта количества МКЦ в составе исходной ферментационной среды: 0, 2, 4 и 6% с добавлением или без добавления 3 порций МКЦ в ходе ферментации. Длительность культивирования составляла 168 часов. В табл. 4 представлены результаты измерений активностей ферментов и общего содержания внеклеточного белка в пробах слива.

Таблица 4. Продукция внеклеточных карбогидраз штаммом *P. verruculosum* ЭГП-40 при культивировании в ферментере на питательной среде с разным содержанием МКЦ.

МКЦ в исходной среде, %	3 добавки МКЦ	Белок, мг/мл	КМЦ-аза, ед/мл	Ксиланаза, ед/мл	Авицелаза, ед/мл	β -глюкозидаза, ед/мл
0	+	19±1,0	592±18	392±38	8±1	26±2
	-	13±0,5	330±20	218±36	4±1	16±1
2	+	34±0,6	1157±38	970±50	14±3	60±2
	-	26±0,8	802±22	621±52	11±1	45±3
4	+	35±1,2	1184±36	1014±41	16±1	66±1
	-	28±0,5	973±21	785±39	15±2	52±2
6	+	37±0,5	1315±35	1090±47	17±1	71±1
	-	36±0,6	1262±43	1026±54	16±1	67±1

В ходе данного эксперимента показано, что для достижения высокого уровня синтеза целевой КМЦ-азы и других (базовых) ферментов достаточно 2% МКЦ в составе исходной

питательной среды с тремя добавки МКЦ в процессе ферментации, что позволит снизить стоимость ферментационной среды примерно на 25%.

Оптимизация условий глубинного культивирования рекомбинантных штаммов *P.verruculosum* F10 в 1-литровых ферментерах. Для рекомбинантного штамма *P.verruculosum* F10, полученного ранее в лаборатории биосинтеза ферментов ИБФМ РАН, используя аналогичную схему экспериментов, были также проведены исследования по оптимизации условий культивирования и состава ферментационной среды. Было показано, что оптимальным способом подачи подпитки, так же, как и для штамма-продуцента *P.verruculosum* ЭГП-40, является дробный способ, температурный оптимум биосинтеза ферментов для данного продуцента - 32°C, pH-оптимум также находится в достаточно широком диапазоне - 4,5 – 5,0. Исследуя влияние состава ферментационной среды на биосинтез ферментов штаммом *P.verruculosum* F10, удалось снизить количество дорогостоящего компонента (МКЦ) в составе исходной питательной среды до 2%, при этом, не осуществляя добавок МКЦ в ходе ферментации, без существенных потерь в активностях получаемого ферментного препарата. Это, в свою очередь, позволит сократить затраты на ферментационную среду примерно на 30%.

3. Влияния индуцирующего действия растворимых дисахаридов на биосинтез целлюлаз штаммом *P.verruculosum* ЭГП-40

Исследование индуцирующего действия растворимых дисахаридов на биосинтез целлюлаз штаммом *P.verruculosum* ЭГП-40 при культивировании в колбах. Известно, что синтез микробных целлюлаз наряду с целлюлозой индуцируется различными дисахаридами. Так, например, софороза является хорошим индуктором для *Trichoderma reesei* (Sternberg, Mandels, 1979), гентибиоза – для *P.purpurogenum* (Takashi Kurasawa, 1991). Известны также примеры индукции ферментов целлобиозой, ламинарибиозой, лактозой и др.(Eberhart, Beck, 1973; Woodward, Wiseman, 1982). Таким образом, целью работы на данном этапе было исследование индуцирующего действия, как смеси продуктов реакции поликонденсации, получаемой с помощью β -глюкозидазного ферментного препарата, так и отдельных дисахаридов, на биосинтез целлюлаз штаммом *P.verruculosum* ЭГП-40.

В рамках этого исследования было проведено периодическое культивирование трансформанта *P.verruculosum* ЭГП-40 на стандартной питательной среде для *P.verruculosum*, содержащей различные индукторы целлюлаз. Исходя из полученных данных (рис.4), видно,

что все исследуемые дисахариды, как в смеси, так и отдельно оказывают индуцирующее действие на биосинтез карбогидраз.

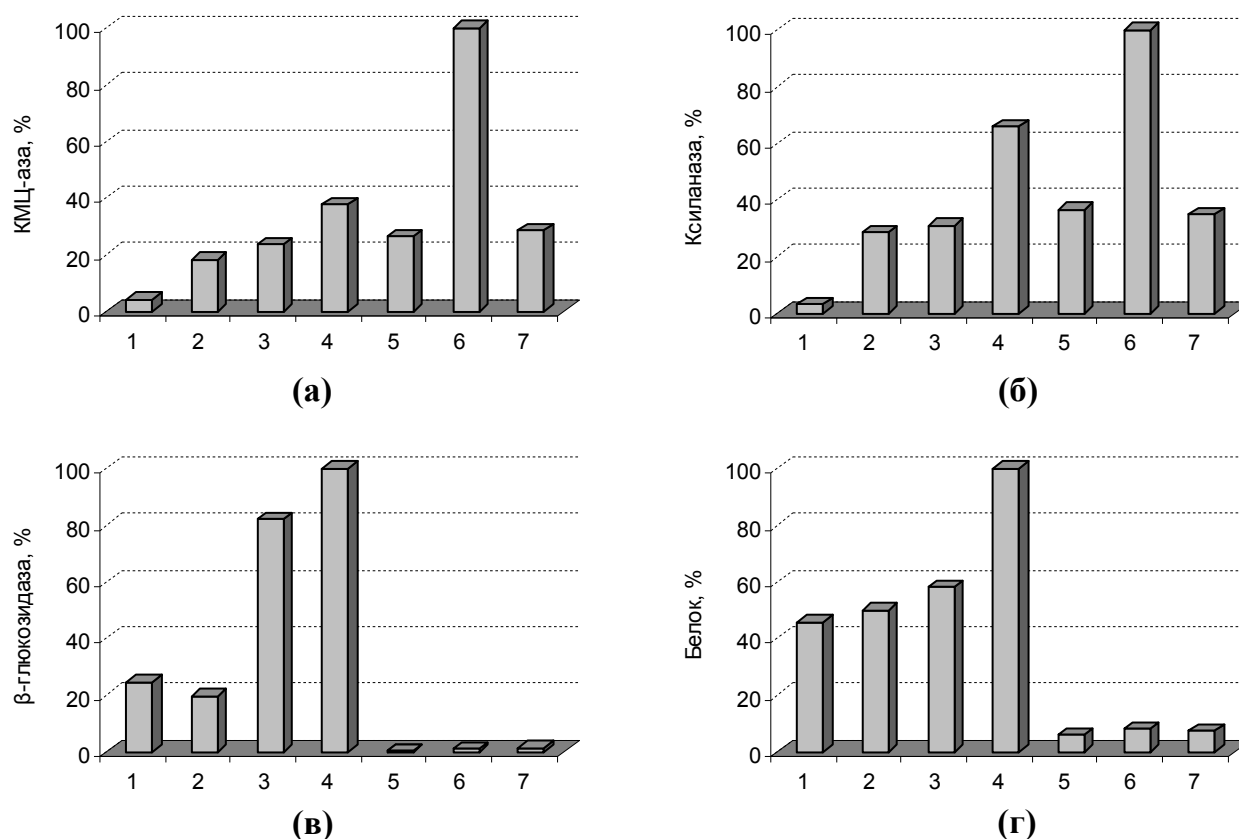


Рисунок 4. Влияние различных индукторов на биосинтез ферментов штаммом *P.verruculosum* ЭГП-40 при культивировании в колбах (1 - 6% глюкозы (контроль); 2 - 4% смеси сахаров + 2% глюкозы; 3 - 4% смеси сахаров; 4 - 6% смеси сахаров; 5 - 6% глюкозы + 65 мг софорозы; 6 - 6% глюкозы + 345 мг гентиобиозы; 7 - 6% глюкозы + 85 мг целлобиозы).

Очевидно, что гентиобиоза является наиболее сильным индуктором КМЦ-азы и ксиланазы *P.verruculosum* по сравнению с другими дисахаридами. Однако активность β-глюкозидазы в присутствии только гентиобиозы наблюдается на очень низком уровне. Подобное нескоординированное изменение уровня синтеза ферментов штаммом ЭГП-40 может объясняться различиями в механизмах регуляторного контроля синтеза ферментов.

Исследование индуцирующего действия растворимых дисахаридов на биосинтез целлюлаз штаммом *P.verruculosum* ЭГП-40 при культивировании в 1-литровых ферментерах. В ходе настоящего эксперимента была предпринята попытка полной или частичной замены микрокристаллической целлюлозы (МКЦ) в составе исходной питательной среды, а также 3 добавок МКЦ в процессе ферментации, на смесь сахаров, полученной в

результате реакции поликонденсации глюкозы, при культивировании штаммом *P.verruculosum* ЭГП-40 в 1-литровых ферментерах.

Как вино из полученных данных (рис.5а), при замене 1/3 количества МКЦ на смесь сахаров активности ферментов несколько превосходят контрольный вариант (1). При замене 2/3 количества МКЦ активности ферментов снижаются незначительно. Однако суммарные активности ферментов (в пересчете на весь объем супернатанта слива) наблюдаются на уровне контрольных значений (рис.5б). При осуществлении только 3 добавок МКЦ в процессе ферментации потери в активностях ферментов в среднем составили 15-17%. Более существенное снижение активностей ферментов наблюдается при полной замене МКЦ на смесь сахаров.

Таким образом, показано, что 2/3 МКЦ в составе исходной питательной среды можно заменить на смесь продуктов конденсации без потерь в активностях основных ферментов, осуществляя при этом 3 добавки МКЦ в процессе ферментации.

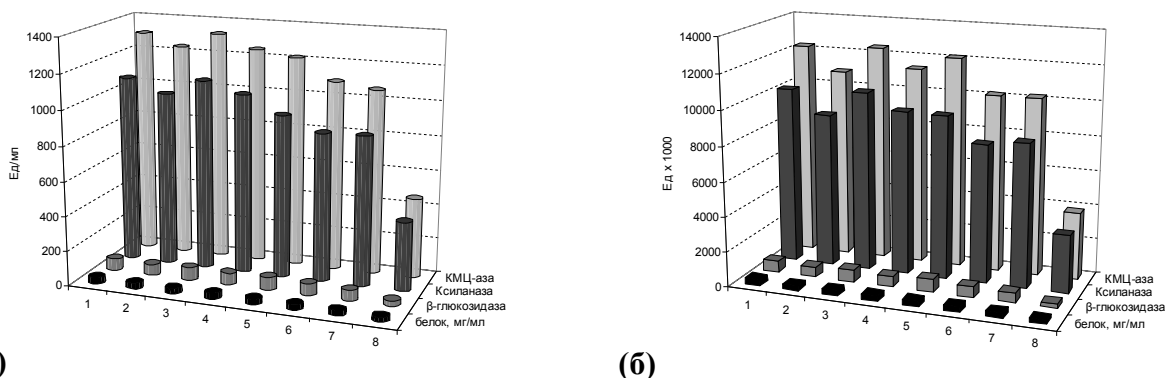


Рисунок 5. Индукция синтеза ферментов дисахаридами (софорозой, гентиобиозой, целлобиозой) при культивировании в 1-литровых ферментерах (а – максимальные активности ферментов; б – выход ферментов); 1 - 6% МКЦ + 4% глюкозы + 3 добавки МКЦ (контроль); 2 - 6% МКЦ + 4% глюкозы; 3 - 4% МКЦ + 2% смеси сахаров + 4% глюкозы + 3 добавки МКЦ; 4 - 4% МКЦ + 2% смеси сахаров + 4% глюкозы; 5 - 2% МКЦ + 4% смеси сахаров + 4% глюкозы + 3 добавки МКЦ; 6 - 2% МКЦ + 4% смеси сахаров + 4% глюкозы; 7 - 0% МКЦ + 6% смеси сахаров + 4% глюкозы + 3 добавки МКЦ; 8 - 0% МКЦ + 6% смеси сахаров + 4% глюкозы.

4. Культивирование трансформанта *P.verruculosum* ЭГП-40 на различных целлюлозосодержащих субстратах

С целью исследования возможности замены дорогостоящей МКЦ в составе исходной ферментационной среды было проведено культивирование штамма *P.verruculosum* ЭГП-40 на питательных средах, основным углеродным субстратом в которых являлись: древесина хвойная обессмоленная (ДХОС), целлюлоза лиственная, целлюлоза хвойная (отходы отечественных целлюлозно-бумажных комбинатов), пергамент растительный (обрезки, накапливающиеся при производстве пергамента). Контрольным экспериментом было

культивирование на МКЦ. На рис.6 представлены максимальные значения активностей ферментов и содержания внеклеточного белка в КЖ.

Из всех исследованных субстратов наилучшие результаты были получены при культивировании на пергаменте. Активности КМЦ-азы, ксиланазы и β -глюкозидазы в этом случае уступали контрольным значениям примерно на 24-27%. В случае использования в качестве субстратов лиственной и хвойной целлюлозы снижение уровня синтеза ферментов относительно контрольного было в среднем на 50%. При культивировании на ДХОС снижение активности ферментов оказалось наиболее существенным и составило по сравнению с контролем примерно 73%, что, вероятно, вызвано, присутствием в ней большого количества нецеллюлозных компонентов, в частности лигнина.

Таким образом, отходы пергаментного производства являются весьма привлекательным субстратом для получения промышленных целлюлаз, так как обеспечивают достаточно высокий (сопоставимый с МКЦ) уровень синтеза целевых ферментов.

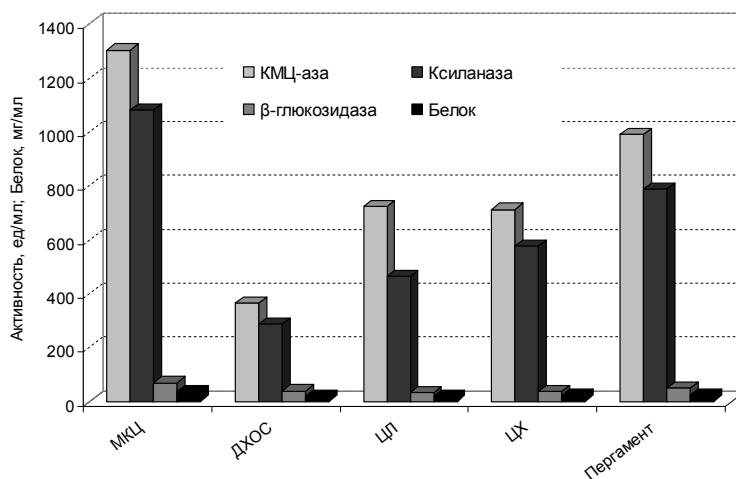


Рисунок 6. Активности ферментов и содержание внеклеточного белка в КЖ, полученной при культивировании штамма *P.verruculosum* ЭП-40 в 1-литровых ферментерах на различных целлюлозосодержащих субстратах: микрокристаллической целлюлозе (МКЦ), древесине хвойной обессмоленной (ДХОС), целлюлозе лиственной (ЦЛ), целлюлоза хвойной (ЦХ), пергаменте.

Отметим, однако, что при культивировании на лиственной и хвойной целлюлозах и пергаменте, наблюдалась значительная задержка начального роста культуры (примерно 4-5 суток) (рис.7а), тогда как при культивировании на МКЦ и измельченной сосне она составляла 1-2 суток. Предположительно она вызвана наличием веществ, входящих в состав исследуемых субстратов и подавляющих начальный рост гриба, а также синтез целлюлозолитических ферментов, которые используются при производстве этих целлюлоз на ЦБК. Одной из причин удлиненной лаг-фазы, вероятно, также может служить и повышенная устойчивость данных субстратов к ферментативному воздействию, обусловленная их надмолекулярной структурой.

Таким образом, из-за существенного увеличения продолжительности процесса культивирования получение карбогидраз с использованием целлюлозосодержащих субстратов, альтернативных МКЦ, значительно удорожается.

В поисках решения этой проблемы было проведено периодическое культивирование *P.verruculosum* ЭГП-40 в 1-литровых ферментерах на среде, содержащей 6% пергамент, предварительно предобработанного ферментным препаратом *P.verruculosum* B537 в дозах 1 и 2,5 мг ФП на 1 г пергамент (рис.7б и 7в, соответственно).

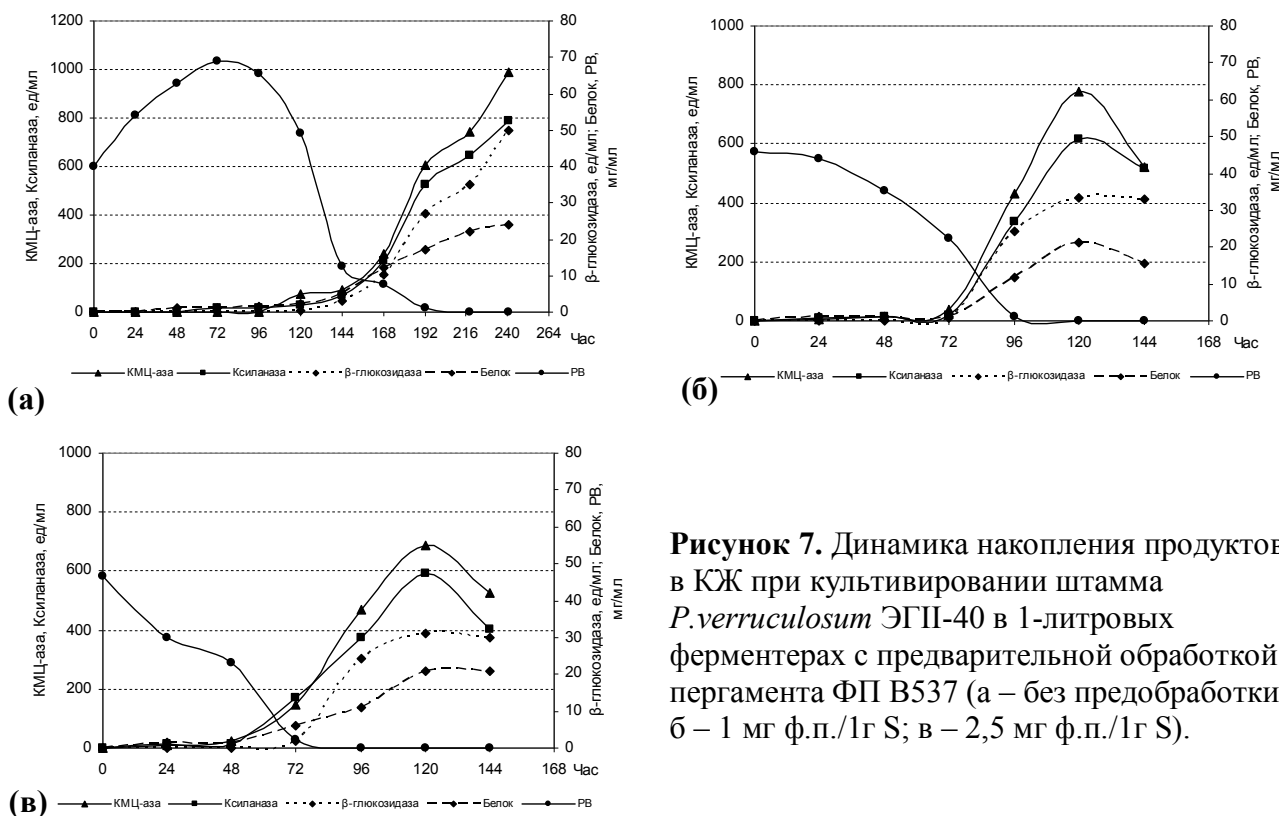


Рисунок 7. Динамика накопления продуктов в КЖ при культивировании штамма *P.verruculosum* ЭГП-40 в 1-литровых ферментерах с предварительной обработкой пергамент ФП B537 (а – без предобработки; б – 1 мг ф.п./1г S; в – 2,5 мг ф.п./1г S).

Как видно из полученных данных, в результате предобработки пергамент в случае дозы 1 мг ФП на 1 г S лаг-фаза составила примерно 3 суток (рис.7б), при увеличении дозы ФП до 2,5 мг ФП на 1 г S – примерно 2 суток, что на 3 и 2 суток короче по сравнению с вариантом без предобработки. Необходимо отметить что, максимумы активностей исследуемых ферментов и количество внеклеточного белка в КЖ, полученной при культивировании с предобработкой, в среднем на 25% уступают таковым, полученным при культивировании без предобработки, однако эти потери могут быть компенсированы сокращением времени ферментации, так как максимальные значения активностей ферментов наблюдаются уже на 120 часов культивирования.

5. Исследование гидролитической способности ферментного препарата, полученного на основе рекомбинантного штамма *P.verruculosum* ЭГП-40, по отношению к различным видам ЦСМ

Был проведен гидролиз различных видов ЦСМ (измельченной осины, измельченной обессмоленной сосны, измельченной багассы) с помощью ФП, полученных на основе новых штаммов *P.verruculosum* ЭГП-40 и ЭГП-40. Гидролиз проводили в течение 48 часов при 50°C и различной дозировке ФП по белку (2, 5, 10 мг белка на 1 г субстрата) в присутствии избытка целлобиазного ФП F10 (40 ед целлобиазы на 1 г субстрата). Через 3, 24 и 48 часов из реакционной смеси отбирали пробы, в которых измеряли концентрацию восстанавливающих сахаров (ВС) и глюкозы. В качестве контрольных препаратов были использованы: B537, полученный на основе исходного штамма *P.verruculosum* B537, коммерческие препараты, полученные на основе *T.reesie*: Spesyme CP, Celluclast 1.5L, Accelerase 1000, CellicCtec (значения активностей препаратов представлены в табл.5).

Таблица 5. Удельные активности ферментных препаратов, ед/мг белка.

Название ФП	Белок, мг/мл	КМЦ-аза	Ксиланаза	β -глюкозидаза
<i>P.verruculosum</i> B537, (контроль)	834 \pm 33	14,9 \pm 0,6	15,0 \pm 0,6	1,25 \pm 0,05
Spesyme CP	118 \pm 5	27,7 \pm 1,1	7,5 \pm 0,3	0,57 \pm 0,02
Celluclast 1.5L	184 \pm 7	17,5 \pm 0,7	2,9 \pm 0,1	0,15 \pm 0,01
Accelerase 1000	103 \pm 4	30,7 \pm 1,2	3,3 \pm 0,1	2,94 \pm 0,12
CellicCtec	182 \pm 6	11,3 \pm 1,0	1,4 \pm 0,1	2,81 \pm 0,03
<i>P.verruculosum</i> ЭГП-40	760 \pm 27	17,6 \pm 0,5	23.2 \pm 0,8	1,1 \pm 0,05
<i>P.verruculosum</i> ЭГП-34	704 \pm 25	20,0 \pm 0,6	7,5 \pm 0,3	0,35 \pm 0,05

Наиболее высокой осахаривающей способностью по отношению к исследуемым природным целлюлозосодержащим субстратам обладает рекомбинантный препарат ЭГП-40 рис.8 и превосходит по эффективности гидролиза этих видов ЦСМ как контрольный препарат, полученный с помощью исходного штамма *P.verruculosum* B537, так и коммерческие ферментные препараты (рис.8). Степень конверсии в результате гидролиза измельченной осины, сосны и багассы при действии препарата ЭГП-40 составила 52, 46 и 54%, соответственно. Препарат ЭГП-34 также обладает достаточно высокой осахаривающей способностью, хотя и уступает на всех субстратах препарату ЭГП-40, а также контрольным препаратам Spesyme CP и B537 на измельченной сосне. Однако по отношению к измельченной осине и багассе гидролитическая способность препарата ЭГП-34 превосходит или находится примерно на одинаковом уровне с контрольным и коммерческими препаратами. Степень конверсии измельченной осины, сосны и багассы в случае использования этого препарата составила 50, 44 и 50%, соответственно.

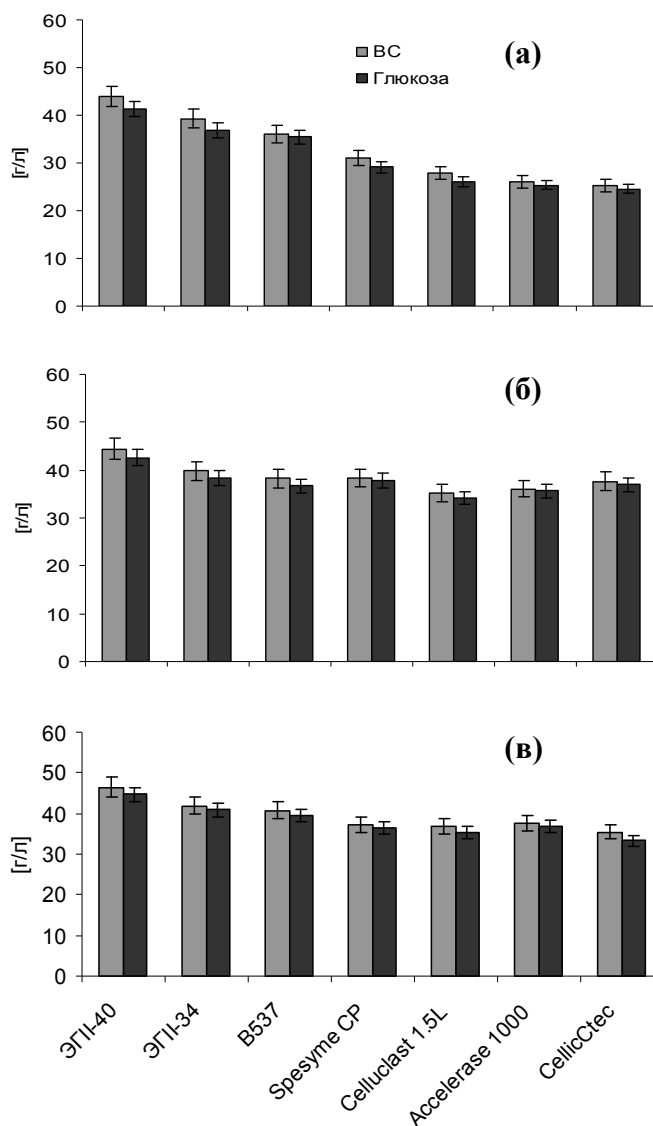


Рисунок 8. Выход ВС и глюкозы (г/л) за 48 часов гидролиза различных природных ЦСМ в присутствии препарата F10 (40 ед целлюлазной активности на 1 г субстрата): а - измельченная осина; б - измельченная обессмоленная сосна; в - измельченная багасса. Условия: 50°C, pH 5, [S] = 100 г/л (сухой вес), [E] = 5 мг/г субстрата, 250 об/мин.

На рис. 9 представлены кинетические кривые гидролиза измельченной осиновой древесины рекомбинантными ферментными препаратами ЭГП-40, ЭГП-34, препаратом B537 и коммерческими препаратами.

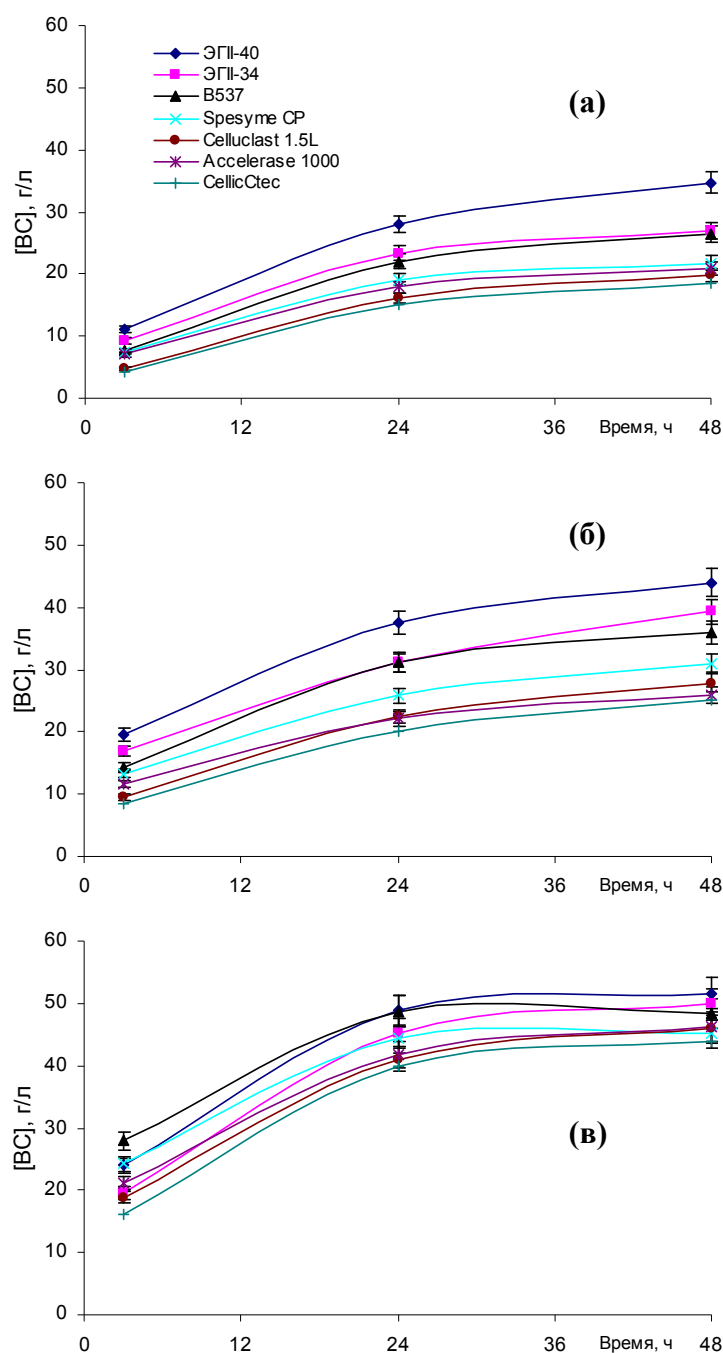


Рисунок 9. Кинетические кривые накопления ВС при гидролизе измельченной осиновой древесины препаратами ЭГП-40, ЭГП-34 и контрольными препаратами в присутствии препарата F10 (40 ед целлюлазной активности на 1 г субстрата): а – 2 мг на 1 г субстрата, б – 5 мг на 1 г субстрата, в – 10 мг на 1 г субстрата. Условия: 50°C, pH 5, [S] = 100 г/л (сухой вес), 250 об/мин.

Как видно из полученных данных, ферментный препарат ЭГП-40 по глубине и скорости гидролиза превосходит контрольный препарат B537 и коммерческие препараты за исключением начального отрезка времени при дозировке 10 мг на 1 г субстрата, где он несколько уступил контрольному препарату B537. Отметим также, что при гидролизе измельченной осиновой древесины выход ВС, достигаемый при действии рекомбинантных

препаратов через 24 часа гидролиза, превосходит или находится на уровне значений выхода ВС, достигаемый при действии контрольного или коммерческих препаратов через 48 часов, что позволяет снизить время гидролиза.

6. *In vitro* “кормовые” испытания препаратов ЭГП-40 и ЭГП-34 на различных типах кормов

Существует два распространенных типа кормовых рационов животных и птиц. Основу первого рациона составляют пшеница, ячмень и рожь, основу второго - соя. Исходя из этого, в качестве модельных систем при проведении “кормовых” испытаний препаратов и индивидуальных ферментов были выбраны следующие: смесь пшеница + ячмень (в соотношении 60:40 по весу), соевая мука и пшеничные отруби. Все субстраты предварительно измельчали на механической мельнице и просеивали, чтобы получить однородную смесь. “Кормовой” тест проводили при следующих условиях: 40°C, рН 5, концентрация субстрата 50 мг/мл, перемешивание реакционной смеси. Препараты уравнивали по белку, использовали три концентрации – 1 мг/г, 2 мг/г, 5 мг/г белка на 1 г субстрата. Данный диапазон белковых концентраций выбран, исходя из имеющихся сведений по реальному применению ферментных препаратов на практике. Продолжительность инкубирования составляла 3 часа, после чего отбирали пробы, в которых измеряли концентрацию ВС.

Как видно из представленных данных (рис.10), наиболее эффективным при действии на различные кормовые субстраты оказался препарат ЭГП-40, что объясняется сбалансированностью компонентного состава его ферментного комплекса, который, в свою очередь, характеризуется не только высокой целлюлазной (КМЦ-азной), но и высокой ксиланазной активностью. Подобное увеличение способности рекомбинантного препарата ЭГП-40 гидролизовать кормовые субстраты позволит значительно снизить количество ферментного препарата, добавляемого на практике в кормовые смеси.

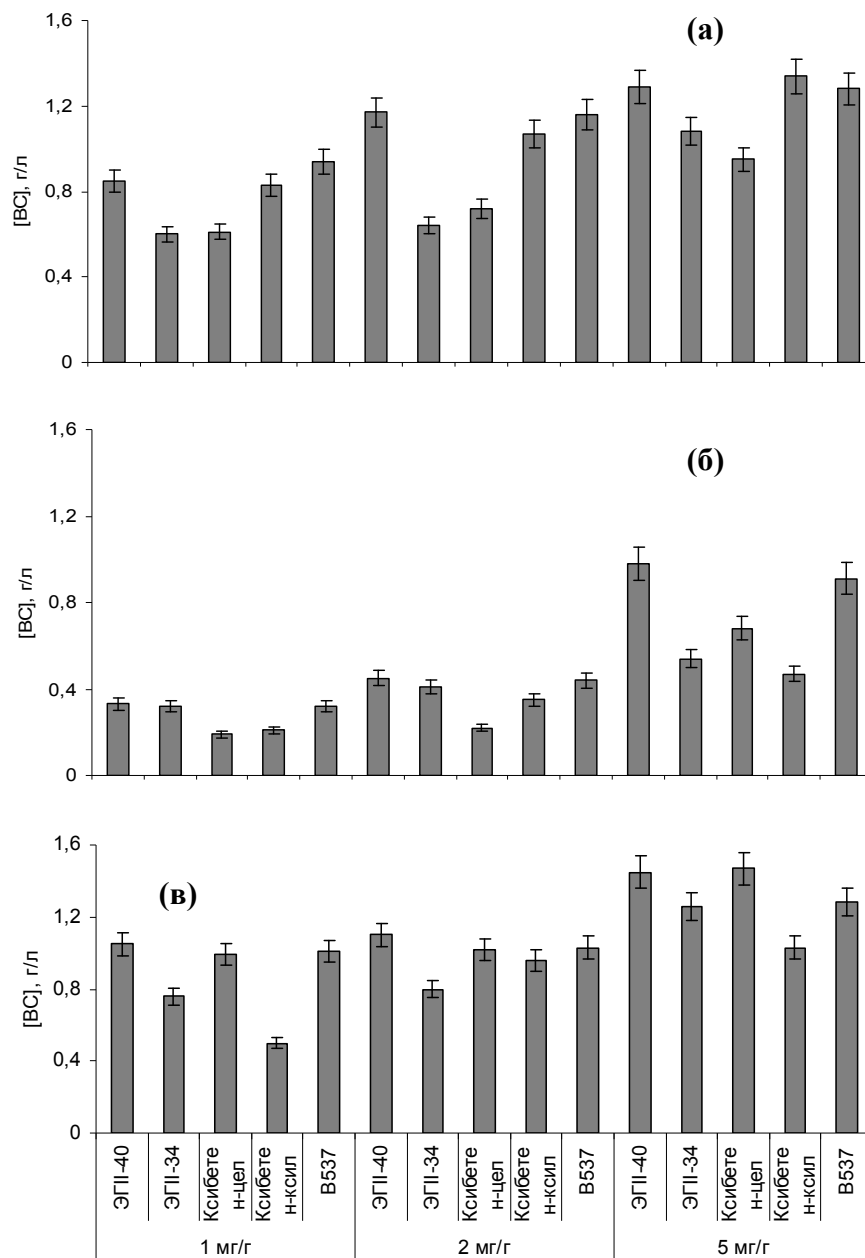


Рисунок 10. Результаты *in vitro* “кормового” теста препаратов на различных кормовых субстратах: а - смесь пшеница + ячмень (в соотношении 60:40 по весу), б - соевая мука, в - пшеничные отруби. Условия: 40°C, pH 5, [S] = 500 г/л (сухой вес), [E] = 1, 2 и 5 мг/г, 250 об/мин.

ВЫВОДЫ

1. Созданы новые рекомбинантные штаммы на основе гриба *P.verruculosum*, продуцирующие гидролитические комплексы с увеличенной целлюлазной и эндо- β -1,4-глюканазной активностью.
2. Для рекомбинантных штаммов *P.verruculosum* – продуцентов эндоглюканазы II (ЭГП-40) и β -глюкозидазы (F10) оптимизированы состав питательной среды и условия культивирования в 1-литровых ферментерах. Оптимальными параметрами для достижения высокого уровня синтеза ферментов являются $T = 32^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 4,5 - 5,5$, способ подачи подпитывающего раствора - дробный.
3. В процессе оптимизации удалось снизить количество основного компонента питательной среды (микрористаллической целлюлозы) с 6 до 2% без существенных потерь активностей ферментов (КМЦ-азы, ксиланазы, β -глюкозидазы).
4. Исследовано индуцирующее действие продуктов реакции поликонденсации (глюкозы, целлобиозы, софорозы, гентиобиозы) на биосинтез целлюлаз новым рекомбинантным штаммом *P.verruculosum* ЭГП-40. Установлено, что использование смеси этих продуктов позволяет заменить до 70% микрористаллической целлюлозы в составе исходной питательной среды без существенных потерь в активностях ферментов.
5. Установлена возможность полной замены МКЦ в составе исходной питательной среды на пергамент.
6. С помощью рекомбинантных штаммов *P.verruculosum* получен ферментный препарат карбогидраз *P.verruculosum* ЭГП-40, который обеспечивает увеличение выхода продуктов гидролиза на 10-15% по сравнению с контрольным ферментным препаратом, полученным с помощью исходного штамма *P.verruculosum* B537.
7. В результате проведения *in vitro* “кормовых” тестов установлено, что рекомбинантный препарат *P.verruculosum* ЭГП-40 обладает повышенной эффективностью действия на кормовые субстраты по сравнению с коммерческими аналогами, что позволит значительно сократить дозу препарата, добавляемого на практике в кормовые смеси.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ

1. **В.А. Немашкалов**, А.О. Беккаревич, А.В. Кошелев, О.Н. Окунев, А.М. Рожкова, О.Г. Короткова, А.П. Синицын. Создание высокоактивного ферментного препарата для биоконверсии багассы на основе рекомбинантного штамма *Penicillium verruculosum*. Хранение и переработка сельхозсырья. 2011, №10, С. 33-35.
2. О.Г. Короткова, А.М. Рожкова, В.Ю. Матыс, А.В. Кошелев, О.Н. Окунев, **В.А. Немашкалов**, О.А. Синицына, А.Г. Правильников, Р.М. Андрианов, И.Н. Овешников, Е.Р.

Давидов, А.П. Сеницын. Получение комплексных биокатализаторов на основе ферментных препаратов из рекомбинантного гриба *Penicillium verruculosum* и применение их в гидролизе отходов деревообрабатывающей и сельскохозяйственной промышленности. Катализ в промышленности. 2011, №5, С. 61-68.

3. А.М. Рожкова, О.Г. Короткова, А.Г. Правильников, Р.М. Андрианов, А.П.Сеницын, О.А. Сеницына, О.Н.Окунев, В.Ю. Матыс, А.В. Кошелев, **В.А. Немашкалов**, Н.В. Цурикова. Применение нового комплексного ферментного препарата при переработке целлюлозосодержащей биомассы. Хранение и переработка сельхозсырья. 2011, №10, С. 44-47.

4. Koshelev A.V., Matys V.Yu., **Nemashkalov V.A.**, Skomorovsky A.A., Ustinov B.B., Zorov I.N., Morozova V.V., Korotkova O.G., Sinitsyn A.P., Biodegradation of paper parchment by mycelium fungi *Penicillium* and *Trichoderma* and possibility of their application for production of cellulose-lytic enzymes and bioethanol. Abstract of International Conference "Biocatalysis-2007: Fundamentals & Applications". St. Petersburg, 2007, P. 114.

5. Osipov D.O., Koshelev A.V., Zorov I.N., Matys V.Yu., Bubnova T.V., **Nemashkalov V.A.**, Okunev O.N., Rozhkova A.M., Sinitsyn A.P. Simultaneousfermentation of fungi *Trichoderma longibrachiatum* and *Penicillium verruculosum* as a tool for obtaining cellulose complex with increased β -glucosidase activity. Abstract of International Conference "Biocatalysis-2007: Fundamentals & Applications". Arkhangelsk, 2009, P. 107.

6. **Немашкалов В.А.**, Кошелев А.В., Окунев О.Н. Биосинтез карбогидраз гриба *Penicillium verruculosum* при культивировании на различных целлюлозосодержащих субстратах. Тезисы 13-ой Международной Пушинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века». Пушино, 2009, С. 174.

7. **Немашкалов В.А.**, Беккаревич А.О., Кошелев А.В., Матыс В.Ю., Бубнова Т.В., Рожкова А.М., Короткова О.Г. Создание рекомбинантного штамма-продуцента β -глюкозидазы для увеличения эффективности процесса ферментативного осахаривания целлюлозосодержащего сырья. Материалы 2-ого Конгресса-партнеринга и выставки по биотехнологии и биоэнергетике. Москва, 2010, С. 133.

8. Сеницын А.П., Сеницына О.А., Рожкова А.М., Зоров И.Н., Федорова Е.А., Семенова М.В., Саттрудинов А.Д., Короткова О.Г., Андрианов Р.М., Правильников А.Г., Волков П.В., Осипов Д.О., Бушина Е.В., Кондратьева Е.А., Гусаков А.В., **Немашкалов В.А.**, Беккаревич А.О., Матыс В.Ю., БубноваТ.В., КошелевА.В., Окунев О.Н. Комплекс ферментов для эффективного осахаривания лигноцеллюлозных материалов. Материалы 2-ого Конгресса-партнеринга и выставки по биотехнологии и биоэнергетике. Москва, 2010, С. 162-163.

9. **Немашкалов В.А.**, Кошелев А.В., Окунев О.Н. Создание рекомбинантного штамма-продуцента целлюлозы (β -глюкозидазы). Тезисы 14-ой Международной Пушинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века». Пушино, 2010, С. 276-277.

10. Короткова О.Г., Правильников А.Г, **Немашкалов В.А.**, Рожкова А.М., Сеницын А.П. Гидролитическая способность новых ферментных препаратов на основе гриба *Penicillium verruculosum*. Материалы VI Московского международного конгресса «Биотехнология: состояние и перспективы развития». Москва, 2011, С. 326-328.