

ОТХОДЫ ПЕРГАМЕНТНОГО ПРОИЗВОДСТВА КАК СУБСТРАТ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ФЕРМЕНТНОГО КОМПЛЕКСА КАРБОГИДРАЗ *PENICILLIUM VERRUCULOSUM*

Осипов Д.О.¹, Немашкалов В.А.², Кошелев А.В.², Мерзлов Д.А.^{1,3}, Короткова О.Г.¹

¹Институт Биохимии им. А.Н.Баха РАН, Москва, Россия (119071, Москва, Ленинский проспект, 33, стр.2), e-mail: inbi@inbi.ras.ru

²Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина, Пушкино, Россия (142290, Московская область, Пушкино, пр-т Науки, 5), e-mail: boronin@ibpm.pushchino.ru

³Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия (119991, Российская Федерация, Москва, Ленинские горы, 1), e-mail: info@rector.msu.ru

Показана возможность использования пергамента в качестве альтернативного микрокристаллической целлюлозе (МКЦ) субстрата, для получения комплексов карбогидраз продуцируемых мицелиальным грибом *Penicillium verruculosum*. При использовании пергамента в ферментационной среде, значения активностей и содержания белка уменьшились не более чем на 25 % по сравнению с контрольной ферментационной средой. При этом увеличивалась лаг-фаза роста гриба. Разработана технология ферментативной предобработки пергамента, позволяющая значительно сократить лаг-период роста культуры и ускорить процесс культивирования продуцента почти в 2 раза. Применение предобработки пергамента, предназначенного для выращивания гриба, ферментным препаратом карбогидраз перед проведением ферментации привело к получению максимума активностей в культуральной жидкости через 120 часов. При продолжении культивирования значения активностей ферментов падают.

Ключевые слова: пергамент, карбогидразы, *Penicillium verruculosum*, ферментация.

PARCHMENT MANUFACTURE WASTES AS A SUBSTRATE FOR THE CARBOHYDRASE ENZYME COMPLEX PRODUCTION

Osipov D.O.², Nemashkalov V.A.¹, Koshelev A.V.¹, Merzlov D.A.^{1,3}, Korotkova O.G.²

¹A.N. Bach Institute of biochemistry of RAS, Moscow, Russia (119071 Moscow; Leninsky prospekt, 33, build. 2), e-mail: inbi@inbi.ras.ru

²G. K. Skryabin Institute of biochemistry and physiology of microorganisms, Pushchino, Russia (142290, Moscow region, Pushchino, prospekt Nauki, 5), e-mail: boronin@ibpm.pushchino.ru

³Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia (119991, Moscow, Leninskie gory, 1), e-mail: info@rector.msu.ru

It was shown that a parchment could be used as an alternative substrate instead of microcrystalline cellulose for production carbohydrase enzyme complexes secreted by *Penicillium verruculosum*. Application of parchment in the fermentation medium resulted in reduced activity values and protein content but not more than 25% compared to the control fermentation medium. This increases the lag phase of growth of the fungus 2-fold compared to microcrystalline cellulose due to recalcitrance of the parchment. Therefore, fungal fermentation becomes more expensive. Procedure of parchments enzyme pretreatment was developed. It allows to decrease lag-phase and the fermentation time in 2-fold: it ends after 48 hours from the start of the fermentation. Pretreatment of parchment intended for fungi cultivation by carbohydrase enzyme preparation prior to fermentation resulted in a peak of activity in the culture liquid after 120 hours. With continued culturing enzyme activity values fall.

Keywords: parchment, carbohydrases, *Penicillium verruculosum*, fermentation.

Весьма эффективным и естественным способом утилизации целлюлозосодержащих отходов, основанным на ферментативном разрушении органического субстрата, является микробная биодegradация. Она позволяет решить две основные задачи: создание экономически выгодного процесса производства целевого продукта и утилизацию потенциальных экологических загрязнителей. С помощью ферментов карбогидраз (в частности, целлюлаз и гемицеллюлаз) микроорганизмы расщепляют целлюлозу с

образованием простых сахаров, которые затем могут быть конвертированы в различные полезные продукты: спирты, органические и аминокислоты, кормовые компоненты и пр. [2]. Промышленное получение технических ферментов является экологически и экономически выгодным, о чем свидетельствует возрастающий объем продаж технических ферментов на мировом рынке с ежегодной динамикой в 10 %. Одним из важнейших факторов рентабельности процессов биоконверсии лигноцеллюлозных материалов, наряду со стоимостью самого сырья, является эффективность гидролитического действия карбогидразных комплексов, которая, в свою очередь, определяется как свойствами индивидуальных ферментов, так и их взаимодействием в составе этого комплекса, а также стоимостью ферментационного процесса [4,6].

Основными продуцентами промышленных карбогидраз являются мицелиальные грибы рода *Trichoderma*, обладающие высокой секреторной способностью. Однако грибы рода *Penicillium* также по праву занимают одно из главных мест в ряду промышленно важных продуцентов, поскольку способны синтезировать ферментные комплексы более сбалансированного состава, кроме того, индивидуальные ферменты обладают более высокой удельной активностью и операционной стабильностью.

Оптимизация ферментационных сред и условий культивирования является важным этапом в разработке схем биоконверсии. Во многом затраты на производство ферментного препарата, получаемого на основе карбогидразного комплекса, определяются стоимостью компонентов ферментационной среды. В ферментационной среде для выращивания наиболее дорогим компонентом является микрокристаллическая целлюлоза (МКЦ), вклад которой в стоимость ферментации составляет около 50 %. Поэтому для получения технических ферментов обычно используют дешевые и доступные целлюлозосодержащие субстраты, являющиеся альтернативой дорогостоящей микрокристаллической целлюлозе (МКЦ) [3,5]. Следует также отметить, что отсутствие целлюлозного компонента (индуктора ферментов) в составе питательной среды существенно снижает продуктивность штаммов. Таким дешевым источником целлюлозы могут являться обрезки пергаменты, производимые целлюлозно-бумажными комбинатами. Например, объемы отходов пергаменты только Троицкой бумажной фабрики составляют до 1,5 тонн в день [3]. Пергамент – широко распространенный в настоящее время упаковочный материал. Его изготавливают из чистой целлюлозной бумаги-основы. После пергаментации бумага приобретает специфические свойства – становится жиро- и влагонепроницаемой, не разрушается в воде при кипячении и при увлажнении не теряет механической прочности [5].

Целью исследования являлась оптимизация состава питательной среды для культивирования гриба *Penicillium verruculosum* 221.

Материалы и методы

Штаммы микроорганизмов. *P. verruculosum* 221 – продуцент карбогидразного комплекса.

Состав сред. Инокуляционная среда (г/л): глюкоза – 15; дрожжевой экстракт – 10; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 5; KH_2PO_4 – 15; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,3; CaCl_2 – 0,23). Режим стерилизации: 1 атм., 1 час.

Среда для культивирования в ферментере содержала (г/л): глюкоза – 40; пшеничные отруби – 10; целлюлозный субстрат – 60; дрожжевой экстракт – 10; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 5; KH_2PO_4 – 7; CaCl_2 – 0,23; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,3; пеногаситель лапрол – 10 капель. Режим стерилизации ферментационной среды: 1 атм., 1 час (2 раза) и 1 раз 0,5 атм., 30 мин. pH среды после стерилизации: 5,3.

Культивирование штамма *P. verruculosum*. Предварительно выращивался инокулят в 100 мл инокуляционной среды в течение 48 часов при 32 °С и 250 об/мин. Штамм гриба культивировали, осуществляли в лабораторных 1-литровых ферментерах на установке «КФ-108» при следующих условиях: 30–32 °С, pH 4,5 – 5,0, расход воздуха 0,7 л/мин. Поддержание этих параметров, а также скорости подачи подпитывающего раствора, осуществлялось в автоматическом режиме с помощью программного обеспечения «Quadrus@ (Проинтех, Россия). Мицелий для засева ферментеров выращивался на среде ИК в течение 24 часов при 30 °С. Ферментация проводилась в 2 стадии: культивирование в режиме «batch» до 24 часов, культивирование с подаиткой (20% раствор глюкозы) в режиме «fed-batch» до 144 часов. Отбор проб осуществляли стерильно через специальный пробоотборник.

После окончания культивирования в ферментерах культуральную жидкость центрифугировали при 5000 об/мин 40 мин.

Определение ферментативных активностей. Активности ферментных препаратов по отношению к полисахаридным субстратам: карбоксиметилцеллюлозе (КМЦ), глюкуроноксиану березы (ксилан), микрокристаллической целлюлозе (МКЦ) – рассчитывали по начальным скоростям образования восстанавливающих сахаров (ВС), определяемых методом Шомоди – Нельсона [7]. За единицу активности принимали такое количество фермента, которое приводит к образованию 1 мкмоль ВС в минуту при концентрации субстрата 5 г/л. Активность по n-НФ-β-D-глюкопиранозиду (n-НФГ) определяли, измеряя начальную скорость образования n-нитрофенола. За единицу активности принимали количество фермента, необходимое для образования 1 мкмоль n-нитрофенола в минуту при концентрации субстрата 1 мМ.

Содержание белка в препаратах определяли по методу Лоури, используя в качестве стандарта ферментный препарат *P. verruculosum* известным содержанием белка (содержание белка составляло 899 мг/г) [1].

Ферментные препараты. Ферментный препарат на основе штамма *P. verruculosum* 221, выращенного по аналогичной схеме культивирования, был получен ранее с помощью лиофильной сушки культуральной жидкости.

Результаты и обсуждение

Было проведено культивирование штамма *P. verruculosum* 221 на питательной среде с добавлением растительного пергамент (обрезки, накапливающиеся при производстве пергамента). Ферментацию проводили в режиме fed-batch, осуществляя дробную подпитку 50 %-ным раствором глюкозы. Длительность культивирования в различных вариантах была разной и зависела от времени достижения культурой максимального уровня синтеза ферментов. В контрольном эксперименте проводили культивирование с использованием МКЦ. На рис. 1 представлены максимальные значения активностей ферментов и содержания внеклеточного белка в КЖ.

При культивировании на пергаменте активности КМЦ-азы, ксиланазы и β -глюкозидазы в этом случае уступали контрольным значениям примерно на 24–27 %. Таким образом, учитывая низкую стоимость, отходы пергаментного производства являются весьма привлекательным субстратом для получения промышленных целлюлаз, так как обеспечивают достаточно высокий (сопоставимый с МКЦ) уровень синтеза целевых ферментов.

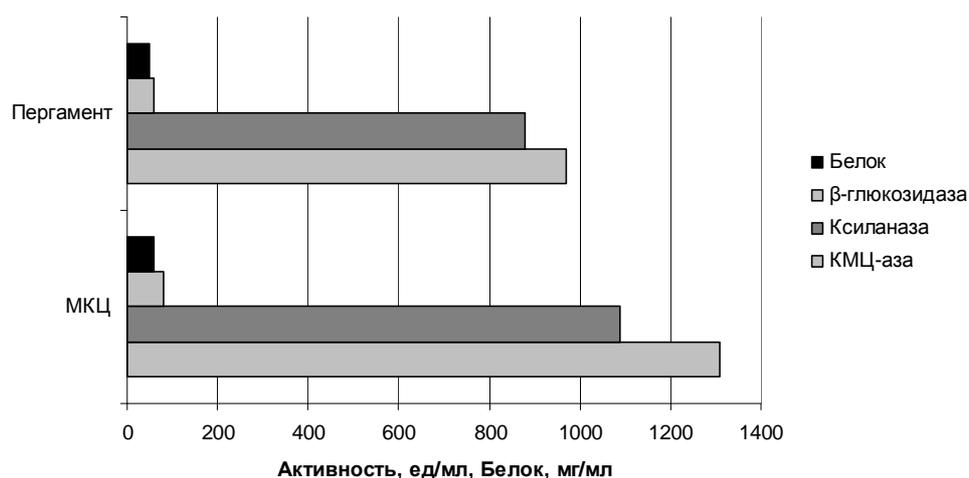


Рисунок 1. Активности ферментов и содержание внеклеточного белка в КЖ, полученной при культивировании штамма *P. verruculosum* 221 в 1-литровых ферментерах в режиме fed-batch на субстратах: микрокристаллической целлюлозе (МКЦ) и пергаменте

Стоит отметить, что при культивировании на пергаменте наблюдалась значительная задержка начального роста культуры (примерно 4–5 суток) (рис. 2), тогда как при культивировании на МКЦ она составляла 1–2 суток. Предположительно она вызвана наличием веществ, входящих в состав пергаamenta и подавляющих начальный рост гриба, а также синтез целлюлолитических ферментов. Одной из причин удлиненной лаг-фазы, вероятно, также может служить и повышенная устойчивость пергаamenta к ферментативному воздействию, обусловленная его надмолекулярной структурой.

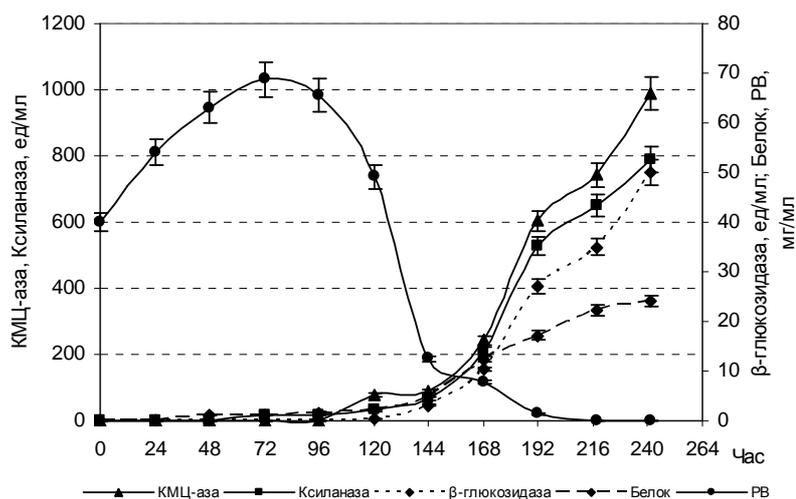


Рисунок 2. Динамика накопления ферментов в КЖ при культивировании штамма *P. verruculosum* 221 в 1-литровых ферментерах на 6 % пергаamenta без предобработки

Таким образом, из-за существенного увеличения продолжительности процесса культивирования получение карбогидраз с использованием пергаamenta, по сравнению с МКЦ, значительно удорожается.

В поисках решения этой проблемы было проведено периодическое культивирование штамма *P. verruculosum* 221 в 1-литровых ферментерах на среде, содержащей 6 % пергаamenta, предварительно предобработанного ферментным препаратом *P. verruculosum* 221 в дозах 1 и 2,5 мг белка ферментного препарата на 1 г пергаamenta (рис. 3 и 4).

Из полученных данных следует, что в результате предобработки пергаamenta ферментным препаратом в количестве 1 мг белка на 1 г субстрата лаг-фаза составила примерно 3 суток (рис. 3). Максимальные активности основных ферментов в КЖ были достигнуты на 120 часов культивирования и составили: КМЦ-аза – 780 ед/мл, ксиланаза – 163, β-глюкозидаза – 33 ед/мл, общее количество внеклеточного белка – 21,4 мг/мл.

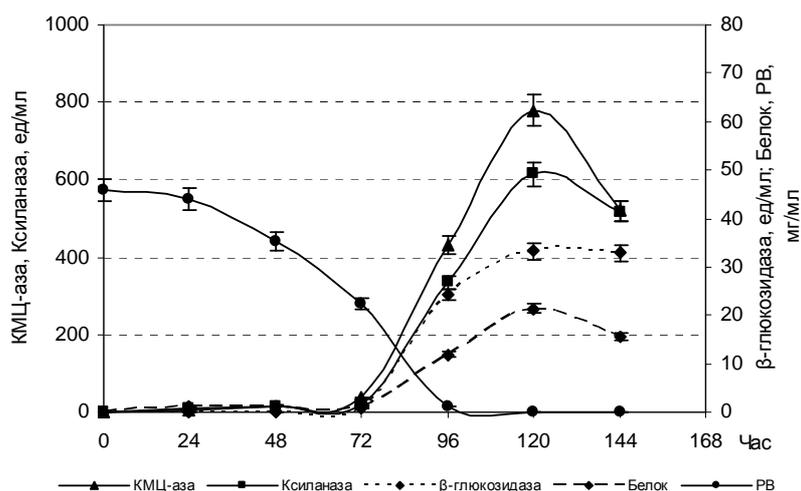


Рисунок 3. Динамика накопления ферментов в КЖ при культивировании штамма *P. verruculosum* 221 в 1-литровых ферментерах с предварительной обработкой пергамента ферментным препаратом 221 (1 мг белка на 1 г субстрата)

При увеличении дозы ферментного препарата до 2,5 мг белка на 1 г субстрата (рис. 4) лаг-фаза составила примерно 2 суток, что примерно на 2 суток короче по сравнению с вариантом без предобработки. Максимальные активности основных ферментов в КЖ были получены также на 120 часов культивирования и составили: КМЦ-аза – 686 ед/мл, ксиланаза – 591 ед/мл, β-глюкозидаза – 31 ед/мл, общее количество внеклеточного белка – 21 мг/мл.

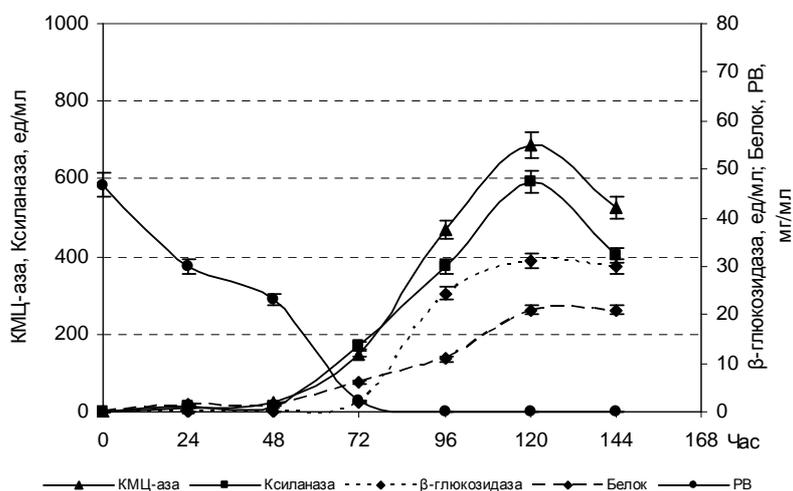


Рисунок 4. Динамика накопления ферментов в КЖ при культивировании штамма *P. verruculosum* 221 в 1-литровых ферментерах с предварительной обработкой пергамента ферментным препаратом 221 (2,5 мг белка на 1 г субстрата)

В целом, максимумы значений активностей 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.

Заключение

В ходе проведения исследования была показана принципиальная возможность использования пергамента в качестве альтернативного МКЦ субстрата карбогидраз без существенного снижения уровня биосинтеза ферментов, продуцируемых грибом *P. verruculosum* 221. Устойчивость пергамента к микробной деструкции обуславливает увеличение продолжительности лаг-фазы и, следовательно, процесса биосинтеза ферментов в целом. Поэтому была разработана технология ферментативной предобработки пергамента, которая позволила значительно сократить лаг-период роста культуры и ускорить процесс культивирования продуцента почти в 2 раза.

Исследование выполнено при поддержке МОН РФ в рамках проекта RFMEFI62114X0002. В работе использовано оборудование и ресурсы ЦКП «Промышленные биотехнологии» ИНБИ РАН.

Список литературы

1. Зайцева, Е.А. Изучение биокатализаторов и возможностей их практического использования в рамках федеральной целевой научно-технической программы России «Исследования и разработки по приоритетным направлениям науки и техники» / Е.А. Зайцева, Т.А. Осипова // Вест. Моск. ун-та, сер. 2, Химия. – 2006. – Т. 47. – № 41. – С. 4-11.
2. Марков, А.В. Влияние тепловой жидкостной предобработки на эффективность биоотварки х/б тканей под действием ферментных препаратов / А.В. Марков, А.В. Гусаков, С.Г. Гришутин, К.Г. Кондратьева // Текстильная химия. – 2003. – № 2. – С. 31.
3. Лапин, В.В. Применение ферментного препарата целлокандин из *Geotrichum candidum* ЗС-106 для роспуска макулатуры и обезвоживания суспензии целлюлозы. [Текст] / В.В. Лапин, Н.А. Родионова, Н.А. Загустина // Прикл. биохим. микробиол. – 2002. – 38. – № 4. – С. 452.
4. Лыков И.Н., Шестакова Г.А., Логинов А.А. Технология микробиологической конверсии отходов пергамента // Приоритетные направления развития науки и техники: тезисы докл. Всероссийской науч.-техн. конф. – Тула, 2008. – С.3-5.
5. Каталог Троицкой бумажной фабрики [Электронный ресурс]. – URL: <http://www.tbf.ru/pergament> (дата обращения: 10.11.2014).

6. Nelson, N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of sugars [Text] / N. Nelson // J. Biol. Chem. – 1944. – V. 153. – P. 375-379.
7. Досон Р. Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. Справочник биохимика. Пер. с англ. / Р. Досон, Д. Эллиот, У. Эллиот, К. Джонс. – М.: Мир, 1991. – 543 с.

Рецензенты:

Попов В.О., д.х.н., профессор, директор института. ФГБУН Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, г. Москва;

Савицкий А.П., д.х.н., профессор. ФГБУН Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, г. Москва.