

СИНТЕЗ ХИТИНАЗ И ДРУГИХ КАРБОГИДРАЗ *TRICHODERMA* НА СРЕДАХ С РАЗЛИЧНЫМИ ИСТОЧНИКАМИ УГЛЕРОДА

Е.А. Виноградова, Т.И. Громовых, Ю.А. Рыбаков

ФГАОУ ВО «Московский политехнический университет», Москва, Россия

Штаммы рода *Trichoderma* востребованы в различных отраслях промышленности за счет широкого спектра вторичных метаболитов и активного полиферментного комплекса, позволяющего проводить биоконверсию сырья и отходов производств, в том числе хитинсодержащие. Целью данного исследования является изучение ферментативных активностей карбогидраз штамма вида *Trichoderma harzianum*.

Объектом исследования был штамм *T. harzianum* F-1786 коллекции БРЦ ВКПМ. Оценку продукции хитиназ проводили при культивировании микроорганизма с использованием жидкой среды, содержащей 2% деминерализованного хитина («Macklin», Китай) в качестве единственного источника углерода и азота и имеющей минеральный состав (г/л): K_2HPO_4 – 1.3; $MgSO_4$ – 0.5; KCl – 0.5; $ZnSO_4$ – 0.01; $FeSO_4$ – 0.01; $CuSO_4$ – 0.005. Продукцию целлюлаз, маннаназ, ксиланаз, карбоксиметилцеллюлаз (КМЦаз) оценивали при культивировании гриба в жидкой среде с добавлением 2% кристаллической целлюлозы («ДиаМ»), маннана (Sigma, США), ксилана (Sigma, США) и карбоксиметилцеллюлозы (Sigma, США) соответственно в качестве единственного источника углерода. Основа среды включала (г/л): $NaNO_3$ – 3; K_2HPO_4 – 1.3; $MgSO_4$ – 0.5; KCl – 0.5; $ZnSO_4$ – 0.01; $FeSO_4$ – 0.01; $CuSO_4$ – 0.005; pH 6.0-6.5. Культивирование проводили в течение 7 суток при 28°C. Ферментативные активности определяли по скорости гидролиза полимеров в суспензиях и растворах 50 мМ натрий-ацетатного буфера (pH 5.5) в течение 30 минут со следующим содержанием полимеров: коллоидный хитин – 1%, ксилан – 0.5%; галактоманнан – 0.5%; КМЦ – 1% [1]. Целлюлолитическую активность определяли по методу Мандельс-Вебера гидролизом полоски фильтровальной бумаги в течение 90 минут [1]. За единицу ферментативной активности, измеренную спектрофотометрически, принимали количество фермента, катализирующее освобождение 1 мкМ редуцирующих сахаров при взаимодействии с 3,5-динитросалициловой кислотой за 1 мин в реакционной смеси на 1 мг белка.

Из рассматриваемых карбогидраз микромицет при культивировании в течение 5 суток в меньшей степени продуцирует хитиназы. Координированная индукция ксиланазы и маннаназы показали большую специфичность по отношению к ксилану и галактоманнану соответственно. Наибольшая продукция и наименьшая специфичность была показана для целлюлаз, в том числе КМЦаз, в особенности по отношению к растворимым субстратам: ксилану, галактоманнану и КМЦ.

Для хитиназ были рассмотрены динамика биосинтеза и изменение активности по отношению к тестируемым субстратам в течение двух суток. Продукция хитиназы увеличилась и показала большую активность по отношению к хитину, что указывает на возможность базальной продукции карбогидраз.

Отдельно была рассмотрена хитинолитическая активность каждой из карбогидраз на 5 и на 7 сутки культивирования. Активность каждой, за исключением целлюлазы, возросла за двое суток. По отношению к хитину наибольшую активность показали КМЦазы и маннаназы. Активность хитиназы оказалась в несколько раз меньше, поэтому при создании ферментного препарата, гидролизующего хитин, необходимо ориентироваться на экспрессию не только хитиназ, но и других карбогидраз.

Как показали результаты, культивирование продуцента на целлюлозе или гемицеллюлозе (ксилан, маннан) сопровождается более высоким уровнем накопления ферментов, гидролизующих хитин, чем рост на среде с хитином, что предполагает эффективное использование сред с целлюлозо-содержащими отходами для получения препаратов хитиназы.

Литература

1. Полыгалина Г.В., Чередниченко В.С., Римарева Л.В. Определение активности ферментов: справочник. Москва: ДеЛи принт, 2003. 372 с.