

- 3, 441-447, 1990.
4. Герхардт Ф. и др. Методы общей бактериологии. 1, М., 1983.
 5. Диксон М., Узбб Э. Ферменты 1, М., 1982.
 6. Дорофеев А.Г., Пивоварова Т.А., Каравайко Г.И. Микробиология, 59, 2, 205-212, 1990.
 7. Резников А.А., Муликовская Е.П., Соколов И.Ю. Методы анализа природных вод. М., 1970.
 8. Lizama H.M., Suzuki I. Appl. Environ. Microbiol., 55, 10, 2588-2591, 1989.
 9. Nikolov L., Valkova-Valchanova M., Mchochev M. J. Biotechnol., 7, 2, 87-94, 1988.

Поступила 9. XII. 1997

Биолог. журн. Армении. 3-4 (50), 1997

УДК 579.66'15+579.66'112+674.038.1

БИОКОНВЕРСИЯ ОБРЕЗКОВ ВИНОГРАДНОЙ ЛОЗЫ В БЕЛОК КУЛЬТУРАМИ *TRICHODERMA REESEI* И ДРОЖЖЕЙ

А.В. ГАСПАРЯН, М.А. КИНОСЯН

Республиканский центр депонирования микробов НАН и
Министерства образования и науки РА. 378510, г. Абовян

Проведен ферментативный гидролиз целлюлозы обрезков виноградной лозы с помощью культур *Trichoderma reesei*. Выявлено, что в полученных ферментативных гидролизатах из сахаров в основном образуются глюкоза, целлобиоза, ксилоза, а также арабиноза, раффиноза, уроновые кислоты, что позволяет использовать эти гидролизаты для выращивания келтозо- и целлобиозоусваивающих дрожжей. Изучена возможность обогащения обрезков винограда микробным белком смешанными культурами *Tr.reesei* и дрожжей в условиях твердофазной ферментации.

Կատարվել է խաղողի վազի ետված ճյուղերի ֆերմենտային հիդրոլիզ *Tr. reesei* կուլտուրաների միջոցով: Բացահայտվել է, որ ստացված ֆերմենտային հիդրոլիզատներում շաքարներից հիմնականում առաջանում են գլյուկոզ, ցելոբիոզ, քսիլոզ, ինչպես նաև արաբինոզ, ռաֆինոզ, ուրոնաթթուներ, որը բոլի է տալիս այլ հիյուրոլիզատները օգտագործել քսիլոզ և ցելոբիոզ յուրացնող շաքարասնկերի աճեցման համար: Ուսումնասիրվել է խաղողի ետված ճյուղերի մանրէային սպիտակուցով հարստացման հնարավորությունը պինդ ֆազային ֆերմենտացիայի պայմաններում *Tr.reesei*-ի և շաքարասնկերի խառը կուլտուրաներով:

The enzymatic hydrolysis of grape branches by cultures of *Tr.reesei* was carried out. In obtained enzymatic hydrolyzates mainly were formed glucose, cellobiose, xylose, as well as arabinose, raffinose, uronic acids, which permitted to use such hydrolyzates for growth of xylose and cellobiose utilizing yeasts. The possibility of enriching the grape branches with microbial protein under conditions of solid-substrate fermentation with mixed cultures of *Tr.reesei* and yeasts has been studied.

Обрезки виноградной лозы - ферментативный гидролиз - *Trichoderma reesei*

Биоконверсия растительных остатков, обогащение их белком и использование в качестве корма для животных представляет большой практический интерес и является перспективным направлением в биотехнологии [3,6,10].

Из сельскохозяйственных целлюлозолигниновых отходов характерными для Армении являются виноградные обрезки, имеющие следующий химический состав, %: целлюлоза - 30-32, лигнин - 14,0, экстрактивные вещества - 15,0 [8]. Эти данные свидетельствуют, что субстрат благоприятен для биоконверсии в белок.

Для обогащения растительного сырья белком разработаны и разрабатываются различные технологии. С этой целью используются микромицеты, особенно культуры *Tr.reesei*, обладающие целлюлазным комплексом и способные гидролизовать полимеры растительных субстратов до мономерных соединений [3,8,11,13]. При ферментативном гидролизе растительного сырья грибом *Tr.reesei* создаются благоприятные условия для выращивания дрожжей как на ферментативных гидролизатах, так и при совместном их выращивании глубинной и твердофазной ферментацией (ТФ) [2,3,6,8].

Целью данной работы явилось получение ферментативных гидролизатов виноградных обрезков с помощью *Tr.reesei* для выращивания ксилито- и целлобиозоусваивающих дрожжей, а также изучение возможности обогащения микробным белком обрезков виноградной лозы смешанными культурами *Tr.reesei* и указанных дрожжей в условиях твердофазной ферментации.

Материал и методика. Объектами исследования служили штаммы культур *Tr.reesei* ИИМИА 10060, 10180 и 10206 - продуценты целлюлолитических ферментов, а также дрожжи рода *Candida* из коллекции культур Республиканского центра депонирования микробов НАН и Министерства образования и науки РА (РЦДМ) с условным обозначением ИИМИА

Для выращивания грибную культуру использовалась среда Чанека - Дюка следующего состава, %: $(NH_4)_2SO_4$ - 0,3; KCl - 0,05; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,05; KH_2PO_4 - 0,1; $FeSO_4$ - 0,001; кукурузный экстракт - 0,5; целлюлоза (предварительно обработанные щелочью измельченные виноградные обрезки) - 1,5 - 2,0; pH 5,0. Культивирование проводилось в конических колбах емкостью 500 мл, содержащих 75 мл среды, на каталиках (200 - 250 об/мин) при 30°. В качестве посевного материала использовались 7-суточные культуры *Tr.reesei*, выращенные на среде с 0,05% 2-диоксиглоукозы. На одну колбу использовался посевной материал с одного косяка.

Источником целлюлаз служил фильтрат культуральной жидкости (КЖ) *Tr.reesei*.

Целлюлолитическая активность определялась общепринятыми методами [1,4,12]. За единицу С_А активности (экзо-целлобиогидролитной или экзо-1,4-β-глюканазной активности) принималось такое количество фермента, которое в принятых условиях (pH 4,7-5,0, 50°, 30 мин фильтровальной бумаги) катализирует образование 1 мкмоль ПВ по глюкозе за 1 мин. За единицу С_А активности (экзо-1,4-β-глюканазной активности) принимается такое количество фермента, которое в принятых условиях (pH 4,7-5,0, 50°, 0,5% Na-KMCl катализирует образование 1 мкмоль ПВ по глюкозе за 1 мин.

В качестве растительного субстрата при ферментативном превращении использовались обрезки виноградной лозы, измельченные в лабораторных условиях.

Редуцирующие вещества (РВ) по глюкозе определялись методом Шомана-Нельсона [14], а также методом хроматографии на бумаге с использованием как качественных, так и количественных методов определения разных сахаров. Количество глюкозы определяется гексозоокислительным методом.

Общий азот определялся методом Кьельдаля [1].

Опыты по протейнизации обрезков винограда в условиях твердофазной ферментации в стационарном слое проводили в конических колбах объемом 200 мл с 2, 5 и 10 г обрезков, увлажненных до 80 % питательной средой следующего состава, %: $(NH_4)_2SO_4$ - 0,3; KH_2PO_4 - 0,12; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ - 0,06; CaCl₂ · 2H₂O - 0,01; NaCl - 0,01; pH 5,2-5,3. Посевной материал дрожжей

готовили на среде того же состава, но с глюкозой (1%) и дрожжевым экстрактом (0,5%). Дрожжи выращивали в колбах на качалках в течение 18 ч до полного расхода глюкозы и вносили в количестве 2 мл на каждую колбу для ТФ. Культуру *Tr.reesei* выращивали в глубоких условиях в течение 3 суток и вносили в количестве 1 мл вместе с дрожжами на каждую колбу. Продолжительность ТФ - 15-20 суток с периодическим перемешиванием.

После ТФ получаемый продукт высушивался, анализировался на содержание белка или сырого протеина. Сырой протеин определялся методом Кьельдаля после ивличения неорганического азота (0,5 М ТХУ).

Результаты и обсуждение. Данные, представленные в табл.1, показывают, что изученные штаммы *Tr.reesei* характеризуются комплексом целлюлаз.

Обработанные штаммы *Tr.reesei* обладают разной целлюлолитической активностью. Согласно литературным данным [5,7,11], биосинтез целлюлаз у микроорганизмов зависит от состава питательной среды и условий культивирования. Так, максимальное образование целлюлаз на разных средах для штаммов грибов родов *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Acremonium*, *Aureobasidium*, *Hemicola*, *Chaetomium*, *Phoma* в среднем составляет: C_1A - 0,5-31 ед/мл, а C_2A - 0,2-50 ед/мл КЖ.

Таблица 1. Биосинтез целлюлаз штаммами *Tr.reesei* в динамике роста

№ штаммов <i>Tr.reesei</i> по ИММНА	Время культивирования, сут			
	7		10	
	целлюлолитическая активность, ед/мл КЖ			
	C_1A	C_2A	C_1A	C_2A
10060	0,5	2,3	0,1	1,0
10180	1,2	3,0	1,6	4,5
10206	2,6	5,5	3,2	7,5

Штамм 10060 на указанной среде продуцирует в основном C_1A фермент, максимальный выход которого составляет 2,3 ед/мл после 7 суток культивирования. Дальнейшее культивирование продуцента приводит к инактивации фермента. Максимальный выход целлюлаз у штаммов 10180 и 10206 отмечается в течение 10 суток культивирования и составляет: C_1A -1,6 и 3,2 ед/мл, а C_2A — 5,5 и 7,5 ед/мл КЖ соответственно.

Максимальная каталитическая активность целлюлаз указанных штаммов проявляется при pH 4,7-5,0 и температуре 50-55°.

Результаты исследования ферментативного гидролиза виноградных обрезков с помощью целлюлаз культур *Tr.reesei* показали, что максимальное накопление РВ в ферментативном гидролизате происходит за 6 ч гидролиза. Продолжение гидролиза до 24 ч приводит к незначительному увеличению РВ (табл.2).

Таблица 2. Образование РВ при ферментативном гидролизе виноградных обрезков целлюлазами *Tr.reesei* [условия: 2г субстрата; 20 мл КЖ (2,5 ед/мл C_1A и 7,0 ед/мл C_2A); 50°; качалка 150 об/мин]

Время гидролиза, ч	Общее количество РВ, мг/мл
Исходное	8,0
2	29,1
4	50,4
6	60,6

Ферментативный гидролиз виноградных обрезков целлюлазами *Tr.reesei* обуславливает накопление в ферментативном гидролизате РВ в количестве 68,2 мг/мл, т.е. в концентрации более 30% по сухому весу, из которого на долю глюкозы приходится 37,5 мг/мл.

Содержание РВ в ферментативных гидролизатах виноградных обрезков представлено в табл.3.

Таблица 3. Характеристика ферментативных гидролизатов обрезков виноградной лозы

РВ, %					
глюкоза	целлобиоза	ксилоза	арабиноза	раффиноза	уроновые кислоты
55,4	22,5	8	7	5,1	2,0

Методом хроматографии на бумаге выявлено, что в ферментативных гидролизатах виноградных обрезков из РВ образуются глюкоза, целлобиоза, ксилоза, а также арабиноза, раффиноза, уроновые кислоты, что создает благоприятную среду для выращивания ксилосо- и целлобиозоусваивающих дрожжей с целью получения кормового белка. Ферментативные гидролизаты можно использовать как источник углерода в питательной среде, а также как отдельную среду, так как в них содержится источник азота.

Обогащение микробным белком виноградных обрезков культурами дрожжей и *Tr.reesei* в условиях ТФ выявило, что в получаемом продукте происходит увеличение сырого протеина в 2-3 раза, по сравнению с исходным субстратом (табл.4).

Таблица 4. Увеличение количества общего азота и сырого протеина в стационарном слое виноградных обрезков после роста *Tr.reesei* и дрожжей *Candida* в условиях ТФ (условия: 30°; 20 суток; периодическое перемешивание)

Субстрат, количество, %	Сырой протеин, %	Общий азот, %
Контроль (обрезки)	10,6	1,7
2	35,25	5,64
5	30,31	4,85
10	20,25	3,24

Таким образом, обогащенные микробным белком виноградные обрезки могут быть использованы в качестве кормового продукта в животноводстве.

ЛИТЕРАТУРА

1. Великая Е.И., Суходол В.Ф. Лабораторный практикум по курсу общей технологии бродильных производств. 310, М., 1983.

2. Макарова Е.Н., Пожитнева Е.Н., Гаспарян А.В. Тез. докл. III науч. семинара "Превращения древесины при энзиматическом, микробиологическом воздействиях". Рига, 1988.
3. Проблемы биоконверсии растительного сырья (под ред. Скрябина Г.К. и др.). 296, М., 1986.
4. Гухлядсва А.П., Полюгина Г.В. Методы определения активности гидролитических ферментов. 287, М., 1981.
5. Соловьёва И.В., Окунев О.Н., Крюкова Е.Г., Попова Н.Н., Сеницин А.П., Черноглазов В.М. Прикл. биохим. и микроб., 33, 4, 388-392, 1997.
6. Трансформация продуктов фотосинтеза (под ред. Бекера М.Е.). Рига, 1984.
7. Туземисова К.А., Амирханова Л.М., Усланов А.К., Бекмаханова Н.Е. Тез. докл. III Всесоюз. конф. "Биосинтез ферментов микроорганизмами", 144, Пушкино, 1986.
8. Целлюлолитические ферменты: реальные возможности и перспективы их применения. ВНИИ СЭПТИ, обзор. инф., 5, 2, 1983.
9. Чхартушвили Д.А. Автореф. канд. дисс., 22, Тбилиси, 1986.
10. Biomass conversion technology: principles and practice (Ed. Moo-Young M.). 211, New-York, Pergamon Press, 1987.
11. Doppelbauer R., Esterbauer H., Steiner W., Lafferty R., Steinmuller H. Appl. Microbiol. Biotechnol., 26, 5, 485-494, 1987.
12. Mandels M., Hontz L., Nyström J. Biotechnol. Bioeng., 16, 11, 1471-1493, 1974.
13. Ropars M., Marchal R., Pourquie J., Vandecasteele J. P. Bioresour. Technol., 42, 3, 197-204, 1992.
14. Somogyi M. J. Biol. Chem., 195, 1, 19-22, 1952.

Получено 10.IX.1997