

УДК 636.085.1

**ОПТИМИЗАЦИЯ ПРОЦЕССА КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ШТАММА
PENICILLIUM VERRUCULOSUM EX13 – ПРОДУЦЕНТА ФЕРМЕНТОВ
ДЛЯ КОРМОВЫХ ДОБАВОК**

**Сатрутдинов А.Д., канд. биол. наук, Шашков И.А.,
Кондратьева Е.Г., канд. физ.-мат. наук, Рожкова А.М., канд. хим. наук,
Зоров И.Н., канд. хим. наук, Сеницын А.П., д-р хим. наук**

*Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии» РАН (Москва)*

Реферат. Приведены результаты влияния состава питательной среды и условий ферментации на продуктивность процессов биосинтеза ферментов для кормовых добавок.

Ключевые слова: кормовые ферментные препараты, ксиланаза, карбоксиметилцеллюлаза, *Penicillium verruculosum*, оптимизация

Summary. The results of influence of fermentation media composition and conditions on the productivity of the biosynthesis of enzymes for feed additives are presented.

Key words: feed enzyme preparations, xylanase, carboxymethylcellulase, *Penicillium verruculosum*, optimization

Введение. Корма для животных и птицы составляют основную долю затрат современных сельскохозяйственных предприятий. Для эффективного животноводства и птицеводства необходимы мероприятия по оптимизации затрат на комбикорма при одновременном повышении продуктивности животных и птицы. Современные комбикорма имеют достаточно сложный состав, и представляют сбалансированную смесь углеводов (крахмал и простые сахара), белков, обогащенных незаменимыми аминокислотами (особенно лизина и метионина), жиров и минеральных солей. Содержание каждого компонента комбикорма подбирается в зависимости от назначения и возраста животных и птицы, с учетом доступности, показателей качества и стоимости тех или иных компонентов.

Зерновые, являющиеся основой большинства комбикормов, содержат некрахмальные полисахариды (НПС), которые являются антипитательным фактором и затрудняют процесс переваривания комбикорма. Характерными НПС злаков являются β -глюканы и ксиланы. В процессе набухания и переваривания комбикорма β -глюканы и ксиланы не гидролизуются в желудочно-кишечном тракте, но образуют вязкие растворы, что является основным источником проблем при скармливании комбикормов на основе пшеницы, ржи и ячменя. Особенно эта проблема актуальна в птицеводстве, при выращивании кур-бройлеров и индюшки, поскольку птица потребляет мало жидкости. Негативным фактором является то, что НПС, в первую очередь ксиланы, сорбируют на себя значительную часть питательных и минеральных веществ и жидкости, которые в неизменном виде выводятся из организма животных, что приводит к перерасходу кормов и снижению показателей продуктивности у сельскохозяйственных животных и птицы. Таким образом, очевидна необходимость разрушения НПС для увеличения эффективности применения кормовых рационов на основе злаков. Важным инструментом, позволяющим увеличивать питательную ценность кормов за счёт разрушения НПС, являются кормовые ферменты или ферментные препараты (ФП), обладающие НПС-литической активностью, в первую очередь, за счёт наличия в них в разном соотношении карбогидраз с целлюлазной, β -

глюканазной и ксиланазной видами активности [1]. Использование кормовых ФП в рационах сельскохозяйственных животных и птицы является неременным условием современного высокопродуктивного животноводства и птицеводства.

При получении ФП наиболее затратной стадией является процесс их биосинтеза (культивирование микроорганизмов – продуцентов кормовых ферментов). К важным технологическим характеристикам продуцентов ферментов следует отнести их отношение к источникам питания (различным компонентам питательной среды), требования к интенсивности аэрации, значениям рН и температуры среды культивирования, устойчивость к инфекциям и другим внешним факторам. Стабильность уровня биосинтеза ферментов, как правило, выше у микроорганизмов, способных функционировать в широком диапазоне изменений перечисленных выше факторов.

В данной работе исследовано влияние состава питательной среды и рН на продуктивность процесса биосинтеза кормовых ферментов – целлюлазы (эндо-β1,4-глюканазы) и ксиланазы грибом *Penicillium verruculosum*.

Объекты и методы исследования. В работе был использован высокопродуктивный рекомбинантный штамм *P.verruculosum* EX13, получение которого приведено в работах [2,3].

Исходный состав ферментационной среды в (г/л): глюкоза кристаллическая – 40; микрокристаллическая целлюлоза (МКЦ) – 60; пшеничные отруби – 10; дрожжевой экстракт – 10; (NH₄)₂SO₄ – 10; KH₂PO₄ – 14; MgSO₄ • 7H₂O – 0,6; CaCl₂ • 7H₂O – 0,6 [4].

Условия культивирования: температура – 32 °С, рН 4,75±0,25; рО₂ 30 %, продолжительность процесса – 144 часа. Ферментации проводили в ферментёрах КФ-103 (Проинтех, Россия).

Подпитки: внесение 50 % раствора глюкозы в количестве 30 г на 1 литр ферментационной среды – 1 раз в сутки (всего 4 раза); МКЦ в количестве 3 г на 1 литр ферментационной среды 1 раз в сутки (всего 3 раза).

Для определения активности эндо-глюканазы использовали Na-соль карбоксиметилцеллюлозы (КМЦ), ксиланазы – ксилан берёзы. Определение активностей по отношению к этим субстратам проводили по начальным скоростям образования восстанавливающих сахаров (ВС), используя модифицированный метод Шомоди-Нельсона [5]. За единицу активности принимали такое количество фермента, которое приводило к образованию 1 мкмоль ВС в мин при концентрации субстрата в реакционной смеси 5 г/л (50 °С., рН 5,0).

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП «Промышленные биотехнологии» ФИЦ Биотехнологии РАН.

Обсуждение результатов. Наиболее дорогостоящим субстратом в составе питательной среды (см. выше) является дрожжевой экстракт, потому на первом этапе было исследовано влияние уменьшения его концентрации на эффективность процесса ферментации (рис.1). В качестве критерия эффективности процесса была выбрана суммарная продуктивность по КМЦазе и ксиланазе в супернатанте, равная произведению активности ферментов в мл среды и объема фугата культуральной жидкости из ферментера. Этот показатель указан на всех графиках по вертикальной шкале. Очевидно, что уменьшение содержания дрожжевого экстракта в питательной среде в 10 раз лишь незначительно снижает продуктивность процесса ферментации (на 15 % для КМЦазы и на 14,5 % для ксиланазы).

На следующем этапе исследований вместо кристаллической глюкозы была использована глюкозная патока (с содержанием глюкозы 64,5 %), а дрожжевой экстракт был заменён кукурузным экстрактом (КУК), с содержанием сухих веществ 50 % и соевая мука.

Содержание патоки и КУК были рассчитаны таким образом, чтобы их количество (по содержанию сухих веществ) соответствовало таковым соответственно в кристаллической глюкозе и дрожжевом экстракте.

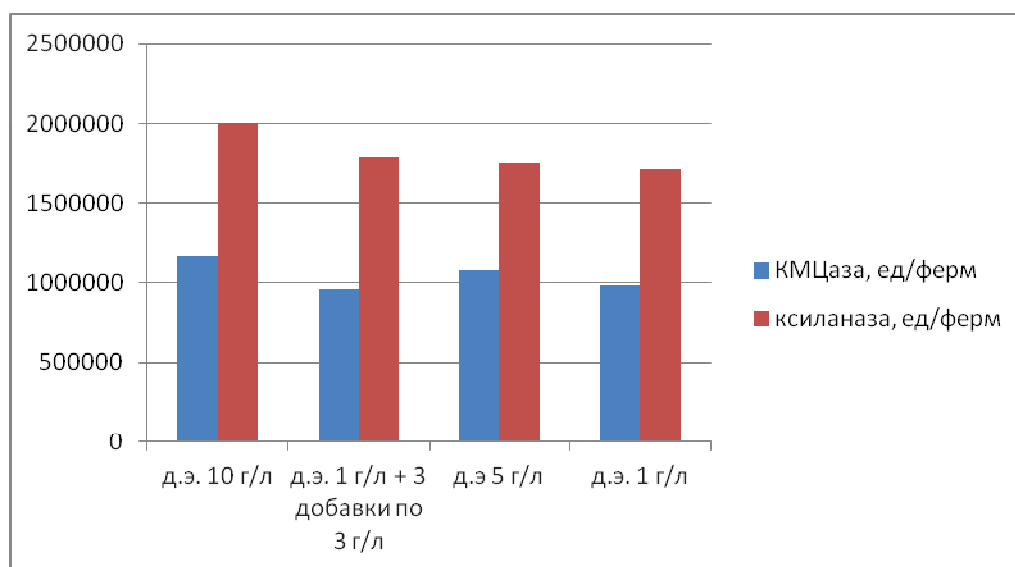


Рис. 1. Влияние различных концентраций дрожжевого экстракта (д.э.) и способов его внесения на продуктивность биосинтеза эндо-глюканазы и ксиланазы штаммом *P.verruculosum* EX13

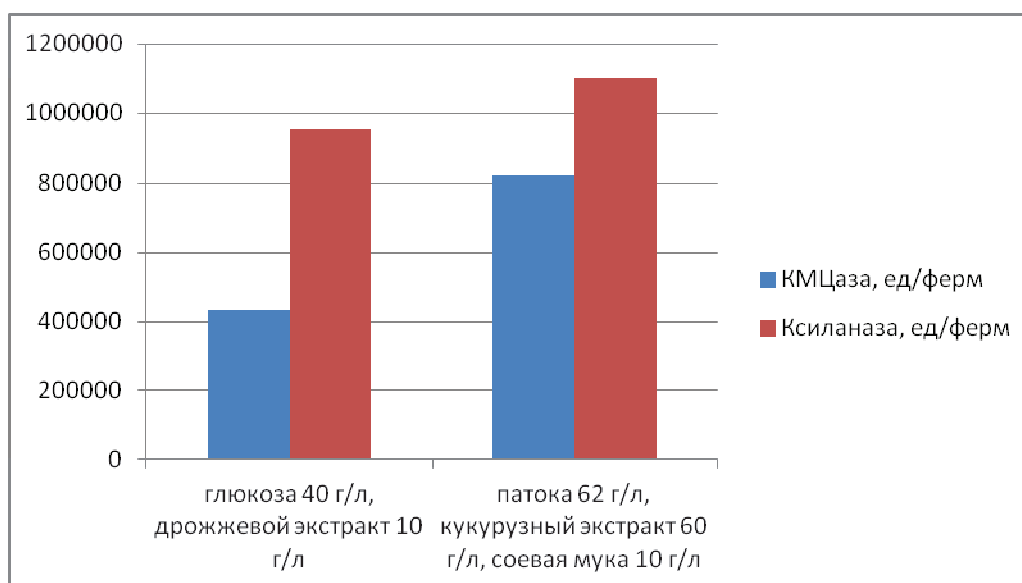


Рис. 2. Сравнение продуктивности процесса биосинтеза эндо-глюканазы и ксиланазы штаммом *P.verruculosum* EX13 с использованием глюкозной патоки, кукурузного экстракта и соевой муки

Использование новых субстратов благотворно сказалась на процессе биосинтеза (рис. 2): продуктивность по ксиланазе возросла на 14,7 %, а по KMЦазе на 90 %.

Было исследовано влияние на эффективность процесса ферментации концентрации КУК и возможность использования соевой муки и КУК в разных сочетаниях. Как видно из рис. 3, использование КУК в концентрации 60 г/л и совместное использование соевой муки (10 г/л) и КУК (30 г/л) приводило к наибольшим значениям продуктивности процесса

по КМЦазе и ксиланазе, при этом снижение концентрации КУК с 30 до 15 г/л приводило лишь к незначительному уменьшению продуктивности.

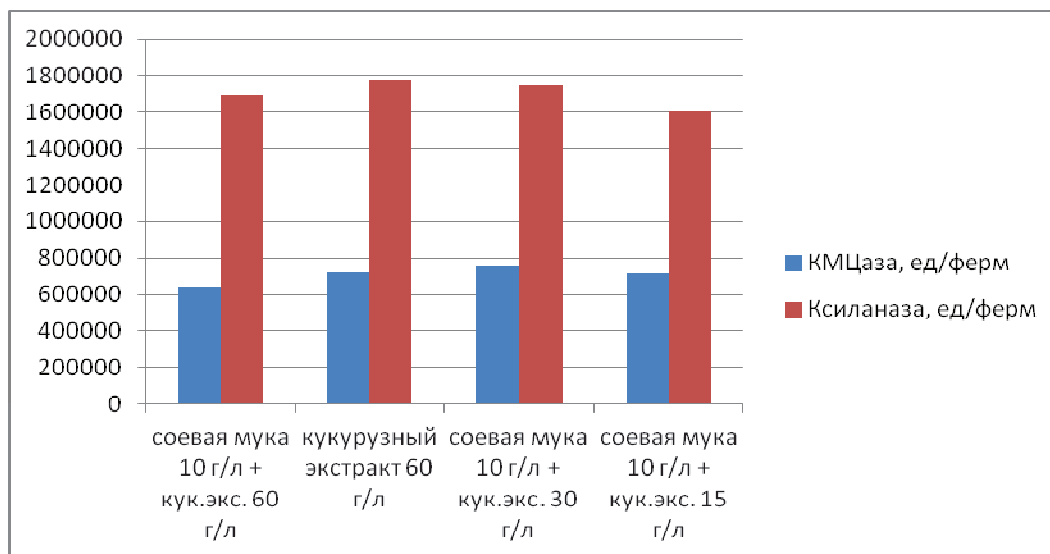


Рис. 3. Влияние изменения концентрации кукурузного экстракта, а также наличия соевой муки на продуктивность процесса культивирования штамма *P.verruculosum* EX13

Далее исследовали возможность частичной или полной замены соевой муки на мочевину при культивировании штамма *P.verruculosum* EX13. Была установлена возможность исключить из состава питательной среды соевую муку с заменой её на мочевину.

Известно, что МКЦ, входящая в состав питательной среды *P.verruculosum* EX13, является достаточно дорогостоящим субстратом. Поэтому была исследована возможность уменьшения концентрации МКЦ в исходной питательной среде и снижения расхода МКЦ в подпитках, осуществляемых в ходе ферментаций.

Установлено, что снизить общий расход МКЦ можно или за счёт снижения концентрации МКЦ в исходной питательной среде (без изменения расхода в подпитках), или отказаться от подпиток без снижения концентрации МКЦ в исходной питательной среде.

Выводы. Установлено, что при культивировании штамма *P.verruculosum* EX13 в исходной ферментационной среде кристаллическую глюкозу можно заменить на глюкозную патоку, а дрожжевой экстракт на кукурузный экстракт и мочевину, при этом возможно снизить концентрацию МКЦ в стартовой среде с 60 г/л до 30 г/л, сохранив интенсивность подпитки МКЦ в процессе ферментации.

Литература

1. Bauer S., Development and application of a suite of polysaccharide-degrading enzymes for analyzing plant cell walls. Proc Natl Acad Sci USA. 2006; 103(30):11417-11422.
2. Получение и свойства мутантов *Penicillium verruculosum* – суперпродуцентов целлюлаз и ксиланаз/ И.В. Соловьева [и др]// Микробиология. – 2005. – Т.74. – С.1-7.
3. Получение высокоэффективных ферментных комплексов целлюлаз и гемицеллюлаз для гидролиза растительного сырья на основе штамма *Penicillium verruculosum*/ А.П. Сеницын [и др]// Биотехнология. – 2013. – №5. – С.50-53.
4. Немашкалов В.А. Биосинтез карбогидраз гриба *Penicillium verruculosum* при культивировании на различных целлюлозосодержащих субстратах. Диссертация на соискание ученой степени канд. биол. наук, Пушкино, ИБФМ, 2012. – 19 с.
5. Методы изучения и свойства целлюлитических ферментов/ А.П. Сеницын [и др]. – М.:ВИНИТИ, 1990. – 290 с.