

© О. В. Чемерис

**МАСШТАБИРОВАНИЕ ПРОЦЕССА ГЛУБИННОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ
ГРИБА *IRPEX LACTEUS* (FR.) FR. – ПРОДУЦЕНТА ЦЕЛЛЮЛОЗОЛИТИЧЕСКИХ
ФЕРМЕНТОВ***ФГБОУ ВО «Донецкий государственный университет»
Россия, 283050, ДНР, г. Донецк, ул. Щорса, 46*

Чемерис О. В. Масштабирование процесса глубинного культивирования гриба *Irpex lacteus* (Fr.) Fr. – продуцента целлюлозолитических ферментов. – При масштабировании процесса глубинного культивирования штамма гриба *Irpex lacteus* (Fr.) Fr. 2434 – продуцента экзоферментов целлюлазного комплекса на питательной среде, содержащей отходы переработки кукурузы, установлена воспроизводимость результатов, полученных в малых объемах питательной среды, только на начальных этапах культивирования. Высокая активность целлюлозолитических ферментов штамма-продуцента наблюдалась с 3-х по 10-е сутки культивирования. Снижение ферментативной активности культуральной жидкости установлено на 15-е сутки культивирования.

Ключевые слова: масштабирование, глубинное культивирование, комплекс целлюлозолитических ферментов, *Irpex lacteus* (Fr.) Fr.

Введение

Возобновляемая растительная биомасса, к которой относятся целлюлозосодержащие отходы – отходы сельского хозяйства, отходы переработки зерновых культур, биомасса быстрорастущих и энергетических растений, обладает высоким биотехнологическим потенциалом [6, 8, 14]. Особое внимание уделяется возможностям применения растительного сырья в энергетике и промышленной биотехнологии для производства биотоплива [2, 8, 14, 15], в пищевой промышленности для создания обогащенных биологически ценными веществами ингредиентов и продуктов [5], в микробиологической промышленности для получения кормовых дрожжей, растительно-углеводных или растительно-белковых кормов [4, 11]. Однако развитие малоотходных технологий переработки растительного сырья ограничено высокой прочностью его лигноцеллюлозной структуры [1, 21].

Наряду с традиционным кислотным гидролизом целлюлозы активно разрабатываются и ферментативные способы деструкции растительных отходов, позволяющие получить ценные продукты, которые в дальнейшем могут быть использованы в различных отраслях промышленности. Для реализации энзиматического гидролиза необходимым является наличие комплексных ферментных препаратов целлюлаз, продуцентами которых являются микроскопические грибы *Trichoderma* [22, 24], *Penicillium* [23], а также обладающие необходимым для деструкции целлюлозы полным набором ферментов базидиальные грибы, принадлежащие к родам *Irpex*, *Pleurotus*, *Daedaleopsis* и др. [7, 16, 17]. Поэтому разработка эффективных технологий получения ферментных препаратов является актуальной и требует определения закономерностей биосинтетических процессов в условиях масштабного перехода от лабораторных исследований к производственным условиям.

Цель работы – исследовать особенности масштабирования процесса глубинного культивирования штамма базидиального гриба *Irpex lacteus* (Fr.) Fr. 2434 – продуцента ферментов целлюлозолитического действия.

Материал и методы исследования

Объектом исследования выступал штамм базидиального гриба *I. lacteus* 2434. Культивирование штамма-продуцента осуществляли в течение 15-ти суток при температуре 30 ± 2 °С в колбах Эрленмейера объемом 100 мл с 50 мл питательной среды и в лабораторном ферментере объемом 2 л с 1 000 мл питательной среды. Лигноцеллюлозный субстрат – листья початков кукурузы предварительно измельчали (фракция частиц составляли не более 3 мм) и вносили в количестве 2 %, в качестве жидкой фазы использовали солевой раствор среды Чапека [9, 17]. В качестве инокулюма использовали мицелиальную суспензию штамма-продуцента, внося 10 % от объема питательной среды [3]. Мицелиальную суспензию штамма *I. lacteus* 2434 получали при глубинном культивировании на питательной среде Чапека, содержащей 2 % Na-карбоксиметилцеллюлозы в качестве индуктора ферментов целлюлазного комплекса.

Активность ферментов целлюлазного комплекса культуральной жидкости штамма-продуцента *I. lacteus* 2434 определяли относительно следующих субстратов: фильтровальной бумаги (ФБ-активность), Na-карбоксиметилцеллюлозы (эндоглюканазная активность) и целлобиозы (целлобиазная активность) в соответствии с общепринятыми методиками [12, 13, 19]. За единицу целлюлозолитической активности (Ед.) принимали такое количество фермента, которое образовывало 1 μmol редуцирующих сахаров в течение 1 мин в условиях опыта ($t=+40$ ° С, рН 5,0). Удельную активность (Ед./мг) определяли отношением общей активности культуральной жидкости (Ед./мл) к содержанию белка в культуральной жидкости (мг/мл). Концентрацию редуцирующих сахаров в перерасчете на глюкозу определяли методом Шомодьи-Нельсона [9, 12, 20], глюкозу определяли глюкозооксидазно-пероксидазным методом с использованием наборов реагентов для определения содержания глюкозы в биологических жидкостях («Глюкоза – Агат», ООО «Агат-Мед», Россия). Содержание белка определяли по методу Бредфорда [18]. Статистическую обработку полученных экспериментальных данных осуществляли методом дисперсионного анализа, а сравнение средних арифметических величин – методом Дункана [10].

Результаты и обсуждение

Целлюлозолитическая активность штамма *I. lacteus* 2434 по отношению к фильтровальной бумаге была выявлена уже на 3-и сутки культивирования (рис. 1) независимо от объема питательной среды.

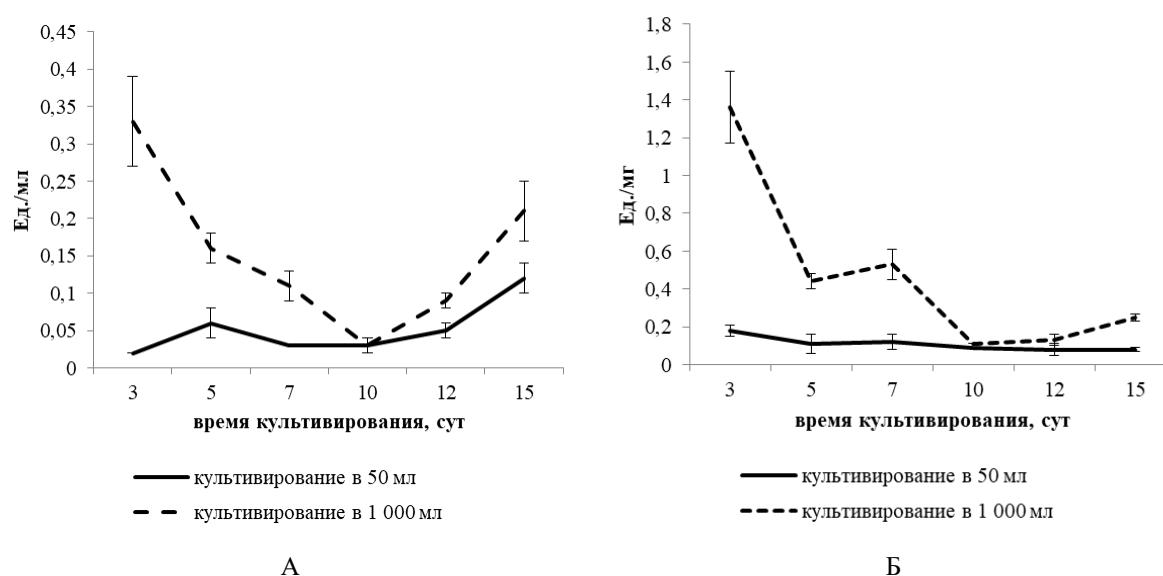


Рис. 1. ФБ-активность культуральной жидкости штамма *Irpex lacteus* (Fr.) Fr. 2434 при культивировании на питательной среде с листьями початков кукурузы: А – общая активность, Б – удельная активность

Однако наибольшая ферментативная активность культуральной жидкости наблюдалась при культивировании продуцента в 1 000 мл питательной среды. При этом отмечены два максимальных пика ФБ-активности культуральной жидкости – на 3 и на 15-е сутки культивирования, с минимальными значениями на 10-е. При культивировании штамма продуцента на питательной среде с лигноцеллюлозным субстратом в объеме питательной среды 50 мл ферментативная активность составляла $\sim 0,05$ Ед./мл с максимумом на 15-е сутки (рис. 1А).

Удельная ФБ-активность штамма *I. lacteus* 2434 в 50 мл питательной среды оставалась примерно на одном уровне в течение всего периода культивирования. Максимум ферментативной активности отмечен на 3-и сутки культивирования продуцента в большем объеме питательной среды

Установлены различия в проявлении эндоглюканазной активности культуральной жидкости штамма *I. lacteus* 2434 (рис. 2). Так, при культивировании штамма-продуцента в малом объеме питательной среды, содержащей отходы переработки кукурузы, максимальные значения эндоглюканазы отмечены на 5-е сутки с последующим снижением к 15-м суткам. При больших объемах питательной среды выявлены два максимальных значения ферментативной активности на 5-е и 12 сутки культивирования (рис. 2А).

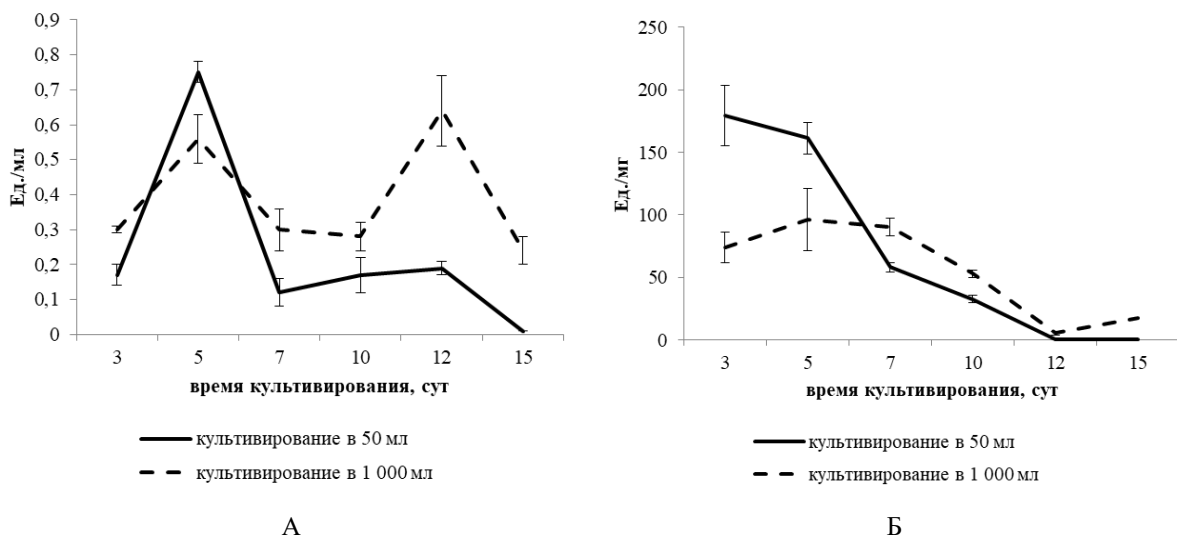


Рис. 2. Эндоглюканазная активность культуральной жидкости штамма *Irpex lacteus* (Fr.) Fr. 2434 при культивировании на питательной среде с листьями початков кукурузы:

А – общая активность, Б – удельная активность

Характер проявления удельной эндоглюканазной активности штамма *I. lacteus* 2434 при культивировании в малом и большом объемах питательной среды совпадал. Максимальные значения активности фермента выявлены на начальных этапах культивирования с дальнейшим снижением к 15-м суткам (рис. 2Б).

Высокая целлюбиазная активность культуральной жидкости штамма *I. lacteus* 2434 отмечена на 5-е сутки культивирования в малом объеме питательной среды (рис. 3А). К 15-м суткам культивирования ферментативная активность культуральной жидкости значительно снижалась. При культивировании штамма-продуцента в 1 000 мл питательной среды активность целлюбиазы была достаточно стабильной с 3-х по 12-е сутки культивирования, однако к 15-м суткам снижалась более чем в два раза.

Удельная целлюбиазная активность культуральной жидкости штамма *I. lacteus* 2434 при культивировании в малом объеме питательной среды была ниже, чем при культивировании в большем объеме (рис. 3Б). Однако к 15-м суткам культивирования ферментативная активность культуральной жидкости значительно снижалась, что может указывать на истощение питательной среды и недостаточное ее количество для поддержания метаболических процессов продуцента.

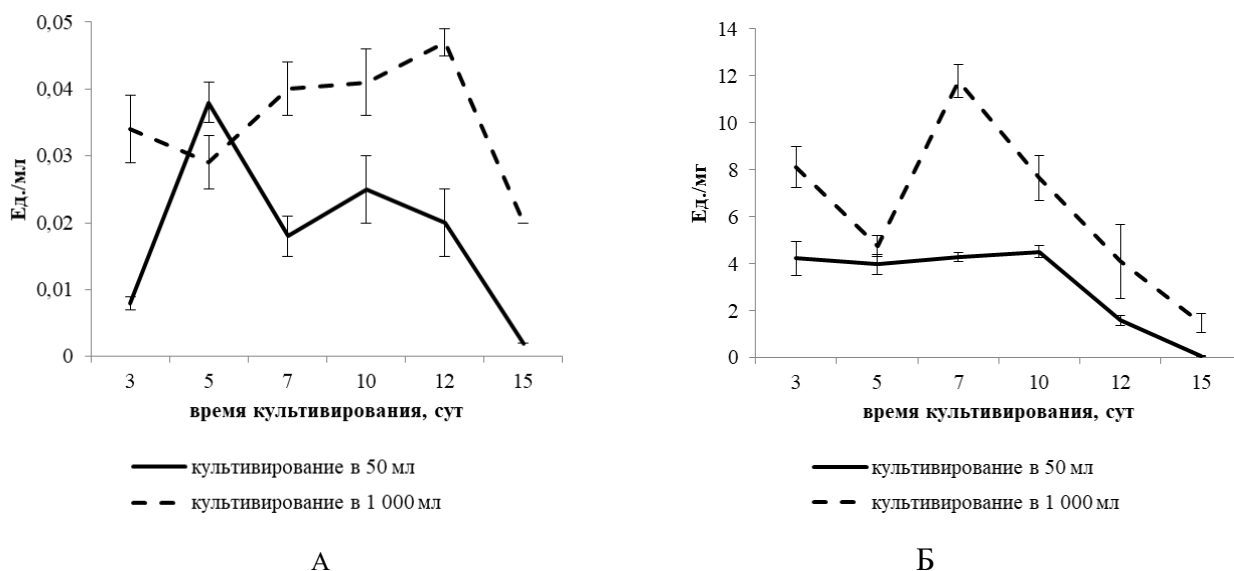


Рис. 3. Целлюбиазная активность культуральной жидкости штамма *Irpex lacteus* (Fr.) Fr. 2434 при культивировании на питательной среде с листьями початков кукурузы:

А – общая активность, Б – удельная активность

Выводы

Масштабирование процесса культивирования штамма *I. lacteus* 2434 – продуцента внеклеточных ферментов целлюлозолитического действия показало воспроизводимость результатов, полученных в малых объемах питательной среды, только на начальных этапах культивирования. Высокая ферментативная активность целлюлаз установлена с 3-х по 10-е сутки культивирования, что необходимо учитывать при разработке технологии получения ферментного препарата.

Исследование проведено в рамках выполнения государственного задания по теме «Биологические способы переработки растительных отходов агропромышленного комплекса» (№ госрегистрации 124012400346-5).

Список литературы

1. Алешина Л. А., Глазкова Л. А., Луговская С. В., Подойникова М. В., Фофанов А. Д., Силина Е. В. Современное представление о строении целлюлоз // Химия растительного сырья. 2001. № 1. С. 5–36. EDN: HWILFL.
2. Байбакова О. В. Плодовые оболочки овса в качестве сырья для получения биоэтанола при масштабировании процесса по объему // Фундаментальные исследования. 2015. № 9–2. С. 215–218. EDN: UILBPT.
3. Бисько Н., Мустафин К., Сулейменова Ж., Ахметсадыков Н., Нармуратова Ж. Разработка методики получения физиологически активного инокулюма и изучение кинетических параметров синтеза грибной биомассы и биологически активных веществ // European journal of biomedical and life sciences. 2016. № 3. С. 4–10.
4. Валеева Р. Т., Красильникова О. В., Шурбина М. Ю., Нуретдинова Э. И. Солома – отход агропромышленного комплекса как перспективное сырье для получения кормовых и белковых препаратов // Вестник Технологического университета. 2016. Т. 19. № 6. С. 137–140.
5. Волкова Г. С., Соколова Е. Н., Ионов В. В., Давыдкина В. Е., Фурсова Н. А., Серба Е. М. Эффективность применения комплекса ферментов для переработки жмыха брусники обыкновенной в пищевой ингредиент // Химия растительного сырья. 2024. № 1. С. 310–319. DOI 10.14258/jcrpm.20240112766. EDN: XSYLQF.
6. Джахонгирова Г. З., Акбарова Н. А., Агзамова Н. А. Исследование растительных отходов в качестве источников энергии // Universum: технические науки. 2018. № 8(53). С. 37–40. EDN: XWXGLZ.

7. Древаль К. Г., Бойко М. І. Нові продуценти целюлозолітичних ензимів целюлозолітичних ензимів серед вищих базидіальних грибів серед вищих базидіальних грибів // Біотехнологія. 2011. Т. 4, № 1. С. 87–92. EDN: PXQPBVJ.
8. Калашиникова О. Б., Буденкова Е. А., Ульрих Е. В., Чупахин Е. Г., Кригер О. В., Масютин Я. А., Смага М. А., Басова Ю. С. Изучение процесса ферментативного гидролиза предобработанной биомассы мискантуса // Техника и технология пищевых производств. 2022. Т. 52, № 2. С. 254–270. DOI 10.21603/2074-9414-2022-2-2361. EDN: PUHOFM.
9. Методы экспериментальной микологии: справочник / И. А. Дудка, С. П. Вассер, И. А. Элланская и др.: [отв. ред. В. И. Билай]. К.: Наук. думка, 1982. 552 с.
10. Приседський Ю. Г. Статистична обробка результатів біологічних експериментів: навч. посібник / Ю. Г. Приседський. Донецьк : Кассиопея, 1999. 210 с.
11. Ромалийский В. С. Приготовление углеводно-белковых кормов посредством биоферментации вторичных растительных отходов АПК // Инновации в сельском хозяйстве. 2016. № 4(19). С. 208–217. EDN: WHAOMJ.
12. Синицын А. П. Биоконверсия лигноцеллюлозных материалов: Уч. пособие. М.: Изд-во МГУ, 1995. 224 с.
13. Синицын А. П., Черноглазов В. М., Гусаков А. В. Методы изучения и свойства целлюлозолитических ферментов // Итоги науки и техники. Сер. Биотехнология. 1993. Т. 25. 152 с.
14. Скиба Е. А., Будаева В. В., Павлов И. Н., Макарова Е. И., Золотухин В. Н., Сакович Г. В. Получение ферментативных гидролизатов технических целлюлоз мискантуса и их спиртовое брожение // Биотехнология, 2012, № 6, С. 42–52. EDN: NVSCMT.
15. Сушкова В. И. Анализ технологических схем получения этанола и его сопродуктов из лигноцеллюлозосодержащего сырья (Обзор) // Химия растительного сырья. 2025. № 2. С. 5–27. <https://doi.org/10.14258/jcprgm.20250215474>. EDN: ZGYVZC.
16. Фоменко И. А., Тучкова С. Н. Утилизация целлюлозосодержащих отходов при помощи грибов // Новые технологии. 2021. Т. 17, № 5. С. 123–133. DOI 10.47370/2072-0920-2021-17-5-123-133. EDN: VGUTCY.
17. Чемерис О. В. Оптимизация условий культивирования штамма *Irpex lacteus* 2434 – перспективного продуцента внеклеточных целлюлаз // Проблеми екології та охорони природи техногенного регіону. 2023. № 4. С. 64–68. EDN: ZGQHIW.
18. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M. M. Bradford // Anal. Biochem. 1976. Vol. 72. P. 248–254.
19. Ghose T. K. Measurement of cellulase activity / T. K. Ghose // Pure Appl. Chem. 1987. V. 59, No 2. P. 257–268.
20. Nelson N. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of sugars / N. Nelson // J. Biol. Chem. 1944. V. 153, N 2. P. 375–379.
21. Parthasarathi R., Bellesia G., Chundawat S. P., Dale B. E., Langan P., Gnanakaran S. Insights into hydrogen bonding and stacking interactions in cellulose // J Phys Chem A. 2011. Dec 15. 115 (49). P. 14191–202. DOI: 10.1021/jp203620x.
22. Qian Y., Zhong L., Sun Y., Sun N., Zhang L., Liu W., Qu Y., Zhong Y. Enhancement of Cellulase Production in *Trichoderma reesei* via Disruption of Multiple Protease Genes Identified by Comparative Secretomics // Front. Microbiol. 2019. Vol. 10: 2784. P. 1–12. DOI: 10.3389/fmicb.2019.02784.
23. Rao M., Mishra C. Properties and applications of *Penicillium funiculosum* cellulase immobilized on a soluble polymer // Biotechnol Lett. 1984. Vol. 6, 319–322. <https://doi.org/10.1007/BF00129062>.
24. Sternberg D. Production of cellulase by *Trichoderma* // Biotechnol Bioeng Symp. 1976. Vol. 6. P. 35–53.

Поступила в редакцію 15.09.2025 г.

Chemeris O. V. Scaling up the process of deep cultivation of the fungus *Irpex lacteus* (Fr.) Fr., a producer of cellulolytic enzymes. – When scaling up the process of deep cultivation of the fungus *Irpex lacteus* (Fr.) Fr., a producer of exoenzymes of the cellulase complex, on a nutrient medium containing corn processing waste, the reproducibility of the results obtained in small volumes of the nutrient medium was established only at the initial stages of cultivation. The high enzymatic activity of the cellulase producer strain was observed from the 3rd to the 10th day of cultivation. A decrease in the enzymatic activity of the culture fluid was observed on the 15th day of cultivation.

Keywords: scaling, deep cultivation, cellulolytic enzyme complex, *Irpex lacteus* (Fr.) Fr.

Чемерис Оксана Вячеславовна

кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник НИЧ
ФГБОУ ВО «Донецкий государственный
университет», г. Донецк, ДНР, РФ.
E-mail: chemeris07@rambler.ru
ORCID: 0000-0002-2446-4710
AuthorID: 869557

Chemeris Oksana Viacheslavovna

Candidate of Biological Sciences,
Senior Researcher of the Research Department,
Donetsk State University,
Donetsk, DPR, Russian Federation.