

Доцент И.В. Черемушкина¹, магистрант Н.А. Некрасова¹,
старший преподаватель С.Н. Черняева²,
профессор О.С. Корнеева¹

¹(Воронеж. гос. ун-т. инж. технол.) кафедра микробиологии и биохимии,
тел. (473) 255-55-57

²(Воронеж. гос. ун-т. инж. Технол) кафедра информационных технологий,
моделирования и управления

Оптимизация условий биосинтеза β -маннаназы грибного происхождения

Оптимизированы условия биосинтеза фермента β -маннаназы методом математического моделирования эксперимента. Проведенные экспериментальные испытания подтвердили эффективность оптимизации на основе математического моделирования эксперимента методом наименьших квадратов. При этом активность β -маннаназы, синтезируемой микромицетом *Trichoderma harzianum*, составила 564,0 ед/мл, что превышает активность фермента на контрольной среде в 2,7 раза. Удельные энергозатраты процесса культивирования снизились на 12 %.

Biosynthesis conditions of β -mannanase enzymes have been optimized by a method of mathematical experiment modeling. The experimental tests have confirmed the effectiveness of optimization based on mathematical modeling of the experimental method of least squares. In this case, the activity of β -mannanase synthesized by *Trichoderma harzianum* was 564.0 U / mL, which is higher than the activity of the enzyme in the control environment at 2.7 times. Specific energy consumption of the process of cultivation decreased by 12%.

Ключевые слова: β -маннаназа, активность, удельные энергозатраты, метод наименьших квадратов.

β -Маннаназа (ЕС 3.2.1.78) - фермент, относящийся к классу О-гликозид-гидролаз, расщепляет внутренние β -1,4-гликозидные связи в манназах, являющихся полимерами клеточной стенки многих растений. Продуктами их ферментативного гидролиза являются манноза и низкомолекулярные манноолигосахариды, которые обладают выраженным пребиотическим и иммуностимулирующим действием [1, 2, 3].

В настоящее время β -маннаназы стали объектом повышенного внимания в связи с перспективами их применения в различных отраслях промышленности, в частности, при производстве биофармацевтических препаратов для ветеринарии и использования в качестве биодобавки в кормопроизводстве [4, 5].

При промышленном производстве ферментных препаратов высокая стоимость питательной среды неизбежно приводит к удорожанию целевого продукта, поэтому использование органических источников питания среды, являющихся относительно дешевым и доступным сырьем, будет положительно сказываться на рентабельности производства.

В предыдущих работах для глубинного культивирования микроскопического гриба *Trichoderma harzianum* в качестве источников азотного и углеродного питания были предложены NaNO_3 (0.1 % по азоту) и 4 % фруктозы соответственно. Активность β -маннаназы составила 210 ед/мл [6].

Использование для биосинтеза β -маннаназы органических источников азота и углерода представляет экономический интерес, поскольку эти компоненты являются относительно дешевым и доступным сырьем, что немаловажно для рентабельности промышленного производства ферментного препарата.

Целью данной работы было проведение оптимизации состава питательной среды для глубинного культивирования микромицета *Trichoderma harzianum* с целью повышения биосинтеза им β -маннаназы и снижения удельных энергозатрат на процесс культивирования.

Культивирование продуцента осуществляли глубинным способом в ферментере вместимостью 100 л (ООО – фирма «Принтех») на питательной среде Чапека в течение 72 ч при температуре 30-32 °С, в качестве источника углерода вносили кукурузную му-

ку, в качестве источника азота – белково-витаминный концентрат. Условия культивирования продуцента и органические источники азота и углерода были выбраны в ходе ранее проведенных исследований [7].

Определение активности β-маннаназы проводили методом Сомоджи-Нельсона. В качестве субстрата использовали галактоманнан LBG (камедь рожкового дерева). За единицу активности принимали такое количество фермента, которое при гидролизе галактоманнана образует 1 ммоль маннозы за одну минуту в ацетатном буфере рН 4,5 при 60 °С [8, 9].

Оптимизацию условий биосинтеза проводили с применением методов математического моделирования: построение адекватной математической модели процесса методом наименьших квадратов с последующим статистическим анализом результатов; нахождение оптимальных условий биосинтеза фермента и энергозатрат процесса.

Программа исследований закладывалась в экспериментальную матрицу, включающую 32 отдельных опыта. Для получения простейшей адекватной модели требовалось связать выходные параметры системы (β-маннаназная активность, удельные энергозатраты) с входными - условиями культивирования и концентрацией компонентов среды.

В качестве основных факторов, влияющих на биосинтез β-маннаназы *T.harzianum*, были взяты: X_1 – температура культивирования, °С; X_2 – рН среды; X_3 – продолжительность культивирования ч.; X_4 – концентрация источника углерода (кукурузная мука), %; X_5 – концентрация источника азота белково-витаминный (БВК), %. Все эти факторы совместимы и некоррелируемы между собой. Пределы изменения исследуемых факторов приведены в таблице 1.

Т а б л и ц а 1

Пределы изменения факторов при биосинтезе β-маннаназы *T.harzianum*

Условия планирования	Кодированное значение	Значения факторов				
		X_1	X_2	X_3	X_4	X_5
		T, °С	рН	τ, ч.	$C_{к.м.}$, %	$C_{бвк.}$, %
Основной уровень	0	32	4	72	4	0,2
Интервал варьирования	Δ	6	1	12	1	0,1
Верхний уровень	+1	38	5	84	5	0,3
Нижний уровень	-1	26	3	60	3	0,1

Критериями оценки влияния различных факторов на биосинтез β-маннаназы была активность в глубинной культуре (Y_1 , ед/мл) и удельные энергозатраты процесса культивирования (Y_2 , кВт·ч/л).

Оптимизация условий культивирования продуцента заключалась в подборе таких тех-

нологических режимов, при которых величина β-маннаназной активности была бы максимальной, а удельные затраты процесса культивирования минимальными.

Экспериментальная матрица включала в себя 32 различных эксперимента (таблица 2).

Т а б л и ц а 2

Матрица экспериментальных данных

Опыты	Кодированные значения факторов					Y_1 , ед/мл	Y_2 , кВт·ч/л
	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5		
1	2	3	4	5	6	7	8
1	384,5	436,9	418,3	384,0	540,5	432,8	0,202
2	384,5	397,5	418,3	384,0	422,3	401,3	0,204
3	413,8	436,9	418,3	384,0	422,3	415,0	0,208
4	413,8	397,5	418,3	384,0	422,3	409,5	0,208
5	384,5	436,9	415,0	384,0	422,3	408,5	0,216
6	384,5	397,5	415,0	384,0	540,5	424,3	0,218
7	413,8	436,9	415,0	384,0	540,5	438,0	0,225
8	413,8	397,5	415,0	384,0	422,3	409,3	0,223
9	384,5	436,9	418,3	534,9	422,3	439,4	0,210
10	384,5	397,5	418,3	534,9	540,5	455,1	0,213

1	2	3	4	5	6	7	8
11	413,8	436,9	418,3	534,9	540,5	468,9	0,219
12	413,8	397,5	418,3	534,9	422,3	437,5	0,217
13	384,5	436,9	415,0	534,9	540,5	462,3	0,227
14	384,5	397,5	415,0	534,9	422,3	430,8	0,225
15	413,8	436,9	415,0	534,9	422,3	427,9	0,232
16	413,8	397,5	415,0	534,9	540,5	460,5	0,234
17	239,8	563,0	563,0	523,6	563,0	490,5	0,213
18	198,2	563,0	563,0	523,6	563,0	481,9	0,219
19	563,0	280,4	563,0	523,6	563,0	498,8	0,215
20	563,0	297,8	563,0	523,6	563,0	502,2	0,217
21	563,0	563,0	354,7	523,6	563,0	513,5	0,202
22	563,0	563,0	316,4	523,6	563,0	505,6	0,231
23	563,0	563,0	563,0	246,6	563,0	500,0	0,206
24	563,0	563,0	563,0	563,0	563,0	557,4	0,223
25	563,0	563,0	563,0	523,6	232,5	489,0	0,213
26	563,0	563,0	563,0	523,6	507,3	543,8	0,217
27	563,0	563,0	563,0	523,6	563,0	563,0	0,216
28	563,0	563,0	563,0	523,6	563,0	564,0	0,216
29	563,0	563,0	563,0	523,6	563,0	563,0	0,216
30	563,0	563,0	563,0	523,6	563,0	563,0	0,216
31	563,0	563,0	563,0	523,6	563,0	563,0	0,216
32	563,0	563,0	563,0	523,6	563,0	562,0	0,216

Проверка показала, что экспериментальные данные являются нормально распределенными и однородными.

Коэффициенты уравнений регрессии вычисляются по методу наименьших квадратов в матричном виде, поэтому необходимо отметить, что экспериментальные данные должны быть однородными и нормально распределенными. Коэффициенты уравнений регрессии определялись по формуле:

$$b = (\Phi^T \Phi)^{-1} \cdot \Phi^T \vec{Y} \quad (1)$$

где $\Phi = \{ \Phi_{iu} \} = \{ f_u(\vec{X}_i) \}$ - регрессионная матрица. Число строк матрицы равно числу экспе-

риментов, число столбцов равно числу функций модели;

$\vec{Y} = \{ y_i^{эксн} \}$ - столбец выходных параметров;

$\vec{b} = \{ \hat{b}_u \}$ - столбец искомых коэффициентов.

Для определения коэффициентов взаимодействия необходимо расширить таблицу 2 дополнительными столбцами, учитывающими эффект двойного и квадратичного взаимодействия факторов. Будем рассматривать уравнения регрессии в виде:

$$Y = b_0 + b_1 X_1 + b_2 X_2 + b_3 X_3 + b_4 X_4 + b_5 X_5 + b_6 X_1 X_2 + b_7 X_1 X_3 + b_8 X_1 X_4 + b_9 X_1 X_5 + b_{10} X_2 X_3 + b_{11} X_2 X_4 + b_{12} X_2 X_5 + b_{13} X_3 X_4 + b_{14} X_3 X_5 + b_{15} X_4 X_5 + b_{16} X_1^2 + b_{17} X_2^2 + b_{18} X_3^2 + b_{19} X_4^2 + b_{20} X_5^2 \quad (2)$$

Эффекты взаимодействия определяли аналогично линейным эффектам. В соответствии с данными таблицы 2 рассчитывали коэффициенты уравнения регрессии. Величина коэффициента регрессии (b_i) характеризует

вклад каждого фактора (X_i) условия биосинтеза в значения уровня β -маннаназной активности и энергозатрат (Y_i).

Полученные уравнения регрессии имели следующий вид:

$$Y_1 = -121,3 - 0,14 X_1 - 0,2 X_2 + 0,82 X_3 + 1,5 X_4 - 0,4 X_5 - 8,1 \cdot 10^{-5} X_1 X_2 + 2,24 \cdot 10^{-4} X_1 X_3 - 1,15 \cdot 10^{-3} X_1 X_4 + 1,5 \cdot 10^{-3} X_1 X_5 + 2,9 \cdot 10^{-4} X_2 X_3 - 5,3 \cdot 10^{-4} X_2 X_4 + 1,8 \cdot 10^{-3} X_2 X_5 + 7,5 \cdot 10^{-4} X_3 X_4 - 2,4 \cdot 10^{-3} X_3 X_5 + 2,6 \cdot 10^{-4} X_4 X_5 + 4,6 \cdot 10^{-5} X_1^2 - 9,3 \cdot 10^{-5} X_2^2 + 9,5 \cdot 10^{-5} X_3^2 - 1,2 \cdot 10^{-3} X_4^2 + 4,3 \cdot 10^{-4} X_5^2 \quad (3)$$

$$Y_2 = 2,33 + 2,97 \cdot 10^{-4} X_1 - 3,01 \cdot 10^{-4} X_2 - 8,7 \cdot 10^{-3} X_3 - 4,9 \cdot 10^{-4} X_4 + 2,8 \cdot 10^{-4} X_5 - 4,9 \cdot 10^{-6} X_1 X_2 + 2,6 \cdot 10^{-6} X_1 X_3 - 5,2 \cdot 10^{-7} X_1 X_4 + 1,24 \cdot 10^{-6} X_1 X_5 + 6,3 \cdot 10^{-6} X_2 X_3 + 4,9 \cdot 10^{-7} X_2 X_4 - 1,24 \cdot 10^{-6} X_2 X_5 + 5,7 \cdot 10^{-7} X_3 X_4 - 2,6 \cdot 10^{-7} X_3 X_5 - 2,2 \cdot 10^{-7} X_4 X_5 + 7,7 \cdot 10^{-7} X_1^2 - 1,9 \cdot 10^{-9} X_2^2 + 3,9 \cdot 10^{-6} X_3^2 + 4,5 \cdot 10^{-7} X_4^2 - 1,8 \cdot 10^{-8} X_5^2 \quad (4)$$

Значимость коэффициентов регрессии проверяли по критерию Стьюдента. В результате проверки все критерии следует признать значимыми. Вычисляли значение остаточной дисперсии, которая определяет величину разброса выходных параметров \vec{y} под действием случайных помех:

$$S_{ост}^2 = \frac{1}{N-k} \sum_{i=1}^N (y_i^{б\ddot{y}ч} - y_i^{э\ddot{к}сп})^2, \quad (5)$$

где k – число коэффициентов модели.

Вычисленная остаточная дисперсия для обеих моделей составила:

$$S_{lost}=9.025, \quad S_{2ost}=3,481 \times 10^{-5} \quad (6)$$

Значения дисперсии свидетельствуют о том, что данные, полученные по модели, практически не расходятся с экспериментальными данными.

Проверку эффективности полученной модели проводили с использованием F-критерия Фишера. Вычисленное значение F было больше табличного, что доказывает эффективность полученной модели.

По построенным моделям найдем значения переменных $x_i, i=1,5$, при которых удельные энергозатраты процесса культивирования будут минимальными, а активность фермента β -маннаназы будут максимальными, т. е. необходимо решить задачу оптимизации двух критериев:

$$Y_2 \rightarrow \max,$$

$$Y_1 \rightarrow \min.$$

Введем линейную свертку критериев:

$$Q = Y_2 - Y_1 \rightarrow \max \quad (7)$$

С помощью математических расчетов в MathCAD были найдены оптимальные значения условий биосинтеза фермента и удельных энергозатраты процесса (таблица 3).

Т а б л и ц а 3

Оптимальные условия культивирования продуцента

Факторы биосинтеза	Оптимальные значения факторов
Температура, °С	32
pH среды	4
Продолжительность культивирования, ч.	72
Концентрация источника углерода, %	3,7

Концентрация источника азота, %	0,2
---------------------------------	-----

Для подтверждения достигнутых результатов проведен контрольный эксперимент: при исходных условиях культивирования и оптимальных, подтвердивший эффективность оптимизации на основе математического моделирования эксперимента методом наименьших квадратов.

При оптимальных условиях β -маннаназная активность выросла в 2,7 раза и составила 564,0 ед/мл, а удельные энергозатраты снизились по сравнению с затратами на процесс культивирования на контрольной среде на 10 %, что является более выгодным с экономической точки зрения.

ЛИТЕРАТУРА

1 Корнеева, О. С. Пребиотические свойства маннозы и ее влияние на специфическую резистентность. [Текст] / О. С. Корнеева, А. С. Глущенко, И. В. Черемушкина / Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 2012. - № 5. - С. 51-57.

2 Корнеева, О. С. Исследование пребиотических и иммуномодулирующих свойств маннозы и манноолигосахаридов [Текст] / О. С. Корнеева, И. В. Черемушкина, А. С. Глущенко / Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2011. - № 4/1 (38). – С. 137-138.

3 Пат. № 2437663 Способ коррекции микрофлоры кишечника [Текст] / О. С. Корнеева, А. С. Глущенко, И. В. Черемушкина; опубл. 27.12.2011 г, Бюл. № 36.

4 Черемушкина, И. В. Роль биомодифицированных кормов в повышении качества продукции перепеловодства [Текст] / И. В. Черемушкина, Н. А. Чигирина, Е. П. Анохина и др. / Вестник Воронежской государственной технологической академии. - 2010. – Т. 45. - № 3. – С. 82-84.

5 Черемушкина, И. В. Биотехнология маннозосодержащих гидролизатов и исследование пребиотических свойств маннозы [Текст] / И. В. Черемушкина, А. С. Глущенко, Е. П. Анохина и др. // Биотехнология. – 2010. - № 5 – С. 56-61.

6 Корнеева, О. С. Биосинтез β -маннаназы грибом *Trichoderma harzianum* при глубинном культивировании [Текст] / О. С. Корнеева, Н. А. Чигирина // Вестник Воронежской государственной технологической академии. — 2004. — № 9. - С. 54-57.

7 Корнеева, О. С. Исследование пребиотических и иммуномодулирующих свойств маннозы и манноолигосахаридов [Текст] / О. С. Корнеева, И. В. Черемушкина, Н. А. Некрасова // Актуальная биотехнология. – 2012. - № 2. – С. 41-42.

8 Польшгалина, Г. В. Определение активности ферментов [Текст]: справочник / Г. В. Польшгалина, В. С. Чередниченко, Л. В. Римарева. - М.: ДеЛи принт, 2003. - 375 с.

9. Somogyi, M. J. Determination of reducing sugar [Text] / M. J. Somogyi // J. Biol. Chem. – 1952. – V. 195. – № 1. – P. 19-28.

10 Линик, Ю. В. Метод наименьших квадратов и основы математико-статистической теории обработки наблюдений [Текст] / Ю. В. Линик. – М.: Государственное издательство физико-математической литературы, 1958. – 337 с.

REFERENCES

1 Korneeva, O. S. The prebiotic properties of mannose and its effect on specific resistance. [Text] / O. S. Korneeva., A. S. Gluchenko, I.V. Cheremushkina // Journal of epidemiology, microbiology and immunobiology. - 2012. - № 5. - P. 51-57.

2 Korneeva, O. S. The study of prebiotic and immunomodulatory properties of mannose and mannoooligosaccharides [Text] / O. S. Korneeva, I.V. Cheremushkina, A. S. Gluchenko // Bulletin of Ural Medical academic science. – 2011. - № 4/1 (38). – P. 137-138.

3 Pat. № 2437663 The method of correction of the intestinal microflora [Text] / O. S. Korneeva, A. S. Gluchenko, I. V. Cheremushkina; publ. 27.12.2011, Bull. № 36.

4 Cheremushkina, I. V. Role biomodified feed in improving the quality of breeding quail products [Text] / I. V. Cheremushkina, N. A. Chigirina, E. P. Anohina et al / Bulletin of the Voronezh State Technological Academy. - 2010. – Т. 45. - № 3. – P. 82-84.

5 Cheremushkina, I.V. Biotechnology mannose containing hydrolysates and study pre-biotic properties of the mannose [Text]/ I.V. Cheremushkina, A. S. Gluchenko, E. P. Anohina // Biotechnology. – 2010. - № 5 – P. 56-61.

6 Korneeva, O. S. The biosynthesis of β -mannanase by the fungus *Trichoderma harzianum* in the deep cultivation [Text] / O. S. Korneeva, N.A. Chigirina // Bulletin of the Voronezh State Technological Academy. - 2004. - № 9. - P. 54-57.

7 Korneeva O. S. The study of prebiotic and immunomodulatory properties of mannose and mannoooligosaccharides [Text] / O. S. Korneeva, I.V. Cheremushkina, N. A. Nekrasova // Actual biotechnology.– 2012. - № 2. – P. 41-42.

8 Polygalina, G. V. Determination of enzyme activity. [Text]: directory / G. V. Polygalina, V. S. Cherednichenko, L. V. Rimareva. – М.: DeLi print, 2003. – 375 p.

9 Somogyi, M.J. Determination of reducing sugar [Text] / M. J. Somogyi // J. Biol. Chem. – 1952. – V. 195. – № 1. – P. 19-28.

10 Linik, Y. V. The method of least squares and the basis of mathematical-statistical theory of observation processing [Text] / Linik Y. V. – М.: State publishing house of physical and mathematical literature, 1958. – 337 p.