

УДК 577.152.3

**КСИЛАЗЫ *Trichoderma reesei* – БИОСИНТЕЗ
И ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ГИДРОЛИЗА ЗЕРНОВЫХ КОРМОВ**

Ю.А. Морозова, Е.В. Скворцов, Ф.К. Алимова

Аннотация

Штамм *Trichoderma reesei* M18.2 способен к активному синтезу ксиланаз и целлюлаз на отходе спиртового производства – послеспиртовой барде. При глубинном культивировании на барде активность ксиланаз и целлюлаз достигала максимального значения на четвёртые сутки культивирования и составляла 530 и 3.3 МЕ/мл соответственно. Исследован состав углеводной фракции фуражных сортов зерновых культур Республики Татарстан. Содержание ксиланов в ней достигало 11.4%. Глубина ферментативного гидролиза зернового сырья исследуемыми гидролитическими ферментами *Trichoderma reesei* M18.2 и коммерческим препаратом амилаз «Термамил» достигала 43% абсолютно сухого веса при 60 °С.

Ключевые слова: *Trichoderma reesei*, ксиланазы, целлюлазы, амилазы, ферментативный гидролиз.

Введение

Одними из наиболее изучаемых микроорганизмов во всём мире считаются грибы рода *Trichoderma* [1–3]. Они являются продуцентами комплекса гидролитических ферментов – эндо-1,4-β-ксиланаз (КФ 3.2.1.8), целлюлаз (КФ 3.2.1.4), эндо-1,3(4)-β-глюканаз (КФ 3.2.1.6) – и обладают высокой секреторной способностью. Указанные свойства делают ферментные препараты на основе штаммов *Trichoderma* универсальными для применения во многих биотехнологических процессах. Интерес к этим ферментам растёт благодаря огромному потенциалу их использования в сельскохозяйственном производстве и ряде отраслей промышленности, ориентированных на переработку растительного сырья [4].

В настоящее время для культивирования штаммов *Trichoderma*, синтезирующих ксиланазы и целлюлазы, как правило, используют среды, полученные путем экстрагирования отходов переработки зерна злаков и растворы ксилана [5, 6]. Приготовление таких сред требует временных и финансовых затрат.

Микроорганизмы, в том числе микроскопические грибы, обладают высокой адаптивностью к изменению внешних факторов – источников питания и условий роста, что обусловлено гибкой регуляцией обменных процессов, включая синтез ферментов. Реализация способности к сверхсинтезу, то есть образованию определённого продукта в количествах, превосходящих физиологические потребности микроорганизма, зависит прежде всего от факторов питания, компонентов питательной среды, содержащих индуцирующие ксиланазы и целлюлазы вещества [16]. Однако до настоящего времени нет исследований, однозначно определивших оптимальный состав среды для синтеза ксиланаз грибом *Trichoderma*.

Разные группы исследователей культивируют продуцент на разных средах [5, 6]. В связи с этим продолжают быть актуальными исследования, направленные на поиск новых эффективных сред для биосинтеза ксиланаз грибом *Trichoderma*.

Между тем при производстве спирта из зерна (например, пшеницы, кукурузы или ржи) получается довольно большое количество отработанной массы прошедшего ферментацию зернового сырья, из которого путем дистилляции извлечен алкоголь. Эта масса называется послеспиртовой бардой [7]. Зерновая барда, получаемая на спиртовых заводах, содержит различные питательные компоненты и является потенциально пригодной средой для культивирования штаммов различных грибов.

Ферменты грибов рода *Trichoderma* могут иметь практическое значение при применении в кормах сельскохозяйственных животных, содержащих рожь и ячмень. Так, в составе ржи негативную роль играют пентозаны. Они снижают переваримость ржаного корма и, как следствие, прирост животных. У цыплят и поросят, наиболее чувствительных групп животных, водорастворимые фракции углеводов набухают в пищеварительном тракте, замедляют скорость прохождения химуса, приводят к усиленному брожению. Высоковязкие слизи затрудняют воздействие амилолитических ферментов. При скармливании ржи птице выделяется жидкий, липкий помет, что приводит к обезвоживанию организма и в результате к потере живой массы вместо прироста [8]. Одним из важнейших биохимических компонентов зерна ячменя являются также β -глюканы, или растворимая клетчатка [9]. Высокое содержание β -глюканов в зерне ячменя негативно влияет на его применение в кормах – увеличивает вязкость химуса и снижает его переваримость. Ксиланазы и целлюлазы грибов рода *Trichoderma* в составе зерновых кормосмесей осуществляют гидролиз антипитательных полимеров и позволяют снизить их негативное влияние, что имеет большое практическое значение.

Цель настоящей работы – установление закономерностей биосинтеза ксиланаз и целлюлаз грибами рода *Trichoderma* на послеспиртовой барде и исследование эффективности использования этого ферментного комплекса в процессе гидролиза различных зерновых смесей.

Материалы и методы

Исследуемые микроорганизмы. В работе использовали микроскопический гриб *Trichoderma reesei* M18.2, предоставленный лабораторией Саксонского института прикладной биотехнологии (г. Лейпциг, Германия), полученный путем селекции штаммов, подвергнутых воздействию мутагенных факторов.

Среды, для культивирования микроорганизмов.

Картофельно-глюкозный агар (КГА). Состав КГА (г/л): отвар картофеля – 200, агар – 20, глюкоза – 20, стрептомицин – 1.

Послеспиртовая барда. Была предоставлена Усадским спиртовым заводом Республики Татарстан (табл. 1).

С целью увеличения синтеза ферментов, в процессе приготовления, в питательную среду добавляли следующие компоненты: KH_2PO_4 (15 г/л), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (4.8 г/л), CaCl_2 (0.3 г/л), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.3 г/л), мочевины (4.8 г/л), целлюлоза (5 г/л), Tween (2 г/л).

Табл. 1

Биохимический состав барды

	Результаты анализа сушеной барды, пшеничной
Массовая доля, %	
влаги	7.90
протеина	30.20
клетчатки	5.10
жира	9.45
зола	6.23
крахмала	1.25
растворимых сахаров	3.27
кальция	0.07
фосфора	1.05
Токсичность	не установлено
Витамины, тыс. МЕ/кг	
А	4.50
D	–
Е	18.8
Витамины группы В, мг/кг	
В1	7.30
В2	34
В4	170
В5	72

Ферменты. Коммерческий препарат α -амилазы (КФ 3.2.1.1) «Термамил» производства Novozymes (Дания). Культуральная жидкость (КЖ) *T. reesei* M18.2, содержащая ксиланазы и целлюлазы.

Зерновые смеси. В работе использовались фуражные сорта, выращенные на территории Республики Татарстан (РТ).

Состав первой зерновой смеси: ячмень – 50%, рожь – 40%, овёс – 10% (ЯРО), состав второй: ячмень – 50%, пшеница – 40%, овёс – 10% (ЯПО). Зерно измельчали на лабораторной мельнице, затем с гидромодулем 1 : 3 пропускали через роторно-кавитационный аппарат.

Культивирование. Культивирование *T. reesei* M18.2 проводили на осажённой (4000 об/мин) центрифуге Eppendorf 5810R (Германия) и нецентрифугированной барде глубинным способом в колбах ёмкостью 250 мл с объёмом питательной среды 50 мл при начальном pH 5.0–6.5. Стерилизацию осуществляли на автоклаве ГК-100 (г. Тюмень, Россия) при 120 °С 30 мин. Культуры грибов для инокуляции выращивали на скошенном КГА в пробирках объёмом 20 мл в течение 5 сут при температуре 28 °С. Для получения инокулята делали смыв со скошенного КГА 8 мл стерильной воды. В каждую колбу добавляли инокулят из расчета 25 мл на литр барды. Культивирование осуществлялось при 30 °С, 130 об/мин в темноте на шейкере-инкубаторе Innova 43R (США). Отбор проб проводили каждые 24 ч. Длительность культивирования составляла 7 сут.

Определение ферментативных активностей. Ксиланазную активность определяли по начальной скорости образования восстанавливающих сахаров (ВС) при гидролизе ксилана [10]. За единицу активности ксиланаз принимали такое

количество фермента, которое необходимо для образования 1 мкмоль ВС за 1 мин при действии на ксилан при 50 °С на водяной бане LOIP LB-200 (Россия) и pH 5.0.

Целлюлазную активность измеряли по стандартной методике IUPAC [11], субстратом служила хроматографическая бумага Whatman № 1.

Амилазную активность определяли по начальной скорости образования ВС при гидролизе растворимого крахмала методом [12]. За единицу активности амилаз принимали такое количество фермента, которое необходимо для образования 1 мкмоль ВС за 1 мин при действии на субстрат при 50 °С и pH 5.

Анализ концентрации ВС проводили по стандартной методике с помощью окрашивания их динитросалициловой кислотой [13].

Гидролиз зерновых смесей исследуемыми ферментными препаратами. Инкубацию зерновой смеси с исследуемой культуральной жидкостью, содержащей ксиланазы и целлюлазы, проводили в стеклянных колбах на водяной бане LOIP LB-200 в течение 60 мин при 60 °С. Гидромодуль в опыте составлял 1 : 3. Гидролизованную суспензию разделяли центрифугированием при 4000 об./мин 10 мин. Содержание растворенных веществ определяли с использованием рефрактометра.

Определение углеводного состава зерна и зерновых гидролизатов. Исследования углеводного состава зерна проведены методом высокоэффективной жидкостной хроматографии, после проведения мягкого кислотного гидролиза [14].

Статистическая обработка результатов. Для сравнения применяли интервальные оценки. Уровень значимости $p < 0.05$. Данные на рисунках и в таблицах представлены как среднее \pm стандартное отклонение [15].

Результаты и их обсуждение

В работе описаны результаты синтеза гидролитических ферментов *Trichoderma* при культивировании на послеспиртовой барде. Барда является суспензией, содержащей взвешенные нерастворимые частицы, которые могут быть осаждены центрифугированием, и растворённые в жидкой фазе компоненты. Было проведено культивирование продуцента на осаждённой центрифугированием и неосаждённой бардах.

Динамика изменения активности ксиланаз и целлюлаз в КЖ при культивировании на двух видах барды приведена на рис. 1. Результаты исследования показали, что максимальная ксиланазная и целлюлазная активности в КЖ изолята *T. reesei* M18.2 были достигнуты на 4-е сутки культивирования (рис. 1, а–г). При росте продуцента на неосаждённой фракции барды ксиланазная активность составляла 335 (рис. 1, а), а целлюлазная активность 1.35 МЕ/мл (рис. 1, в). Исследования синтеза ферментов *T. reesei* M18.2 на осаждённой центрифугированием послеспиртовой барде показали, что максимальная активность ксиланаз и целлюлаз в КЖ составляла 530 (рис. 1, б) и 3.3 (рис. 1, г) единиц соответственно. Сравнивая результаты экспериментов на разных видах барды, можно сделать вывод о том, что на осаждённой фракции барды происходил более активный синтез исследуемых ферментов. Ксиланазная активность становилась выше в среднем на 37%, а целлюлазная – на 40%. Предположительно, это связано с более доступными процессами диффузии растворенных веществ фильтрата барды в клетки продуцента, что обеспечивает его питательными веществами.

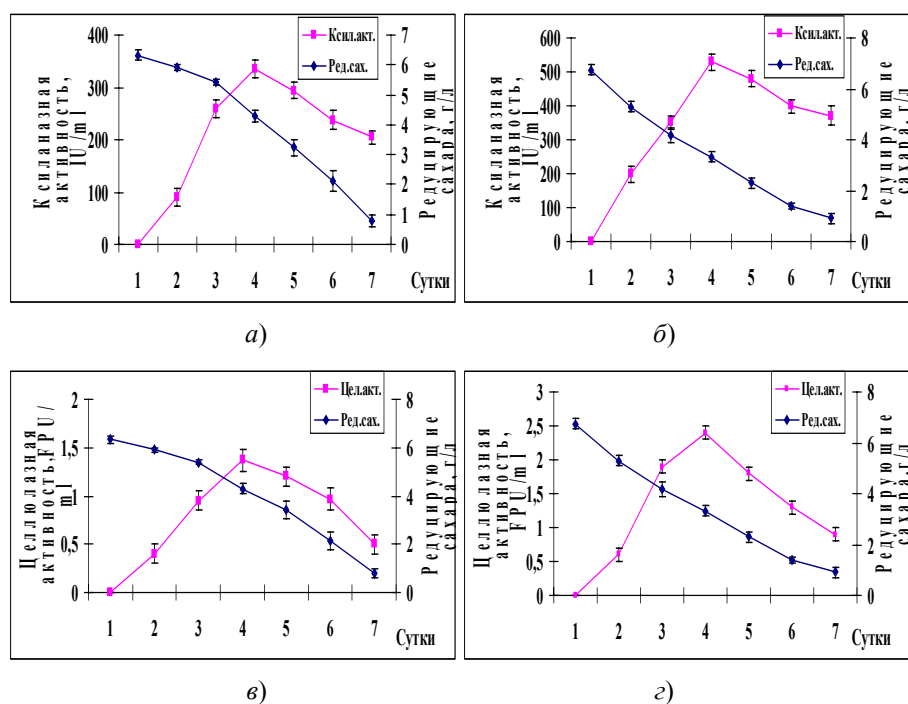


Рис. 1. Ксиланазная (а, б) и целлюлазная (в, г) активности КЖ изолята *T. reesei* M18.2 на неосаждённой (а, в) и осаждённой (б, г) послеспиртовой бардах в течение 7 сут роста. Показаны средние значения трёх экспериментов и стандартные отклонения

Ранее Лариной с соавторами [16] было показано, что максимальная ксиланазная активность КЖ *T. viride* 44-11-62/3 на среде, содержащей пшеничные отруби, порошок целлюлозы, кукурузный экстракт, кормовые дрожжи, K_2HPO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ достигала на 5-е сутки и составляла 140 ед. активности. Результаты этого же исследования показали, что самую высокую целлюлазную активность обеспечивала питательная среда в состав, которой входил свекловичный жом и кукурузная мука. Шуваева и Сысоева в своей работе [17] по получению ксиланаз использовали среду с пшеничными отрубями, соломой и проросшими ростками зерна и показали, что активность на ней была выше на 15–20%, чем на стандартной питательной среде.

Концентрация редуцирующих сахаров в культуральной жидкости в процессе ферментации продуцента снижалась на протяжении всего процесса. В начале культивирования она составляла в среднем 6.5 г/л, к концу процесса достигала 1.1 г/л (рис. 1). Исследования показали, что в первые сутки культивирования происходил активный прирост биомассы, а начиная с 3-х суток наблюдалось резкое увеличение гидролитических активностей. Это может свидетельствовать о том, что редуцирующие сахара среды потреблялись микромицетом *T. reesei* M18.2 и использовались для роста биомассы и синтеза экзоферментов.

В целом результаты показали, что послеспиртовая барда пригодна для получения ферментных препаратов из КЖ *T. reesei* M18.2.

Табл. 2

Состав нецеллюлозных углеводов злаков РТ, % ВСВ

Культура	Ксилоза	Арабиноза	Глюкоза	Мальтоза	Ксилан	Крахмал
Рожь (фураж)	6.98 ± 0.34	5.95 ± 0.30	60.41 ± 1.25	2.07 ± 0.11	11.37	56.23
Пшеница (фураж)	5.93 ± 0.35	5.16 ± 0.25	56.62 ± 1.04	2.19 ± 0.07	6.76	52.93
Ячмень (фураж)	5.02 ± 0.21	3.62 ± 0.13	55.53 ± 0.96	1.77 ± 0.07	7.20	51.57

Применение ксиланаз в кормовой промышленности связано с необходимостью гидролиза ксилана [4], поэтому следующим этапом исследований стало изучение процессов гидролиза исследуемыми ферментами различных зерновых смесей, в составе которых содержался ксилан.

Для получения более полного представления о составе зерна был изучен состав углеводной фракции: было проанализировано содержание в исследуемых образцах крахмала и пентозанов. В результате проведения хроматографического исследования гидролизата получены концентрации моносахаридов ксилозы, арабинозы, глюкозы и мальтозы, входивших в состав исходного крахмала и пентозанов. Исходя из этих концентраций и молекулярных масс сахаридов, вычислено содержание этих полисахаридов в исследованных образцах зерна [8] (табл. 2).

Из полученных результатов видно, что в составе зерна всех злаков содержится довольно значительное количество ксиланов. До 11.4% содержат фуражные сорта ржи, именно это обстоятельство не позволяет использовать ее в качестве основы кормовых рационов сельскохозяйственных животных. Немного меньше ксиланов содержится в пшенице до 6.8% и ячмене до 7.2%.

Таким образом, проанализировав состав зерна основных районированных в РТ злаковых культур, можно сделать заключение о целесообразности исследования применения ксиланаз в составе кормовых рационов на основе злаков.

Были проведены исследования применения полученной КЖ *T. reesei* M18.2 и коммерческого препарата – амилазы «Термамил» на гидролиз зерновых смесей. Компоненты смесей: ячмень (50%), рожь (40%), овёс (10%) (ЯРО) и ячмень (50%), пшеница (40%), овёс (10%) (ЯПО). Активности ксиланаз и целлюлаз, добавляемых в зерносмесь, соответствовали нормам кормовой промышленности и составили 0.025 мл на 25 г зерносмеси, а количество коммерческого препарата амилаз – 0.015 мл. Такая дозировка ферментов соответствует 0.5 МЕ ксиланаз/грамм зерна и 0.2 IU амилаз/грамм зерна. Активности ферментов в исходном гидролизате составили 0.17 МЕ ксиланаз/мл и 0.07 МЕ амилаз/мл.

При применении ферментных препаратов в составе кормовых рационов особое значение имеет влияние температуры на активность ферментов. В процессе приготовления кормов часто применяется их предварительное прогревание или варка, имеющая целью частичный гидролиз кормовых компонентов и увеличение их переваримости. Гидролиз проводили при 60 °С (табл. 3).

Табл. 3

Гидролиз зерновых смесей при 60 °С

Зерновая смесь (ячмень, пшеница, овёс)	% гидролиза зерна	Зерновая смесь (ячмень, рожь, овёс)	% гидролиза зерна
Контроль: ЯПО без ферментов	15 ± 0.5	Контроль: ЯРО без ферментов	13 ± 0.7
ЯПО + ксиланаза, целлюлаза	21 ± 0.3	ЯРО + ксиланаза, целлюлаза	23 ± 0.1
ЯПО + амилаза	36 ± 0.5	ЯРО + амилаза	38 ± 0.5
ЯПО + ксиланаза, целлюлаза + амилаза	42 ± 0.2	ЯРО + ксиланаза, целлюлаза + амилаза	43 ± 0.4

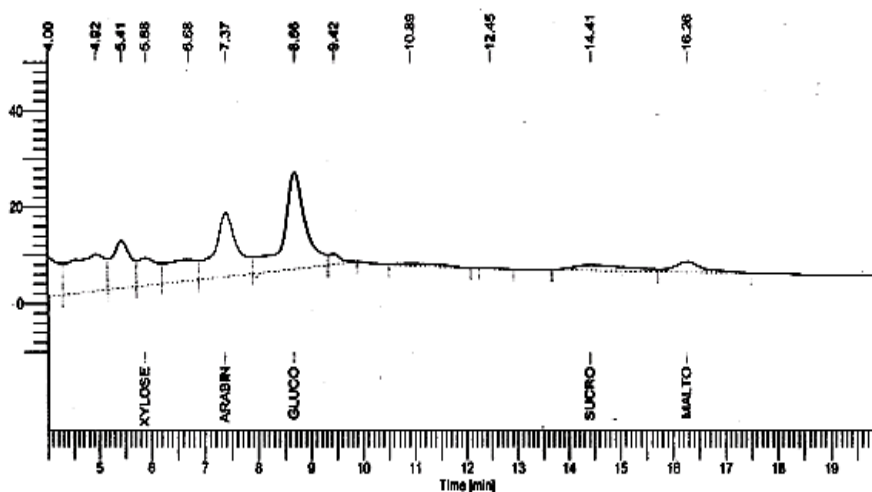


Рис. 2. Хроматограмма растворимых моносахаров зерносмеси ЯПО до гидролиза

Хроматографическое исследование содержания растворимых моносахаров до и после гидролиза зерносмеси ЯПО показало незначительное количество ксилозы, арабинозы, глюкозы, сахарозы и мальтозы в растворе до начала гидролиза (рис. 2), что говорит о полимерном состоянии основных структурных углеводов зерна, мономерами которых являются моносахара.

После окончания гидролиза в результате работы ксиланаз, целлюлаз и амилаз повышалось содержание в растворе ксилозы, арабинозы, глюкозы и мальтозы, что говорит о гидролизе крахмала и ксилана зерна (рис. 3). Особенно значительно увеличилось содержание мальтозы и глюкозы в ферментоллизате.

Основной объём гидролиза осуществляют амилазы. «Термамил» при 60 °С за 1 ч переводит в растворимое состояние 36–38% зерна. Добавка ксиланаз и целлюлаз в процессе позволяет увеличить гидролиз до 42–43% (табл. 3). Аналогичные результаты были показаны А.В. Марковым с соавторами [2]: при гидролизе арабиноксилана комплексным ферментным препаратом, продуцируемым микроскопическим грибом *Trichoderma longibrachiatum*, глубина процесса составляла 40%.

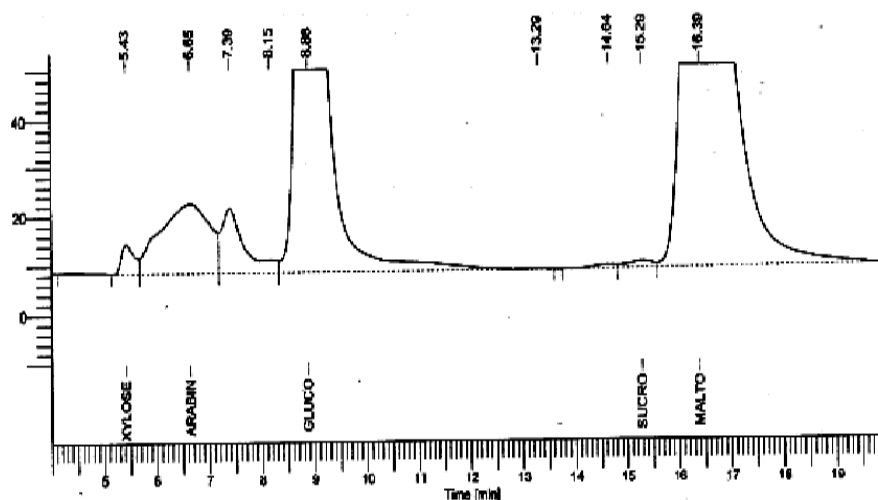


Рис. 3. Хроматограмма гидролизата зерносмеси ЯПО амилазами «Термамил» и ксиланазами *T. reesei* M18.2

Заключение

Проведенные исследования показали, что штамм *Trichoderma reesei* M18.2 способен к активному синтезу ксиланаз и целлюлаз на отходе спиртового производства – послеспиртовой барде. Результаты экспериментов на разных фракциях барды показали, что на осаждённой фракции происходил более активный синтез исследуемых ферментов. Показатели ксиланазной активности увеличивались на ней в среднем на 37%, а целлюлазной – на 40%. Это, вероятно, можно объяснить более доступными процессами диффузии растворенных веществ фильтрата барды в клетки продуцента, что обеспечивает его питательными веществами. Динамика исследования концентрации редуцирующих сахаров в процессе роста продуцента показала, что их количество уменьшается на протяжении всего процесса. Исследован состав полисахаридной фракции фуражного зерна РТ. Фуражные сорта ржи содержат до 11.4% этой фракции, именно это обстоятельство не позволяет использовать ее в качестве основы кормовых рационов сельскохозяйственных животных. Результаты работы показали проявление синергизма при совместном действии ксиланаз, целлюлаз и амилаз в процессе гидролиза изученных зерносмесей. Глубина гидролиза достигала 43%. Исследования доказали целесообразность применения ферментов *Trichoderma reesei*, полученных на послеспиртовой барде, для предварительного гидролиза зерновых кормов.

Литература

1. Алимова Ф.К., Тазетдинова Д.И., Тухбатова Р.И. Биотехнология. Промышленное применение грибов рода *Trichoderma*. – Казань: Казан. гос. ун-т, 2007. – 229 с.
2. Алимова Ф.К. Современная система *Trichoderma* / *Hyphocrea* // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. – 2005. – Т. 147, кн. 2. – С. 28–57.

3. Тухбатова Р.И., Тазетдинова Д.И., Алимова Ф.К., Мельников Л.В. Микроорганизмы палеопочв Республики Татарстан // Учен. зап. Казан. ун-та. Сер. Естеств. науки. – 2008. – Т. 150, кн. 2. – С. 225–230.
4. Марков А.В., Гусаков А.В., Дзедзюля Е.И., Устинов Б.Б., Антонов А.А., Окунев О.Н., Беккаревич А.О., Сеницын А.П. Свойства гемицеллюлаз ферментного комплекса *Trichoderma longibrachiatum* // Прикл. биохим. и микробиол. – 2006. – Т. 42, № 6. – С. 654–664.
5. Ahmed S., Imdad S.S., Jamil A. Comparative study for the kinetics of extracellular xylanases from *Trichoderma harzianum* and *Chaetomium thermophilum* // Electron. J. Biotechnol. – 2012. – V. 15, No 3. – P. 1–8. – doi: 10.2225/vol15-issue3-fulltext-2.
6. Soliman H.M., Sherief A.-D.A., EL-Tanash A.B. Production of xylanase by *Aspergillus niger* and *Trichoderma viride* using some agriculture residues // Int. J. Agricult. Res. – 2012. – V. 7, No 1. – P. 46–57. – doi: 10.3923/ijar.2012.46.57.
7. Ненайденко Г.Н., Журба О.С., Шереверов В.Д. Послеспиртовая барда в качестве органического удобрения // Ликёроводочное производство и виноделие. – 2008. – № 9. – С. 15–19.
8. Попов В.В. Рожь в питании животных // Адаптивное кормопроизводство. – 2012. – № 1. – С. 15–23.
9. Рыбалка А.И., Копусь М.М., Донцов Д.П. Современные направления улучшения качества зерна ячменя // Аграрный вестн. Юго-Востока. – 2009. – № 3. – С. 18–21.
10. König J., Grasser R., Pikor H., Vogel K. Determination of xylanase, β -glucanase, and cellulase activity // Anal. Bioanal. Chem. – 2002. – V. 374, No 1. – P. 80–87.
11. Ghose T.K. Measurement of cellulase activities // Pure & Appl. Chem. – 1987. – V. 59, No 2. – P. 257–268.
12. Panduranga Murthy G., Sindhu K.S., Mokshith M.C., Surabhi Shrivastava, Lokesh S. Isolation and partial purification of acidic amylases from *Marihot esculenta*, crantz (cassava) peel // Electron. J. Biol. – 2010. – V. 6, No 3. – P. 80–85.
13. Maes C., Delcour J.A. Structural characterisation of water-extractable and water-unextractable arabinoxylans in wheat bran // J. Cereal Sci. – 2002. – V. 35, No 3. – P. 315–326.
14. Bartolomé B., Santos M., Jiménez J.J., del Nozal M.J., Gómez-Cordovés C. Pentoses and hydroxycinnamic acids in brewer's spent grain // J. Cereal Sci. – 2002. – V. 36, No 1. – P. 51–58.
15. Акберова Н.И. Описательная статистика. Интервальные оценки: Учеб.-метод. рук. и сб. задач к практ. занятиям по курсу «Математические методы в биохимии». – Казань: Казан. гос. ун-т, 2004. – 40 с.
16. Ларина Л.Н., Павлова Н.М., Шишкова Э.А., Бравова Г.Б. Оптимизация биосинтеза ксиланазы микроскопическим грибом *Trichoderma viride* // Биотехнология. – 2005. – № 4. – С. 29–37.
17. Шуваева Г.П., Сыроева М.Г. Ксиланаза микромицета *Rhizopus var. microsporus* 595: препаративное получение, структурно-функциональные свойства, применение // Прикл. биохим. и микробиол. – 2010. – Т. 46, № 6. – С. 693–699.

Поступила в редакцию
13.02.13

Морозова Юлия Анатольевна – младший научный сотрудник кафедры биохимии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия.
E-mail: _maroz_@mail.ru

Скворцов Евгений Владимирович – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник кафедры биохимии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия.

E-mail: eskvortsov@rambler.ru

Алимова Фарида Кашифовна – доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой биохимии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия.

E-mail: farida_alimova@hotmail.com

* * *

***Trichoderma reesei* XYLANASES: BIOSYNTHESIS AND APPLICATION FOR HYDROLYSIS OF FEED GRAIN**

Yu.A. Morozova, E.V. Skvortsov, F.K. Alimova

Abstract

The strain of *Trichoderma reesei* M18.2 is capable of an active synthesis of xylanases and cellulases on the waste of spirit production – distillery grains. During the submerged cultivation on the grains, the activity of xylanases and cellulases reached maximum value (530 IU/ml and 3.3 FPU/ml respectively) on the fourth day. We investigated the composition of the carbohydrate fraction from the fodder grains of Tatarstan. The content of xylans in this fraction made up 11.4%. The depth of enzymatic hydrolysis of raw grain by the investigated hydrolytic enzymes *Trichoderma reesei* M18.2 and the commercial amylase preparation “Termamyl” reached 43% of absolutely dry weight at 60°C.

Keywords: *Trichoderma reesei*, xylanases, cellulases, amylases, enzymatic hydrolysis.

References

1. Alimova F.K., Tazetdinova D.I., Tukhbatova R.I. Biotechnology. Industrial Application of Fungi of the Genus *Trichoderma*. Kazan, Kazan. Gos. Univ., 2007. 229 p. (In Russian)
2. Alimova F.K. The modern system of *Trichoderma/Hypocrea*. *Uchenye Zapiski Kazanskogo. Seriya Estestvennye Nauki*, 2005, vol. 147, no. 2, pp. 28–57. (In Russian)
3. Tukhbatova R.I., Tazetdinova D.I., Alimova F.K., Melnikov L.V. Microorganisms of fossil soils of the Republic of Tatarstan. *Uchenye Zapiski Kazanskogo Universiteta. Seriya Estestvennye Nauki*, 2008, vol. 150, no. 2, pp. 225–230. (In Russian)
4. Markov A.V., Gusakov A.V., Dzedzyulya E.I., Ustinov B.B., Antonov A.A., Okunev O.N., Bekkarevich A.O., Sinitsyn A.P. Properties of hemicellulases of the enzyme complex *Trichoderma longibrachiatum*. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.*, 2006, vol. 42, no. 6, pp. 654–664. (In Russian)
5. Ahmed S., Imdad S.S., Jamil A. Comparative study for the kinetics of extracellular xylanases from *Trichoderma harzianum* and *Chaetomium thermophilum*. *Electron. J. Biotechnol.*, 2012, vol. 15, no. 3, pp. 1–8. doi: 10.2225/vol15-issue3-fulltext-2.
6. Soliman H.M., Sherief A.-D.A., EL-Tanash A.B. Production of xylanase by *Aspergillus niger* and *Trichoderma viride* using some agriculture residues. *Int. J. Agricult. Res.*, 2012, vol. 7, no. 1, pp. 46–57. doi: 10.3923/ijar.2012.46.57.
7. Nenaïdenko G.N., Zhurba O.S., Shereverov V.D. Distillery grains as an organic fertilizer. *Likero-vodochnoe proizvodstvo i vinodelie*, 2008, no. 9, pp. 15–19. (In Russian)
8. Popov V.V. Rye in animal nutrition. *Adaptivnoe kormoproizvodstvo*, 2012, no. 1, pp. 15–23. (In Russian)
9. Rybalka A.I., Kopus M.M., Dontsov D.P. Current areas of quality improvement of barley grain. *Agrarnyi Vestn. Yugo-Vostoka*, 2009, no. 3, pp. 18–21. (In Russian)
10. König J., Grasser R., Pikor H., Vogel K. Determination of xylanase, β -glucanase, and cellulase activity. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2002, vol. 374, no. 1, pp. 80–87.

11. Ghose T.K. Measurement of cellulase activities. *Pure & Appl. Chem.*, 1987, vol. 59, no. 2, pp. 257–268.
12. Panduranga Murthy G., Sindhu K.S., Mokshith M.C., Surabhi Shrivastava, Lokesh S. Isolation and partial purification of acidic amylases from *Marihot esculenta*, crantz (cassava) peel, *Electron. J. Biol.*, 2010, vol. 6, no. 3, pp. 80–85.
13. Maes C., Delcour J.A. Structural characterisation of water-extractable and water-unextractable arabinoxylans in wheat bran. *J. Cereal Sci.*, 2002, vol. 35, no. 3, pp. 315–326.
14. Bartolomé B., Santos M., Jiménez J.J., del Nozal M.J., Gómez-Cordovés C. Pentoses and hydroxycinnamic acids in brewer's spent grain. *J. Cereal Sci.*, 2002, vol. 36, no. 1, pp. 51–58.
15. Akberova N.I. Descriptive statistics. Interval Estimations. Kazan, Kazan. Gos. Univ., 2004. 40 p. (In Russian)
16. Larina L.N., Pavlova N.M., Shishkova E.A., Bravova G.B. Optimization of xylanase biosynthesis by the microfungus *Trichoderma viride*. *Biotehnologiya*, 2005, no. 4, pp. 29–37. (In Russian)
17. Shuvaeva G.P., Sysoeva M.G. Xylanase of the micromycete *Rhizopus var. microsporus* 595: Preparative production, structural and functional properties, and application. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.*, 2010, vol. 46, no. 6, pp. 693–699. (In Russian)

Received
February 2, 2013

Morozova Yuliya Anatolevna – Junior Research Fellow, Department of Biochemistry, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University, Kazan, Russia.

E-mail: _maroz_@mail.ru

Skvortsov Evgenii Vladimirovich – PhD in Biology, Senior Research Fellow, Department of Biochemistry, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University, Kazan, Russia.

E-mail: eskvortsov@rambler.ru

Alimova Farida Kashifovna – Doctor of Biology, Professor, Head of the Department of Biochemistry, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University, Kazan, Russia.

E-mail: farida_alimova@hotmail.com